

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ И КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ»

На правах рукописи

ТЫРИНОВА ТАМАРА ВИКТОРОВНА

«Цитотоксическая активность дендритных клеток против клеток
глиобластомы: медиаторы, механизмы регуляции и возможности
направленной коррекции»

14.03.09 – «Клиническая иммунология, аллергология»

диссертация на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научный консультант:
доктор медицинских наук,
профессор,
член-корреспондент РАН
Е.Р. Черных

Новосибирск

2019

Оглавление

Введение	6
Глава 1. Роль цитотоксической активности дендритных клеток в противоопухолевом иммунном ответе (обзор литературы)	18
1.1 Общая характеристика дендритных клеток.....	18
1.2 Классификация дендритных клеток.....	19
1.2.1 Миелоидные дендритные клетки	21
1.2.2 Плазмоцитоидные дендритные клетки.....	25
1.2.3 Дендритные клетки моноцитарного происхождения <i>in vivo</i>.....	28
1.2.4 Дендритные клетки моноцитарного происхождения <i>in vitro</i>. IFNα-индуцированные дендритные клетки.....	31
1.3 Цитотоксическая активность дендритных клеток.....	34
1.3.1 Общие принципы и механизмы киллерной функции эффекторных клеток.....	35
1.3.2 Дендритные клетки как эффекторные клетки врожденного иммунитета.....	41
1.3.3 Основные механизмы цитотоксической активности дендритных клеток человека	43
1.3.4 Клетки-мишени для цитотоксических дендритных клеток	45
1.3.5 Цитотоксические дендритные клетки и опухоль.....	46
1.3.6 Регуляция цитотоксической активности дендритных клеток.....	52
1.3.7 Роль цитотоксической активности дендритных клеток в иммунном надзоре при опухолевом росте	56
1.4 Общая характеристика глиом головного мозга	59
1.5 Механизмы иммуносупрессии глиом головного мозга.....	61

1.6 Вакцины на основе дендритных клеток	65
1.7 Заключение.....	66
Глава 2. Материалы и методы	68
2.1 Реактивы и препараты	68
2.2 Характеристика пациентов	70
2.3 Генерация IFNα-индуцированных ДК (ИФН-ДК)	71
2.4 Клеточные линии	72
2.4.1 Клеточные линии, полученные из первичных культур опухолевых клеток пациентов с глиомами головного мозга	72
2.4.2 Культивирование нейросфер	73
2.4.3 Стандартные клеточные линии.....	74
2.5 Исследование субпопуляций клеток методом проточной цитофлуориметрии	74
2.5.1 Исследование экспрессии поверхностных молекул на клетках ..	74
2.5.2 Исследование внутриклеточной экспрессии молекул	75
2.5.3 Иммунофенотипическое исследование ИФН-ДК.....	76
2.5.4 Иммунофенотипическое исследование опухолевых клеток	81
2.6 Исследование продукции субпопуляциями клеток растворимых факторов	81
2.6.1 Определение продукции sTNFα	81
2.6.2 Мультиплексный анализ цитокинов и хемокинов.....	82
2.7 Исследование цитотоксической активности ДК	82
2.7.1 МТТ-тест.....	82
2.7.2 Детекция апоптоза в опухолевых клетках	83
2.7.3 Дегрануляция ДК.....	84

2.8 Определение уровня экспрессии мРНК TNFα в ДК	85
2.9 Определение активности фермента TNFα-конвертирующего фермента (TACE)	86
2.10 Статистический анализ	87
Глава 3. Результаты исследования	89
3.1 Цитотоксическая активность ИФН-ДК здоровых доноров против опухолевых клеток глиобластомных линий	89
3.1.1 Характеристика глиобластомных линий	89
3.1.2 Характеристика цитотоксической функции ИФН-ДК здоровых доноров против клеток глиобластомных линий	94
3.2 Экспрессия проапоптогенных рецепторов на клетках глиобластомных линий	102
3.3 Сигнальные пути, вовлеченные в реализацию цитотоксической функции ИФН-ДК здоровых доноров против клеток глиобластомных линий	107
3.3.1 Роль рецепторно-опосредованной цитотоксической активности ИФН-ДК здоровых доноров	107
3.3.2 Грануло-опосредованная цитотоксичность ИФН-ДК здоровых доноров	114
3.4 Противоопухолевая цитотоксическая активность ИФН-ДК больных глиобластомой	121
3.5 Экспрессия цитотоксических молекул дендритными клетками больных глиобластомой	127
3.6 Роль регуляции экспрессии мембранной формы TNFα в реализации цитотоксической активности ИФН-ДК больных глиобластомой	136

3.7 Влияние растворимых факторов, продуцируемых глиобластомными клетками, на цитотоксическую активность ИФН-ДК	147
---	------------

3.8 Модуляция противоопухолевой цитотоксической активности ИФН-ДК больных глиобластомой	161
3.8.1 Влияние рекомбинантного интерлейкина 2 на цитотоксическую активность ИФН-ДК больных глиобластомой	161
3.8.2 Влияние двуцепочечной ДНК человека на цитотоксическую активность ИФН-ДК больных глиобластомой	170
Глава 4. Обсуждение	178
Заключение	190
Выводы	195
Список сокращений	197
Список литературы	200

Введение

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Дендритные клетки (ДК) представляют собой клетки врожденного иммунитета и относятся к группе профессиональных антигенпрезентирующих клеток, которые играют ведущую роль в запуске специфического противоопухолевого иммунного ответа [23]. Благодаря высокой плотности антигенпредставляющих молекул МНС I и II классов, экспрессии ко-стимуляторных молекул (CD80, CD86) и продукции широкого спектра цитокинов и хемокинов ДК обладают способностью активировать наивные Т-клетки, эффекторные CD8⁺ Т-клетки и индуцировать антигенспецифический иммунный ответ, обеспечивая таким образом взаимодействие врожденного и приобретенного иммунитета [228]. Проведенные за последние 20 лет исследования показали, что наряду с антигенпрезентирующей функцией и способностью регулировать иммунный ответ, ДК наделены киллерной функцией, т.е. способны напрямую инициировать гибель опухолевых клеток [101, 132, 163, 302]. Однако эта функция ДК является наименее изученной и вызывает много вопросов относительно ее роли в противоопухолевом иммунном ответе.

Противоопухолевая цитотоксическая активность ДК реализуется с вовлечением различных механизмов, которые типичны для всех цитотоксических клеток (NK-клеток, цитотоксических CD8⁺ Т-лимфоцитов и др.). Один из таких механизмов связан с экспрессией дендритными клетками проапоптогенных молекул суперсемейства TNF (TNF α , FasL, TRAIL и др.), взаимодействие которых с соответствующими рецепторами на опухолевых клетках вызывает гибель последних [101, 162, 163, 201]. Другой (грануло-опосредованный) механизм связан с высвобождением содержащихся в литических гранулах ДК цитолитических медиаторов, включая перфорин и гранзимы [40, 162, 302]. При этом важно отметить, что различные типы ДК

(миелоидные ДК, плазмцитотидные ДК) характеризуются разным профилем экспрессии цитотоксических лигандов и, соответственно, разными механизмами реализации цитотоксической активности [302]. Кроме того, цитотоксический потенциал ДК может определяться типом самих клеток-мишеней и их чувствительностью к тем или иным механизмам лизиса [302, 318], а также регулироваться различными активационными стимулами (цитокины IFN I типа, IL-15, IL-3, лиганды к паттерн-распознающим рецепторам TLR, в том числе липополисахарид, одно- и двуцепочечные РНК, неметилованные CpG олигонуклеотиды) [49, 63, 101, 169, 195, 209, 325].

Естественным «системным резервуаром» клеток-предшественников для ДК являются моноциты. При этом интерфероны I типа, и прежде всего IFN α , представляют собой сигналы опасности, которые продуцируются большинством клеток в ответ на воспалительные стимулы [117]. IFN α способен вызывать быструю дифференцировку циркулирующих моноцитов в ДК [38, 115]. О важной роли IFN α как индуктора дифференцировки ДК свидетельствует и опыт применения этого цитокина и препаратов на его основе в качестве адьюванта при некоторых видах опухолей (меланоме, гепатоцеллюлярной карциноме, карциноме почки, глиобластоме и др.) [123, 203, 220]. В данном случае IFN α проявляет не только прямой ингибирующий эффект на рост опухоли, но и обладает стимулирующим эффектом на клетки иммунной системы, в том числе индуцирует дифференцировку и активацию ДК, что играет важную роль в развитии противоопухолевого иммунного ответа [220].

Под контролем IFN α и связанных с ним транскрипционных факторов (STAT-1, IRF7, ISGF3 и др.) находится большинство генов, участвующих не только в процессах дифференцировки ДК из моноцитов [31, 45, 115], но также генов цитотоксических молекул (TRAIL, перфоринов и гранзимов) [162]. В итоге генерируемые *ex vivo* в присутствии IFN α ДК (ИФН-ДК) представляют уникальную популяцию функционально активных клеток, отличающейся от стандартно культивируемых ДК в присутствии IL-4 (ИЛ4-ДК) более

выраженным антиген-презентирующими способностями, более выраженной миграционной активностью к лимфоидным цитокинам, а также более стабильным фенотипом [143, 174, 239, 272]. Кроме того, ИФН-ДК обладают цитотоксической активностью против различных опухолевых линий и экспрессируют широкий спектр цитотоксических лигандов (TNF α , TRAIL, FasL, перфорины) [162, 163], а также секретируют гранзим Б, который почти не продуцируется ИЛ4-ДК [162].

В условиях опухолевого роста функциональная активность ДК зачастую нарушена, что снижает эффективность противоопухолевого иммунного ответа. Однако, до сих пор практически отсутствуют данные о том, может ли быть изменена киллерная функция ДК при онкопатологии и с чем связаны эти изменения. Проведенные нами ранее исследования показали, что ИФН-ДК пациентов с глиомами головного мозга способны лизировать FasL- и TRAIL-чувствительные иммортализованные опухолевые линии [318]. Однако, в отличие от больных с глиомами низкой степени злокачественности для больных с глиомами более высокой степени злокачественности (глиобластомой) характерно нарушение цитотоксической активности ИФН-ДК против опухолевой линии Нер-2, лизис которой опосредуется через активацию TNF α -зависимого сигнального пути [318].

Учитывая то, что глиобластома, несмотря на всю проводимую терапию, является одной из наиболее злокачественных и агрессивных форм опухолей у человека [127], можно предположить, что выявленное нарушение эффекторной функции ДК играет значимую патогенетическую роль в несостоятельности противоопухолевой защиты у этих больных, однако многие вопросы остаются открытыми. Так, до настоящего времени не исследовано, способны ли ИФН-ДК больных злокачественными глиомами проявлять цитотоксическую активность против аутологичных опухолевых клеток, какие механизмы реализации этой функции являются доминирующими, насколько критичным может быть обнаруженный селективный дефект TNF α -

опосредованного механизма цитотоксичности ИФН-ДК больных в отношении аутологичных опухолевых клеток.

Для изучения этого вопроса наиболее оптимальными объектами исследования рассматриваются линии глиобластомных клеток, включая клетки нейросфер (как модель стволовых опухолевых клеток), полученные из первичных культур опухоли пациентов. Клетки таких глиобластомных линий (в отличие от иммортализованных опухолевых линий) сохраняют генетические характеристики исходной опухоли в течение первых 1-8 пассажей [134].

Из данных литературы известно, что продуцируемые злокачественными глиомами растворимые факторы нарушают процессы дифференцировки и созревания ДК, их антигенпрезентирующую способность [328]. Однако, могут ли компоненты секрета клеток глиальных опухолей быть негативными регуляторами цитотоксичности ДК, неизвестно, равно как и отсутствуют сведения о причастности продуцируемых злокачественными глиомами растворимых молекул к выявленному селективному дефекту $\text{TNF}\alpha$ -опосредованного механизма цитотоксической активности ИФН-ДК.

Особый интерес представляют исследования возможных способов регуляции цитотоксических свойств ДК, поскольку усиление этой функции ДК или получение ДК с высоким цитотоксическим потенциалом может стать новой стратегией противоопухолевой иммунотерапии. Проведенные нами ранее исследования показали, что интерлейкин 2 (IL-2) и внеклеточная двуцепочечная ДНК (dsDNA) человека обладают стимулирующим действием на цитотоксическую активность ИФН-ДК больных злокачественными глиомами против $\text{TNF}\alpha$ -чувствительных клеток HEp-2 [318]. Однако способны ли указанные модуляторы быть активаторами цитотоксической активности ДК больных против аутологичных глиомных клеток, не известно.

Учитывая изложенные выше факты была сформулирована **цель работы**: охарактеризовать тумороцидную функцию ИФН α -индуцированных дендритных клеток человека против клеток глиобластомы на основе оценки

цитотоксической активности дендритных клеток против глиобластомных линий, изучения роли рецепторно- и грануло-опосредованных механизмов цитотоксичности и исследования их регуляции.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи**:

- 1) Оценить цитотоксическую активность ИФН-ДК здоровых доноров против опухолевых клеток различных глиобластомных линий (иммortalизованные и неиммortalизованные линии глиобластомных клеток, включая клетки нейросфер).
- 2) Изучить экспрессию проапоптогенных рецепторов (TNF-R, Fas, TRAIL-R2) на клетках различных глиобластомных линий.
- 3) Изучить значение рецепторно- (TNF α /TNF-R1-, FasL/Fas- и TRAIL/TRAIL-R2-зависимых) и грануло-опосредованных (перфорин/гранзим Б-зависимого) механизмов в реализации цитотоксической активности ИФН-ДК доноров против клеток различных глиобластомных линий.
- 4) Исследовать цитотоксическую активность ИФН-ДК больных злокачественными глиомами против аутологичных и аллогенных глиобластомных линий.
- 5) Изучить экспрессию цитотоксических молекул (mTNF α , sTNF α , FasL, TRAIL, перфорина и гранзима Б) дендритными клетками больных глиобластомой.
- 6) Оценить взаимосвязь активности TNF α -конвертирующего фермента (TACE) и экспрессии мРНК TNF α с цитотоксической активностью ИФН-ДК.
- 7) Исследовать продукцию цитокинов в первичных культурах глиобластомных клеток и линии U87, а также оценить влияние растворимых факторов глиобластомных клеток на цитотоксическую функцию ИФН-ДК.

- 8) Изучить влияние и механизмы действия интерлейкина 2 и двуцепочечной ДНК человека на противоопухолевую цитотоксическую активность ИФН-ДК больных глиобластомой.

Научная новизна полученных результатов

Впервые детально охарактеризована способность ДК, генерированных из моноцитов крови в присутствии $IFN\alpha$, лизировать линии опухолевых клеток, полученные от пациентов с гистологически верифицированной глиобластомой. Установлено, что несмотря на фенотипическую гетерогенность глиобластомных линий, большинство из них чувствительны к цитотоксическому действию ИФН-ДК. Впервые показано, что цитотоксическая активность ИФН-ДК против глиобластомных клеток реализуется с участием как рецепторно-опосредованных ($TNF\alpha/TNF-R1$ -, $FasL/Fas$ -, $TRAIL/TRAIL-R2$ -зависимых) механизмов, так и перфорин/гранзим Б-зависимого механизма. При этом грануло-зависимый и $TNF\alpha/TNF-R1$ -зависимый сигнальные пути вносят наибольший вклад в цитотоксический потенциал ИФН-ДК. Впервые выявлено снижение цитотоксической активности ИФН-ДК больных глиобластомой против аутологичных и аллогенных опухолевых клеток, что ассоциировано с нарушением $TNF\alpha/TNF-R1$ -опосредованной цитотоксичности. Селективный дефект $TNF\alpha$ -опосредованного механизма цитотоксичности ИФН-ДК обусловлен низкой экспрессией мембранной формы $TNF\alpha$ в результате снижения экспрессии гена $TNF\alpha$ и возрастания экспрессии и активности $TNF\alpha$ -конвертирующего фермента. Блокирование $TNF\alpha$ -конвертирующего фермента повышает экспрессию мембранной формы $TNF\alpha$ и усиливает цитотоксическую активность ИФН-ДК больных глиобластомой против $TNF-R1$ -экспрессирующих опухолевых клеток. Впервые продемонстрировано, что растворимые факторы, продуцируемые глиобластомными клетками, влияют на $TNF\alpha$ -опосредованную цитотоксическую активность ИФН-ДК. При этом показано, что низкая экспрессия мембранной формы $TNF\alpha$ на ИФН-ДК

больных глиобластомой коррелирует с высокой продукцией ряда цитокинов (IL-1 β , G-CSF, PDGF, IL-8, IP-10) аутологичными опухолевыми клетками первичных культур. Установлено, что экзогенный интерлейкин 2 и внеклеточная двуцепочечная ДНК человека стимулируют экспрессию мембранной формы TNF α , перфорина и гранзима Б (для двуцепочечной ДНК) и повышают цитотоксическую активность ИФН-ДК больных глиобластомой против аутологичных опухолевых клеток. Впервые показано, что регулирующее влияние двуцепочечной ДНК на TNF α -опосредованную цитотоксическую активность ДК ассоциируется с увеличением экспрессии мРНК TNF α , а также со снижением экспрессии и ослаблением активности TNF α -конвертирующего фермента.

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическая значимость работы заключается в расширении знаний о функции ДК как клеток-эффекторов врожденного иммунитета, способных индуцировать гибель глиобластомных клеток. Полученные данные о чувствительности глиобластомных клеток к цитотоксическому действию ИФН-ДК, а также о вовлечении различных проапоптогенных молекул в реализацию цитотоксического эффекта ДК имеют большое значение для понимания клеточных и молекулярных механизмов развития противоопухолевого иммунного ответа при глиобластоме. Выявленная чувствительность большинства глиобластомных линий к цитотоксическому действию ДК, опосредованному через TNF α /TNF-R1-сигнальный путь, а также нарушение этого механизма у пациентов с глиобластомой вносят весомый вклад в формирование современной модели иммуноредактирования опухоли и указывают на патогенетическую значимость цитотоксической функции ДК при опухолевом росте. Продемонстрированная сопряженность между снижением экспрессии мембранной формы TNF α и усилением экспрессии и активности TNF α -конвертирующего фермента в ИФН-ДК больных глиобластомой раскрывает новый механизм нарушения TNF α -опосредованной

цитотоксичности ИФН-ДК у больных глиобластомой и подчеркивает значимость мембранной формы $\text{TNF}\alpha$ в реализации цитотоксической активности ИФН-ДК. Кроме того, данные о влиянии растворимых факторов, продуцируемых клетками глиобластомы, на $\text{TNF}\alpha$ -зависимую цитотоксическую активность ИФН-ДК свидетельствуют еще об одном механизме ускользания опухоли от иммунного надзора.

С точки зрения практической значимости работы полученные данные о противоопухолевой цитотоксической активности ИФН-ДК и причинах дефекта этой функции у больных глиобластомой позволяют определить новые молекулярные мишени для разработки перспективных стратегий, направленных на элиминацию опухолевых клеток у пациентов с злокачественными глиомами головного мозга. При этом усиление цитотоксической активности ИФН-ДК больных глиобластомой с помощью рекомбинантного интерлейкина 2 или внеклеточной двуцепочечной ДНК человека расширяет перспективы практического применения ДК в иммунотерапии глиобластомы.

Методология и методы исследования

Диссертационная работа базировалась на основных принципах культивирования различных типов клеток (дендритных клеток, опухолевых линий) и широком наборе современных подходов к исследованию клеток *in vitro*. Основопологающим методом изучения цитотоксической активности ДК против опухолевых клеток-мишеней был МТТ-тест. Роль различных механизмов в реализации цитотоксической активности ДК была исследована с помощью нейтрализующих антител и ингибиторов сигнальных молекул. Значительная часть данных была получена с помощью метода проточной цитометрии (экспрессия проапоптогенных лигандов TRAIL, FasL, $\text{TNF}\alpha$, перфорины и гранзима Б и других молекул на поверхности и во внутриклеточном компартменте ДК, рецепторов к проапоптогенным лигандам на опухолевых клетках, а также апоптоз-индуцирующая активность ДК в

отношении опухолевых клеток). Кроме того, в исследовании были применены метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени – для оценки экспрессии мРНК $\text{TNF}\alpha$, спектрофлуометрический метод – для анализа активности $\text{TNF}\alpha$ -конвертирующего фермента, иммуноферментный анализ – для оценки продукции цитокинов и хемокинов дендритными клетками и опухолевыми клетками.

Основные положения, выносимые на защиту

1. ИФН-ДК здоровых доноров обладают цитотоксической активностью против линий опухолевых клеток, полученных от пациентов с гистологически верифицированной глиобластомой.
2. Ведущую роль в реализации цитотоксической активности ИФН-ДК против глиобластомных клеток играют перфорин/гранзим Б- и $\text{TNF}\alpha/\text{TNF-R1}$ -зависимые механизмы.
3. Снижение цитотоксической активности ИФН-ДК больных против аутологичных глиобластомных клеток обусловлено дефектностью $\text{TNF}\alpha/\text{TNF-R1}$ -зависимого механизма лизиса вследствие нарушения экспрессии мембранной формы $\text{TNF}\alpha$ на ДК.
4. Рекомбинантный интерлейкин 2 и внеклеточная двуцепочечная ДНК повышают цитотоксическую активность ИФН-ДК больных глиобластомой против аутологичных опухолевых клеток за счет усиления экспрессии дендритными клетками мембранной формы $\text{TNF}\alpha$.

Степень достоверности и апробация результатов

Высокая достоверность полученных результатов определяется продуманным дизайном исследования, подтверждается использованием различных подходов с автоматизированной оценкой результатов (иммунологические методы, молекулярно-генетические исследования) и

различных клеточных моделей (стандартизованные опухолевые линии, опухоли пациентов с гистологически верифицированным диагнозом). Все реагенты были сертифицированными продуктами известных фирм. Достоверность выявленных различий подтверждена стандартными методами статистической обработки результатов. Основные положения работы доложены в виде устных и стендовых докладов и обсуждены на Объединенном иммунологическом форуме (Нижний Новгород, Россия, 2013 г.), Российском научном форуме на Урале с международным участием «Актуальные вопросы фундаментальной медицины» (Екатеринбург, Россия, 2014 г.), международной конференции «Клеточные и молекулярные механизмы взаимоотношения опухоли и микроокружения» (Томск, Россия, 2015 г.), II Петербургском онкологическом форуме «Белые Ночи – 2016» (Санкт-Петербург, Россия, 2016 г.), IX отчетной научной сессии НИИФКИ «Фундаментальные и клинические аспекты иммунологии» (Новосибирск, Россия, 2016 г.), 30-ой ежегодной конференции Европейского научного сообщества по макрофагам и дендритным клеткам (Амстердам, Голландия, 2016 г.), 14-ом (Шанхай, Китай, 2016 г.) и 15-ом (Ахен, Германия, 2018 г.) международном симпозиуме по дендритным клеткам, конференции «Дни Иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, Россия, 2017 г.), ежегодном иммуно-онкологическом конгрессе Европейской ассоциации медицинских онкологов (Женева, Швейцария, 2017 г., 2018 г.), III международной конференции «Лимфология: от фундаментальных исследований к медицинским технологиям» (Новосибирск, Россия, 2018 г.). Научные результаты признаны в мире, что подтверждено публикациями в высокорейтинговых международных (Q1 – Q2) и отечественных научных журналах, рекомендованных Перечнем ВАК. Полученные в рамках диссертационной работы и опубликованные результаты исследований процитированы в ведущих международных изданиях – *Journal of Neuroimmunology*; *Critical Reviews in Immunology*; *Experimental and Therapeutic Medicine*; *International Journal of Cancer*; *Brain, Behavior and Immunity* и др.

Апробация диссертации состоялась 18 апреля 2019 г. на семинаре клинического отдела ФГБНУ НИИ фундаментальной и клинической иммунологии.

Личный вклад автора

Работа проводилась на базе лаборатории клеточной иммунотерапии НИИФКИ. Идеологическое планирование работы проведено совместно с д.м.н., проф., член-корр. РАН Е.Р. Черных. Результаты работы были получены либо лично автором, либо сотрудниками при его непосредственном участии (в рамках выполнения темы НИР 041 «Исследование молекулярно-клеточных основ регуляции иммунного ответа и разработка новых технологий в клеточной иммунотерапии онкологических, инфекционных и аутоиммунных заболеваний» и гранта РФФИ №14-04-00446) или руководстве (в рамках выполнения проектов гранта РФФИ №16-34-00711 и гранта Президента Российской Федерации в конкурсе государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук МК-7611.2016.7). В совместных работах автору принадлежит ключевая роль в постановке задач, выборе методов исследования, разработке методик и гипотез, проведении культуральных и основных методик (выделение моноклеарных клеток из проб периферической крови условно-здоровых доноров и больных злокачественными глиомами, генерация ДК, получение и ведение опухолевых линий, цитотоксический тест, цитофлуориметрический и спектрофлуориметрический анализы, иммуноферментный анализ, ПЦР), систематизации и обобщении экспериментальных данных, анализе литературных источников, интерпретации и статистической обработке полученных результатов, подготовке публикаций, а также представлении результатов исследований на научных конференциях.

Патоморфологический и иммуногистохимический анализ образцов опухоли пациентов, включенных в исследование, выполнен на базе Регионального центра высоких медицинских технологий (г. Новосибирск)

к.м.н. Ворониной Е.И., Селяковой М.С., Серпениновой Н.Н и д.м.н. Агеевой Т.А.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 27 печатных работ, включая 15 статей в отечественных журналах, рекомендованных Перечнем ВАК РФ для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени доктора наук по научной специальности 14.03.09 – «Клиническая иммунология, аллергология», и 3 статьи и 3 тезисов в зарубежных журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus, а также 6 публикаций в материалах российских и зарубежных научных форумов и конференций. Получен 1 патент.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 229 страницах печатного текста, содержит 16 таблиц и 49 рисунков. Состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы, содержащего 355 источников.

Глава 1. Роль цитотоксической активности дендритных клеток в противоопухолевом иммунном ответе (обзор литературы)

1.1 Общая характеристика дендритных клеток

Дендритные клетки (ДК) представляют собой клетки врожденного иммунитета и относятся к группе профессиональных антигенпрезентирующих клеток (АПК), которые представляют антигены Т-клеткам, стимулируют развитие иммунного ответа на различные патогены и повреждающие стимулы, и, таким образом, обеспечивают взаимодействие врожденного и приобретенного иммунитета.

Впервые эти клетки описал немецкий врач и патологоанатом Пауль Лангерганц [245]. Изучая иннервацию кожного покрова, он обнаружил в эпидермисе крупные клетки неправильной формы, с ветвящимися отростками, хорошо развитым аппаратом Гольджи и дольчатым ядром. Долгое время эти клетки оставались мало изученными в силу малочисленности и отсутствия специфических маркеров. Как АПК ДК стали объектом пристального изучения с 1973 г., когда в серии экспериментов Ральф Штейман и соавт. описали у мышей древовидные клетки лимфоидных органов, назвав их дендритными клетками [304]. Впервые было продемонстрировано, что ДК являются мощными стимуляторами Т-клеточного ответа. Значимость этих и последующих исследований ДК была оценена Нобелевским комитетом премией Штейману в области медицины за «открытие ДК и их роли в активации адаптивного иммунитета».

В сравнении с другими АПК (макрофаги (МФ), В-клетки) ДК превосходят на несколько порядков по эффективности презентации антигена, что обусловлено более высокой экспрессией на ДК продуктов генов главного комплекса гистосовместимости (МНС), прежде всего молекул МНС II класса, а также ко-стимуляторных молекул (CD40, CD80, CD86) [23, 30]. В результате только ДК способны активировать наивные Т-лимфоциты.

В условиях воспаления незрелые ДК барьерных тканей интенсивно поглощают (путем пино- или фагоцитоза) окружающий материал, в том числе чужеродные продукты; активируются патогенами (через патоген-ассоциированные молекулярные паттерны РAMP, представленные на поверхности патогенов) и подвергаются действию провоспалительных цитокинов [23, 228]. Под влиянием этих стимулов ДК мигрируют в региональные лимфатические узлы, что сопровождается созреванием ДК. Процесс созревания ассоциируется с изменением функциональной активности ДК. Незрелые ДК адаптированы к захвату антигена и его процессингу, однако слабо мигрируют, имеют низкую экспрессию молекул МНС II класса (HLA-DR) и ко-стимуляторных молекул и не способны эффективно активировать Т-клетки. При созревании под действием повреждающих и воспалительных стимулов способность к захвату антигена снижается, а миграционная активность, экспрессия HLA-DR и ко-стимуляторных молекул, напротив, возрастает. В итоге зрелые ДК приобретают способность активировать Т-клетки лимфатических узлов. Высокая экспрессия молекул МНС II, CD80 и CD86 обеспечивает дендритным клеткам выполнение их основной функции — презентации антигенных пептидов Т-лимфоцитам и активация Т-клеточного ответа [228]. При этом направленность ответа во многом обусловлена типом ДК.

1.2 Классификация дендритных клеток

ДК представляют собой гетерогенную популяцию клеток, что связано с существованием нескольких источников дифференцировки ДК. Главным прекурсором ДК является гемопоэтическая стволовая клетка (ГСК) костного мозга (КМ). Однако, в отличие от других клеток иммунной системы, имеющих четкую линии дифференцировки (Т-клетки, В-клетки и др.), ДК могут дифференцироваться из разных гистогенетических ростков ГСК (Рисунок 1.1).

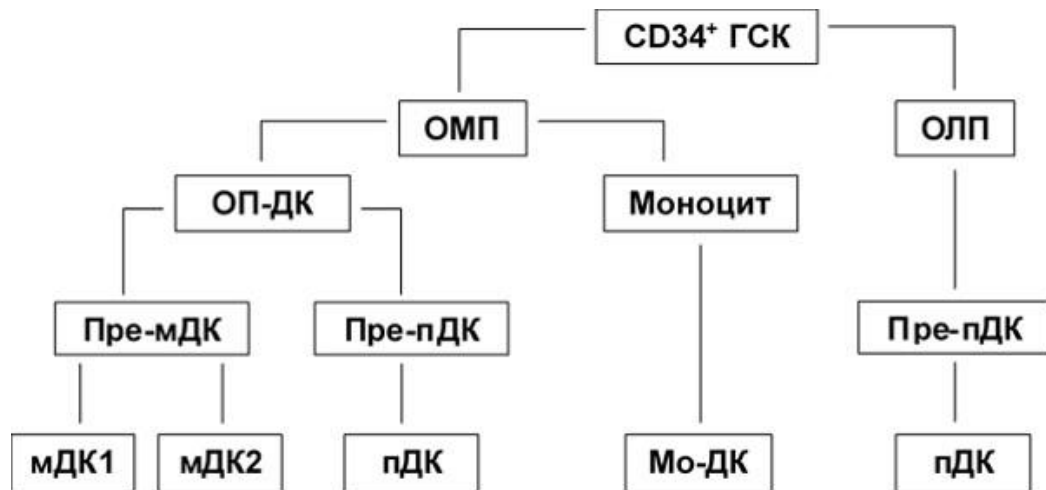


Рисунок 1.1 – Происхождение различных типов дендритных клеток

На схеме условно представлены возможные линии дифференцировки дендритных клеток человека. CD34⁺ ГСК – гемопоэтическая стволовая клетка костного мозга; ОМП – общий миелоидный предшественник; ОЛП – общий лимфоидный предшественник; ОП-ДК – общий предшественник дендритных клеток; Пре-мДК – предшественник миелоидных дендритных клеток; Пре-пДК – предшественник плазмоцитоидных дендритных клеток; мДК1 и мДК2 – миелоидные дендритные клетки 1 и 2 типа, соответственно; пДК – плазмоцитоидные дендритные клетки; Мо-ДК – дендритные клетки моноцитарного происхождения.

Активация тех или иных факторов транскрипции, а также присутствие FLT3-лиганда (лиганд *fms*-подобной тирозинкиназы 3) определяет линию развития общего ДК-предшественника (ОП-ДК) в КМ в миелоидные ДК (мДК), обладающие наибольшей антигенпрезентирующей способностью среди всех типов ДК, и плазмоцитоидные (пДК), считающимися основными продуцентами интерферонов I типа (IFN I) [297, 298]. Было установлено, что индукция дифференцировки ОП-ДК в сторону пДК зависит от экспрессии транскрипционного фактора TCF4 [75], а мДК – от BATF3 и IRF4 [252, 278, 331]. Кроме того, направленность дифференцировки ОП-ДК связана и с другими транскрипционными факторами (IRF8, ZBTB46, ID2, STAT3 или STAT5) [215].

Предшественники мДК покидают КМ и заселяют периферические органы, тогда как пДК развиваются в КМ *in situ*. Выход пДК из КМ зависит от активации фактора RUNX2 [71, 308]; в этом случае пДК, как и мДК, попадают

в кровотоков и также заселяют периферические органы. Еще один возможный путь, типичный для развития пДК, – это дифференцировка из общего лимфоидного предшественника (ОЛП) независимо от ОП-ДК [274].

Несмотря на то, что на ДК экспрессируют молекулы, которые связаны с их происхождением и принадлежностью к разным субпопуляциям, на клеточной поверхности ДК также детектируются различные пан-лейкоцитарные маркеры, участвующие в реализации многих функций ДК. Так, например, ДК экспрессируют интегрины (CD11a/CD18 и CD49/CD29) [130], общий лейкоцитарный антиген CD45, высоко гликозилированную молекулу CD43 (рецептор для лигандов CD54, молекул МНС I класса, гиалуроновой кислоты и галектина-1) [110]. Кроме того, ДК экспрессируют пан-лейкоцитарные молекулы, которые участвуют в регуляции системы комплемента (CD46 и CD55) и являются рецепторами для различных патогенов [185]. Так, CD46 связывается с вирусом кори, герпеса и стрептококками *S. Pyogenes*, тогда как CD55 – с вирусом Коксаки, энтеровирусами [193]. Особое место занимают молекулы суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли TNFR (CD265, CD298 (Na/K АТФ-аза) и др.). Например, CD265 (RANK, receptor activator of nuclear factor κ B), представленный на поверхности лейкоцитов, в том числе и ДК крови, взаимодействует с вовлеченным в метаболизм костной ткани лигандом CD254 (RANK-L), участвуя таким образом в активации и дифференцировке остеокластов [76].

1.2.1 Миелоидные дендритные клетки

Многочисленные наблюдения свидетельствуют о том, что мДК только в небольшом количестве присутствуют в периферической крови (ПК), тогда как основная их часть сосредоточена в тканях и органах. Традиционно мДК человека характеризуются как популяция клеток с фенотипом линейно-негативных (CD3⁻, CD19⁻, CD20⁻, CD56⁻) и CD14^{lo}CD16^{lo}

HLADR⁺CD11c⁺CD123⁻ клеток [230]. Однако, по данным некоторых исследователей мДК все же могут экспрессировать на поверхности молекулу CD56, характерную для NK-клеток [124]. Исследования *in vitro* показали, что CD34⁺ ГСК могут дифференцироваться в популяцию мДК, представленную в периферической крови (ПК), при активации FLT3L, SCF (фактор роста стволовых клеток), GM-CSF, IL-4, IL-3, IL-6 и тромбопоэтина (ТРО) [256].

В зависимости от локализации, фенотипа и выполняемых функций мДК подразделяют на несколько субпопуляций – мДК 1 типа (мДК1) и мДК 2 типа (мДК2) [7, 298], которые дифференцируются из общего предшественника мДК [279]. мДК2 – преобладающая субпопуляция ДК в периферической и пуповинной крови, КМ и селезенке, тогда как мДК1 во всех лимфатических органах представляют наименее малочисленную субпопуляцию среди всех ДК [283].

Для мДК1 человека характерна экспрессия маркера CD141 (тромбомодулин или BDCA-3, антиген ДК крови 3). При этом относительное количество CD141⁺ ДК среди всех мононуклеарных клеток (МНК) ПК не превышает 0,03 %. CD141⁺ мДК1 заселяют все лимфоидные (селезенка, миндалины и др.) и нелимфоидные органы (печень, легкие, кожа и кишечник и др.) [128, 204]. В то же время есть данные о том, что использование маркера CD141 не позволяет точно выделить с высокой чистотой популяцию мДК1 из тканей человека [124]. Кроме того, например, почти 50 % мДК1 кишечника экспрессирует молекулу CD56, которую обычно применяют в протоколе выделения ДК для негативной сортировки, рассматривая мДК как CD56⁻ клетки [124]. Вполне вероятно, что CD56 также присутствует и на мДК1 других органов и тканей. Наиболее полно мДК1 можно охарактеризовать как HLA-DR⁺CD11c⁺CD123⁻CD11b⁻Sirpα⁻(CD172⁻)CD141⁺Clec9A⁺клетки.

Исследование особенностей транскрипции ряда генов и функциональной активности выявило гомологию мДК1 человека с мышинными CD8⁺CD103⁺ ДК [81, 147, 191]. Как и мышинные ДК, мДК1 экспрессируют хемокиновый рецептор XCR1 и не экспрессируют лангерин (CD207) [24].

CD141⁺ мДК отличаются высоким уровнем экспрессии паттерн-распознающих рецепторов TLR3 и, соответственно, отвечают на стимуляцию polyI:C или вирусной двуцепочечной РНК (dsRNA) [90, 147, 191], а также характеризуются высоким уровнем экспрессии мРНК TLR8 [164], распознающего бактериальные одноцепочечные РНК. Согласно данным литературы, мДК1 человека (в отличие от мышей) не экспрессируют TLR4 (рецептор к липополисахариду большинства грам-негативных бактерий) и TLR9 (сенсор двуцепочечной ДНК (dsDNA)) [156, 230]. В итоге мДК1 резистентны к *E.coli* и не способны захватывать и кросс-презентировать компоненты этой бактерии [151]. В то же время мДК1 характеризуются высокой продукцией IFN III типа (IFN γ) в ответ на активацию TLR3 [176] различными вирусами, включая вирус гепатита С человека [345]. По-видимому, такие особенности определяют важную роль мДК1 в кросс-презентации и индукции цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ). Однако, для мДК1 характерна низкая продукция провоспалительного цитокина IL-12p70 в ответ на стимуляцию лигандами к TLR3 (poly I:C) и/или к TLR8 (R848) [230].

мДК1 характеризуются выраженной способностью к кросс-презентации антигенов через молекулы МНС I класса [147], особенно клеточных антигенов и иммунных комплексов, а также к индукции ЦТЛ-ответа [77, 287]. Но в то же время среди всех клеточных субпопуляций крови мДК1 не являются доминирующим типом клеток с точки зрения кросс-презентации растворимых антигенов [68].

В отличие от аналогичного типа мышинных ДК мДК1 человека эффективно стимулируют пролиферативный ответ аутологических и аллогенных CD4⁺ Т-клеток [230]. С точки зрения индукции иммунологической толерантности о мДК1 известно немного. В литературе есть единичные данные об индукции CD141⁺ дендритными клетками кожи генерации регуляторных Т-клеток (Трег) [73]. Однако, клетки, исследованные в этой работе, не были истинными CD141⁺ мДК1, поскольку экспрессировали моноцитарный маркер CD14 [213]. Worah K. и соавт. обнаружили высокую

экспрессию фермента индоламин-2,3-диоксигеназу 1 (IDO1), участвующего в метаболизме триптофана [339]. IDO1 вовлечен в активацию Трег *in vitro* [231], однако какова роль этого фермента в функциональной активности CD141⁺ мДК1 пока неизвестно.

мДК 2 типа экспрессируют молекулу CD1c⁺ (BDCA-1) и составляют почти 1 % всех МНК периферической крови. Как и мДК1, мДК2 присутствуют в лимфоидных (в лимфатических узлах, миндалинах, селезенке), а также в нелимфоидных органах и тканях (в коже, печени, почках, легких, кишечнике) [204]. Фенотип мДК2 можно определить как HLA-DR⁺ CD11c^{hi}CD123⁻Sirpα⁺CD1c⁺Clec9A⁻ клетки [204]. В отличие от мДК1, для этого типа мДК человека характерна экспрессия лангерина (CD207), обнаруженного на клетках кожи (клетках Лангерганца) и распознающего маннозиллированные гликопротеины и гликолипиды бактерий [41]. Стоит отметить, что идентификацию мДК2 по экспрессии CD1c затрудняет тот факт, что этот антиген присутствует на В-клетках, мДК1 и моноцитах [93, 253, 257]. В то же время, например, CD141 экспрессируется на мДК2 селезенки человека [124]. В связи с этим стоит обращать внимание на другие молекулы, которые могли бы послужить в качестве дополнительных маркеров мДК2 (Clec9A, Cadm1) [58, 124, 271]. В последнее время особое внимание уделяют молекуле CD5, экспрессия которой на мДК2 определяет не только фенотипические, но и функциональные различия между отдельными субпопуляциями мДК2 [344].

Различные исследования демонстрируют, что мДК2 ПК экспрессируют высокий уровень TLR2 и достаточно низкий - TLR4. Что касается сенсоров нуклеиновых кислот, для субпопуляции с низкой экспрессией CD5 (CD5^{lo} мДК2) характерна экспрессия TLR8 и TLR7, тогда как для CD5^{hi} мДК2 - TLR3 [344]. В отличие от мДК1, мДК2 на высоком уровне экспрессируют компоненты инфламасом NLRP4 (IPAF), NLRC4 и IL-1b, а также цитоплазматических сенсоров РНК RIG-I (рецептор группы RIG-подобных рецепторов) и IFIT1 (ингибитор трансляции вирусной РНК) [339], что указывает на роль мДК2 в обнаружении вирусов в цитоплазме и развитии

воспалительного ответа. Еще одним отличием мДК2 от мДК1 является высокая продукция первыми IL-12p70 [230], при этом основными продуцентами выступают CD5^{lo} мДК2 [344]. Kassianos A.J. и соавт. показали, что E.coli трансформирует мДК2 в клетки с иммунорегуляторным фенотипом, продуцирующие на высоком уровне супрессорный цитокин IL-10, а также растворимые CD25 и IDO1. Похожим эффектом обладает и липополисахарид (ЛПС) E.coli [151].

мДК2 способны кросс-презентировать растворимые антигены без активации TLR, также, как и активированные мДК1, однако уступают последним в представлении антигенов некротических клеток [164, 230]. CD1c⁺ ДК проявляют способность, аналогичную CD141⁺ ДК, активировать аллогенные CD4⁺ Т-клетки и индуцировать их дифференцировку как в Th1-, так и Th2-клетки [230]. Есть данные о том, что CD1c⁺ ДК кишечника индуцируют продукцию IL-17 аллогенными CD4⁺ Т-клетками [331]. Также была показана роль CD1c⁺ ДК в активации Foxp3⁺ Трег [200, 331]. Стоит отметить, что CD5^{hi} мДК2 способны в большей степени индуцировать Трег *in vitro* по сравнению с CD5^{lo} мДК2 [344]. Однако, как и в случае с мДК1, роль мДК2 в индукции Трег и толерантности требует дальнейшего изучения.

1.2.2 Плазмоцитоидные дендритные клетки

Плазмоцитоидные ДК (пДК) получили свое название в силу схожести с Ig-продуцирующими плазматическими клетками. пДК циркулируют в небольшом количестве (менее 0,5 % всех МНК) в крови, однако составляют основную долю всех ДК в тимусе и миндалинах. В присутствии ростовых факторов FLT3L и TPO CD34⁺ ГСК могут дифференцироваться *in vitro* в пДК [66]. Характерным маркером для пДК является лектиновый рецептор С-типа BDCA-2 (CD303). Лиганд к этому рецептору до сих пор не идентифицирован, однако известно, что экспрессия CD303 находится под негативным контролем IFN α [342]. Еще одним характерным маркером пДК считается молекула

CD123 (рецептор к IL-3, IL-3Ra), что определяет влияние IL-3 на дифференцировку этого типа клеток. Однако, этот маркер не является строго специфичным для пДК, поскольку его экспрессия обнаруживается на ОП-ДК и гранулоцитах [76].

пДК представляют собой высоко специализированные клетки с точки зрения распознавания нуклеиновых кислот через локализованные во внутриклеточном компартменте рецепторы TLR7 и TLR9. TLR7 распознает вирусные РНК, эндогенные РНК и синтетические олигорибонуклеотиды, тогда как TLR9 является сенсором для неметилованных CpG-обогащенных последовательностей ДНК, типичных для вирусов и бактерий, а также эндогенных ДНК и синтетических CpG олигодезоксинуклетидов [43]. TLR7 и TLR9 рекрутируют цитозольный адаптерный белок MyD88 (Myeloid differentiation primary response gene 88), который передает сигнал через различные звенья сигнального пути (в том числе через киназы группы IRAK, фактор 6, ассоциированный с рецептором TNF (TRAF6) и ряд других протеинкиназ и адаптерных белков) на транскрипционный фактор IRF7 (интерферон регулирующий фактор 7), транскрипционный ядерный фактор NF-κB, а также другие транскрипционные факторы и киназы, которые обеспечивают активацию синтеза провоспалительных цитокинов (TNFα, IL-12p70, IL-1β, IL-6), хемокинов (IL-8/CXCL8), ко-стимуляторных молекул. Однако, в первую очередь результатом активации TLR7 и TLR9 рецепторов в пДК является индукция секреции интерферонов IFNα и IFNβ через MyD88-IRF7-сигнальный путь [43], которые регулируют Th1 и ЦТЛ-поляризацию, кросс-презентацию, стимулируют экспрессию МНС и ко-стимуляторных молекул на АПК, активируют мДК, NK и В-клетки, а также обладают протективным эффектом в отношении пДК [247].

Как и в случае с мДК, пДК человека можно разделить на две субпопуляции, которые различаются между собой экспрессией молекулы CD2 (CD2^{hi} или CD2⁺ и CD2^{lo} или CD2⁻). При этом данные литературы о биологической значимости и роли в иммунном ответе двух этих субпопуляций

пДК противоречивы. Оба типа пДК демонстрируют выраженную активацию и высокую продукцию цитокинов в ответ на вирусы, однако, например, CD2^{hi} пДК экспрессируют IL-12p40 в ответ на вирус гриппа, лучше стимулируют наивные Т-клетки и отличаются большей устойчивостью в ответ на стресс и глюкокортикоиды [55, 62, 211, 230]. Согласно исследованиям ряда авторов, CD2⁺/CD2^{hi} пДК характеризуются морфологией, типичной для классических пДК, а также продуцируют высокий уровень IFN I типа в ответ на стимуляцию [55, 326]. Есть данные о том, что все CD2⁺ пДК ко-экспрессируют CD33, миелоидный маркер предшественников ДК. Такие клетки способны стимулировать Т-клеточный ответ и продуцировать IL-12 [286]. При этом Villani A.-С. и соавт. показали, что CD2⁺ пДК экспрессируют классические маркеры пДК CD123 и CD303, однако утрачивают высокую экспрессию IRF7 и способность продуцировать IFN I типа [326]. Эти данные могут указывать на то, что истинные пДК все же представляют собой популяцию CD2⁻ клеток, тогда как CD2⁺ ДК могут быть предшественниками пДК.

Зачастую пДК обнаруживают в лимфатических узлах, дренирующих опухоль, и вокруг солидных опухолей. В таких пДК регистрируется высокая экспрессия фермента IDO1, а их присутствие в зоне опухоли ассоциировано с более неблагоприятным прогнозом для больных [223, 299].

Способность пДК продуцировать IFN I типа связывают с ролью этих клеток в развитии аутоиммунных заболеваний, для которых характерно нарушение регуляции экспрессии IFN-стимулированных генов в ответ на аутоантигены (системная красная волчанка, псориаз) [237]. Кроме того, показано, что пациенты с мутацией STING (стимулятор генов интерферонов) характеризуются высокой концентрацией в сыворотке IFN α и IFN α -экспрессирующих пДК [263]. Несмотря на то, что высокий уровень сывороточного IFN α детектируется и при других аутоиммунных патологиях, циркулирующие пДК с высокой продукцией IFN α не обнаруживается у таких больных [263], что свидетельствует о патогенетической значимости пДК при

аутоиммунных заболеваниях, ассоциированных с гиперпродукцией IFN α у пациентов с мутациями STING.

1.2.3 Дендритные клетки моноцитарного происхождения *in vivo*

Долгое время считалось, что все ДК человека дифференцируются из CD14⁺ моноцитов [111]. Однако развитие новых технологий позволило выяснить, что ДК моноцитарного происхождения (Мо-ДК) представляют собой отдельную субпопуляцию ДК.

Биологическая значимость моноцитов как предшественников ДК была продемонстрирована в работе с экспериментальными моделями на примере лейшманиоза, в которых моноциты действительно дифференцировались *in vivo* в клетки, фенотипически и функционально сходные с ДК [182]. Дальнейшие исследования на мышах показали, что моноциты дифференцируются в ДК *in vivo* при различных состояниях, ассоциированных с воспалением, включая инфекции и аутоиммунные патологии [217, 288]. Похожие результаты были получены и в исследованиях моноцитов человека. Так, при различных воспалительных заболеваниях (болезнь Крона, язвенный колит) обнаружена высокая миграционная активность изотоп-меченых аутологичных моноцитов в слизистую кишечника [121, 149]. В других работах показано, что при аллергическом рините стимуляция аллергеном индуцирует рекрутирование моноцитов в слизистую носа через несколько часов, а спустя 3 дня в этой зоне обнаруживается вновь образовавшаяся популяция ДК [95], что указывает на потенциальную роль моноцитов в качестве клеток-предшественников для ДК.

Проведенный транскриптомный анализ показал, что Мо-ДК схожи по экспрессии ряда генов с ДК, генерированными из моноцитов в культуре *in vitro* [118, 289]. Стоит отметить, что при определенных условиях моноциты могут быть предшественниками не только ДК, но и МФ. В этом случае такие МФ также отличаются от резидентных МФ, имеющих эмбриональное

происхождение [178]. При этом направленность дифференцировки моноцитов в ДК или МФ может зависеть от активации тех или иных транскрипционных факторов. Так, MAFB контролирует дифференцировку моноцитов в МФ, тогда как IRF4, BLIMP-1 и арил-гидрокарбоновый рецептор (AHR) необходимы для дифференцировки моноцитов в ДК [118]. Благодаря современным методам исследования было установлено, что, в отличие от предшественников ДК КМ-происхождения, которые прекоммитированы уже на ранних этапах развития в сторону дифференцировки в мДК или пДК, в CD14⁺ моноцитах человека отсутствуют признаки предопределенной дифференцировки только в МФ или только в ДК [118], что свидетельствует о роли микроокружения в процессах дифференцировки моноцитов.

Фенотипически Мо-ДК представляют собой HLA-DR⁺CD11c⁺ клетки, которые также экспрессируют маркеры ДК крови CD1c, CD1a, CD1b, FcεRI, а также молекулы, типичные для МФ, CD206, CD14 и CD11b [95, 126, 173, 289, 338]. Наиболее распространенный фенотип Мо-ДК, которым руководствуются при изучении этой субпопуляции ДК, выглядит как HLA-DR⁺CD11c⁺CD14^{int}CD206⁺CD1c⁺ клетки.

Мо-ДК проявляют те же функции, что и классические ДК, включая способность активировать наивные Т-клетки и экспрессию хемокинового рецептора CCR7, обеспечивающего рекрутирование ДК в лимфатические узлы. Мо-ДК схожи морфологически с мДК и пДК по наличию отростков и отсутствием крупных цитоплазматических вакуолей, что отличает их от МФ моноцитарного происхождения. Как и моноциты, Мо-ДК экспрессируют хемокиновый рецептор CCR2, обеспечивающий миграцию клеток в периферические ткани [46]. Однако это маркер не является строго специфичным для Мо-ДК, поскольку, например, в экспериментальных моделях показано, что интестинальные CCR2⁺ ДК мышей дифференцируются из КМ-предшественника ДК [284].

Учитывая сложность выделения из крови и тканей, данные о функциональной активности Мо-ДК ограничены. Показано, что Мо-ДК

эффективно активируют CD4⁺ и CD8⁺ Т клетки *ex vivo* [187, 289, 351]. С точки зрения продукции цитокинов в большинстве случаев Мо-ДК продуцируют провоспалительные цитокины (TNF- α , IL1- β , IL-6, IL-12p70) в ответ на стимуляцию *ex vivo* [27, 187, 289]. Также Мо-ДК, выделенные из синовиальной жидкости при ревматоидном артрите или из асцита опухолевого происхождения, способны индуцировать Th17-поляризацию через продукцию IL-23 [289]. Поскольку Th17-клетки играют важную роль в тканевом повреждении, полученные результаты свидетельствуют о вовлеченности Мо-ДК в патогенез воспалительного ответа при данных патологиях.

Поскольку Мо-ДК были обнаружены при различных воспалительных процессах, этот тип ДК первоначально получил название воспалительных ДК. Однако позже было показано, что этот термин ошибочен, поскольку ДК моноцитарного происхождения обнаруживают и в отсутствии воспаления в различных тканях и органах (слизистые кишечника, кожа, скелетные мышцы и др.) [45, 172, 310, 322]. Так, например, в легких и бронхо-альвеолярном лаваже здоровых доноров показано присутствие популяции CD14⁺CD206⁺CD1c⁺CD1a⁺ клеток, которые экспрессируют транскрипционный фактор IRF4 [88], а также хемокиновые рецепторы CCR2 [27] или CCR7 [244].

Присутствуют ли Мо-ДК в ПК, до сих пор неясно. Описывают популяцию CD14⁺CD1c⁺CD11b⁺ клеток в ПК человека, однако эти клетки не экспрессируют, например, характерные для Мо-ДК молекулы CD206 и CD1a [28]. При этом доля таких клеток возрастает у пациентов с меланомой. В то же время транскриптомный анализ свидетельствует о том, что эта популяция клеток ближе к моноцитам, чем к истинным Мо-ДК.

В экспериментальных моделях показано, что циркулирующие моноциты рекрутируются в опухоль, где в дальнейшем дифференцируются в ДК [106, 259, 290]. Поэтому можно предположить, что у человека опухолевое микроокружение также содержит в миелоидном инфильтрате воспалительные Мо-ДК, однако этот вопрос еще недостаточно изучен. Опухоль-ассоциированные Мо-ДК были идентифицированы при раке легкого и

кишечника [173], а также при меланоме [28]. Кроме того, анализ клеток аденокарциномы легкого показал, что CD1c⁺ ДК экспрессируют моноцитарные/макрофагальные маркеры CD14, CCR2, CD206, CD64 и CD11b, что может свидетельствовать о присутствии в опухоли популяции Мо-ДК [177].

Помимо перечисленных выше основных субпопуляций ДК в последнее время выделяют еще ряд дополнительных субпопуляций ДК (CD16⁺ ДК, 6-Slan-ДК и др.), существующих *in vivo*, однако вопрос об их роли и происхождении до сих пор открыт.

1.2.4 Дендритные клетки моноцитарного происхождения *in vitro*. IFN α -индуцированные дендритные клетки

В 1994 г. Sallusto F. и Lanzavecchia A. впервые продемонстрировали возможность получения ДК из моноцитов в культуре *in vitro*, что произвело революцию в последующем изучении ДК и легло в основу создания вакцин на основе ДК [268]. Такие ДК по фенотипу, морфологии и функциям были схожи с *ex vivo* изолированными ДК человека [277]. Однако развитие новых технологий показало, что ДК, генерированные *in vitro*, на самом деле существенно отличаются от пула ДК, дифференцировавшихся из ОП-ДК *in vivo* [52, 194].

Существуют различные способы получения ДК *in vitro*. Прежде всего это связано с тем, что использование вакцин на основе ДК рассматривается в качестве одной из перспективных стратегий лечения при онкопатологии, направленной на усиление противоопухолевого иммунитета. Соответственно, выбор наиболее оптимального протокола получения ДК *ex vivo*, которые характеризовались бы полноценной функциональной активностью, является ключевой задачей при разработке новых методов специфической иммунотерапии.

Традиционный протокол получения ДК основан на инкубации моноцитов периферической крови с гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором (GM-CSF), который направляет дифференцировку клеток в сторону миело-моноцитарной линии, и интерлейкином 4 (IL-4) [268], ингибирующим развитие макрофагов через активацию Janus kinase 3 (JAK3)-STAT6-сигнального пути [8, 323]. Недавнее исследование Vento-Tormo R. и соавт. показало, что IL-4 запускает каскад сигнальных путей в моноцитах, результатом которых является деметилирование ряда генов (*SLAMF1*, *DUOX1*, *PFAS*), обеспечивающее дифференцировку моноцитов в ДК [323]. Генерированные таким образом ДК (ИЛ4-ДК) характеризуются незрелым фенотипом с низкой экспрессией ко-стимуляторных молекул (CD80, CD86, CD40) [316], высокой способностью захватывать антигены и слабой способностью индуцировать Т-клеточный пролиферативный ответ [85], способностью к миграции в ответ на провоспалительные хемокины [269], адгезией к эпителию и тканям [162, 323]. Активация незрелых ИЛ4-ДК различными стимулами и цитокиновыми коктейлями (ЛПС, PolyI:C, TNF α , ПГЕ2 и др.) приводит к созреванию ДК, что сопровождается снижением их способности к эндоцитозу, увеличением экспрессии ко-стимуляторных молекул, молекул МНС II класса, продукции провоспалительных цитокинов и индукции генерации хелперных и эффекторных Т-лимфоцитов [216, 316].

Существуют другие протоколы получения ДК, в том числе основанный на использовании IFN α вместо IL-4, при этом время генерации ДК в этом случае обычно короче [20, 38, 162].

В целом, цитокиновые коктейли, которые используются для получения ДК *ex vivo* из моноцитарных предшественников, в той или иной степени отражают условия для дифференцировки моноцитов в тканевые воспалительные ДК *in vivo*. Так, источником продукции для IL-4 (а также GM-CSF) могут быть Th2-клетки, тучные клетки, базофилы, кератиноциты и др. [112, 296]. Дифференцировка моноцитов в ДК может также индуцироваться

интерферонами I типа, которые продуцируются большинством клеток в ответ на инфекционные и воспалительные стимулы [117]. Интерфероны I типа, и прежде всего IFN α , являются сигналами опасности и способны вызывать быструю дифференцировку циркулирующих моноцитов в ДК [38, 115]. При этом IFN α -индуцированные ДК проявляют признаки не только миелоидных ДК, а также и плазмцитоподобных ДК, поскольку характеризуются высокой экспрессией генов IFN-ассоциированных сигнальных путей (*STAT1* и *IRF7*), высокой экспрессией молекулы CD123 и низким уровнем миелоидного маркера CD209 (DC-SIGN) [115, 162]. Молекула DC-SIGN относится к лектиновому семейству C-типа и вовлечена в контроль ряда функций ДК, в т.ч. во взаимодействие ДК и Т-клеток, миграцию ДК из периферической крови в ткани, а также эндоцитоз патогенов [161]. Однако снижение экспрессии DC-SIGN не влияет на миграционную способность ИФН-ДК и их способность активировать Т-лимфоциты *in vivo* [241].

Анализ экспрессии ряда генов [162] показал, что для ИФН-ДК характерна более высокая экспрессия генов, кодирующих антипролиферативные и противовирусные эффекторные молекулы протеинкиназу R (PKR), Mx1, олигоаденилат синтетазу, а также ряд других генов-мишеней интерферонов I типа. С другой стороны, для ИЛ4-ДК типична более высокая экспрессия генов, вовлеченных в ИЛ-4-специфический ответ и связанных с липидным метаболизмом, хемотаксисом и адгезией. ИЛ4-ДК отличаются высоким уровнем экспрессии генов, ассоциированных с процессом фагоцитоза, - гены для Ig-рецепторов FCGR1B, FCAR и FCER2, компонентов комплемента C1QA, C3 и рецептора C1QR1, а также CD209 и CD205, что ассоциируется с более незрелым фенотипом ДК. Уровень мРНК молекулы DC-LAMP (dendritic cell lysosomal associated membrane protein), характерной для зрелых ДК и участвующей в процессинге антигенов, в ИФН-ДК выше по сравнению с ИЛ4-ДК. Для ИЛ4-ДК характерно более высокая экспрессия генов, ассоциированных с адгезией к эпителию и воспаленным тканям, а также генов, ассоциированных с этапами взаимодействия с Т-

клетками. К этой группе можно отнести такие молекулы, как интегрин αE , CD97, $\beta 2$ интегрины CD18, CD11b и CD11c. ИФН-ДК отличаются более высоким уровнем мРНК хемокинового рецептора CCR7 и интегрин $\alpha 4$, играющих важную роль в миграции зрелых ДК к лимфоидным узлам [241].

Показано, что ИФН-ДК в сравнении с ИЛ4-ДК характеризуются более высокой продукцией провоспалительных цитокинов (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF α , TNF β , IFN- γ), способностью стимулировать Th1- и Th17- клетки, а также антиген-специфические CD8⁺ Т-клетки [143, 174, 219, 221].

Вследствие своей быстрой генерации, чувствительности к различным факторам, стимулирующим созревание, выраженной АПК-функцией и способностью индуцировать продукцию Т-клетками Th1-цитокинов применение ИФН-ДК может всерьез рассматриваться как более эффективный по сравнению с ИЛ4-ДК способ иммунотерапии.

1.3 Цитотоксическая активность дендритных клеток

Исследования последних двух десятилетий демонстрируют, что спектр функциональной активности ДК намного шире. Наряду со способностью активировать цитотоксические клетки иммунного ответа (ЦТЛ, НК-клетки, макрофаги), ДК могут проявлять прямую цитотоксическую активность против опухолевых и вирус-инфицированных клеток. Выявленная цитотоксическая активность ДК может способствовать развитию эффективного иммунного ответа, направленного на элиминацию чужеродного патогена или повреждающего стимула, и облегчать поглощение и представление Т-клеткам антигенов в комплексе с молекулами МНС. Кроме того, ДК обладают цитотоксической активностью против активированных лимфоцитов, что рассматривается как механизм «feed-back» регуляции, направленный на ограничение иммунного ответа и поддержание иммунного гомеостаза.

1.3.1 Общие принципы и механизмы киллерной функции эффекторных клеток

Киллерная активность клеток иммунной системы является важной биологической функцией, направленной на элиминацию прежде всего опухолевых и вирус-инфицированных клеток. Традиционно, к основным представителям эффекторных клеток относят НК-клетки, $CD8^+$ и $CD4^+$ ЦТЛ, NKT-клетки, а также лимфокин-активированные клетки (LAK-клетки). Также эффекторной функцией обладают и другие типы клеток, которые условно можно назвать «непрофессиональными» киллерными клетками. К этой группе относят моноциты, макрофаги, эозинофилы, нейтрофилы и др. Однако, цитотоксическое действие этих клеток в основном связано с высвобождением различных цитолитических цитокинов и медиаторов (ROS, H_2O_2 , NO, RON и др.) [120, 181, 343]. Несмотря на то, что секреция цитокинов и хемокинов ($IFN\gamma$, $TNF\alpha$, GM-CSF, IL-5, IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES) профессиональными киллерными клетками играет важную роль в регуляции иммунного ответа [44, 84, 102, 300], клеточно-опосредованная цитотоксичность представляет собой основную функцию этих клеток.

Несмотря на различия в способах и путях распознавания клеток-мишеней, эффекторные клетки врожденного и приобретенного иммунитета характеризуются схожими механизмами реализации цитотоксической активности.

Доминирующим в реализации цитотоксической активности большинства эффекторных клеток ($CD8^+$ и $CD4^+$ ЦТЛ, НК-клетки, LAK-клетки) принято считать грануло-опосредованный механизм (Рисунок 1.2). Этот тип цитотоксической активности связан с высвобождением в иммунологический синапс содержимого цитоплазматических гранул эффекторных клеток, прежде всего перфорины, гранзимов, гранулизинов, катепсинов, калретикулина, которые активируют различные про-энзимы, нарушают целостность мембраны клеток-мишеней и запускают процессы

апоптоза в них, а также обеспечивают резистентность эффекторных клеток к собственным цитолитическим механизмам [29, 83, 107].

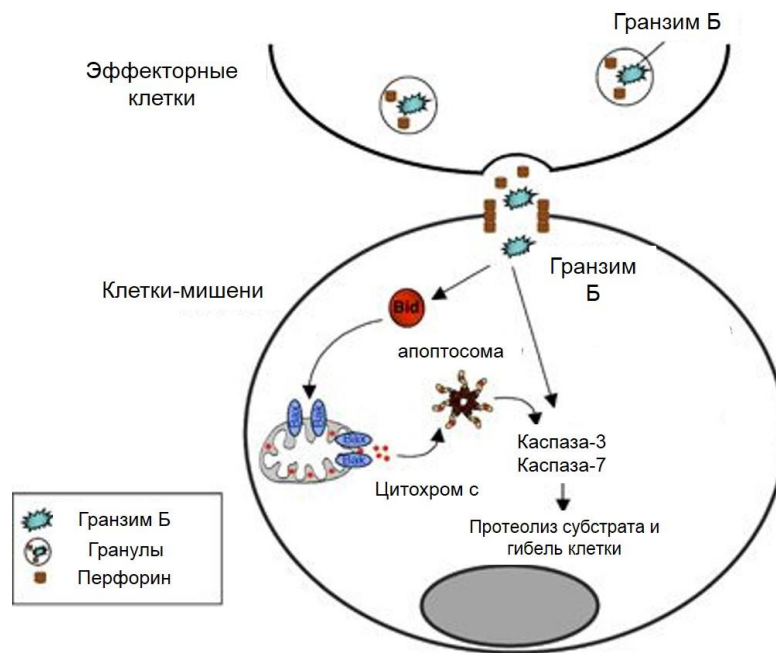


Рисунок 1.2 – Грануло-зависимый механизм апоптоза [83]

На рисунке представлена схема индуции апоптоза клеток-мишеней после того, как содержимое цитолитических гранул клеток-эффекторов высвобождается в иммунологический синапс. Гранзим Б, проникая через перфориновые поры, активирует каспаз-зависимый сигнальный путь или митохондриальный путь индуции апоптоза с вовлечением молекулы Bid и высвобождением цитохрома с.

Грануло-опосредованная цитотоксичность включает в себя процессы распознавания эффекторными клетками клеток-мишеней, поляризации цитотоксических гранул к иммунологическому синапсу и затем высвобождение их содержимого в синапс для индуции апоптоза клеток-мишеней [83]. Перфорин связан с протеогликаном серглицином, который поддерживает перфорин в мономерной неактивной форме [248]. Нейтральный pH и Ca^{2+} в иммунологическом синапсе позволяют перфोरину диссоциировать от серглицина и полимеризоваться с формированием пор на мембране клеток-мишеней через Ca^{2+} -зависимый механизм. С одной стороны, образующиеся при этом поры могут функционировать как неселективные ионные каналы [317]. Проникновение через них воды и низкомолекулярных веществ вызывает коллоидно-осмотический лизис клеток-мишеней. С другой стороны, через

перфориновые поры проникают гранзимы. Гранзимы схожи по своей структуре с трипсином и относятся к семейству сериновых протеаз. У мышей это семейство включает 10 гранзимов, тогда как у человека только 5 гранзимов. Основная функция гранзимов связана с активация сигнальных путей, ведущих к гибели клетки-мишени. При этом недавние исследования показали, что гранзимы способны индуцировать гибель клеток как минимум через 3 различные пути. Среди всех гранзимов человека наиболее изученным с точки зрения цитотоксической активности является гранзим Б [83]. Он, как и другие гранзимы, синтезируется в виде неактивного предшественника (про-энзим), но с помощью катепсина С, который удаляет N-терминальный дипептид, становится активным [72]. Кроме того, гранзимы также до момента проникновения в клетку-мишень диссоциируют от связанного с ними серглицина, что также служит механизмом активации [72]. Проникая через перфориновые поры (или другие альтернативные механизмы) в клетки-мишени, гранзим Б запускает классический сигнальный путь индукции апоптоза, каспаз-зависимый апоптоз, через последовательную активацию инициаторных каспаз (каспазы-8, -10) и эффекторных каспаз -3, -6, -7. Расщепление каспазами ряда ключевых субстратов, в частности ингибиторов нуклеаз, ламинов - ядерных цитоскелетных белков и т.д., приводит к фрагментации ДНК и деструкции клетки. Для гранзима А характерен каспаз-независимый механизм действия с вовлечением митохондриального пути и повреждением ДНК [190]. Гранзим А влияет на митохондриальную цепь переноса электронов, индуцируя продукцию синглетного кислорода, обладающего повреждающим действием в отношении мембраны и всей структуры митохондрий, структурных белков, ферментов и нуклеиновых кислот. Кроме того, митохондриальные повреждения запускают активацию комплекса SET (oxidative stress response complex), который участвует в деструкции ДНК. Гранзим Н и К также активируют каспаз-независимый митохондриальный путь [72]. В отношении гранзима М до сих пор нет четких представлений, какой из механизмов клеточной гибели запускает этот

гранзим. Есть данные о том, что он играет синергическую роль в гранзим Б-опосредованном апоптозе [250], инактивируя протеиназный ингибитор 9 (PI-9) гранзима Б опухолевых клетках [206], а также участвует в процессах аутофагии [157].

Второй механизм цитотоксической активности, который характерен для эффекторных клеток, – это внешний сигнальный путь индукции апоптоза (Рисунок 1.3), который реализуется через трансмембранные «рецепторы смерти», относящиеся к суперсемейству TNF (tumor necrosis factor (TNF) receptor gene superfamily) [199]. Наиболее охарактеризованы рецепторы этого семейства Fas (обозначается также DR2, APO-1 или CD95), TNF-R1 (DR1, CD120a, p55 или p60), DR3 (APO-3, LARD, TRAMP или WSL1), TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (TRAIL-R1; DR4 или APO-2), TRAIL-R2 (DR5, KILLER или TRICK2). Эти рецепторы обладают схожими цитеин-обогатенным внеклеточным доменом и цитоплазматическим доменом из 80 амк, называемым «доменом смерти» (DD) [21]. DD играет важную роль в передаче сигнала от поверхности клетки к внутриклеточным участникам сигнального пути апоптоза.

Лиганды к «рецепторам смерти», молекулы TNF α , TRAIL/Apo2L, FasL, относящиеся к семейству TNF-лигандов, экспрессируются в клетках в виде трансмембранных белков II типа [225, 275, 285]. В результате расщепления протеазами их внеклеточные домены могут также высвобождаться из клетки в свободном растворимом тримерном виде.

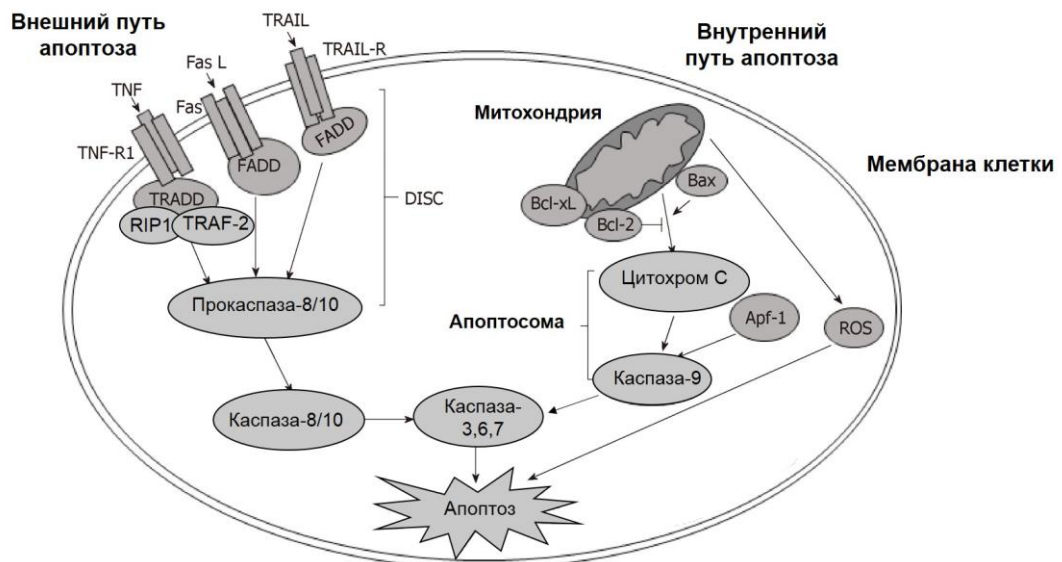


Рисунок 1.3 – Схема рецепторно-зависимого (внешнего) и митохондриального (внутреннего) путей апоптоза в клетке [135]

На рисунке представлены два пути индукции апоптоза: внешний путь через взаимодействие цитотоксических лигандов с рецепторами семейства TNF (TNF-R1, Fas, TRAIL-R), активирует аутокаталитическое расщепление прокаспаз-8 и -10 с последующей активацией эффекторных каспаз-3, -6, -7; внутренний путь реализуется на мембране митохондрий с вовлечением проапоптотической молекулы bax и антиапоптотических молекул bcl-2 и bcl-xL, активацией bax, ведущей к высвобождению цитохрома c из митохондрий, последующему его связыванию с фактором активации апоптотических протеаз Apf-1 и дальнейшему формированию апоптосомы с рекрутированием каспаз-9 и -3.

В целом, механизм индукции апоптоза для цитотоксических лигандов сходен. При этом если для FasL существует только один рецептор - Fas [225] то TRAIL и TNF α могут связываться с несколькими типами рецепторов [275, 285]. Так, для TRAIL описано 5 рецепторов, однако проводить сигнал апоптоза способны только два из них (TRAIL-R1 и TRAIL-R2), поскольку содержат в своей структуре DD. Сигнальный путь гибели клетки не запускается при связывании TRAIL с рецепторами-«ловушками» («decoy-receptors») TRAIL-R3 и TRAIL-R4, не имеющих цитоплазматического домена смерти (TRAIL-R3) либо содержащих его в виде усеченного нефункционального варианта (TRAIL-R4). Однако эти рецепторы также играют важную роль в регуляции TRAIL-индуцированного апоптоза. Оба эти рецептора могут ингибировать TRAIL-опосредованный апоптоз, конкурируя с «рецепторами смерти» TRAIL-R1 и TRAIL-R2 за связывание с TRAIL или

препятствуя передаче сигнала апоптоза. Наконец, TRAIL может связываться с остеопротегерином (OPG) [301], представляющим собой растворимый рецептор. OPG обладает слабым сродством к TRAIL, и его физиологические функции до конца не известны. Для TNF α описаны два клеточных рецептора TNF-R1 и TNF-R2 [285], однако только рецептор TNF-R1 содержит домен DD [312].

«Рецепторы смерти» при взаимодействии с соответствующими лигандами тримеризуются или олигомеризуются, рекрутируя адаптерный белок FADD (Fas-ассоциированный протеин, содержащий DD) [225, 275] или, в случае связывания TNF α с TNF-R1, белок TRADD (TNF-R1-ассоциированный DD-белок) [285]. Вслед за этим FADD (или TRADD) через эффекторные домены смерти (DED) рекрутирует инициаторные прокаспазы-8 и -10. В случае TNF α /TNF-R1-взаимодействия для проведения проапоптотического сигнала необходимо образование комплекса TRADD с другими сигнальными белками RIP1 (белок 1, взаимодействующий с рецептором) и TRAF-2 (TNF-R-ассоциированный фактор 2) с последующим рекрутированием FADD и прокаспазы-8 [214]. В результате образуются сигнальные комплексы, индуцирующие смерть (DISC), в которых происходит димеризация и активация каспазы-8 путем аутокаталитического расщепления [229]. Инициаторная каспаза-8 расщепляет прокаспазу-3, -6 и -7, эффекторов апоптоза, до формы активных ферментов [214].

Характерно, что в одних клетках-мишенях (клетки I типа) связывания лиганда с рецептором бывает достаточно для запуска программированной гибели, не вовлекая в этот процесс митохондрии, тогда как в других (клетки II типа) происходит запуск внутреннего митохондриального пути индукции апоптоза (Рисунок 1.2 и Рисунок 1.3) [229]. В этом случае активированная каспаза-8 расщепляет протеин Bid [282], относящийся к проапоптотическому семейству белков Bcl-2. Далее Bid в усеченном виде (tBid) транслоцируется в митохондрию и активирует другие молекулы семейства Bcl-2 (Bax и Bak). Эти молекулы участвуют в формировании пор в митохондриальной мембране,

способствуя тем самым выходу цитохрома *c* в цитозоль клетки [334]. Высвобождаемый из митохондрий цитохром *c* вместе с цитоплазматическим фактором Apf-1 (фактор активации апоптотических протеаз 1) участвует в активации каспазы-9, что в дальнейшем активирует эффекторные каспазы-3, -6, и -7 [50].

Таким образом, связывание цитотоксических лигандов с рецепторами смерти приводит также, как и в случае грануло-опосредованной цитотоксичности к активации каспаз-зависимых событий процесса апоптоза в мишенях.

1.3.2 Дендритные клетки как эффекторные клетки врожденного иммунитета

Еще в 1994 году было высказано предположение, что АПК могут быть задействованы в механизмах периферической деплеции Т-клеток через FasL-зависимый механизм [80]. Согласно предложенной модели, которая получила название «Decadence», АПК конститутивно экспрессируют FasL, но покоящиеся Т-клетки не чувствительны к нему, поскольку не экспрессируют рецептор Fas. Взаимодействие через Т-клеточный рецептор (TCR) с АПК приводит к активации лимфоцитов и их пролиферации. Кроме того, на активированных Т-лимфоцитах начинает экспрессироваться молекула Fas, в результате чего Т-клетки становятся чувствительны к FasL-зависимому апоптозу при повторной активации. С одной стороны, эта модель предполагала существование эффекторной функции у АПК, которая могла бы обеспечить поддержание иммунологической толерантности и регуляцию иммунного ответа на собственные антигены. С другой стороны, такая модель объясняла аутоиммунные реакции, возникающие у Fas-негативных мышей [330]. Аутореактивные Т-клетки у таких мышей не чувствительны к апоптозу,

характеризуются более длинным жизненным циклом и вызывают различные деструктивные изменения тканей и органов.

Süss G. и Shortman K. через два года подтвердили эту гипотезу на мышцах, показав, что $CD8\alpha^+$ ДК селезенки действительно экспрессируют FasL и ограничивают активацию $CD4^+$ Т клеток через FasL-зависимый механизм индукции апоптоза [307]. При этом $CD8^-$ ДК не обладают такой способностью, экспрессируют мало FasL и, в отличие от $CD8\alpha^+$ ДК, проявляют выраженные антигенпрезентирующие свойства. Lu L. и соавт. также обнаружили, что FasL-опосредованный сигнальный путь участвует не только в регуляции дендритными клетками иммунного ответа, но может быть вовлечен в реализацию апоптоз-индуцирующей активности ДК мышей против опухолевых клеток Fas^+ Т-лимфобластной линии Jurkat [202].

Примерно в это же время, в середине 1990-х, стали появляться данные об эффекторной функции ДК у человека. Одними из первых в этом направлении были работы, связанные с исследованием *in vitro* взаимоотношений ДК и Т-лимфоцитов при вирусной инфекции (вирус иммунодефицита человека HIV-1, вирус кори). Было показано, что ДК периферической крови участвовали в активации Т-клеток и их инфицировании вирусом, а также при со-культивировании индуцировали апоптоз [57] или подавляли пролиферацию антиген-реактивных лимфоцитов [109]. В данном случае описанный феномен был представлен как одно из важных звеньев патогенеза вирусной инфекции и роли ДК в ее прогрессии. Однако, не было известно, какие цитотоксические молекулы задействованы в этом процессе. Авторы предположили, что сам вирус стимулирует экспрессию на ДК каких-то лигандов, за счет которых осуществлялся киллинг Т-клеток. Действительно, Beaulieu S. и соавт. на примере ДК тимуса человека продемонстрировали стимулирующее влияние HIV-1 как на продукцию дендритными клетками растворимых цитотоксических факторов FasL и $TNF\alpha$, так и на цитотоксическую активность ДК против активированных $CD4^+$ и $CD8^+$ тимоцитов, но не покоящихся МНК ПК [34].

Далее Fanger N.A. и соавт. показали, что миелоидные CD11c⁺ ДК в ответ на 12-часовую стимуляцию IFN α или IFN γ обладали киллерной активностью против различных опухолевых линий, чувствительных к TRAIL (клетки Т-лимфобластной линии Jurkat, линии рака яичника OVCAR3, линии меланомы WM, линии карциномы простаты PC-3) [101]. Описанный феномен позволил предположить, что миелоидные CD11c⁺ ДК, наряду с другими эффекторными клетками, обладают патрулирующей функцией в организме и способны уничтожать спонтанно возникающие опухолевые клетки. При этом в отличие от других лимфоидных и миелоидных клеток (Т-клетки, НК-клетки, МФ), которые экспрессируют TRAIL и могут использовать эту молекулу для индукции гибели клеток-мишеней, TRAIL-позитивные ДК могут приводить к образованию апоптотических фрагментов, которые в дальнейшем захватываются ДК, процессируются и представляются в комплексе с молекулами МНС I класса CD8⁺ Т клеткам, то есть стимулируя таким образом ЦТЛ-ответ [14].

На сегодняшний день цитотоксическая функция продемонстрирована для различных типов дендритных клеток, хотя механизмы ее реализации и биологическая значимость остаются во многом неизученными.

1.3.3 Основные механизмы цитотоксической активности дендритных клеток человека

Проведенные за последние 20 лет исследования позволили выяснить основные механизмы цитотоксической активности ДК. Как и классические эффекторные клетки, ДК, циркулирующие в ПК человека, экспрессируют различные типы молекул с проапоптогенной активностью. Такое фенотипическое разнообразие, предположительно, позволяет им в максимальной степени проявлять цитотоксическую активность против клеток-мишеней разных гистологических типов, отличающихся между собой по

чувствительности к лизису. При этом для мДК продемонстрирован более широкий спектр экспрессии цитотоксических молекул по сравнению с пДК. Так, медиаторы грануло-опосредованной цитотоксичности перфорин и гранзим Б, которые обычно действуют в паре против клеток-мишеней, обнаружены только в мДК [302], тогда как в пДК детектируется только гранзим Б [138]. Среди молекул семейства TNF хорошо изученной и чаще всех выявляемой является молекула TRAIL, которая экспрессируется на поверхности и внутриклеточно в мДК [101, 201] и пДК [302, 303]. Также на обоих типах ДК периферической крови экспрессируется FasL [201, 353]. Кроме того, для мДК характерна экспрессия $\text{TNF}\alpha$ и $\text{TNF}\beta$ (лимфотоксин $\text{LT}\alpha\beta$).

Вполне вероятно, что разнообразие цитотоксических лигандов, экспрессируемых ДК крови не ограничивается этим списком, и при определенных условиях ДК могут индуцировать гибель клеток-мишеней через другие механизмы. Действительно, ДК моноцитарного происхождения (генерируемые из CD14^+ моноцитов периферической или пуповинной крови) при обработке различными стимулами (ЛПС, $\text{IFN}\alpha$, $\text{IFN}\beta$, $\text{IFN}\gamma$ и др.) демонстрируют более широкий профиль экспрессии эффекторных молекул. Полученные *in vitro* ДК могут экспрессировать практически все типы цитотоксических лигандов: молекулы литических гранул перфорин и гранзим Б [40], медиаторы семейства TNF – $\text{TNF}\alpha$ [201], TRAIL [163, 291], FasL [40, 201], лимфотоксин [201], а также метаболит NO – пероксинитрит [169].

Как известно, основная доля ДК находится в тканях и органах. Клетки Лангерганца, один из типов мДК, сосредоточены в базальных слоях эпидермиса кожи и слизистых, то есть зонах, пограничных с внешней средой. Эти клетки адаптированы к захвату антигена и его процессингу, затем они способны мигрировать в лимфатический узел и представлять антигены Т-клеткам. Киллерная активность клеток Лангерганца, продемонстрированная несколькими авторами и реализуемая через TRAIL- [249] и FasL-зависимый [294] сигнальные пути, может указывать на то, что киллерная функция

представляет собой один из важных этапов дифференцировки этих клеток с точки зрения формирования локального иммунного ответа на чужеродный патоген.

Проапоптогенные молекулы также обнаружены и на ДК-резидентах лимфоидных тканей и органов. Резидентные ДК попадают в лимфоидные органы на стадии незрелых клеток и даже клеток-предшественников и в процессе дифференцировки и созревания уже не покидают его, презентирова антигены (как свои, так и чужие) в пределах органа. Показано, что ДК тимуса в ответ на вирусную нагрузку (HIV-1) секретируют FasL и TNF α [34].

Суммируя накопленные данные, можно сказать, что для ДК наиболее распространенными и изученными эффекторными молекулами являются гранзим Б как медиатор грануло-опосредованной цитотоксичности и молекула семейства TNF TRAIL, медирующая рецепторно-зависимую цитотоксичность.

1.3.4 Клетки-мишени для цитотоксических дендритных клеток

Что касается мишеней, то цитотоксическую активность ДК рассматривают прежде всего с позиции противоопухолевого иммунного ответа. Показано, что ДК обладают прямым цитотоксическим действием против различных опухолевых линий – гематологических (различные лимфомы и лейкозы), эпителиальных (карцинома кожи, слизистых, внутренних органов) [139, 291, 324]. Кроме того, ДК способны индуцировать гибель первичных опухолевых клеток, полученных от пациентов с онкопатологией (опухоли головы шеи, гемобластозы, рак легкого и др.) [139, 165, 318]. Вирус-инфицированные клетки, как уже упоминалось, также являются клетками-мишенями для ДК, в частности, инфицированные вирусом папилломы человека (HPV) кератиноциты и клетки цервикального эпителия, а также ряд опухолевых линий, клетки которых характеризуются повышенной экспрессией рецепторов смерти (TRAIL-R1/R2) по сравнению с

неинфицированными клетками. Кроме того, цитотоксическая активность ДК может быть направлена на элиминацию вирус-инфицированных лимфоцитов [189, 303].

Эффекторная функция ДК может также иметь большое значение для регуляции активированных $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток при их взаимодействии с ДК [218, 350].

Кроме того, ДК обладают цитотоксичностью против нормально пролиферирующих эндотелиальных клеток, что также может иметь важное значение с точки зрения подавления ангиогенеза в опухоли [139] или негативного влияния на процессы иммунорегуляции при аллотрансплантациях [209]. При этом важно отметить, что ДК не оказывают цитотоксического действия на нормальные соматические клетки (фибробласты, кератиноциты, меланоциты, клетки скелетной мускулатуры, аутологичные Т-бласты) [101, 139, 303].

1.3.5 Цитотоксические дендритные клетки и опухоль

1.3.5.1 Дендритные клетки моноцитарного происхождения

Наиболее полно прямая противоопухолевая цитотоксическая функция изучена на ДК, генерированных из моноцитарных предшественников в присутствии различных цитокинов.

Исследование цитотоксической активности показали, что ДК, генерированные из моноцитов в присутствии цитокинов IL-4, IL-15 или $IFN\alpha$, экспрессируют в той или иной степени основные проапоптогенные молекулы и способны индуцировать гибель различных типов опухолевых клеток через рецепторно-опосредованный и грануло-зависимый механизмы апоптоза со всеми присущими характеристиками этого процесса (Таблица 1.3.1). При со-культивировании с ДК апоптоз в опухолевых клетках развивается достаточно быстро, начальные этапы апоптоза в опухолевых клетках по данным

некоторых авторов регистрируются через полчаса после взаимодействия с ДК [139]. ДК эффективно индуцируют апоптоз-специфическую фрагментацию ДНК в ядрах опухолевых клеток в первые часы после взаимодействия, следом наблюдаются митохондриальные повреждения (через 3 – 24 ч), на более поздних сроках (через 24 – 72 ч) уже регистрируются повреждения мембраны клеток и деградация ядерных белков [139].

Таблица 1.3.1 – Цитотоксическая активность дендритных клеток против опухолевых клеток

Тип ДК	Медиаторы	Мишени
1	2	3
ИЛ4-ДК (ЛПС, IFN) [320]	Bid, каспаза-8	Molt-4, Jurkat, НСТ-15, MCF-7, U-87, A498 и др.
Незрелые ИЛ4-ДК [139, 201]	mTNF α , TRAIL, FasL, LT α , LT β	Лейкозы, линии солидных опухолей, первичные клетки опухоли головы и шеи
зрелые ИЛ4-ДК (CD40L) [139]	sTNF α , sFasL	PCI-4B SCCHN
ИЛ4-ДК пуповинной крови (ЛПС, IFN γ) [291]	Внутриклеточный TRAIL	HL60, Jurkat, Daudi cells
CD123 ⁺ CD11c ⁺ ИЛ4-ДК пуповинной крови [292]	Внутриклеточный TRAIL	Jurkat, U937, HL60 (цитостический эффект)
ИЛ15-ДК (+TLR7/8L R848, TNF α , IFN γ , ПГЕ2) [19]	TRAIL, гранзим Б, CD56	K562, U937
ИФН-ДК [162]	TRAIL, гранзим Б	K562
ИФН-ДК (ОК-432) [163]	TRAIL, CD56 FasL	K562 Mia Pa Ca 2
CD11c ⁺ ДК ПК (ЛПС, IFN γ , IL-15) [210]	sTNF α	Опухолевые линии РМЖ
IL-15-активированные мДК (ЛПС) [132, 165]	TRAIL, mTNF α	K562, Jurkat, лимфомные линии

продолжение Таблицы 1.3.1

1	2	3
Перитуморальные CD11c ⁺ HLA-DR ⁺ ДК [302]	Перфорин, гранзим Б, TNF α , iNOs	
Перитуморальные CD123 ⁺ HLA-DR ⁺ [302]	TRAIL	
CD11c ⁺ HLA-DR ⁺ ДК ПК [302]	Перфорин, гранзим Б	K562
CD123 ⁺ HLA-DR ⁺ ДК ПК [302]	TRAIL	Jurkat
CD3 ⁻ TCR $\alpha\beta$ ⁻ CD14 ⁻ CD1 9 ⁻ CD16 ⁻ CD56 ⁻ CD11b ⁻ C D4 ⁺ HLA-DR ⁺ ДК ПК [139, 201]	mRNA mTNF α , TRAIL, FasL, LT α , LT β	PCI-13 SCCHN
CD1c ⁺ мДК ПК [9]	TRAIL	Jurkat
CD123 ⁺ пДК ДК [9]	TRAIL	Jurkat

Примечание: в таблице приведены данные об экспрессии цитотоксических молекул (Медиаторы) и мишенях цитотоксической активности различных типов ДК. Для каждого типа ДК в скобках указан способ активации/индукции созревания. РМЖ – рак молочной железы.

Кроме внешнего пути апоптоза, ДК могут также индуцировать апоптотический сигнал в опухолевых мишенях на митохондриальном уровне, активируя Bid [320], проапоптотическую молекулу семейства Bcl-2, что приводит к активации митохондриального пути [67, 93].

Наряду с цитотоксическим эффектом, ДК способны ингибировать пролиферацию опухолевых клеток и тем самым останавливать рост опухоли [183, 292, 321].

Использование различных протоколов получения *in vitro* ДК из моноцитарных предшественников влияет не только на антигенпрезентирующие свойства, но также может определять различия в киллерных свойствах ДК. Так, показано, что для ИФН-ДК и ИЛ15-ДК

характерна более выраженная цитотоксичность (и цитостатичность) по сравнению со стандартно генерируемыми ИЛ4-ДК против ряда опухолевых линий, чувствительных к грануло-опосредованному [19, 162] и TRAIL- и FasL-зависимому лизису [184]. Можно предположить, что это связано с прямым стимулирующим влиянием $IFN\alpha$ и IL-15 на регуляцию экспрессии проапоптотических молекул, вовлеченных в реализацию цитотоксической активности ДК. Эти предположения подтверждаются исследованиями некоторых авторов. Наряду с транскрипционными факторами, которые относятся к $IFN\alpha$ -ассоциированному сигнальному пути (STAT-1, IRF7, IFN -ISGF3 и др.), ИФН-ДК отличаются от ИЛ4-ДК высоким уровнем экспрессии мРНК цитотоксических молекул гранзима Б и М, TRAIL, дефензима- $\alpha 1$, являющихся важной составляющей цитотоксической функции киллерных клеток [162]. Кроме того, интактные ИФН-ДК характеризуются высокой экспрессией самой молекулы TRAIL [162, 163], а также продукцией гранзима Б, который почти не секретируется ИЛ4-ДК [162].

Что касается IL-15, то, как известно, этот цитокин стимулирует цитотоксическую функцию клеток-эффекторов [59, 305, 309], активируя в них STAT- и PIK3-зависимые сигнальные пути [146, 226] и влияя тем самым на экспрессию основных проапоптотических медиаторов (TRAIL, FasL, перфорин и гранзим Б) как на уровне мРНК [305], так и на уровне белков [59]. По-видимому, подобный эффект IL-15 проявляет и в отношении ДК, однако эти предположения нуждаются в дальнейшей проверке.

Также на клеточной мембране ИФН-ДК и ИЛ15-ДК присутствует НК-клеточный маркер CD56 [19, 163, 238], уровень экспрессии которого коррелирует с выраженностью противоопухолевой цитотоксической активности [163]. На ИЛ4-ДК эта молекула не обнаружена.

1.3.5.2 Миелоидные дендритные клетки

Исследования киллерной активности ДК не ограничиваются только данными *in vitro*. Выделенные из периферической крови человека незрелые миелоидные CD11c⁺ ДК экспрессируют во внутриклеточном компартменте различные проапоптогенные лиганды, в том числе TRAIL, FasL, TNF α [101, 132, 165, 201] и медиаторы грануло-опосредованной цитотоксичности перфорин и гранзим Б [302], а также могут проявлять цитотоксичность против перевиваемых опухолевых линий (лейкозы, меланома, рак легкого, кишечника и др.) и первичных опухолевых клеток, полученных из фрагментов опухоли пациентов (опухоли головы и шеи) [139]. Поскольку незрелые мДК существуют при нормальном гемопоэзе и циркулируют в периферии, то, следовательно, они могут мигрировать в опухоль и быть медиаторами цитотоксической активности. На моделях меланомы показано, что введенные мышам в опухоль генерированных из КМ-предшественников ДК в течение 36 часов мигрируют в лимфатические узлы, дренирующие опухоль, где уже презентируют меланомные антигены Т-лимфоцитам через МНС I и МНС II молекулы [167]. Вероятно, инициируемый дендритными клетками процесс апоптоза в опухолевых клетках и последующее поглощение фрагментов апоптотических клеток дендритными клетками тесно связаны. Что касается исследований у человека, то накоплены данные о том, что при различных типах опухоли (рак молочной железы, рак легкого, меланома) большее количество ДК в опухолевом микроокружении [32, 48, 54, 197, 260], а также внутриопухолевое введение ДК [198, 319] ассоциировано с более благоприятным прогнозом. Однако, вопрос о том, через какие механизмы и какие сигнальные пути ДК регулируют противоопухолевый иммунитет в иммуносупрессивном опухолевом микроокружении, остается открытым. По-видимому, ДК активируют Т-клеточный ответ и обеспечивают рекрутирование эффекторных клеток [48]. С другой стороны, сами ДК могут выступать в роли эффекторных клеток, участвуя в регрессии опухоли. Об этом

свидетельствует тот факт, что применение синтетического агониста TLR7/8 (имиквимода) у пациентов с базально-клеточной карциномой ассоциируется с увеличением в опухолевом микроокружении CD11c⁺HLA-DR⁺ мДК, экспрессирующих перфорин и гранзим Б, и уменьшением размеров опухоли [302].

1.3.5.3 Плазмоцитоидные ДК

Чаще всего накопление пДК в опухоли (при раке молочной железы, меланоме, раке яичника, опухоли головы и шеи) ассоциируется с их незрелым фенотипом, подавлением продукции IFN I типа, толерогенными свойствами ДК, плохим прогнозом, прогрессией опухоли и метастазированием [86]. Это обусловлено продукцией опухолевыми клетками и микроокружением супрессорных медиаторов (TGF- β , IL-10, ПГЕ2 и др.). С другой стороны, есть данные о том, что TLR7/8-опосредованная активация пДК приводит к их мобилизации в опухоль, и в этом случае присутствие пДК, наоборот, ассоциируется с опухолевой регрессией [302].

При эпителиальных опухолях кожи нанесение упоминавшегося в предыдущем разделе синтетического лиганда к TLR7/8 имиквимода в качестве крема на пораженные участки демонстрирует положительный клинический эффект и регрессию опухоли [133, 302]. С одной стороны, лиганд сам обладает прямым цитотоксическим действием, запуская активацию каспаз и далее апоптоз опухолевых клеток [133]. С другой стороны, он оказывает иммуномодулирующий эффект на различные клетки, и прежде всего на пДК. При этом имиквимод не только активирует антигенпрезентирующие свойства пДК (за счет увеличения экспрессии молекул HLA-DR, CD40, CD80, CD86, усиления стимулирующей активности пДК на пролиферацию Т-клеток и высокой продукции хемокинов) [133, 148], но и трансформирует пДК в потенциально киллерные клетки, стимулируя в них экспрессию

цитотоксических молекул TRAIL и гранзима Б [22, 148]. В экспериментальных моделях показано, что именно пДК и их киллерная активность является одним из ключевых механизмов противоопухолевого действия препарата, поскольку только деплеция TLR7⁺ пДК, а не других эффекторных клеток (В-клеток, ЦТЛ, NK-клеток) отменяла противоопухолевый эффект имиквимода [92]. В данном случае механизм цитотоксической активности пДК был связан с гранзимом Б и TRAIL. У человека присутствие TRAIL⁺ пДК в месте нанесения крема подтверждено иммуногистохимически [302]. При этом TRAIL⁺CD123⁺ пДК плотно окружали опухолевые TRAIL-R1⁺ клетки, что указывает на межклеточные TRAIL/TRAIL-R1-взаимодействия.

Учитывая имеющиеся на сегодняшний день данные, можно предположить, что TRAIL- и гранзим Б-экспрессирующие пДК являются важным звеном противоопухолевого иммунного ответа. Показано, что циркулирующие в ПК незрелые пДК уже могут конститутивно экспрессировать мРНК цитотоксических лигандов, но почти не проявляют цитотоксическую активность против опухолевых мишеней [211]. TLR7-, а также TLR9-опосредованная активация этих клеток усиливает экспрессию TRAIL и гранзима Б и обеспечивает реализацию цитотоксической активности пДК [63, 148, 211, 314]. Какие механизмы вовлечены в распознавание дендритными клетками опухолевых клеток неизвестно. При этом медиатором цитотоксической активности пДК может выступать не только мембранная, но и растворимая форма TRAIL, инициируя таким образом индукцию гибели клеток-мишеней в отсутствии клеточно-контактного взаимодействия [262].

1.3.6 Регуляция цитотоксической активности дендритных клеток

Цитотоксическая активность ДК против опухолевых клеток находится под регулирующим влиянием различных факторов, которые могут стимулировать или, наоборот, снижать эту функцию.

Цитокины. Как уже было описано в предыдущих разделах одним из важных позитивных регуляторов цитотоксической активности ДК является IFN α . Помимо использования в протоколе генерации ДК из моноцитов, обработка IFN α мДК ПК увеличивает цитотоксичность ДК против опухолевых мишеней [101]. Кроме того, продуцируемый самими ДК IFN α по аутокринному механизму активирует цитотоксичность мДК и пДК [9, 63], а также Мо-ДК [324]. Этот эффект объясняется прежде всего IFN α -индуцированной экспрессией лиганда TRAIL на ДК, поскольку экспрессия гена этой молекулы находится под прямым контролем IFN I типа. По этой же причине подобным действием обладает и IFN β [195].

К цитокинам, оказывающим стимулирующий эффект на противоопухолевую цитотоксическую активность ДК, можно отнести IL-15, который трансформирует покоящиеся мДК периферической крови в функционально активные TRAIL- и TNF α -экспрессирующие киллерные клетки [132, 165].

Для CD123⁺ пДК ПК активационным стимулом киллерной функции может быть IL-3 [49], который является фактором роста для пДК, а также комбинация IL-3 и CD40L [211]. Характерно, что указанные модуляторы стимулируют экспрессию гранзима Б в пДК, однако в случае использования только одного IL-3 цитотоксическая активность пДК против клеток K562 реализуется через гранзим Б. При сочетании IL-3 и CD40L лизис K562 связан с экспрессией пДК молекулы TRAIL. По-видимому, разные результаты авторов против одних и тех же опухолевых мишеней связаны с различной степенью зрелости изучаемых пДК, поскольку CD40L является мощным стимулятором не только дифференцировки предшественников в пДК, но также и их дальнейшего созревания в функционально зрелые ДК [122].

К негативным регуляторам можно отнести иммуносупрессорный цитокин TGF- β , продуцируемый регуляторными CD4⁺CD25⁺ Т-клетками, поскольку показано его ингибирующее действие на цитотоксическую активность ИФН-ДК за счет подавления экспрессии на них молекулы TRAIL [265].

TLR-стимуляция. Кроме цитокинов, активировать или усиливать цитотоксические свойства ДК способны различные лиганды к паттерн-распознающим рецепторам. Одним из таких подходов является стимуляция рецептора TLR4, типичного для мДК и ДК, генерируемых в культуре *in vitro* из моноцитов, липополисахаридом [132, 165, 169, 210] или препаратом на основе лиофилизированного стрептококка ОК-432 [163], применяемого в лечении различных типов опухоли. Учитывая тот факт, что TLR4-опосредованный сигнальный путь ведет к синтезу провоспалительных медиаторов, механизмы цитотоксической активности в этом случае связаны с экспрессией дендритными клетками TNF α (растворимой и мембранной формы) [132, 210] и пероксинитрита [169]. Кроме того, ЛПС- или ОК-432-активированные ДК экспрессируют TRAIL [163, 165] и FasL [163].

Стимуляция внутриклеточных TLR, распознающих нуклеотид-содержащие структуры, в частности РНК (для TLR3, TLR7 и TLR8) и неметилированные CpG олигонуклеотиды (для TLR9), также позволяет получить киллерные ДК. Poly(I:C), синтетический аналог вирусной двуцепочечной РНК, через TLR3 стимулирует TRAIL-медируемую цитотоксичность генерированных *in vitro* Мо-ДК, которая контролируется аутокринной продукцией IFN β [325]. Аналогичный механизм продемонстрирован для мДК и Мо-ДК в ответ на стимуляцию TLR7/8 [19, 302] и для пДК – на стимуляцию TLR7 и TLR9 [63, 148, 211, 302]. В этих случаях экспрессия TRAIL контролируется аутокринной продукцией IFN α , которая в свою очередь усиливается при стимуляции TLR7/8 и TLR9.

Кроме описанного в предыдущих разделах синтетического агониста TLR7/8, еще одно перспективное и популярное в настоящее время направление в лечение опухолей – это использование онколитических вирусов в качестве инструмента для прямого цитопатического действия на опухоль, а также для активации противоопухолевого иммунного ответа [9]. Показано, что одним из механизмов противоопухолевой активности онколитических вирусов, в частности вируса кори, может быть усиление против TRAIL-

чувствительных мишеней цитотоксической активности как пДК, так и мДК, которые распознают вирусную ssRNA через TLR7 и RIG-I-подобные рецепторы (RLRs) или только через RLRs, соответственно.

Индукция созревания. Перечисленные выше факторы являются классическими стимулами, инициирующими активацию и созревание ДК, сопровождающееся фенотипическими и функциональными изменениями – повышением экспрессии ко-стимуляторных молекул и МНС молекул, низкой фагоцитарной активностью и высокой способностью индуцировать Т-клеточный пролиферативный ответ [216, 316]. Анализируя работы различных авторов, можно полагать, что процесс дифференцировки и созревания всех типов ДК ассоциируется и с активацией цитотоксических свойств ДК против опухолевых мишеней. Однако, при более детальном изучении было показано появление на поверхности ДК или в их внутриклеточном компартменте проапоптогенных лигандов уже в первые часы (через 4 часа) после стимуляции TLR рецепторов [63, 78], тогда как ко-стимуляторные молекулы (CD40 и CD80) появляются позже [63].

Работам, где цитотоксическая активность и созревание ДК прямо коррелирует, можно противопоставить несколько исследований, в которых показано, что менее зрелые ДК обладают более выраженной цитотоксической активностью. Например, процесс созревания ИЛ4-ДК под действием CD40L сопровождается не только изменением их фенотипа и усилением антиген-презентирующей способности, но и снижением их цитотоксической активности против опухолевых клеток [201]. Одним из объяснений может служить то, что при созревании многие мембранные формы лигандов переходят в секреторные (TRAIL, FasL, TNF α), соответственно, при клеточно-клеточных взаимодействиях шеддинг мембранных лигандов может играть критическую роль в реализации цитотоксической активности ДК. С другой стороны, супернатанты, а не сами CD40L-стимулированные ДК способны индуцировать гибель опухолевых мишеней, что указывает на вовлеченность растворимых факторов в механизмы цитотоксической активности ДК. С точки

зрения биологической значимости цитотоксической функции ДК стоит отметить способность CD40L индуцировать более продвинутую степень зрелости ДК [56], при которой на первый план выходит именно их антиген-презентирующая способность. Учитывая эти данные, а также данные о времени экспрессии проапоптогенных и ко-стимуляторных молекул при активации ДК через TLR рецепторы, логично предположить, что менее зрелые ДК первоначально выполняют функцию киллерных клеток, которые потенциально могут вызывать гибель опухолевых клеток, затем поглощают апоптотические фрагменты, процессируют, а более зрелые ДК, уже антиген-нагруженные, мигрируют в дренирующие лимфатические узлы и презентируют опухолевые антигены и запускают активацию и экспансию антиген-специфичных Т-клеток. Кроме того, снижение апоптоз-индуцирующей активности ДК может быть еще и защитным механизмом для Т-клеток.

1.3.7 Роль цитотоксической активности дендритных клеток в иммунном надзоре при опухолевом росте

Иммуноредактирование опухоли – это процесс подавления роста опухоли, который включается в том случае, когда внутренние механизмы защиты клеток не могут блокировать трансформацию нормальных клеток в опухолевые клетки. Полноценная модель опухолевого иммуноредактирования состоит из трех последовательных фаз: элиминации, равновесия и избегания. В контексте модели иммунного редактирования опухоли ДК являются индукторами и регуляторами иммунного ответа. Однако, каким образом с этой моделью соотносится цитотоксическая функция ДК еще предстоит разобраться. Гипотетически цитотоксические ДК могут участвовать во всех трех стадиях этой модели и могут как способствовать элиминации опухолевых клеток, так и облегчать ускользание опухоли от

иммунного надзора. Подробно эта модель была описана в обзоре Hanke N. и соавт. [129].

На стадии элиминации (Рисунок 1.4), когда опухолевые клетки распознаются иммунной системой, ДК вместе с другими эффекторными клетками (нейтрофилы, МФ, NK-клетки) могут осуществлять киллинг опухолевых клеток. Такое разнообразие цитотоксических механизмов может способствовать эффективному удалению трансформированных клеток. Возможно, потом ДК переключаются на выполнение функции АПК, представляя опухолевые антигены CD4⁺ и CD8⁺ клеткам в дренирующих лимфатических узлах.

На второй стадии, стадии равновесия, которая, как правило, самая длинная и может длиться десятилетиями, иммунная система уже не может полностью уничтожить опухоль, но еще в состоянии эффективно ограничивать ее рост за счет различных механизмов, включая CD8⁺ Т-клеточный ответ, продукцию IL-12 и INF- γ , а также, вероятно, цитотоксичность/цитостатичность ДК. Эти механизмы необходимы для поддержания опухолевых клеток в состоянии функциональной латентности/покоя.

Переход к третьей фазе, фазе избегания, ознаменует утратой опухолью антигенов, нарушениями процессов распознавания, процессинга и презентации антигена, индукцией иммуносупрессии как в пределах опухолевого микроокружения, так и на системном уровне. В этом случае опухоль становится резистентна к иммунной системе и происходит ее неконтролируемый рост. На стадии избегания вполне возможно, что цитотоксическая функция ДК становится уже дефектной. Действительно, несколько исследований продемонстрировали нарушения способности ДК больных хроническим миелолейкозом [132, 165] лизировать опухолевые клетки. Поскольку ДК генерировались *ex vivo*, можно предположить, что выявленные изменения функциональной активности ДК обусловлены нарушениями на уровне непосредственно клеток-предшественников, то есть

циркулирующих моноцитов. Однако какова роль моноцитов в детерминировании цитотоксической функции ДК, особенно при онкопатологии, до сих пор остается неизвестно.

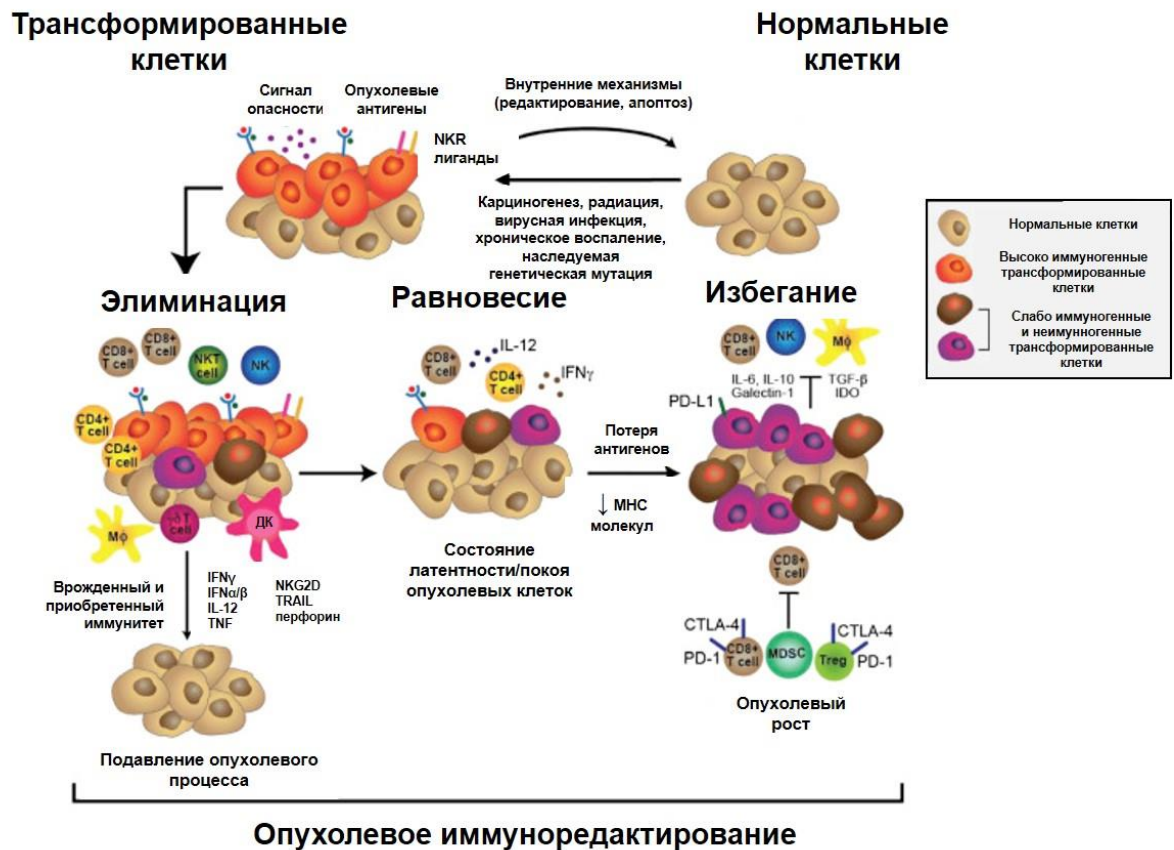


Рисунок 1.4 – Модель опухолевого иммуноредактирования [281]

На этапе элиминации клетки врожденного и приобретенного иммунитета способны бороться с возникающими опухолевыми клетками задолго до того, как опухоль станет проявляться клинически. Фаза равновесия связана с присутствием опухолевых клеток, ускользнувших от иммунного ответа на стадии элиминации, и поддерживается исключительно клетками приобретенного иммунитета. На стадии равновесия генетически нестабильные опухолевые клетки могут утрачивать опухоль-ассоциированные антигены, становятся резистентными к эффекторным механизмам и способны индуцировать генерацию иммуносупрессивного микроокружения, что в конечном итоге приводит к нарушениям в представлении антигена и развития антиген-специфического ответа. Такие опухолевые клетки переходят в фазу избегания, при которой рост опухоли больше не может сдерживаться иммунной системой. На этой стадии опухолевый процесс становится клинически выраженным. ДК – дендритные клетки; МФ – макрофаги; CD4⁺ T cell – CD4⁺ T-клетки; CD8⁺ T cell – CD8⁺ T-клетки; NKT cell – NKT-клетки; $\gamma\delta$ T cell – $\gamma\delta$ T-клетки; Treg – Трег; MDSC – миелоидные супрессорные клетки; PD-1 – рецептор гибели клеток 1; CTLA-4 – антиген цитотоксических лимфоцитов 4; IDO – индоламин-2,3-диоксигеназа 1.

Ограничивать цитотоксический потенциал ДК напрямую могут и супрессорные цитокины, секретируемые опухолью и клетками опухолевого микроокружения, как это было показано для Трег-индуцированного подавления экспрессии TRAIL и TRAIL-зависимой цитотоксичности ДК через продукцию TGF- β [265]. Кроме того, иммуносупрессорные факторы могут нарушать процесс созревания ДК, и тогда они после осуществления киллерной функции и поглощения опухолевых антигенов в отсутствии достаточного активационного сигнала могут становиться толерогенными и вызывать анергию Т-клеток, а также индуцировать генерацию регуляторных Т-клеток и миелоидных супрессорных клеток. Таким образом, цитотоксическая функция может способствовать формированию толерогенной активности ДК.

Несмотря на имеющиеся сегодня сведения, многое относительно противоопухолевой цитотоксической функции ДК остается неизвестным. До сих пор неизвестны механизмы распознавания опухолевых клеток дендритными клетками, каким образом киллерные ДК различают нормальные и трансформированные клетки. Актуальным остается вопрос о том, может ли распознавание опухолевых клеток киллерными ДК вызывать созревание ДК *in vivo* и влиять на последующее развитие эффективного противоопухолевого иммунного ответа. Кроме того, учитывая гетерогенность ДК, не исключено, что тип ДК может влиять на события и механизмы иммунного редактирования опухоли.

1.4 Общая характеристика глиом головного мозга

Глиомы головного мозга составляют почти 80 % всех первичных злокачественных опухолей центральной нервной системы (ЦНС). В подавляющем большинстве случаев глиомы представлены опухолями, развивающимися из клеток астроцитарного ряда, реже из олигодендроцитов. Другие опухоли ЦНС (эпендимомы, хориоидпапилломы, нейробластомы и др.) относятся к нейроэктодермальным новообразованиям, однако в рамках

группы глиом обычно не рассматриваются, т.к. существенно отличаются от них по биологическим и клиническим характеристикам.

Согласно классификации Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), выделяют четыре степени злокачественности глиом (Grade I, II, III, IV) [88], каждая из которых характеризуется своими гистологическими признаками [127]. Глиомы низкой степени злокачественности (Grade I – II) отличаются медленным ростом и высокой степенью дифференцировки клеток, но в то же время способны в дальнейшем переходить к более высокой степени злокачественности. Для глиом Grade III (анapластическая астроцитома) свойственен диффузный инфильтративный рост, преимущественно в больших полушариях мозга. Гистологически эта стадия злокачественности характеризуется ядерной атипией, повышением клеточности и значительной пролиферативной активностью. Наиболее злокачественная форма глиом головного мозга – это глиобластома (Grade IV), максимально активная и быстрорастущая опухоль, состоящая из низкодифференцированных или недифференцированных глиальных клеток, с признаками ядерной атипии, клеточным полиморфизмом, тромбозами сосудов, микроваскулярной пролиферацией и очагами некроза.

Глиобластома (ГБ) представляет собой одну из наиболее часто встречающихся первичных злокачественных опухолей головного мозга, составляя до 60 % всех опухолей головного мозга и примерно треть всех первичных опухолей ЦНС у взрослых [2, 313]. Встречаемость ГБ составляет 3,2 на 100 000 человек [236]. Несмотря на проводимое лечение, прогноз для пациентов с ГБ неблагоприятен; медиана выживаемости, по разным данным, не более 15 месяцев [313], 5-летняя выживаемость – менее 5 % [235].

ГБ разделяют на первичные, то есть образованные *de novo*, и вторичные, трансформированные из глиальных опухолей головного мозга меньшей степени злокачественности. В большинстве случаев встречаются именно первичные ГБ, которые обычно поражают людей более старшего возраста и характеризуются плохим прогнозом по сравнению со вторичными ГБ [6, 336].

Также выделяют 4 типа ГБ – классический, пронеуральный, нейральный, мезенхимальный, каждый из которых характеризуется своими клиническими признаками и прогнозом выживаемости.

Анализ профиля генов выявил три основные группы сигнальных путей, в наибольшей степени активированных в клетках первичных и вторичных ГБ: 1) p53-зависимый путь; 2) сигнальный путь, связанный с рецепторной тирозинкиназой, Ras-белками и фосфатидилинозитол-3-киназой; 3) ретинобластомный путь [243]. Перечисленные сигнальные пути участвуют в неконтролируемой клеточной пролиферации и повышают выживаемость клеток, что обеспечивает опухолевым клеткам избегать контрольных точек регуляции клеточного цикла, старения и апоптоза [64].

Кроме того, для первичных ГБ характерны такие нарушения, как повышенная экспрессия гена рецептора эпидермального ростового фактора (EGFR), мутации фосфатазы и гомолога тензина (PTEN), потеря 10q хромосомы. Во вторичных ГБ наблюдаются мутации фермента изоцитрат дегидрогеназы 1 (IDH1), белка p53, а также потеря 19q хромосомы [1, 15, 336, 346].

1.5 Механизмы иммуносупрессии глиом головного мозга

Развитие и рост опухоли связаны с различными механизмами, которые позволяют ей ускользать от иммунного надзора и создают оптимальные условия для опухолевой прогрессии [5]. Клетки злокачественных глиом и клетки опухолевого микроокружения секретируют цитокины и различные ростовые факторы (IL-6, IL-10, TGF- β , ПГЕ2, IL-1, фактор роста фибробластов bFGF), которые в свою очередь стимулируют рост и пролиферацию опухолевых клеток, ангиогенез, метастазирование, а также индуцируют генерацию клеток с иммуносупрессорной активностью (Трег, М2-подобные макрофаги, миелоидные супрессорные клетки) [105, 137, 242, 264].

Клетки микроглии, имеющие миелоидное происхождение и играющие важную роль в поддержании роста аксонов, экспрессируют лиганд к рецептору программируемой клеточной смерти (PD-L1, B7-H1 или CD274) и FasL, что способствует индукции апоптоза Т-клеток, необходимых для развития противоопухолевого иммунного ответа [26, 91, 205, 327].

Кроме того, гипоксические условия в опухолевом микроокружении, как результат усиленного потребления кислорода быстро пролиферирующими клетками и неадекватной васкуляризации, стимулирует экспрессию генов, вовлеченных в рост опухоли и процессы ангиогенеза (синальный трансдуктор и активатор транскрипции 3 (STAT3), гипоксия-индуцибельный фактор 1 (HIF-1 α), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и др.) [333].

Как известно, антигены, высвобождающиеся из разрушенных опухолевых клеток, поглощаются и презентуются АПК через молекулы МНС I класса цитотоксическим Т-клеткам [144], однако до сих пор нет полной ясности, где именно происходит презентация антигена цитотоксическим Т-клеткам: в головном мозге или за его пределами, на периферии [212]. Основным представителем миелоидных клеток в мозге является микроглия, клетки которой, по предположениям исследователей, презентуют антигены цитотоксическим Т-лимфоцитам в пределах ЦНС [104, 140]. Однако, иммуносупрессивное микроокружение ГБ подавляет экспрессию МНС молекул на клетках микроглии, и следовательно, антиген-презентирующую способность [25, 104].

Исследования Beauvillain С. и соавт. показали, что на самом деле опухоль-инфильтрирующие ДК играют большую роль в презентации антигенов в ГБ [35]. Согласно полученным ими данным, ДК более эффективно в сравнении с неонатальной микроглией праймировали экзогенные антигены цитотоксическим Т-лимфоцитам, а также обладали более выраженной способностью индуцировать продукцию IL-2 и IFN- γ Т-клетками. Таким образом, присутствие ДК наряду с микроглией могло бы обеспечить более эффективное развитие иммунного ответа при глиомах. Это предположение

подтверждают данные об индукции антиген-специфического ответа у больных ГБ при введении ДК, нагруженных ГБ-антигеном или целым лизатом опухоли [175, 254, 255]. Тем не менее, микроокружение опухоли также способно оказывать влияние и на инфильтрирующие ДК, что диктует необходимость проведения дальнейших исследований для оптимизации такого подхода иммунотерапии, основанного на ДК-вакцинах [137, 306].

В пользу того, что представление опухолевого антигена может происходить в периферических лимфатических узлах, свидетельствуют данные ряда экспериментальных работ. Активированные Т-клетки были обнаружены в шейных лимфатических узлах в мышинных моделях ГБ [234]. Кроме того, показано, что антигены ЦНС могут выходить за ее пределы через периваскулярные пространства и поглощаться резидентными ДК шейных лимфатических узлов [171].

Стоит отметить, что концентрация иммуносупрессивных цитокинов на системном уровне в ПК зачастую низка у пациентов с глиомами, что, по всей видимости, не может объяснять нарушения функций периферических иммунных клеток [125]. Тем не менее, независимо от причины, Т-клеточный ответ у больных ГБ снижен даже в периферических лимфатических органах и тканях, добавляя новые задачи в проведении иммунотерапии.

Кроме того, для злокачественных глиом, как и большинства других солидных опухолей, характерна дефектность киллерной активности эффекторных лимфоцитов, что ограничивает противоопухолевый иммунный ответ и ассоциируется с плохим прогнозом [227]. Так, низкая экспрессия молекул МНС I класса на клетках внутримозговых глиом затрудняет распознавание опухолевых антигенов цитотоксическими CD8⁺ Т-лимфоцитами, а продукция супрессорных цитокинов (TGF- β , IL-10) и экспрессия различных клеточных детерминант с ингибиторной активностью (PD-L1, CTLA-4, LAG-3, CD39, CD73, FasL, mTGF- β) приводит к анергии и апоптозу Т-клеток. В отличие от ЦТЛ NK-клетки способны распознавать и лизировать опухолевые клетки-мишени с низкой экспрессией молекул МНС I.

Однако, эффекторная функция NK-клеток у таких пациентов также зачастую нарушена. Это обусловлено как супрессорным влиянием на NK-клетки различных растворимых факторов (TGF- β , лактат дегидрогеназа 5), продуцируемых опухолью, так и экспрессией на самих опухолевых клетках ингибиторных лигандов для NK-ассоциированных рецепторов.

Как и при других солидных опухолях, важную роль в патогенезе развития глиом отводят молекулам контрольных точек иммунного ответа («чекпойнт»-молекулы), за исследование которых в 2018 г. Джеймсу Эллисону (James Patrick Allison) и Тасуку Хондзё (Tasuku Honjo) была присуждена Нобелевская премия в номинации «Физиология или медицина» [4]. Ингибирование этих молекул рассматривается перспективной стратегией, направленной на преодоление иммунорезистентности опухоли и активации иммунных клеток.

Одной из таких молекул является PD-L1, которая через связывание с соответствующим рецептором PD-1 подавляет пролиферацию и функциональную активность ЦТЛ [192]. При этом экспрессия PD-L1 на опухолевых клетках и Т-клетках коррелирует со степенью злокачественности и выживаемостью больных глиомами [332, 335].

Еще одна важная молекула контрольных точек иммунного ответа, которая участвует в ускользании глиом от иммунного ответа – это CTLA-4 (антиген цитотоксических лимфоцитов 4), экспрессирующаяся на активированных Т-клетках и Трег [37, 103].

Указанные молекулы, а также ряд других «чекпойнт»-молекул в последние годы рассматриваются в качестве важных мишеней в лечении злокачественных опухолей. В настоящее время проводятся различные клинические исследования (фаза I/II) с применением моноклональных антител против «чекпойнт»-молекул, однако данных об их эффективном клиническом эффекте в лечении больных глиомами пока нет [311, 352].

1.6 Вакцины на основе дендритных клеток

Основные методы лечения ГБ включают в себя хирургическую резекцию опухоли, радио- и химиотерапию [6]. Учитывая инвазивный рост опухоли и ее локализацию в важных зонах головного мозга, связанных с контролем речи, моторными функциями и чувствительностью, зачастую обширная и полная хирургическая резекция глиом невозможна [3]. В связи с этим инфильтрирующие опухолевые клетки остаются в окружающих тканях, что приводит к рецидиву заболевания [336]. В 70 % случаев рецидив ГБ случается в первый год после проведенной резекции.

Одним из перспективных подходов в лечении ГБ считают проведение иммунотерапии в сочетании с основными методами лечения. Иммунотерапия направлена на индукцию провоспалительного ответа достаточного, чтоб преодолеть иммунную супрессию опухолевого микроокружения. Одним из таких подходов является использование вакцин на основе ДК.

Результаты первых клинических исследований ДК-вакцин при злокачественных глиомах головного мозга были опубликованы в 2001 г. [158, 348]. На сегодняшний день существует множество зарегистрированных клинических исследований с применением ДК в лечении глиом, которые на I, I/II и II фазах продемонстрировали безопасность и эффективность [94]. Однако ни одно из них до сих пор не одобрено FDA (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов) из-за отсутствия результатов III фазы исследования. Тем не менее применение ДК-вакцин позволяет повысить безрецидивную и общую выживаемость больных злокачественными глиомами в ряде случаев почти в 2 раза [70, 188, 347]. Кроме того, есть данные о корреляции между показателями выживаемости и продукцией IFN γ мононуклеарными клетками крови как биомаркера иммунного ответа [136].

Для получения ДК авторы используют различные протоколы. Чаще всего для индукции созревания и нагрузки ДК применяют лизат аутологических

опухолевых клеток, в котором представлен весь спектр антигенного материала [94]. В последние годы набирает популярность использование комбинации различных опухоль-ассоциированных антигенов (IL-13R α 2, EphA2, gp100, YKL-40, WT-1, HER2, MAGE-A3, MAGE-A1, TRP-2) [12, 233, 246], а также подход с трансфекцией в ДК опухолевых мРНК или pp65 мРНК цитомегаловируса [33]. Однако, одно из проведенных исследований показало, что у пациентов, получавших вакцины на основе ДК, нагруженных опухолевым лизатом, медиана выживаемости была выше по сравнению с группой пациентов, в которой для нагрузки ДК использовали опухоль-ассоциированных антигены (34,4 vs 14,5 мес., соответственно) [255].

1.7 Заключение

Несмотря на то, что ведущая функция ДК состоит в эффективной презентации различных антигенов и активации клеток адаптивного (Т-клетки) и врожденного (NK-клетки, МФ и др.) иммунитета, по всей видимости, цитотоксическая активность ДК занимает особое место в развитии иммунного ответа. Накопленные данные свидетельствуют о том, что экспрессия различных проапоптогенных молекул, типичных для классических киллерных клеток, позволяет ДК выполнять цитотоксическую функцию и быть важным эффекторным звеном противоопухолевого иммунного ответа. Однако до сих пор нет ясности, насколько успешно эта функция может реализовываться у пациентов с онкопатологией и, в частности, у пациентов с глиобластомой. В этом аспекте цитотоксическая активность ДК может способствовать развитию эффективного иммунного ответа, направленного на элиминацию чужеродного патогена или повреждающего стимула, и облегчать поглощение и представление Т-клеткам антигенов в комплексе с МНС молекулами. Изучение этого вопроса имеет большую значимость, поскольку очевидно, что нарушение цитотоксической активности ДК может стать причиной ускользания опухоли от иммунного надзора. Исследования цитотоксической

активности ДК против аутологичных глиобластомных клеток имеет большое значение с точки зрения использования вакцин на основе ДК в качестве одной из перспективных стратегий лечения при злокачественных глиомах, направленной на усиление противоопухолевого иммунитета. Зачастую ДК пациентов с глиобластомой характеризуются различными дисфункциями, затрагивая, по-видимому, и цитотоксический потенциал ДК. В этом аспекте подходы не только к направленной регуляции, но и к коррекции цитотоксической активности ДК *ex vivo* могут повысить эффективность ответа у пациентов при проведении ДК-вакцинации.

Глава 2. Материалы и методы

2.1 Реактивы и препараты

В работе были использованы Фиколл 400 (Polysucros w 400, BioClot GmbH, Германия); урографин 76 % (Bayer Schering Pharma AG, Германия); забуференный фосфатом физиологический раствор собственного приготовления (ЗФР, pH=7,6); питательные среды RPMI-1640 (Sigma, США), DMEM/F-12 (Gibco, Великобритания) и α MEM (БиолоТ, Санкт-Петербург); 5мМ L-глутамин (Sigma-Aldrich, США); HEPES-буфер (ПанЭко, Россия); раствор гентамицина 40 мг/мл (Белмедпрепараты, Беларусь); эмбриональная телячья сыворотка (FCS, БиолоТ, Санкт-Петербург, Россия); рекомбинантные цитокины GM-CSF (Sigma-Aldrich, Германия), IFN α (Роферон-А, Roche, Швейцария), интерлейкин 2 человека (Ронколейкин, ООО «НПК «БИОТЕХ», Санкт-Петербург, Россия), фактор роста фибробластов (FGFb, Sigma-Aldrich, США), эпидермальный ростовой фактор (EGF, Sigma-Aldrich, США); липополисахарид (ЛПС E.colli 0114:B4, Sigma-Aldrich, Германия); 0,3% раствор коллагеназы I (Sigma-Aldrich, США); 0,4 % раствор трипанового синего (Sigma-Aldrich, Германия); раствора кумасси (Coomassie Brilliant Blue G-250, Sigma-Aldrich, США); бычий сывороточный альбумин (Sigma-Aldrich, США); 0,25 % раствор трипсина (Sigma-Aldrich, Германия); 0,02 % раствор этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА; ICN, США); синтетический ингибитор металлопротеиназ TAPI-0 (Calbiochem, США); 2-меркаптэтанол (Biochem, Франция); гепарин (ОАО «Синтез», Курган, Россия); N-2 Supplement (100 \times , Gibco, Великобритания); B-27TM Supplement (50 \times , Gibco, Великобритания); желтый бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-тетразолия (MTT, Sigma-Aldrich, Германия); диметилсульфоксид (ДМСО, MP Boimedicals, LLC, Франция); химерные молекулы rhTNFR1/TNFRSF1A Fc chimera, rhFas/TNFRSF6/CD95 Fc chimera и rhTRAIL-R2/TNFRSF10B Fc chimera (все реактивы R&D Systems, США); конканамицин А (Santa Cruz Biotechnology, США); витальный краситель 5,6-карбоксифлуоресцеина

диацетат-N-сукцинимидильный эфир CFSE (Molecular probes, США); растворы для пробоподготовки для цитометрического анализа - раствор для фиксации клеток (FACS Lyse, Becton Dickinson, США) и коммерческий набор растворов для фиксации/пермеабиллизации клеток Transcription Factor Buffer Set (Becton Dickinson, США); коммерческий набор SensoLyte®520 TACE Activity Assay Kit (Anaspec, Inc, Fremont, CA, США).

Для изучения фенотипа различных типов клеток использовали моноклональные антитела фирмы BD PharMingen (США) к антигенам человека CD1a (FITC, Clone HI149), CD11c (FITC, Clone B-Ly6), CD14 (FITC, Clone M5E2), CD86 (FITC, Clone 2331), HLA-DR (FITC, Clone G46-6; PerCP, Clone L243), CD83 (Pe, Clone HB15e), TNF α (APC, Clone 6401.1111), FasL (Pe, Clone NOK-1), TRAIL (Pe, Clone RIK-2), CD107a (APC, Clone H4A3; PerCP, Clone H4A3), гранзим Б (Pe, Clone GB11), CD73 (Pe, Clone AD2), CD271 (Pe, Clone C40-1457), TRAIL-R2 (Pe, Clone YM366), Fas (Pe, Clone DX2); Ki-67 (Pe) фирмы R&D Systems (США) – к антигенам человека TACE (Pe, Clone 111633), TNF-R1 (APC, Clone 16803) и TNF-R2 (Pe, Clone 22235); фирмы BioLegend (США) – к перфोरину человека (Pe, B-D48); фирмы Santa Cruz Biotechnology (США) – к активной форме pNF- κ B p65 (Pe, sc-8008); фирмы MACS® (США) – к антигену человека CD133 (APC, Clone AC133); набор бус Quantum™ APC MESF (Bangs Laboratories, Inc., США), монензин А (BD PharMingen, США), 7-аминоактиномицин D (7-AAD; BioLegend, США); а также коммерческий набор AnnexinV-APC в комбинации с ДНК красителем PI (BioLegend, США).

Секретом различных клеточных культур изучали с использованием тест-системы для иммуноферментного определения концентрации растворимого фактора некроза опухоли альфа (Вектор-Бест, Новосибирск, Россия) и мультиплексной тест-системы для оценки концентрации 27 цитокинов (Bio-Rad, США).

Для молекулярно-генетических методов использовали «РИБО-золь-В» (ФГУН ГИСК, Россия) для выделения тотальной РНК; набор MMLV RT kit

(Евроген, Россия); мастер-микс с интеркалирующим красителем SYBR Green (SYBR Green PCR Master Mix, Applied Biosystems, США).

Двухцепочечная ДНК человека (dsDNA) была предоставлена д.б.н., заведующим лабораторией индуцированных клеточных процессов ИЦиГ СО РАН Богачевым С.С. dsDNA получали из плаценты здоровых рожениц. Для этого ДНК выделяли бесфенольным методом, который позволял получить полноценный геном, сохраняя фрагменты ДНК, прочно ассоциированные с белками ядерного матрикса. Фрагментацию ДНК осуществляли ультразвуком с использованием ультразвукового дезинтегратора при частоте 22 КГц, в результате чего получали смесь фрагментов размером от 300 до 6000 п.н. Полученный препарат dsDNA хранили в физиологическом растворе при –20 °С.

2.2 Характеристика пациентов

В исследование были включены 109 больных глиомами головного мозга, в том числе 62 мужчины и 47 женщин в возрасте от 21 до 75 лет (медиана 51,5 года), проходивших обследование и лечение в отделении нейрохирургии ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии» Министерства здравоохранения РФ и в нейрохирургическом отделении (онкологическое) Федерального нейрохирургического центра Министерства здравоохранения РФ (г. Новосибирск) в период 2012-2019 гг. У 7 пациентов диагностировали гистологически верифицированные глиомы низкой степени злокачественности (Grade II), у 22 пациентов -анапластическую астроцитому (Grade III) и у 80 - глиобластому (Grade IV). Общая характеристика пациентов, включенных в исследование, представлена в Таблице 2.1. В качестве контрольной группы было обследовано 178 совместимых по полу и возрасту здоровых доноров. Забор крови и все иммунологические исследования проводили после получения письменного информированного согласия пациентов.

Таблица 2.1 – Характеристика пациентов

		Количество пациентов n (%)
Возраст (лет)		
	≥40	77 (71 %)
	<40	32 (29 %)
Пол		
	мужчины	62 (57 %)
	женщины	47 (43 %)
WHO Grade		
	Grade II	7 (6 %)
	Grade III	22 (20 %)
	Grade IV	80 (74 %)
Тип опухоли		
	впервые выявленная	73 (67 %)
	рецидив	37 (33 %)
локализация опухоли		
	лобная доля	17 (16 %)
	височная доля	24 (22 %)
	теменная доля	22 (20 %)
	затылочная доля	4 (4 %)
	подкорковые структуры	7 (6 %)
полушарие	≥ 2 долей	35 (32 %)
	левое	60 (55 %)
	правое	45 (41 %)
	оба	4 (4 %)

2.3 Генерация IFN α -индуцированных ДК (ИФН-ДК)

Дендритные клетки генерировали путем культивирования адгезивной фракции мононуклеарных клеток (МНК). Для этого МНК выделяли центрифугированием цельной, гепаринизированной венозной крови в градиенте плотности фиколла-урографина ($\rho = 1,077$) с последующей двукратной отмывкой клеток в забуференном фосфатом физиологическом растворе (ЗФР, pH = 7,6) и однократной – в среде RPMI-1640, дополненной 0,3мг/мл L-глутамина, 5мМ HEPES-буфера, 100 мкг/мл гентамицина (культуральная среда). Далее проводили подсчет выделенных МНК в камере

Горяева и в концентрации 3×10^6 кл/мл помещали в 6-луночные планшеты для культивирования (ТТР, Швейцария) на 1 – 1,5 часа в 3 мл среды RPMI-1640, дополненной 0,3мг/мл L-глутамина, 5мМ HEPES-буфера, 100 мкг/мл гентамицина и 1% аутологичной сыворотки крови. Затем неприлипшую фракцию удаляли, а оставшиеся клетки инкубировали в культуральной среде, дополненной 2,5 % эмбриональной телячьей сыворотки (FCS), в присутствии GM-CSF (40 нг/мл), IFN α (1000 Ед/мл) при 37 °С в CO $_2$ -инкубаторе при 5 % CO $_2$. Для индукции созревания ДК на 3 – 4 сутки вносили липополисахарид (ЛПС E.colli 0114:B4, 10 мкг/мл) и продолжали культивировать в течение 24 ч, после чего проводился подсчет ДК, а также сбор супернатантов ДК в необходимых объемах для тестирования. Жизнеспособность клеток, которую оценивали по окрашиванию трипановым синим, составляла 93 – 95 %. Клеточный выход составлял в среднем $(0,13 \pm 0,1) \times 10^6$ ДК/ 10^6 МНК.

В отдельной серии экспериментов в культуры ИФН-ДК больных злокачественными глиомами совместно с ЛПС добавляли препараты на основе рекомбинантного интерлейкин-2 человека (rIL-2, 50 ЕД/мл) или двуцепочечной ДНК человека (dsDNA, 5 мкг/мл).

Для блокирования активности TNF α -конвертирующего фермента (TACE) в отдельной серии экспериментов в культуры ДК совместно с ЛПС добавляли синтетический ингибитор металлопротеиназ TAPI-0 (25 мкг/мл).

2.4 Клеточные линии

2.4.1 Клеточные линии, полученные из первичных культур опухолевых клеток пациентов с глиомами головного мозга

Первичные культуры клеток глиомных опухолей головного мозга были получены путем механической и последующей ферментативной (0,3 % раствор коллагеназы I) дезагрегации фрагмента ткани опухоли, полученной хирургическим путем от пациентов с гистологически верифицированной

глиобластомой (Grade IV, n = 36), анапластической астроцитомой (Grade III, n = 5) и глиомами низкой степени злокачественности (Grade I-II, в том числе диффузной астроцитомой, олигоастроцитомой; n = 7), проходивших обследование и лечение в отделении нейрохирургии Новосибирского НИИТО и Федеральном нейрохирургическом центре с 2011 по 2018 гг. Исследования проводили после получения письменного информированного согласия больных.

Полученную суспензию клеток в виде адгезивного монослоя культивировали при 37 °C и 5 % CO₂ в среде DMEM/F-12, дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 5мМ HEPES-буфера, 10⁻⁴ М меркаптэтанола, 100 мкг/мл гентамицина и 10 % FCS, обновляя питательную среду два раза в неделю до момента достижения субконфлюэнтного роста адгезивных клеток (от 14 до 70 сут), после чего собирали образцы кондиционных сред и хранили при температуре -80 °C. Первичные культуры глиобластомных клеток пассировали при достижении субконфлюэнтного роста с использованием 0,25 % трипсина и 0,02 % ЭДТА и продолжали вести как опухолевые клеточные линии (n = 13) в полной культуральной среде, обновляя питательную среду два раза в неделю. При достижении субконфлюэнтного роста (70 – 80 %) проводили стандартную методику пассирования (1 раз в 7 – 10 дней). Количество пассажей для клеточных линий варьировало от 3 до 7.

2.4.2 Культивирование нейросфер

Для получения нейросфер клетки первичной культуры, полученные от пациента #6 с гистологически верифицированной глиобластомой, после первого пассирования помещали в концентрации 20 000 – 30 000 кл/мл в культуральные матрасы (25 см³) в среде DMEM/F-12, содержащей 0,3 мг/мл L-глутамина, 5мМ HEPES-буфера, 10⁻⁴ М меркаптэтанола, 100 мкг/мл гентамицина и дополненной фактором роста фибробластов (FGFb, Sigma-

Aldrich, 20 нг/мл), эпидермальным ростовым фактором (EGF, Sigma-Aldrich, 20 нг/мл), гепарином (10 ЕД/мл), N-2 Supplement (100×), B-27™ Supplement (50×) со сменой среды (1/3) каждые 7 – 10 дней. Ростовые факторы (FGFb, EGF, гепарин) каждые 3 – 4 дня дополнительно добавляли в культуры нейросфер. Диссоциацию образующихся агрегатов клеток в виде нейросфер в процессе пассирования культур проводили посредством 0,25 % трипсина и 0,02 % ЭДТА.

2.4.3 Стандартные клеточные линии

Культуры клеток глиобластомы человека линии U-87, эпителиальной карциномы гортани человека линии HEp-2 были предоставлены Институтом Цитологии и Генетики СО РАН (Шилов А.Г.). Клетки культивировали в среде α MEM (БиолоТ, Санкт-Петербург), дополненной 100 мкг/мл гентамицина и 10 % FCS при 37 °C и 5 % CO₂. Пассирование клеточных линий проводили при достижении субконфлюэнтного роста (70 – 80 %) адгезивных клеток посредством 0,25 % трипсина и 0,02 % ЭДТА.

2.5 Исследование субпопуляций клеток методом проточной цитофлуориметрии

2.5.1 Исследование экспрессии поверхностных молекул на клетках

Приготовление образцов для определения относительного содержания субпопуляций клеток, экспрессирующих поверхностные маркеры, проводили в соответствии с методикой Becton Dickinson. К суспензии клеток (50 мкл, $(0,5 - 1) \times 10^6$ клеток/ пробу) в растворе «А» (5 % желатиноля, 0,1 % азида натрия, 0,02 % ЭДТА, 10 % сыворотки доноров АВ (IY) группы в 3ФР), помещенных в пробирки для цитофлуориметрического анализа, добавляли коммерческие моноклональные антитела, конъюгированные с флуоресцентными метками

(флуоресцеинизотиоцианат (FITC), фикоэритрин (PE), перидининхлорофилл протеин (PerCP) или алофикоцианин (APC)) в концентрации 0,1 – 10 мг/мл (в зависимости от инструкции производителя). В качестве негативного контроля использовали изотипические антитела, конъюгированные с аналогичными флуорохромами. Клетки инкубировали 30 мин при 4 °C, после чего дважды отмывали раствором «А» от антител путем центрифугирования при 1 000 об/мин (300 g) 5 мин. Далее осуществляли фиксацию клеток путем добавления к клеточной суспензии 0,4 – 0,5 мл раствора FACS Lyse (Becton Dickinson, США). Подготовленные таким образом пробы подвергали исследованию на лазерном клеточном сортере-анализаторе FACSCalibur (Becton Dickinson, США) с использованием программы Cell Quest (Becton Dickinson, США). Процент позитивных клеток, экспрессирующих соответствующие маркеры, рассчитывался на 10 000 клеток.

2.5.2 Исследование внутриклеточной экспрессии молекул

При необходимости первоначально подготавливали пробы к исследованию экспрессии поверхностных молекул согласно методике, описанной выше, до момента отмывки образцов от моноклональных антител включительно. Далее для детекции экспрессии внутриклеточных молекул, согласно инструкции производителя, проводили процедуру пермеабиллизации, используя коммерческий набор растворов для фиксации/пермеабиллизации Transcription Factor Buffer Set и соответствующие моноклональные антитела, конъюгированные с флуоресцентными метками. В качестве негативного контроля для экспрессии внутриклеточных молекул также использовали изотипические антитела, конъюгированные с аналогичными флуорохромами. По аналогии с методикой подготовки проб для определения поверхностной экспрессии молекул окончательную фиксацию клеток осуществляли путем добавления к клеточной суспензии 0,4 – 0,5 мл раствора FACS Lyse и

анализировали на проточном цитометре FACSCalibur с использованием программы Cell Quest. Процент позитивных клеток, экспрессирующих соответствующие маркеры, рассчитывался на 10 000 клеток.

2.5.3 Иммунофенотипическое исследование ИФН-ДК

2.5.3.1 Общая характеристика фенотипа ИФН-ДК

Фенотип генерированных в присутствии IFN α ДК доноров и больных глиомами головного мозга оценивали согласно методике исследования экспрессии поверхностных молекул, используя флуорохром-меченые моноклональные антитела к антигенам CD1a, CD11c, CD14, CD86, HLA-DR (FITC), CD83. Процент позитивных клеток, экспрессирующих соответствующие CD-маркеры, рассчитывали на 10 000 клеток в регионе больших гранулярных лимфоцитов.

Общая характеристика ИФН-ДК доноров и больных глиомами головного мозга представлена на Рисунке 2.1.

Большинство клеток в популяции ЛПС-стимулированных ИФН-ДК доноров экспрессировали HLA-DR антигены и ко-стимуляторную молекулу CD86. Культуры ИФН-ДК больных глиобластомой были сопоставимы с ИФН-ДК доноров по содержанию HLA-DR- и CD86-позитивных клеток, но отличались меньшим количеством клеток, экспрессирующих молекулу зрелых ДК CD83 ($p_U < 0,05$), а также большей долей клеток, экспрессирующих моноцитарных маркер CD14 ($p_U < 0,05$) и маркер незрелых ДК CD1a ($p < 0,05$).

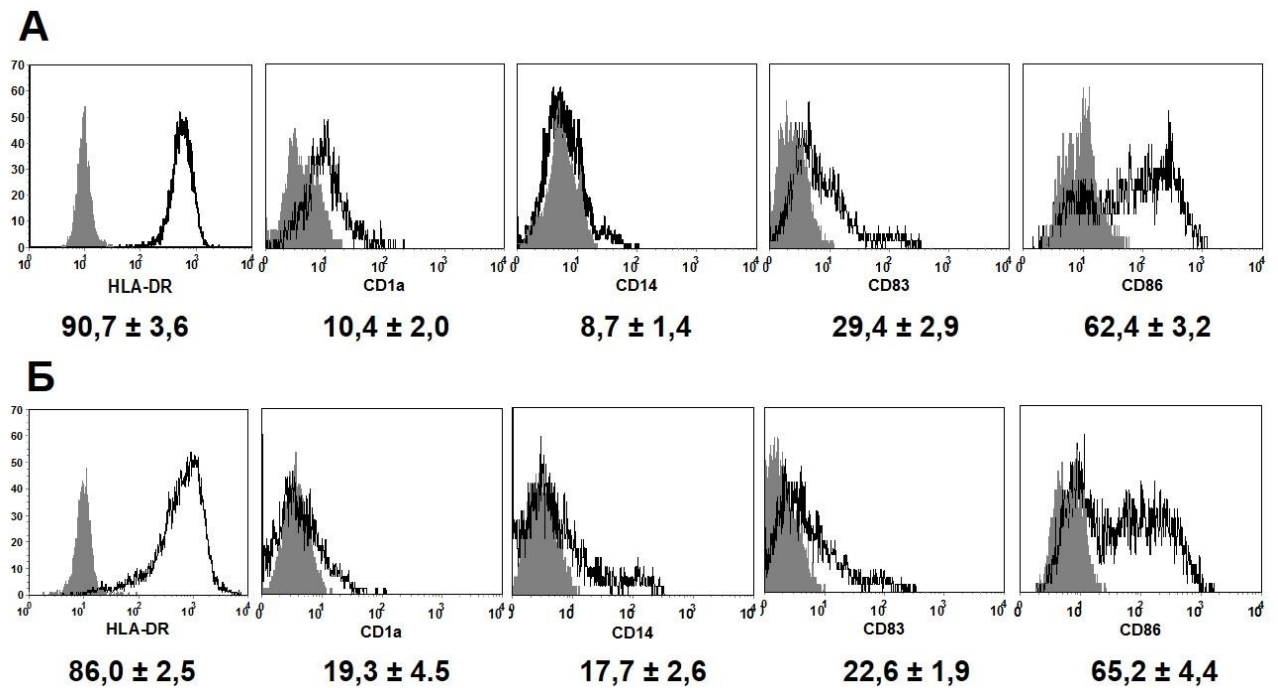


Рисунок 2.1 – Фенотипическая характеристика ИФН-ДК доноров и больных глиобластомой

Представлены репрезентативные гистограммы распределения экспрессии указанных молекул (черная линия) и соответствующих изотип-специфических контролей (серые гистограммы) в культурах ЛПС-стимулированных ИФН-ДК доноров (А) и больных глиобластомой (Б). Под гистограммами в виде средних значений ($m \pm SE$) приведено относительное количество (%) ДК, позитивных по данным антигенам.

2.5.3.2 Исследование экспрессии mTNF α

Экспрессию mTNF α на ИФН-ДК оценивали методом двойного окрашивания для поверхностных антигенов с использованием APC-конъюгированных анти-TNF α -антител и FITC- или PerCP-конъюгированных анти-HLA-DR-антител. Для исключения возможности связывания моноклонального анти-TNF α -антитела с комплексом sTNF α -TNF-R ДК предварительно обрабатывали (в течение 15 мин в темноте при комнатной температуре) глициновым буфером Gly-HCl (pH = 3,0). Глициновый буфер способствовал диссоциации комплекса sTNF α -TNF-R и удалению с мембраны клетки sTNF α (Рисунок 2.2). Далее ДК инкубировали с анти-

TNF α - и анти-HLA-DR-антителами согласно стандартной методике. Относительное количество mTNF α -экспрессирующих клеток оценивали как mTNF α ⁺ HLA-DR⁺ клетки.

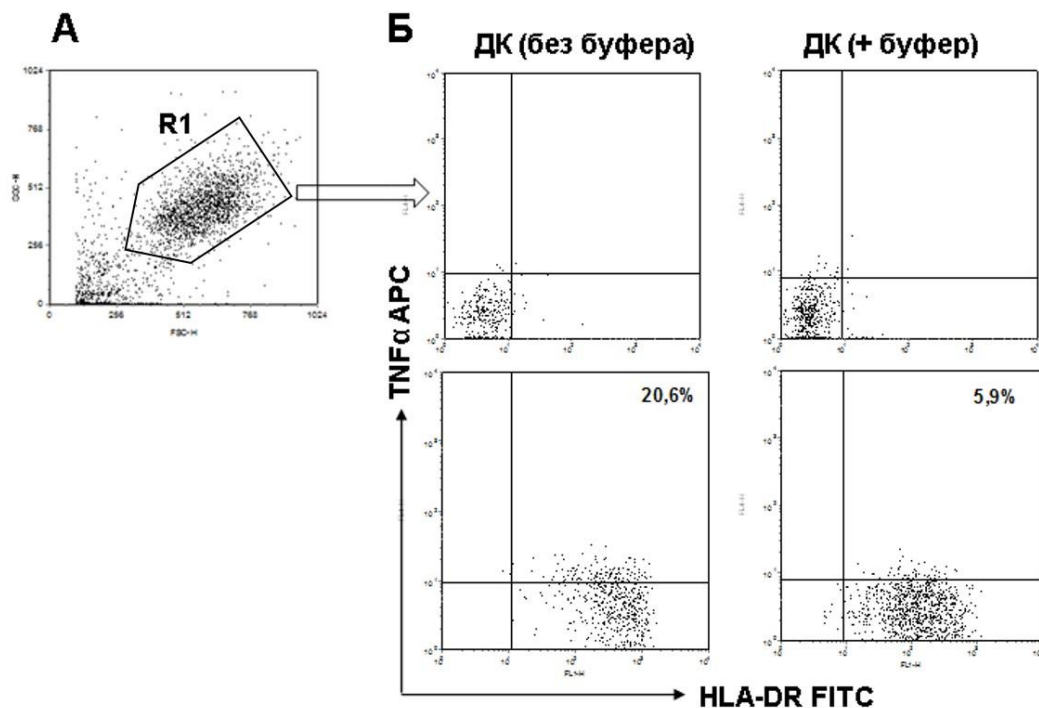


Рисунок 2.2 – Влияние глицинового буфера Gly-HCl (pH = 3,0) на экспрессию mTNF α на ИФН-ДК

Представлены репрезентативные DotPlot гистограммы распределения ЛПС-стимулированных ИФН-ДК донора по флуоресценции APC-меченных анти-TNF α -антител и FITC-меченных анти-HLA-DR-антител. А) область гейтирования ДК в регионе больших гранулярных лимфоцитов (R1); Б) Гейтированные ДК анализировали по двойной экспрессии TNF α и HLA-DR в культурах ИФН-ДК, стандартно меченных моноклональными антителами (без буфера; левые гистограммы), и используя модифицированный протокол с краткосрочной обработкой глициновым буфером Gly-HCl (pH = 3,0) (+буфер; правые гистограммы). Для анализа использовали соответствующие изотип-специфические контроли (верхние гистограммы).

Оценка интенсивности флуоресценции анти-TNF α антител на ДК проводилась с помощью набора бус QuantumTM APC MESF, конъюгированных с различным количеством APC, и выражалась в единицах MESF (molecules of equivalent soluble fluorochromes), отражающих уровень флуорохрома на клетке в исследуемом образце. Поскольку молекула флуорохрома APC является высокомолекулярным протеином, как правило, только одна молекула APC

связывается с моноклональным антителом. В связи с этим MESF, которые детектировались по каналу FL4/APC в виде медианных значений, конвертировали в единицы ABC (antibodies bound per cell), отражающие количество антител, связавшихся с клеткой. Этот показатель использовали для оценки плотности экспрессии на клеточной поверхности анализируемой молекулы.

2.5.3.3 Исследование экспрессии других поверхностных лигандов семейства TNF

Оценку экспрессии FasL и TRAIL на поверхности ДК проводили в гейте HLA-DR⁺ клеток методом двойного окрашивания с использованием Перконъюгированных анти-FasL- или анти-TRAIL-антител и FITC-конъюгированных анти-HLA-DR-антител согласно стандартной методике для определения поверхностных антигенов.

2.5.3.4 Исследование поверхностной экспрессии CD107a

Оценку экспрессии CD107a на поверхности ДК проводили путем добавления APC- или PerCP-меченных моноклональных анти-CD107a антител в культуры ИФН-ДК на 4 сутки (без ЛПС или совместно с ЛПС). Для ингибирования транспорта молекул и предотвращения интернализации комплекса CD107a с PerCP-анти-CD107a антителом одновременно с моноклональным антителом в культуры добавляли монензин А (10^{-3} М). По окончании культивирования ДК инкубировали с FITC-конъюгированными анти-HLA-DR-антителами согласно стандартной методике для определения поверхностных антигенов. Относительное количество CD107a-экспрессирующих клеток оценивали среди HLA-DR⁺ клеток.

2.5.3.5 Исследование экспрессии TNF α -конвертирующего фермента (TACE)

Количество TACE-экспрессирующих ДК определяли с использованием APC-конъюгированных анти-TACE-антител и FITC-конъюгированных анти-HLA-DR-антител согласно стандартной методике для определения поверхностных антигенов на клетке. Относительное количество TACE-экспрессирующих клеток оценивали среди HLA-DR⁺ клеток.

2.5.3.6 Исследование экспрессии молекул цитолитических гранул

Для оценки внутриклеточной экспрессии CD107a, гранзима Б и перфорины ИФН-ДК инкубировали с FITC-конъюгированными анти-HLA-DR-антителами согласно стандартной методике для определения поверхностных антигенов. Далее ДК инкубировали с APC-конъюгированными анти-CD107a-, Ре-конъюгированными анти-гранзим Б- или анти-перфорин-антителами, используя методику оценки экспрессии внутриклеточных молекул (Глава 2.4.2).

2.5.3.7 Определение уровня экспрессии NF κ B

Для оценки уровня активной формы pNF- κ B p65 в ответ на стимуляцию соответствующими агентами ИФН-ДК инкубировали с FITC-конъюгированными анти-HLA-DR-антителами согласно стандартной методике для определения поверхностных антигенов на клетке. Далее клетки инкубировали с Ре-конъюгированными анти-pNF- κ B p65-антителами, используя коммерческий набор для определения внутриклеточных молекул. За час до проведения цитометрического анализа в пробы добавляли ядерный краситель 7-AAD (1 мг/мл клеток раствора 7-AAD в 3ФР) для исключения из

анализа погибших клеток. Поскольку интактные клетки не проницаемы для данного красителя, анализ экспрессии активной формы pNF-κB p65 в исследуемых типах ДК проводился в гейте 7-AAD⁻ клеток (канал детекции FL3). Далее относительное количество pNF-κB p65-экспрессирующих клеток оценивали среди HLA-DR⁺ клеток.

2.5.4 Иммунофенотипическое исследование опухолевых клеток

Оценку поверхностной экспрессии молекул на клетках опухолевых линий проводили согласно стандартной методике после процедуры пассивирования раствором трипсина/ЭДТА, используя FITC-, Pe-, PerCP- или APC-меченные моноклональные анти-HLA-DR-, анти-CD73-, анти-CD133-, анти-CD271-, анти-Fas-, анти-TRAIL-R1-, анти-TNF-R1- и анти-TNF-R2-антитела.

Для оценки пролиферативной активности опухолевых клеток использовали Pe-конъюгированные моноклональные анти-Ki-67-антитела согласно методике оценки экспрессии внутриклеточных молекул.

2.6 Исследование продукции субпопуляциями клеток растворимых факторов

2.6.1 Определение продукции sTNFα

Концентрацию продуцируемого sTNFα в супернатантах ИФН-ДК в ответ на стимуляцию соответствующими агентами определяли методом иммуноферментного анализа, используя соответствующую тест-систему («Вектор-Бест», Россия). Анализ уровня продукции sTNFα в цельных супернатантах культур ИФН-ДК проводился в пересчете на 10⁵ ДК.

2.6.2 Мультиплексный анализ цитокинов и хемокинов

Концентрацию 27 цитокинов (IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17A, Eotaxin, FGFb, G-CSF, GM-CSF, IFN γ , IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF-BB, RANTES, TNF α , VEGF) цитокинов в супернатантах первичных культур опухоли пациентов с глиомами головного мозга, а также глиобластомной линии U-87 оценивали методом проточной флуориметрии на 2-лучевом лазерном автоматизированном анализаторе (Bio-Plex Protein Assay System, Bio-Rad, США) с использованием коммерческих тест-систем в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Полученные значения пересчитывали индивидуально с учетом абсолютного количества клеток культур и линий и выражали в пг/мл/10⁶ клеток.

2.7 Исследование цитотоксической активности ДК

2.7.1 МТТ-тест

Клетки глиобластомных линий, полученных из первичных культур опухоли пациентов, а также линий U-87, НЕР-2 (5×10^4 /лунку) культивировали с ЛПС-стимулированными ИФН-ДК в 96-луночных плоскодонных планшетах (в триплетах) в течение 24 часов в соотношении эффектор:мишень 1:1. За 3 – 4 часа до окончания инкубации в лунки вносили по 20 мкл 5 мг/мл раствора желтого бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-тетразолия (МТТ), а затем по окончании теста планшеты центрифугировали при 1 500 об/мин в течение 5 мин, удаляли супернатант и добавляли по 150 мкл диметилсульфоксида (ДМСО). Через 30 мин после полного растворения пурпурно-синих кристаллов формазана измеряли оптическую плотность содержимого лунок на мультилуночном спектрофотометре (Thermo Scientific

Multiskan FC, Финляндия) при длине волны 492 нм. Расчет цитотоксической активности (%) проводили по стандартной формуле:

$$\left[1 - \frac{\text{ОПэ} + \text{м} - \text{ОПэ}}{\text{ОПм}} \right] \times 100,$$

где ОПэ+м – значение оптической плотности в опытных сериях; ОПэ – значение оптической плотности в лунках с эффекторами; ОПм – значение оптической плотности в лунках с мишенями.

Для изучения роли отдельных сигнальных путей в реализации цитотоксической активности ДК в отдельных экспериментах ИФН-ДК предварительно инкубировали в течение 60 мин с химерными молекулами rhTNFR1/TNFRSF1A Fc chimera (10 мкг/мл), rhFas/TNFRSF6/CD95 Fc chimera (10 мкг/мл) и rhTRAIL R2/TNFRSF10B Fc chimera (10 мкг/мл; все реактивы R&D Systems, США) или в течение 2 ч с конканамицином А (100 нМ, Santa Cruz Biotechnology, США).

2.7.2 Детекция апоптоза в опухолевых клетках

Для определения уровня апоптоза опухолевые клетки инкубировали в 96-луночных круглодонных планшетах (10^4 /лунку) в присутствии ЛПС-стимулированных ИФН-ДК в соотношении ДК:опухолевые клетки 10:1 в течение 18 часов. Культуры дублировали в 12 идентичных повторах с целью получения клеток в количестве, достаточном для проведения цитофлуориметрического анализа. Перед культивированием опухолевые клетки окрашивали витальным красителем CFSE (канал детекции FL1) с конечной концентрацией 2 мкМ в бессывороточной среде RPMI-1640 в течение 15 мин, затем трижды отмывали в RPMI-1640, дополненной 10 % FCS. По окончании инкубации пробы переносили в цитометрические пробирки и исследовали апоптоз с помощью коммерческого набора AnnexinV-APC в комбинации с ДНК красителем PI согласно инструкции производителя

(BioLegend, США). С помощью данного метода определяли живые клетки (AnnexinV⁻PI⁻), клетки в стадии раннего апоптоза (AnnexinV⁺PI⁻) и позднего апоптоза/некроза (AnnexinV⁺PI⁺) в гейте CFSE-позитивных клеток. Процент позитивных клеток, экспрессирующих соответствующие маркеры, рассчитывали на 10 000 клеток. CFSE⁻ клетки рассматривали как ДК и не включали в анализ.

2.7.3 Дегрануляция ДК

Для определения уровня дегрануляции ДК в ответ на взаимодействие с опухолевыми клетками ЛПС-стимулированные ИФН-ДК инкубировали в 96-луночных круглодонных планшетах (10^5 кл/лунку) в присутствии клеток глиобластомной линии, полученной из первичной культуры пациента #6 (ГБ#6) в соотношении ДК:опухолевые клетки 10:1 в течение 18 часов. Культуры дублировали в 12 идентичных повторах, с целью получения клеток в количестве, достаточном для проведения цитофлуориметрического анализа. Перед культивированием опухолевые клетки окрашивали витальным красителем CFSE (2 мкМ) согласно методике, описанной в Главе 2.6.2, что позволяло разделять популяции ДК и опухолевых клеток на проточном цитометре. С начального момента со-культивирования в каждую лунку добавляли 10^{-3} М монензина А и PerCP-меченные моноклональные анти-CD107a антитела. Через 18 ч пробы переносили в цитометрические пробирки, дважды отмывали раствором «А» (см. Глава 2.4.1) и фиксировали клетки раствором FACS Lyse. Относительное количество дегранулирующих ДК оценивали как CD107a⁺ клетки в гейте CFSE-негативных клеток. Контрольными культурами служили CD107a⁺ ДК до начала инкубации с опухолевыми клетками (исходный уровень CD107a⁺ экспрессии). Процент позитивных клеток, экспрессирующих CD107a⁺, рассчитывался на 10 000 клеток.

2.8 Определение уровня экспрессии мРНК $TNF\alpha$ в ДК

Из образцов ИФН-ДК через 2 часа после стимуляции ЛПС выделяли тотальную РНК с помощью коммерческого набора «РИБО-золь-В» согласно инструкции производителя (ФГУН ГИСК, Россия). Количество РНК определяли на спектрофотометре Nanodrop ND-100 (NanoDrop Technologies, Inc., США). Качество выделенной РНК проверяли при помощи электрофореза в 1,5 % агарозном геле, окрашивание EtBR, напряжение 10 В/см между электродами. На следующем этапе проводили реакцию обратной транскрипции для синтеза кДНК на матрице мРНК с использованием амплификатора C1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad Inc.) и набора MMLV RT kit по протоколу производителя (Евроген). Праймеры к мРНК гена $TNF\alpha$ были подобраны с помощью программ "Beacon Designer 7" и синтезированы фирмой «БИОССЕТ». В качестве референсного гена использовали ген «домашнего хозяйства» рибосомального белка P0 $RPLP0$.

Последовательности праймеров, использованных при проведении количественных ПЦР в реальном времени (for – прямой праймер, rev – обратный праймер):

$TNF\alpha$ -for 5`- CCAAT-GGCGT-GGAGC-TGAGA - 3`

$TNF\alpha$ -rev 5`- TGATG-GTGTG-GGTGA-GGAGC-AC - 3`

$RPLP0$ -for 5`- CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC - 3`

$RPLP0$ -rev 5`- CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA- 3`

При отработке условий ПЦР в качестве матрицы использовали кДНК, полученную методом обратной транскрипции с выделенной тотальной РНК из клеток плаценты человека и фибробластов человека. Продукты ПЦР–реакции в данных образцах детектировались с помощью гель–электрофореза в 1,5 % агарозном геле и имели ожидаемую молекулярную массу, совпадающую с размером ампликона. ПЦР в реальном времени проводили в 96-ти луночных оптических планшетах с использованием мастер-микса с интеркалирующим красителем SYBR Green (SYBR Green PCR Master Mix, Applied Biosystems).

Амплификацию проводили в ПЦР-амплификаторе ViiA™ (Applied Biosystems, США). Условия реакции включали первоначальную денатурацию (95 °C) и последующие 40 циклов репликации (95 °C 15 сек, 58 °C 30сек, 72 °C 60 сек). Уровень экспрессии гена *TNFA* нормировали относительно содержания мРНК гена «домашнего хозяйства» *RPLP0*. Каждая ПЦР-постановка включала в себя триплеты тестируемых образцов. Результаты количественной ПЦР в реальном времени анализировали с помощью программного обеспечения QuantStudio™ Real-Time PCR Software v1.1. Расчет относительной экспрессии гена *TNFA* проводили методом сравнения пороговых уровней амплификации ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), используя *RPLP0* в качестве нормировочного гена; группой контроля были ИФН-ДК здоровых доноров, в которой уровень экспрессии целевого гена *TNFA* принимался за 1.

Значения порогового цикла (C_t) рассчитывали как среднее значение триплетов каждого образца.

$$\Delta\Delta C_t(1,2) = (C_t \text{ TNF}\alpha - C_t \text{ RPLP0})_1 - (C_t \text{ TNF}\alpha - C_t \text{ RPLP0})_2,$$

где 1 – больные, 2 – контроль.

2.9 Определение активности фермента TNF α -конвертирующего фермента (TACE)

Для оценки активности фермента TACE в ДК в ответ на стимуляцию соответствующими агентами использовали коммерческий набор Sensolyte®520 TACE Activity Assay Kit согласно инструкции производителя (Anaspec, Inc, Fremont, CA). В данном случае субстратом для фермента выступал FRET (fluorescence resonance energy transfer)-пептид, содержащий специфичные для TACE сайты протеолитического расщепления и метку-краситель QXL™520, гасящий флуоресценцию красителя-донора 5-FAM (флуоресцеина). Расщепление субстрата активным ферментом сопровождается образованием двух пептидных фрагментов и восстановлением

флуоресценции 5-FAM, которая регистрируется на спектрофлуориметре в спектре возбуждения/испускания 490нм/520нм. Тестируемые образцы представляли собой клеточные лизаты, полученные после отмывки культур ДК ЗФР и инкубированные в течение 10 мин при 4 °С в буферном растворе (Component C) коммерческого набора, содержащего 0,1 % (v/v) Triton-X 100 (Sigma Aldrich, США), с последующим центрифугированием клеточной суспензии в течение 10 мин при $2500 \times g$, 4 °С. Далее собирали клеточные супернатанты и хранили при -80 °С до проведения теста. Параллельно со спектрофлуориметрическим анализом оценивали методом Бредфорда количество белка в образцах лизатов ДК. Для этого в лунки 96-луночного плоскодонного планшета вносили 50 мкл образца супернатанта клеточного лизата, затем добавляли по 50 мкл раствора кумасси и измеряли оптическую плотность при длине волны 594 нм на планшетном фотометре Multiscan FC (Thermo Fisher Scientific, США). Концентрацию белка определяли по стандартной серии разведений бычьего сывороточного альбумина возрастающей концентрации, которую исследовали параллельно с образцами. Концентрацию белка выражали в мкг/мл. Результаты исследования активности фермента TACE рассчитывались в виде количества относительных флуоресцентных единиц к 1 мкг белка в образце (RFU/мкг белка).

2.10 Статистический анализ

Математическая обработка полученных результатов проводилась методами описательной и непараметрической статистики с использованием программы «STATISTICA 6.0» и «GraphPad Prism8». Таблицы и рисунки содержат информацию в виде средних арифметических величин (m) и стандартной ошибки средних (SE); в отдельных случаях представлены также значения медианы (Me) и интерквартильного диапазона (IQR; LQ – UQ), а также минимальные и максимальные значения изучаемого признака (Min –

тах). Для выявления значимых различий между сравниваемыми показателями использовали непараметрические критерии: W-критерий Вилкоксона для связанных, парных выборок и U-критерий Манна-Уитни – для сравнения показателей между двумя независимыми группами. Для статистического изучения связи между различными показателями проводили корреляционный анализ с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена (R_s) и линейный регрессионный анализ. Различия считали статистически значимыми при уровне $p < 0,05$. Тепловые карты ряда показателей получали с помощью программы «GraphPad Prism8».

Глава 3. Результаты исследования

3.1 Цитотоксическая активность ИФН-ДК здоровых доноров против опухолевых клеток глиобластомных линий

3.1.1 Характеристика глиобластомных линий

В качестве модели для изучения цитотоксического потенциала ИФН-ДК нами были использованы клеточные линии, полученные из первичных культур фрагментов злокачественных глиом головного мозга. Несмотря на то, что в первичных культурах сохраняются специфические свойства самой опухоли и присущие ей клеточные взаимодействия, пролиферация опухолевых клеток в таких культурах снижена, что влияет на воспроизводимость результатов и ограничивает возможность проведения различных исследований. Генерация клеточных линий из первичных культур позволила нам увеличить количество опухолевых клеток после нескольких пассажей, а также получить морфологически однородные клеточные популяции.

Известно, что при длительном культивировании клеточные линии могут утрачивать присущие первичным опухолям признаки и приобретать новые. Однако, в отличие от ряда опухолей (меланомы, рак легкого, рак молочной железы, рак мочевого пузыря), глиобластома характеризуется низкой мутационной нагрузкой и слабой способностью к формированию неоантигенов [113]. Кроме того, низкая частота мутаций в сравнении с другими типами опухолей наблюдается не только в образцах глиобластомы пациентов, но и сохраняется при последующем культивировании опухолевых клеток в виде клеточных линий. При этом линии, полученные из опухоли пациентов с злокачественными глиомами, сохраняют генетические характеристики исходной опухоли в течение первых восьми пассажей [134]. Эти факты позволили нам использовать культуры глиобластомных линий в качестве клеток-мишеней для последующего изучения цитотоксического

потенциала ИФН-ДК. Стандартная иммортализованная глиобластомная линия U-87 служила контрольной культурой в различных сериях экспериментов.

Изучаемые глиобластомные линии, полученные из первичных культур опухоли пациентов, различались между собой морфологически, однако в целом проявляли черты, характерные для линии U-87 (Рисунок 3.1.1).

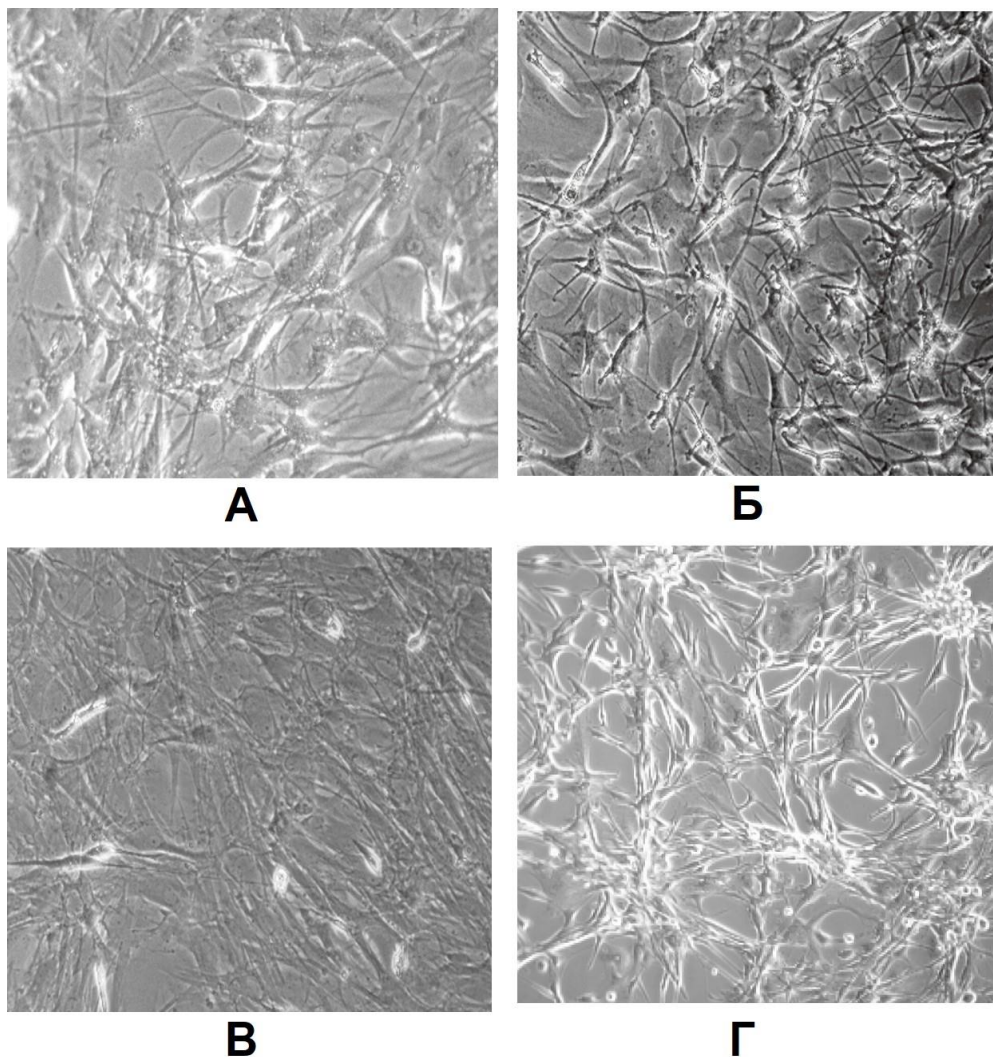


Рисунок 3.1.1 – Глиобластомные линии человека

На рисунке представлены нативные препараты (увеличение $\times 250$) трех репрезентативных глиобластомных линий после 3 – 6 пассажа (А – В), а также глиобластомной линии U-87 (Г).

В культурах клеточных линий присутствовали как мономорфные фибробластоподобные отросчатые клетки, так и полиморфные клетки с фибробластоподобной, полигональной или сферической формой. Кроме того, в клеточных линиях отмечалось присутствие одноядерных и многоядерных клеток.

Пролиферативную активность опухолевых клеток оценивали по экспрессии ядерного белка Ki-67, который присутствует в течение всего клеточного цикла активно пролиферирующих клеток, кроме фазы G0 [280]. По данным некоторых авторов уровень экспрессии Ki-67 ассоциируется со степенью злокачественности глиом [65]. Полученные нами глиобластомные линии обладали высокой способностью к пролиферации. В зависимости от клеточной линии пролиферативная активность (относительное количество Ki-67⁺ клеток) варьировала от 4,4 до 88,7 % (в среднем $(40,0 \pm 21,2) \%$), при этом для некоторых линий этот показатель даже превышал уровень пролиферации клеток линии U-87 (Рисунок 3.1.2).

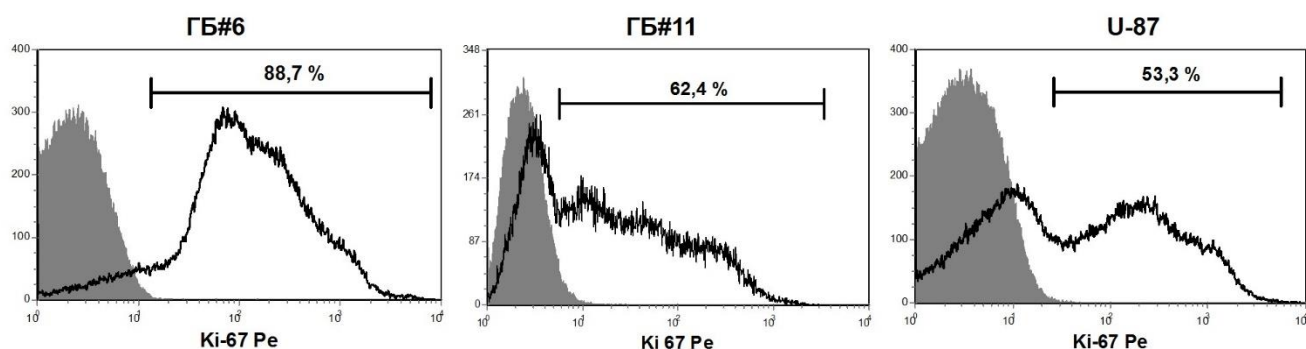


Рисунок 3.1.2 - Пролиферативная активность глиобластомных линий
Представлены гистограммы распределения внутриклеточной экспрессии Ki-67 в двух репрезентативных глиобластомных линиях (ГБ#6 и ГБ#11), полученных из первичных культур опухоли пациентов, а также в линии U-87.

В последнее время появились данные о том, что клетки глиобластомы человека могут экспрессировать маркеры как нейрального, так и мезенхимального происхождения. При этом для некоторых маркеров показана биологическая значимость с точки зрения злокачественности глиомных опухолей, прогрессии, прогноза и выживаемости пациентов, что позволяет их рассматривать в качестве молекулярных мишеней при разработке новых способов терапии. В связи с этим нами была поведена фенотипическая оценка ряда маркеров (CD133, CD73, CD271, HLA-DR) в культурах линий, полученных из фрагментов опухоли пациентов с глиобластомой (Таблица 3.1.1).

Таблица 3.1.1 – Фенотипическая характеристика клеток глиобластомных линий

Маркер	m ± SE	Me	Min - max	U-87
CD133	1,0 ± 0,5	0	0 – 3,5	0,6
CD73	67,8 ± 12,0	73	0 – 95,0	98,0
CD271	22,0 ± 12,8	8	0,9 – 96,0	5,9
HLA-DR	3,5 ± 0,8	3	0,7 – 8	20,0

Примечание: относительное количество клеток с различными маркерами (%) в культурах глиобластомных линий (n=8) представлено в виде средних значений ($m \pm SE$), медианы (Me), диапазона минимальных и максимальных значений (Min – max); для клеток линии U-87 – в виде индивидуальных значений.

Как видно из Таблицы 3.1.1, глиобластомные линии, полученные от разных пациентов, характеризовались разным уровнем экспрессии изучаемых маркеров, что отражает гетерогенность этой группы опухолей. Тем не менее, индивидуальный анализ позволил выявить ряд фенотипических особенностей.

Согласно полученным нами данным, клетки изучаемых линий слабо экспрессировали маркер CD133, описываемый в литературе как маркер опухолевых клеток со стволовыми свойствами [51]. При этом глиобластомная линия U-87, используемая нами в качестве контрольной культуры, была сопоставима по данному показателю с неиммортизированными линиями.

Известно, что клетки злокачественных глиом могут экспрессировать маркеры, типичные для клеток мезенхимального происхождения [180]. Проведенный нами фенотипический анализ показал, что только одна глиобластомная линия (ГБ#7) не содержала CD73⁺ клеток; значительная доля клеток глиобластомных линий, полученных из фрагментов опухоли пациентов, экспрессировала мезенхимальный маркер CD73. Характерно, что иммортилизованная линия U-87 отличалась от глиобластомных линий, полученных из первичных культур, большим содержанием CD73⁺ клеток.

Маркер CD271, относящийся к к суперсемейству TNF, известен как рецептор для фактора роста нервов (NGFR), необходимого для развития

нервной системы [315]. Показано, что CD271 экспрессируется на нейронах, нейральных стволовых клетках, астроцитарных и олигодендроцитарных предшественниках, шванновских клетках и участвует в регуляции поддержания жизнеспособности клеток и клеточного гибели, миграции и ингибиции роста аксонов [11]. С точки зрения опухолевого роста CD271 является медиатором инвазии и миграции глиобластомных клеток [145]. Изучаемые нами глиобластомные линии были гетерогенны по уровню экспрессии CD271 (Таблица 3.1.1). Среди анализируемых культур были линии как с малым количеством CD271-позитивных клеток (0,9 % и 4 %), так и линии, в которых более половины клеток экспрессировали этот маркер (две линии с уровнем экспрессии 51 и 96 %, соответственно). Стоит отметить, что клетки линии U-87 характеризовались низким уровнем экспрессии CD271. Учитывая тот факт, что U-87 представляет стандартную иммортализованную линию опухолевых клеток, можно предположить, что свойства миграции и инвазии в данном случае не являются ключевыми с точки зрения поддержания роста культуры.

Еще одна молекула, которая рассматривается как маркер злокачественности глиальной опухоли и ассоциируется с низкой выживаемостью пациентов, является молекула МНС II класса HLA-DR [89]. Показано, что в отличие от нормальной ткани головного мозга клетки глиомных опухолей характеризуются повышенной экспрессией HLA-DR [89, 100]. Согласно полученным нами данным в культивируемых глиобластомных линиях присутствовали HLA-DR⁺ клетки. В то же время в среднем относительное количество HLA-DR⁺ клеток в линиях было ниже по сравнению с долей HLA-DR⁺ клеток линии U-87.

Таким образом, полученные нами глиобластомные линии характеризуются различной морфологической структурой, способны пролиферировать, поддерживая рост культур, а также отличаются уровнем экспрессии поверхностных маркеров, свойственных для злокачественных глиом головного мозга, что в целом отражает гетерогенность этой группы

опухолей и определяет индивидуальные различия между пациентами с глиобластомой.

3.1.2 Характеристика цитотоксической функции ИФН-ДК здоровых доноров против клеток глиобластомных линий

Проведенные нами ранее исследования показали, что ИФН-ДК доноров обладают дозозависимой цитотоксической активностью против стандартных опухолевых линий различного происхождения и нозологии, в том числе и глиобластомной линий человека U-87 [318]. Учитывая последнее, можно было предположить, что ИФН-ДК также способны лизировать неиммортиализованные клеточные линии, полученные из опухоли пациентов с глиобластомой. В то же время гетерогенность глиобластомных линий с точки зрения морфологии и фенотипа не исключала и различную чувствительность опухолевых клеток пациентов к цитотоксическому действию ДК.

Как видно из Таблицы 3.1.2, ИФН-ДК доноров лизировали клетки всех тестируемых глиобластомных линий (ГБ#1 – ГБ#13).

Таблица 3.1.2 – Цитотоксическая активность ИФН-ДК здоровых доноров против клеток глиобластомных линий

Линия	n	m ± SE	Me (IQR)	Min - max
1	2	3	4	5
ГБ#1	1	20,0	—	—
ГБ#2	1	30,7	—	—
ГБ#3	2	48,2 ± 10,0	48,2	38,2 – 58,2
ГБ#4	1	49,0	—	—
ГБ#5	1	85,0	—	—
ГБ#6	10	48,8 ± 3,2	45,4 (41,0 – 55,0)	38,0 – 69,9

Продолжение Таблицы 3.1.2

1	2	3	4	5
ГБ#7	7	$68,0 \pm 5,0$	69,8 (63,4 – 76,2)	5,5 – 79,3
ГБ#8	18	$38,4 \pm 3,6$	36,9 (23,6 – 49,5)	15,3 – 68,5
ГБ#9	2	$46,8 \pm 12,0$	46,8 (34,8 – 58,7)	34,8 – 58,7
ГБ#10	10	$32,9 \pm 3,6$	29,1 (23,0 – 43,5)	20,0 – 50,0
ГБ#11	5	$45,6 \pm 5,2$	47,2 (40,0 – 50,7)	29,6 – 60,7
ГБ#12	4	$43,9 \pm 4,3$	45,5 (37,3 – 49,4)	31,5 – 50,8
ГБ#13	2	$60,8 \pm 2,6$	60,8 (58,2 – 63,3)	58,2 – 63,3
U-87	6	$38,8 \pm 5,0$	37,3 (31,2 – 45,2)	23,4 – 58,7

Примечание: в виде индивидуальных (для линий ГБ#1, ГБ#2, ГБ#4, ГБ#5) или средних значений ($m \pm SE$), медианы (Me), дипазона интерквартильных (IQR) и минимальных и максимальных (Min – max) значений представлены данные об уровне цитотоксической активности (%) ИФН-ДК здоровых доноров против глиобластомных линий (ГБ), полученных из первичных культур опухоли пациентов, а также против опухолевой линии U-87. n – число наблюдений (количество тестируемых образцов ДК, полученных от различных доноров).

В зависимости от клеточной линии значения цитотоксичности ИФН-ДК варьировали от 20,0 до 85,0 %, что может свидетельствовать о разной степени чувствительности глиобластомных линий, полученных от различных пациентов. Тем не менее, в большинстве случаев ДК доноров обладали выраженной способностью лизировать глиобластомные клетки. Уровень цитотоксичности ИФН-ДК против 9 из 13 опухолевых линий был выше 40,0 %. Характерно, что значения цитотоксической активности ИФН-ДК против клеток линии U-87 были ниже, чем против ряда неиммортизированных глиобластомных линий, полученных из первичных культур опухоли пациентов.

В отдельной серии экспериментов была проведена оценка апоптоза опухолевых клеток глиобластомных линий по связыванию клеток с двумя маркерами – Annexin V (признак раннего апоптоза) и PI (признак позднего апоптоза/некроза). В качестве клеток-мишеней были использованы две глиобластомные линии, характеризующиеся высокой чувствительностью к цитотоксическому действию ИФН-ДК (ГБ#6 и ГБ#11). Как видно из Таблицы 3.1.3, совместное культивирование исходно жизнеспособных глиобластомных клеток, предварительно меченных витальным красителем CFSE, с ИФН-ДК доноров сопровождалось значимым многократным увеличением относительного количества Annexin V⁺ клеток, в том числе в фазе раннего и позднего апоптоза. Таким образом, можно заключить, что в основе цитотоксического действия ДК против глиобластомных клеток лежал механизм индукции апоптоза.

Таблица 3.1.3 – Влияние ИФН-ДК доноров на апоптоз в опухолевых клетках глиобластомных линий

ГБ	Условия	Annexin V ⁺ /PI ⁻ (%)	Annexin V ⁺ /PI ⁺ (%)	Annexin V ⁺ (%)
ГБ#6	Опухолевые клетки	1,86 ± 0,41	0,03 ± 0,02	1,86 ± 0,41
	Опухолевые клетки + ДК	32,43 ± 5,72*	0,68 ± 0,27*	33,16 ± 5,81*
ГБ#11	Опухолевые клетки	1,66 ± 0,0	0,6 ± 0,0	1,72 ± 0,0
	Опухолевые клетки + ДК	21,0 ± 2,0*	38,0 ± 7,0*	59,0 ± 5,0*

Примечание: данные представлены в виде средних значений ($m \pm SE$) относительного количества (%) Annexin V⁺/PI⁻, Annexin V⁺/PI⁺, а также общего количества Annexin V⁺ опухолевых клеток двух глиобластомных линий (ГБ#6, n=7 и ГБ#11, n=3) в гейте CFSE⁺ клеток в отсутствии ДК (опухолевые клетки) и в условиях совместного культивирования с ИФН-ДК доноров (опухолевые клетки + ДК) в течение 18 часов при соотношении эффекторов/мишеней 10:1.
* $p_w < 0,05$ - достоверность различий с контрольной группой (опухолевые клетки).

В отличие от ДК супернатанты ИФН-ДК доноров обладали слабой цитотоксической активностью против глиобластомных линий, средние

значения которой не превышали 12 % при добавлении супернатантов в дозе 25 % (v/v) (Рисунок 3.1.3). Более того, в отношении линии U-87 супернатанты ИФН-ДК не проявляли цитотоксическую активность (0 %). Эти данные позволили заключить, что для реализации цитотоксической активности ИФН-ДК против глиобластомных линий необходимо контактное взаимодействие ДК с опухолевыми клетками.

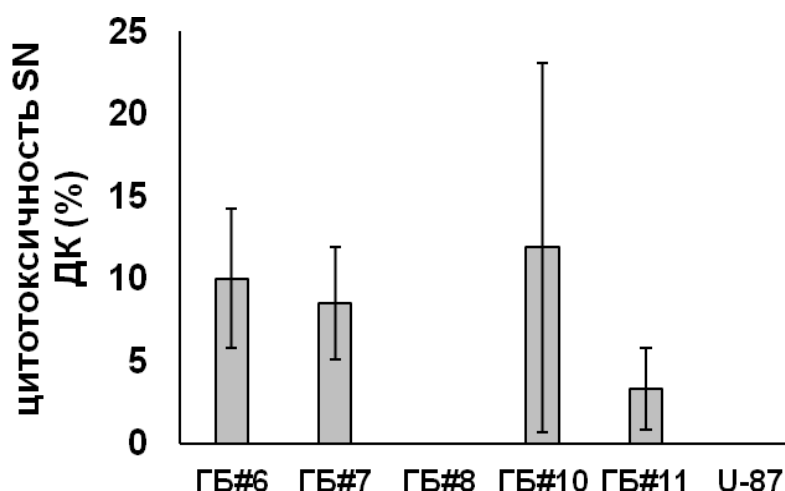


Рисунок 3.1.3 - Цитотоксическая активность супернатантов ИФН-ДК здоровых доноров против глиобластомных линий

На рисунке представлены данные в виде средних значений ($m \pm SE$) цитотоксической активности супернатантов (v/v 25 %) ИФН-ДК доноров против клеток пяти репрезентативных глиобластомных линий ГБ#6 (n=7), ГБ#7 (n=3), ГБ#8 (n=3), ГБ#10 (n=3), ГБ#11 (n=3), а также против линии U-87 (n=3) в 24ч МТТ-тесте. n – число наблюдений (количество тестируемых образцов супернатантов ДК, полученных от различных доноров).

Клетки глиобластомы при культивировании в бессывороточной среде в присутствии ряда ростовых факторов (EGF, FGFb) утрачивают способность к адгезии и росту в виде монослоя, образуя свободноплавающие колонии шарообразной формы, или нейросферы. Считается, что такая форма роста глиобластомных культур ассоциируется с присутствием в них малочисленной популяции стволовых опухолевых клеток, которые обладают выраженным пролиферативным потенциалом, способностью к самоподдержанию и дифференцировке, участвуют в росте, инвазии и метастазировании опухоли [159, 170].

В отдельной серии экспериментов была изучена цитотоксическая активность ИФН-ДК доноров против клеток нейросфер, которые были получены при культивировании клеток первичной опухоли в бессывороточной среде в присутствии ростовых факторов EGF и FGFb (Рисунок 3.1.4А). При этом фенотип клеток нейросфер был схож с фенотипом клеток, растущих в виде адгезивного монослоя глиобластомной линии, полученной из опухоли этого же пациента (Таблица 3.1.4).

Таблица 3.1.4 – Сравнительная характеристика глиобластомных клеток, культивируемых в различных условиях

Маркер	нейросферы	Адгезивный монослой
CD133	0	0
CD73	83	73
CD271	4	4
HLA-DR	3	3

Примечание: в виде индивидуальных значений представлены данные однократного фенотипического анализа экспрессии перечисленных маркеров на клетках нейросфер и линии, растущей в виде адгезивного монослоя, полученных из опухоли одного пациента с глиобластомой.

Согласно полученным нами данным, ИФН-ДК здоровых доноров обладали цитотоксической активностью против клеток полученных нами нейросфер (Рисунок 3.1.4Б). При этом, уровень цитотоксичности ДК против клеток нейросфер был ниже в среднем на 20,0 % по сравнению с аналогичным показателем для ДК против адгезивной линии опухолевых клеток этого же пациента, но культивируемой в стандартных условиях в присутствии сыворотки ((43,7 ± 3,9) vs (33,8 ± 5,3) %), однако различия не были статистически значимыми.

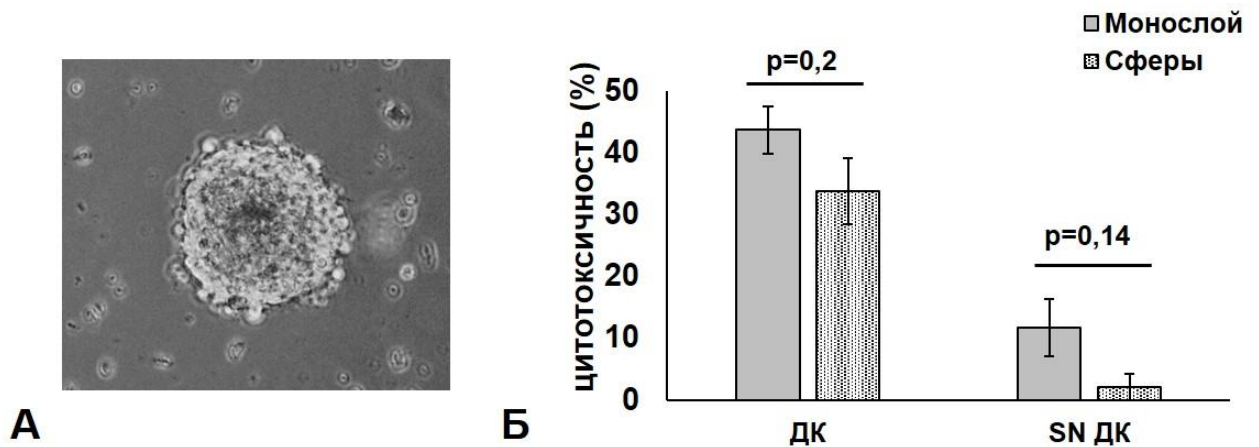


Рисунок 3.1.4 – Цитотоксическая активность ИФН-ДК доноров против клеток нейросфер

А) представлен нативный препарат (увеличение $\times 250$) одной из репрезентативных нейросфер, полученных из первичной глиобластомной культуры; Б) представлены данные в виде средних значений ($m \pm SE$) цитотоксической активности ИФН-ДК ($n = 8$) и супернатантов ДК (SN ДК, $n = 6$) доноров против опухолевых клеток пациента с глиобластомой, культивируемых в стандартных условиях (монослой) и в бессывороточной среде в виде нейросфер (сферы). p – значимость различий между показателями по W -критерию Вилкоксона.

Как и в случае с опухолевыми клетками, растущими в виде адгезивной монослойной линии, клетки нейросфер были слабо чувствительны к цитотоксическому действию супернатантов ИФН-ДК доноров в сравнении с самими ДК ($p = 0,028$). Кроме того, цитотоксичность супернатантов одних и тех же культур ДК доноров против клеток нейросфер была ниже, чем против клеток адгезивно растущей линии. Эти различия регистрировались на уровне тенденции (Рисунок 3.1.4Б). Индивидуальный анализ показал, что в большинстве случаев (5/6) цитотоксичность супернатантов ДК против клеток нейросфер полностью отсутствовала (0 %) и только в одном случае была на уровне 12,7 %.

Анализ уровня апоптоза показал, что ИФН-ДК доноров индуцировали значимое увеличение относительного количества Annexin V⁺ клеток нейросфер, в том числе в фазе раннего (на уровне тенденции, $p=0,08$) и позднего апоптоза ($p = 0,02$) (Таблица 3.1.4). Однако стоит отметить, что уровень апоптоза в клетках нейросфер при со-культивировании с ДК доноров

в большинстве случаев (4/5) было ниже по сравнению с аналогичными показателями в культурах адгезивно растущей глиобластомной линии, полученной из опухоли этого же пациента (Таблицы 3.1.3 и 3.1.5).

Таблица 3.1.5 – Влияние ИФН-ДК доноров на апоптоз в опухолевых клетках нейросфер

Условия	Annexin V ⁺ /PI ⁻ (%)	Annexin V ⁺ /PI ⁺ (%)	Annexin V ⁺ (%)
н/сф	4,18 ± 1,38	0,02 ± 0,01	4,19 ± 1,39
н/сф + ДК	24,72 ± 1,63	4,00 ± 3,02*	28,32 ± 8,33*

Примечание: в виде средних значений ($m \pm SE$) представлены данные об относительном количестве (%) Annexin V⁺/PI⁻, Annexin V⁺/PI⁺, а также общего количества Annexin V⁺ опухолевых клеток линии ГБ#6, культивированных в бессывороточных условиях в виде нейросфер ($n = 5$), в гейте CFSE⁺ клеток в отсутствии ДК (н/сф) и в условиях совместного культивирования с ЛПС-стимулированными ИФН-ДК доноров (н/сф + ДК) в течение 18 часов при соотношении эффекторов/мишеней 10:1. n – количество тестируемых образцов ДК, полученных от различных доноров. * $p_w < 0,05$ - достоверность различий между контрольной и опытной группами.

В целом, полученные в Главе 3.1.1 данные свидетельствуют о том, что цитотоксическая активность ИФН-ДК может быть направлена не только против клеток стандартных иммортализованных опухолевых линий, но и против опухолевых линий, полученных из первичных культур опухоли больных глиобластомой. При этом индивидуальные различия между пациентами проявляются как на уровне морфологических и фенотипических характеристик соответствующих опухолевых линий, так и на уровне чувствительности глиобластомных линий к цитотоксическому действию ИФН-ДК. Цитотоксический эффект ИФН-ДК требует клеточного контакта, на что указывает полное отсутствие или слабая цитотоксическая активность супернатантов ДК в культурах глиобластомных линий, и опосредуется через индукцию апоптоза глиобластомных клеток. Кроме того, мишенями цитотоксической активности ИФН-ДК наряду с опухолевыми клетками, культивируемыми в стандартных условиях, могут быть и клетки нейросфер,

для поддержания роста которых требуется бессывороточная среда и присутствие ростовых факторов. Поскольку формирование нейросфер может рассматриваться как признак опухолевых стволовых клеток, полученные результаты могут иметь важное значение с точки зрения потенциальной роли ДК в качестве клеток-эффекторов, способных индуцировать гибель глиобластомных клеток различной степени дифференцировки.

3.2 Экспрессия проапоптогенных рецепторов на клетках глиобластомных линий

Одним из центральных механизмов реализации цитотоксической функции ДК, как и других эффекторных клеток врожденного и приобретенного иммунитета (NK-клеток, цитотоксических CD8⁺ Т-лимфоцитов), является рецепторно-зависимый механизм [21]. Рецепторно-зависимая цитотоксичность опосредуется за счет взаимодействия мембранно-связанных и растворимых проапоптогенных молекул (TNF α , FasL, TRAIL и др.), экспрессируемых цитотоксическими клетками, с соответствующими рецепторами на опухолевых клетках.

Известно, что ДК, в том числе и ИФН-ДК, экспрессируют лиганды TNF α , FasL, а также TRAIL [162, 163, 350]. Однако, могут ли эти медиаторы участвовать в реализации цитотоксической функции ИФН-ДК против клеток глиобластомы, неизвестно. Как было показано в Главе 3.1.2, в большинстве случаев ИФН-ДК доноров характеризовались высоким уровнем цитотоксичности (> 40 %), хотя линии опухолевых клеток от разных пациентов различались по чувствительности к лизису. Такие различия могли быть связаны с особенностями экспрессии проапоптогенных рецепторов (TNF-R, Fas, TRAIL-R и др.), участвующих в индукции гибели опухолевых клеток.

В связи с этим на следующем этапе нами был проведен анализ экспрессии проапоптогенных рецепторов на клетках глиобластомных линий, полученных из первичных опухолевых культур.

Проведенные исследования показали, что на клетках глиобластомных линий представлены два типа рецепторов к медиатору TNF α – TNF-R1 и TNF-R2 (Рисунок 3.2.1).

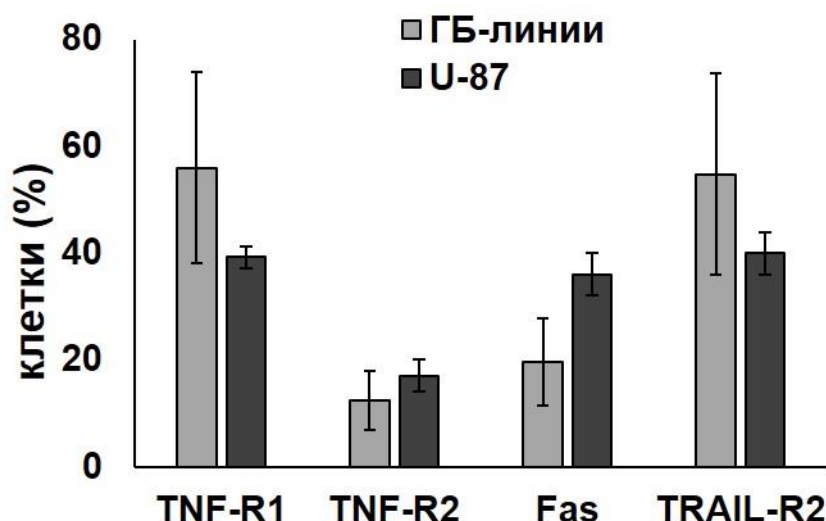


Рисунок 3.2.1 - Экспрессия рецепторов TNF-семейства на глиобластомных клетках

Представлены данные в виде средних значений ($m \pm SE$) относительного количества (%) клеток пяти репрезентативных глиобластомных линий (ГБ-линии), полученных из первичных культур опухоли пациентов, а также клеток линии U-87.

Количество клеток, которые экспрессировали рецептор TNF-R1, участвующий в проведении сигнала к апоптозу [10], варьировало от 11,3 до 89,8 % в зависимости от клеточной линии (в среднем $(56,0 \pm 18,0)$ %). В то же время рецептор TNF-R2, лишенный домена смерти (DD) и не обладающий проапоптогенной активностью [10], был представлен на глиобластомных клетках в меньшей степени (от 2,0 до 28,0 %). Количество опухолевых клеток, экспрессирующих TNF-R2, среди всех анализируемых линий в среднем составляло $(12,5 \pm 5,5)$ %. В качестве примера на Рисунке 3.2.2 приведены индивидуальные значения распределения (Dot Plot гистограммы) экспрессии TNF-R1 и TNF-R2 на поверхности опухолевых клеток одной из анализируемых клеточных линий. Видно, что количество TNF-R1⁺ клеток существенно выше, чем TNF-R2⁺ клеток.

Для сравнения нами была проведена оценка экспрессии изучаемых рецепторов на клетках линии U-87 (Рисунок 3.2.1). Уровень экспрессии проапоптогенного рецептора TNF-R1 на клетках глиобластомной линии U-87 был ниже аналогичного показателя в группе линий, полученных из опухоли пациентов. При этом количество TNF-R2⁺ клеток линии U-87 было в целом

сопоставимо с аналогичным показателем для неиммортизированных глиобластомных линий.

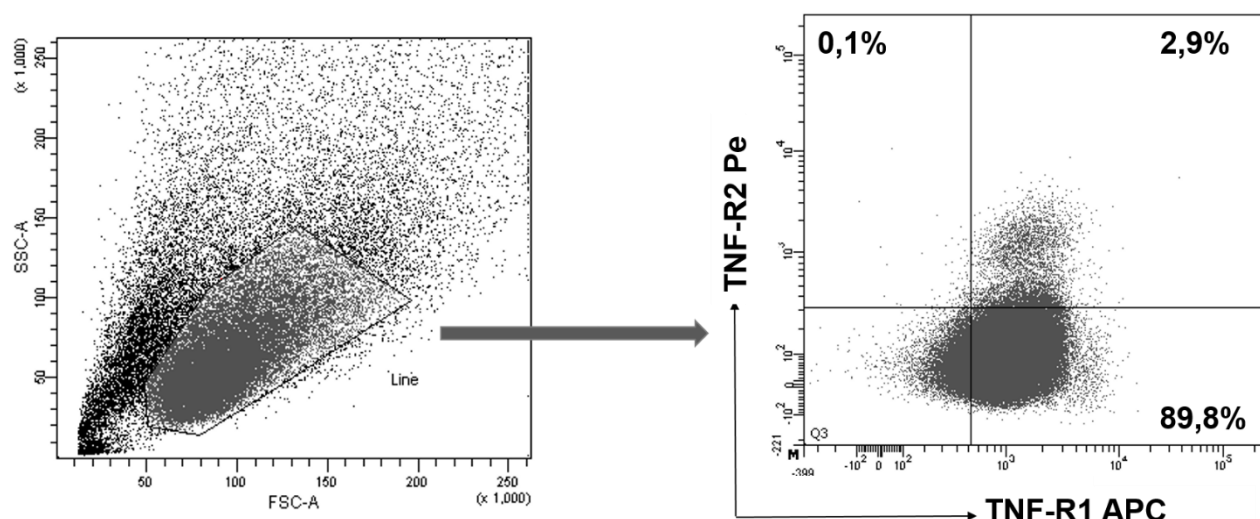


Рисунок 3.2.2 - Экспрессия рецепторов TNF-R на глиобластомных клетках

Представлена цитометрическая характеристика репрезентативной глиобластомной линии. На левом рисунке показана область гейтирования клеток глиобластомной линии, в которой определяли экспрессию на клетках рецепторов TNF-R. На правом рисунке представлены индивидуальные Dot Plot гистограммы распределения опухолевых клеток по флуоресценции APC-меченных анти-TNF-R1-антител и Pe-меченных анти-TNF-R2-антител. Левый верхний квадрант – TNF-R1⁻TNF-R2⁺ клетки, правый верхний квадрант – TNF-R1⁺TNF-R2⁺ клетки, правый нижний квадрант – TNF-R1⁺TNF-R2⁻ клетки.

Анализ экспрессии рецептора TRAIL-R2 (Рисунок 3.2.1), содержащего, как и TNF-R1, домен DD [21], показал, что глиобластомные линии характеризовались выраженной экспрессией указанного рецептора (в среднем $(54,8 \pm 18,8) \%$). Только одна опухолевая линия была TRAIL-R2-негативна. Во всех остальных случаях доля TRAIL-R2⁺ клеток среди изучаемых глиобластомных линий варьировала от 22,0 до 95,0 % в зависимости от линии. В качестве примера на Рисунке 3.2.3 приведены индивидуальные значения относительного количества TRAIL-R2-позитивных клеток в двух анализируемых линиях, демонстрирующие высокий уровень экспрессии данного рецептора.

Характерно, что линия U-87, которая считается чувствительной к

TRAIL-опосредованному лизису [160], экспрессировала рецептор TRAIL-R2 на уровне, ниже аналогичного показателя отдельных неиммortalизованных глиобластомных линий (Рисунки 3.2.1, 3.2.3).

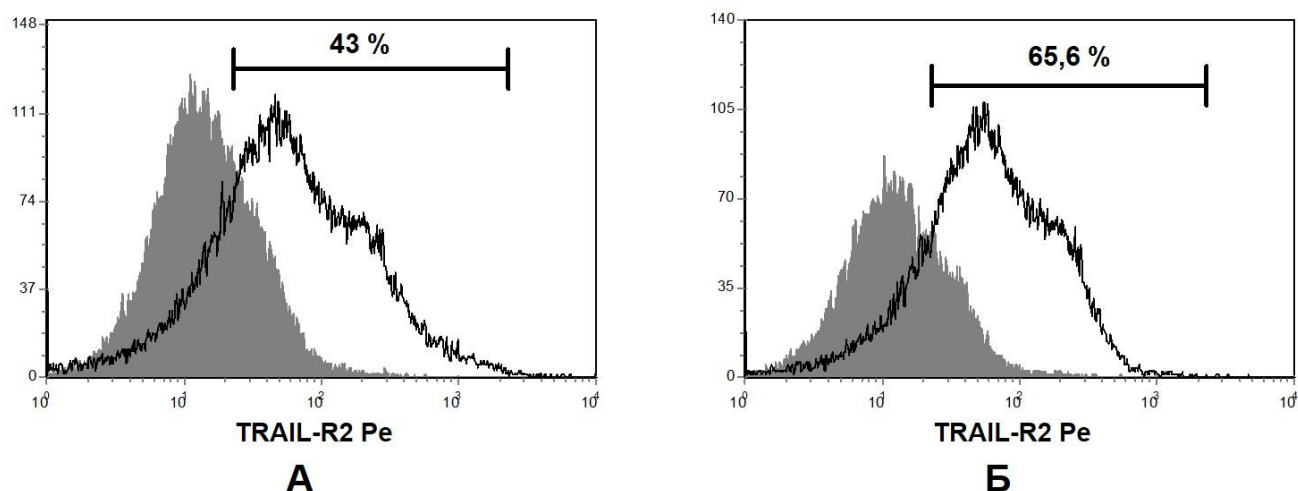


Рисунок 3.2.3 - Экспрессия рецептора TRAIL-R2 на клетках глиобластомных линий

Представлены гистограммы распределения экспрессии TRAIL-R2 на клетках двух репрезентативных глиобластомных линий (А – ГБ#14, Б – ГБ#12), полученных из опухоли пациентов, с указанием относительного количества (%) клеток, позитивных по экспрессии данного рецептора.

Рецептор Fas, механизм действия которого также связан с вовлечением домена DD при активации соответствующим лигандом (FasL) [21, 225], был представлен на клетках глиобластомных линий в меньшей степени по сравнению с TNF-R1 и TRAIL-R2 (Рисунок 3.2.1). Индивидуальный анализ экспрессии Fas показал, что линии характеризовались гетерогенностью по экспрессии этого рецептора, при этом максимальное значение было на уровне 47,0 % (Рисунок 3.2.4). В то же время относительное количество Fas⁺ клеток линии U-87 (Рисунок 3.2.1) составляло в среднем $(36,0 \pm 4,0)$ % и превышало верхние значения интерквартильного диапазона экспрессии Fas в группе неиммortalизованных глиобластомных линий (IQR (8,5 – 28,3) %).

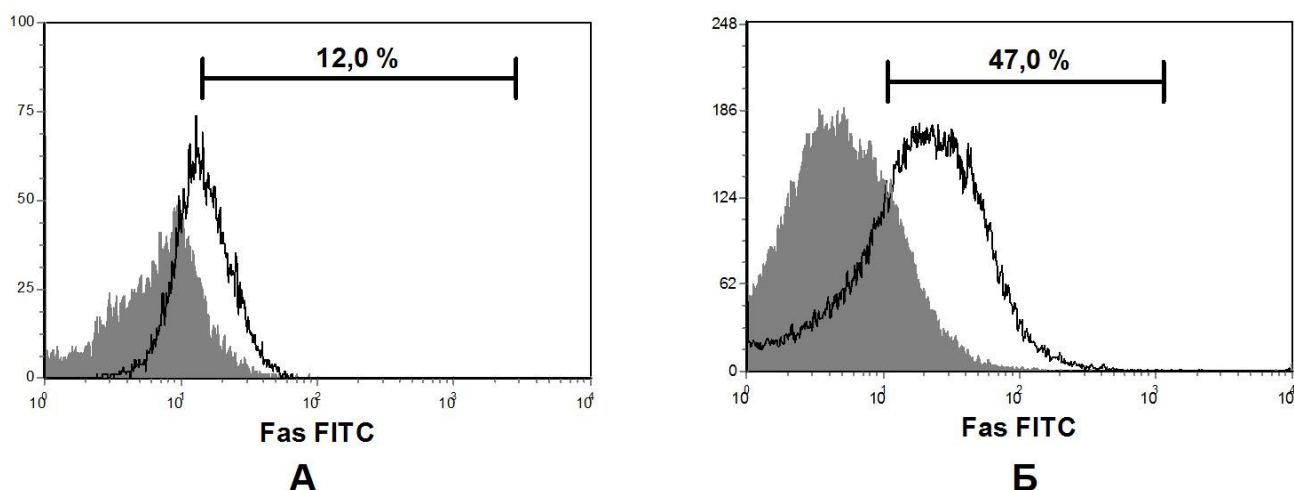


Рисунок 3.2.4 - Экспрессия рецептора Fas на клетках глиобластомных линий

Представлены гистограммы распределения экспрессии Fas на клетках двух репрезентативных глиобластомных линий (А - ГБ#12; Б - ГБ#6), полученных из опухоли пациентов, с указанием относительного количества (%) клеток, позитивных по экспрессии данного рецептора.

Таким образом, проведенный фенотипический анализ позволяет заключить, что присутствие проапоптогенных рецепторов TNF-R1, Fas и TRAIL-R2 на клетках опухолевых линий, полученных из первичных культур глиобластомы, свидетельствует о возможном вовлечении TNF α -, FasL- и TRAIL-зависимых сигнальных путей в индукцию лизиса, опосредованного ИФН-ДК доноров. При этом выявленные индивидуальные различия в уровне экспрессии изученных рецепторов между глиобластомными линиями, полученными от разных пациентов, могут определять разную чувствительность опухолевых клеток к рецепторно-опосредованному механизму апоптоза. Кроме того, сравнительные данные об экспрессии TNF-R, Fas и TRAIL-R2 на клетках линии U-87 и неиммortalизованных глиобластомных линий указывают на тот факт, что стандартные иммortalизованные опухолевые линии не всегда могут служить оптимальной моделью клеток-мишеней для изучения противоопухолевой цитотоксической активности ДК, поскольку не отражают в полной мере существующую гетерогенность глиомных опухолей головного мозга.

3.3 Сигнальные пути, вовлеченные в реализацию цитотоксической функции ИФН-ДК здоровых доноров против клеток глиобластомных линий

3.3.1 Роль рецепторно-опосредованной цитотоксической активности ИФН-ДК здоровых доноров

Полученные на предыдущем этапе данные об экспрессии проапоптогенных рецепторов семейства TNF на клетках линий, культивированных из фрагментов опухоли пациентов с глиобластомой, позволили предположить, что одним их механизмов реализации цитотоксической активности ИФН-ДК против изучаемых мишеней может быть взаимодействие лигандов TNF α , FasL и TRAIL, экспрессируемых дендритными клетками [162, 163, 302], с рецепторами TNF-R1, Fas или TRAIL-R2, соответственно, присутствующими на опухолевых клетках.

Чтобы оценить вклад указанных сигнальных путей в реализацию цитотоксической активности ДК против глиобластомных клеток, ИФН-ДК доноров предварительно инкубировали в течение 60 мин с растворимыми рецепторами rTNF-R1, rFas или rTRAIL-R2. Такой подход позволил нейтрализовать действие лигандов TNF α , FasL или TRAIL, экспрессируемых на ДК, и блокировать соответствующие апоптоз-инициирующие сигнальные пути в клетках-мишенях.

В целом по группе наибольший блокирующий эффект на цитотоксичность ДК против клеток глиобластомных линий отмечался при обработке ИФН-ДК доноров растворимым рецептором rTNF-R1 (Рисунок 3.3.1). Цитотоксическая активность ДК в этом случае значительно снижалась в среднем на $(18,1 \pm 5,1) \%$ ($p = 0,0009$). В то же время обработка ДК рецепторами rFas или rTRAIL-R2 не приводила к статистически достоверному снижению цитотоксической активности ИФН-ДК доноров ($p = 0,12$ и $p = 0,27$, соответственно). Таким образом, наибольший вклад в реализацию цитотоксической активности ИФН-ДК против клеток глиобластомных линий

среди изученных рецептор/лиганд-опосредованных взаимодействий принадлежит TNF α /TNF-R1-сигнальному пути.

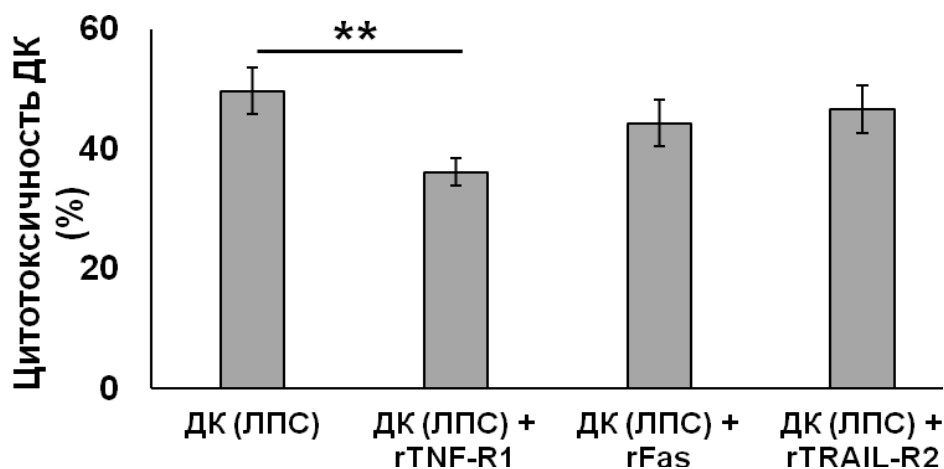


Рисунок 3.3.1 – Влияние блокирования проапоптогенных лигандов семейства TNF на цитотоксическую активность ИФН-ДК доноров против глиобластомных линий

Представлены суммарные данные в виде средних значений ($m \pm SE$) цитотоксической активности (%) интактных ЛПС-стимулированных ИФН-ДК (ДК (ЛПС), $n=22$) и предварительно обработанных в течение 1 часа растворимыми рецепторами rTNF-R1 (10 мкг/мл, $n=22$), rFas (10 мкг/мл, $n=17$) или rTRAIL-R2 (10 мкг/мл, $n=18$), против глиобластомных линий. Влияние rTNF-R1 на цитотоксическую активность ИФН-ДК доноров исследовали на восьми глиобластомных линиях, эффект rFas и rTRAIL-R2 – на шести глиобластомных линиях. Эффект блокирующих факторов в культурах каждой глиобластомной линии изучался с использованием ИФН-ДК от 3 – 5 различных доноров. n – общее число наблюдений. ** $p_w < 0,01$ - достоверность различий между показателями.

Далее между тестируемыми клеточными линиями был проведен индивидуальный сравнительный анализ блокирующего эффекта растворимых рецепторов rTNF-R1, rFas или rTRAIL-R2 на цитотоксическую активность ДК, что позволило выяснить, могут ли изученные сигнальные пути быть для ДК универсальными механизмами лизиса глиобластомных клеток. Актуальность этого вопроса также была связана с данными, продемонстрированными в предыдущих главах, о гетерогенности глиобластом с точки зрения присутствия маркеров злокачественности и проапоптогенных рецепторов, а также чувствительности опухолевых клеток к цитотоксическому действию ИФН-ДК доноров.

Действительно, при изучении TNF α /TNF-R1-сигнального пути (Рисунок 3.3.2) блокирующий эффект rTNF-R1 на цитотоксичность ДК доноров отмечался в шести из восьми тестируемых глиобластомных линиях (медиана супрессии 33 %).

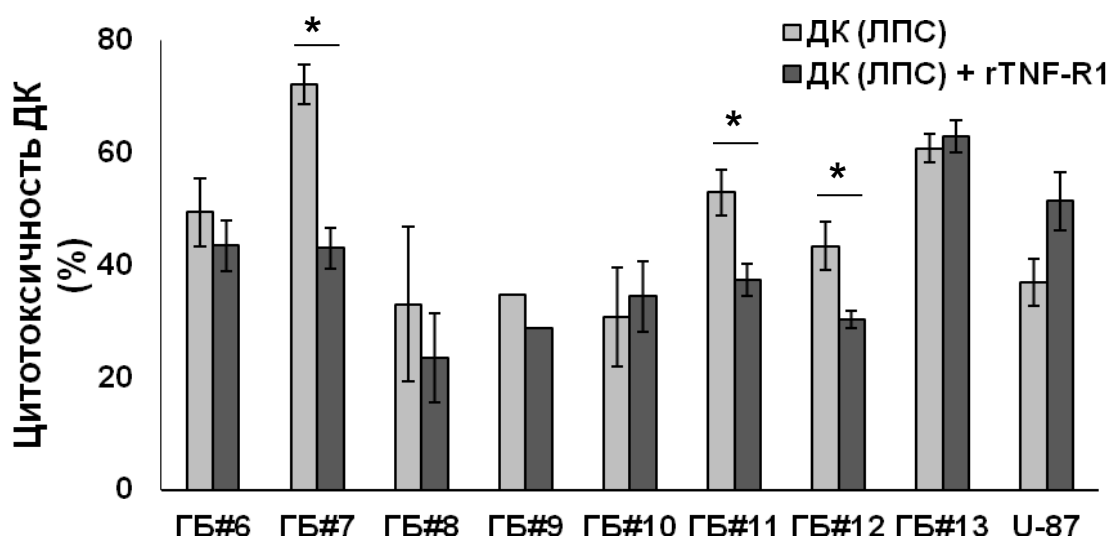


Рисунок 3.3.2 – Влияние rTNF-R1 на цитотоксическую активность ИФН-ДК доноров против клеток глиобластомы

Данные представлены в виде средних значений ($m \pm SE$) цитотоксической активности (%) интактных ЛПС-стимулированных ИФН-ДК (ДК (ЛПС)) и предварительно обработанных в течение 1 часа растворимым рецептором rTNF-R1 (10 мкг/мл, ДК (ЛПС) + rTNF-R1) против глиобластомных линий, полученных из фрагментов опухоли пациентов (ГБ), а также против линии U-87 ($n=3$). Число наблюдений для каждой из линий $n = 3 - 5$, кроме линии ГБ#9 ($n=1$). * $p_w < 0,05$ - достоверность различий между показателями.

Выраженность блокирующего эффекта rTNF-R1 на цитотоксическую активность ИФН-ДК варьировала, что может свидетельствовать о разной степени чувствительности опухолевых клеток, полученных от различных пациентов, к TNF α /TNF-R1-сигнальному пути. Так, наибольшее ингибирующее влияние rTNF-R1 на цитотоксичность ДК было на уровне $(40,1 \pm 5,5) \%$ (против линии ГБ#7), тогда как минимальное снижение цитотоксической активности ДК в ответ на обработку rTNF-R1 составило в среднем $(11,0 \pm 7,3) \%$ (против линии ГБ#6).

Две из восьми опухолевых линий (ГБ#10 и ГБ#13) оказались не чувствительны к TNF α /TNF-R1-опосредованному пути, о чем

свидетельствовало отсутствие блокирующего эффекта rTNF-R1 на исходно высокую цитотоксичность ДК. Кроме того, стоит отметить отсутствие корреляционной связи между экспрессией рецепторов к TNF α на опухолевых клетках и блокирующим эффектом rTNF-R1 ($R_s = 0,50$, $p = 0,6$ для TNF-R1 и $R_s = 0,50$, $p = 0,67$ для TNF-R2). Выявленный факт свидетельствовал о том, что вариации в чувствительности опухолевых клеток к TNF α /TNF-R1-опосредованному лизису не связаны с особенностями экспрессии TNF-R. Характерно, что линия U-87, несмотря на экспрессию рецепторов TNF-R, не была чувствительна к TNF α /TNF-R1-зависимому механизму цитотоксической активности ИФН-ДК, поскольку обработка rTNF-R1 дендритных клеток не приводила к снижению цитотоксичности ИФН-ДК (Рисунок 3.3.2).

Таким образом, опухолевые клетки глиобластомных линий в большинстве случаев чувствительны к TNF α /TNF-R1-опосредованному цитотоксическому действию ИФН-ДК, что подтверждается ослаблением цитотоксической активности ДК при блокировании данного пути. С другой стороны, только частичное подавление цитотоксической активности ДК при блокировании TNF α /TNF-R1-сигнального пути, а также отсутствие эффекта rTNF-R1 в культурах клеток двух из восьми линий свидетельствует о существовании TNF α -независимых механизмов цитотоксического действия ИФН-ДК против глиобластомных клеток.

Анализ чувствительности глиобластомных линий к FasL/Fas-опосредованной цитотоксичности, как и в случае с rTNF-R1, выявил разный уровень блокирующего эффекта rFas на цитотоксичность ДК в зависимости от тестируемой глиобластомной линии (Рисунок 3.3.3). Блокирование FasL/Fas-зависимого пути снижало цитотоксическую активность ДК доноров только против трех из шести тестируемых линий (ГБ#7, ГБ#11 и ГБ#12). Медиана ингибирующего эффекта rFas в культурах чувствительных линий составляла 19,6 %. Выраженность блокирующего эффекта на FasL/Fas-зависимого путь не зависела от уровня экспрессии Fas на опухолевых клетках ($R_s = 0,323$; $p = 0,4$). Так, максимальный уровень блокирующего влияния rFas на цитотоксичность

ДК наблюдался против линии ГБ#12 (в среднем $(25,1 \pm 2,4) \%$), клетки которой слабо экспрессировали рецептор Fas ($12,0 \%$). В то же время цитотоксическая активность ДК против трех из шести тестируемых линий (ГБ#6, ГБ#8, ГБ#10), в которых доля Fas-позитивных клеток превышала 30% , не снижалась при обработке rFas, что свидетельствует о резистентности к FasL/Fas-опосредованной цитотоксичности данных опухолевых линий. Кроме того, стоит отметить, что во всех случаях, за исключением TNF α /TNF-R1-нечувствительной линии (ГБ#10), блокирующий эффект rFas на цитотоксичность ДК был ниже по сравнению с аналогичным показателем для rTNF-R1 ($p = 0,047$). Удельный вклад FasL/Fas-зависимого сигнального пути в лизис TNF α /TNF-R1-резистентной глиобластомной линии (ГБ#10) был также незначителен (снижение цитотоксичности ДК на $(6,7 \pm 6,5) \%$ при обработке rFas). Как видно из Рисунка 3.3.3, цитотоксическая активность ДК против контрольной линии U-87, чувствительной к FasL-зависимому апоптозу [160], снижалась при обработке ДК rFas (в среднем на $(20,4 \pm 5,3) \%$).

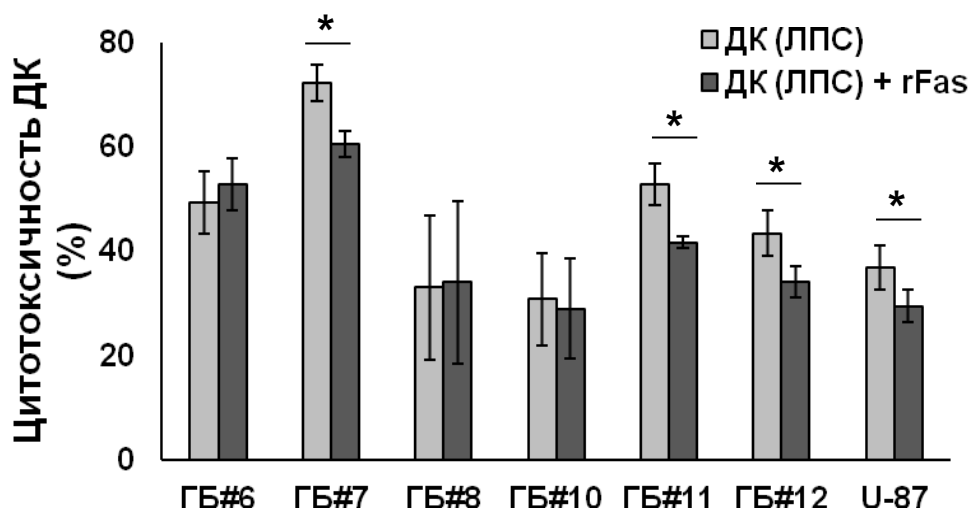


Рисунок 3.3.3 – Влияние rFas на цитотоксическую активность ИФН-ДК доноров против клеток глиобластомы

Данные представлены в виде средних значений ($m \pm SE$) цитотоксической активности (%) интактных ЛПС-стимулированных ИФН-ДК (ДК (ЛПС)) и предварительно обработанных в течение 1 часа растворимым рецептором rFas (10 мкг/мл , ДК (ЛПС) + rFas) против глиобластомных линий, полученных из фрагментов опухоли пациентов (ГБ), а также против линии U-87 ($n=3$). Число наблюдений для каждой из линий $n = 3 - 5$. * $p_w < 0,05$ - достоверность различий между показателями.

Таким образом, FasL/Fas-сигнальный путь может быть вовлечен в реализацию цитотоксической активности ИФН-ДК против клеток глиобластомных линий, однако не является ключевым в этом феномене.

По аналогии с rTNF-R1 и rFas обработка ИФН-ДК растворимым рецептором rTRAIL-R2 (Рисунок 3.3.4) сопровождалась различным уровнем блокирования цитотоксической активности ДК против глиобластомных линий, полученных из опухоли разных пациентов. Подавление цитотоксической активности при обработке ИФН-ДК растворимым рецептором rTRAIL-R2 выявлялось против трех из шести полученных глиобластомных линий (ГБ#7, ГБ#10 и ГБ#11) с медианой супрессии 21,0 %. Максимальное ингибирующее влияние rTRAIL-R2 на цитотоксичность ДК не превышало в среднем 20,0 % ($(19,1 \pm 8,3) \%$ и $(19,0 \pm 1,7) \%$ против глиобластомных линий ГБ#7 и ГБ#11, соответственно). При этом выраженность блокирования TRAIL-зависимого пути не зависела от уровня экспрессии TRAIL-R2 на опухолевых клетках ($R_s = -0,105$; $p = 0,89$).

Ни для одной из тестируемых линий TRAIL/TRAIL-R2-сигнальный путь не был преобладающим с точки зрения их чувствительности к цитотоксическому действию ИФН-ДК доноров. При этом даже цитотоксическая активность ДК против глиобластомной линии, которая была резистентна к TNF α /TNF-R1-сигнальному пути и слабо чувствительна к FasL/Fas-зависимому пути (ГБ#10), в среднем снижалась на 2,0 % при обработке ДК rTRAIL-R2. В целом, блокирующий эффект rTRAIL-R2 на цитотоксичность ДК против тестируемых глиобластомных линий был ниже по сравнению с аналогичным показателем для rTNF-R1 ($p = 0,11$) и значимо не различался с rFas ($p = 0,69$).

В то же время против клеток линии U-87 цитотоксическая активность ИФН-ДК, предварительно обработанных rTRAIL-R2, снижалась более чем на 30 % (в среднем на $(32,9 \pm 0,9) \%$) по сравнению с интактными ИФН-ДК (Рисунок 3.3.4).

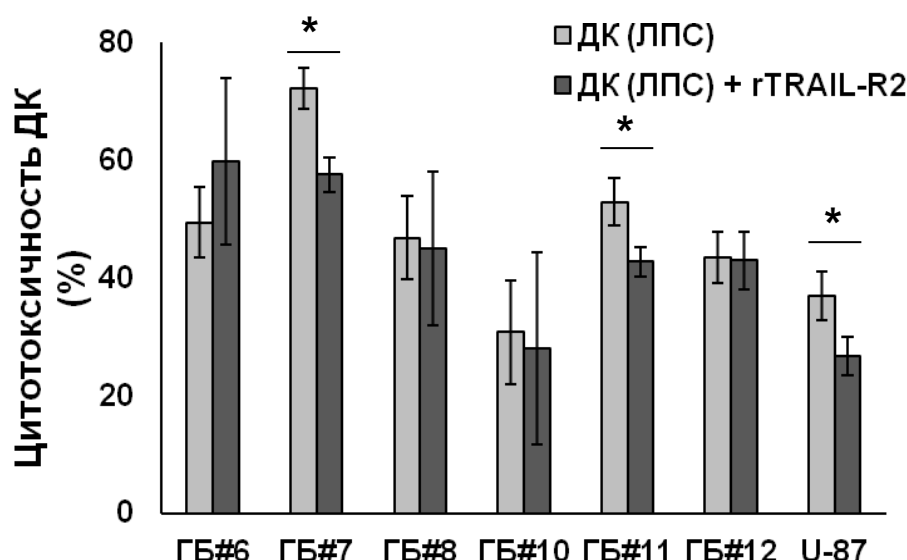


Рисунок 3.3.4 – Влияние rTRAIL-R2 на цитотоксическую активность ИФН-ДК доноров против клеток глиобластомы

Данные представлены в виде средних значений ($m \pm SE$) цитотоксической активности (%) интактных ЛПС-стимулированных ИФН-ДК (ДК (ЛПС)) и предварительно обработанных в течение 1 часа растворимым рецептором rTRAIL-R2 (10 мкг/мл, ДК (ЛПС) + rTRAIL-R2) против глиобластомных линий (ГБ), полученных из первичных опухолевых культур, а также против линии U-87 ($n=3$). Число наблюдений для каждой из линий $n = 3 - 5$. * $p_w < 0,05$ - достоверность различий между показателями.

Таким образом, проведенное исследование показало, что в подавляющем большинстве случаев в реализацию лизиса глиобластомных клеток дендритными клетками вовлечен $TNF\alpha/TNF-R1$ -зависимый механизм, который обеспечивает существенный вклад в цитотоксический потенциал ИФН-ДК. Дополнительными механизмами цитотоксической активности ИФН-ДК против глиобластомных клеток могут быть FasL/Fas- и TRAIL/TRAIL-R2-сигнальные пути. Отсутствие корреляционной связи между уровнем экспрессии проапоптогенных рецепторов на опухолевых клетках и чувствительностью опухолевых клеток к киллерной активности ДК, опосредованной соответствующими сигнальными путями, свидетельствует о существовании механизмов, которые обеспечивают резистентность злокачественных глиом к действию эффекторных клеток. При этом цитотоксическая активность ИФН-ДК против глиобластомной линии U-87

реализуется через TRAIL/TRAIL-R2- и FasL/Fas-сигнальные пути, но без участия TNF α /TNF-R1-сигнального пути.

3.3.2 Грануло-опосредованная цитотоксичность ИФН-ДК здоровых доноров

Учитывая тот факт, что блокирование рецепторно-опосредованных сигнальных путей приводило только к частичной нейтрализации цитотоксического действия против глиобластомных клеток или не влияло на эту функцию у ИФН-ДК доноров, можно было предположить о вовлеченности других механизмов в индукцию лизиса опухолевых клеток.

Одним из универсальных механизмов подавления опухолевого роста и индукции гибели клеток-мишеней эффекторными клетками является грануло-опосредованная цитотоксичность. Этот механизм цитотоксичности связан с дегрануляцией и высвобождением в иммунологический синапс содержащихся в литических гранулах цитолитических медиаторов, включая перфорин, обеспечивающий формирование пор в клетках-мишенях, и гранзим Б, проникающий через поры и индуцирующий процессы апоптоза [83]. Согласно многочисленным исследованиям, различные типы ДК способны индуцировать перфорин/гранзим Б - зависимый цитолиз опухолевых клеток. Экспрессия перфорины и гранзима Б продемонстрирована для плазмцитоподобных [138, 150] и миелоидных ДК [302]. Также экспрессия перфорины и гранзима Б характерна для ДК, генерируемых из моноцитов в присутствии IFN α или IL-15 [19, 162].

В связи с этим было проведено исследование возможного участия перфорин/гранзим Б - опосредованного механизма в реализации цитотоксической активности ИФН-ДК доноров против глиобластомных клеток. С этой целью ДК предварительно обрабатывали конканмицином А (СМА). СМА является специфическим ингибитором вакуолярной H⁺-АТФ-азы, что способствует нейтрализации рН в литических гранулах и приводит в

конечном итоге к инаktivации молекул перфорины [153, 154]. Соответственно, использование СМА позволило блокировать перфорин/гранзим Б - зависимый цитотоксический эффект опухолевых клеток.

Вовлеченность грануло-зависимого механизма оценивали на пяти клеточных линиях, полученных из первичных глиобластомных культур. Обработка ДК конканамицином А снижала цитотоксическую активность ДК доноров против всех тестируемых линий (Ме блокирующего эффекта 37 %; $p = 0,02$) При этом выраженность блокирующего эффекта СМА варьировала от 5,0 % до 64,7 % в зависимости от опухолевой линии (Рисунок 3.3.5).

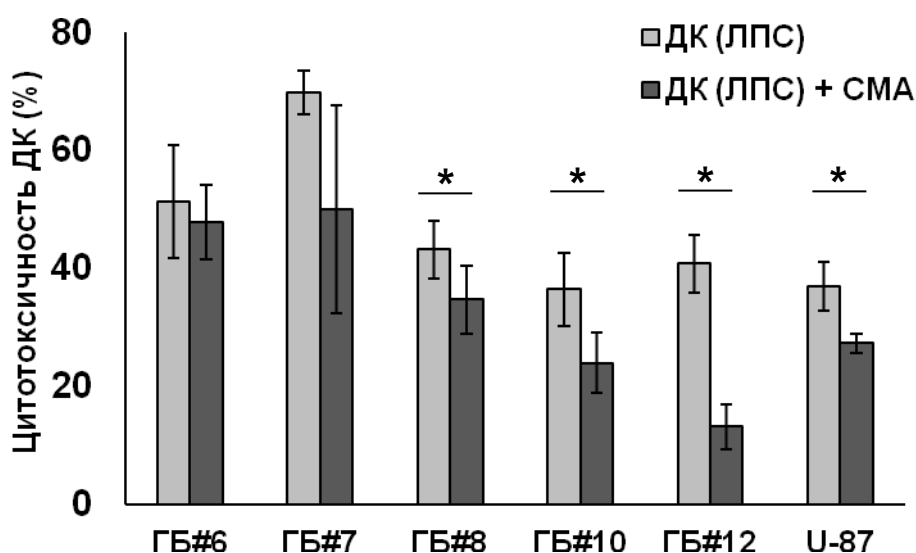


Рисунок 3.3.5 - Влияние конканамицина А на цитотоксическую активность ИФН-ДК доноров против клеток глиобластомы

Данные представлены в виде средних значений ($m \pm SE$) цитотоксической активности (%) интактных ЛПС-стимулированных (ДК (ЛПС)) и СМА-обработанных (ДК (ЛПС) + СМА) ИФН-ДК здоровых доноров против клеточных линий, полученных из опухоли пяти пациентов с глиобластомой (ГБ#6, ГБ#7, ГБ#8, ГБ#10, ГБ#12), а также против клеток линии U-87. Число наблюдений для каждой из линий $n = 3 - 9$. * $p_w < 0,05$ - достоверность различий между показателями.

Клеточная линия (линия ГБ#10), резистентная к $TNF\alpha/TNF-R1$ -сигнальному пути и слабо чувствительная к FasL/Fas- и TRAIL/TRAIL-R2-сигнальному пути, характеризовалась выраженной чувствительностью к грануло-опосредованной цитотоксичности ДК (уровень блокирующего эффекта СМА составил в среднем $(25,7 \pm 18,9) \%$).

В отношении клеток линии U-87 нейтрализующий эффект СМА на цитотоксическую активность ДК был в среднем на уровне 27,0 % (Рисунок 3.3.5), то есть менее выраженный по сравнению с некоторыми тестируемыми неиммортизированными линиями (ГБ#7, ГБ#10, ГБ#12).

При индивидуальном анализе цитотоксической активности ДК было отмечено, что степень влияния СМА прямо коррелировала с исходным уровнем цитотоксичности ИФН-ДК ($R_s = 0,433$; $p = 0,04$; $n = 22$; Рисунок 3.3.6А).

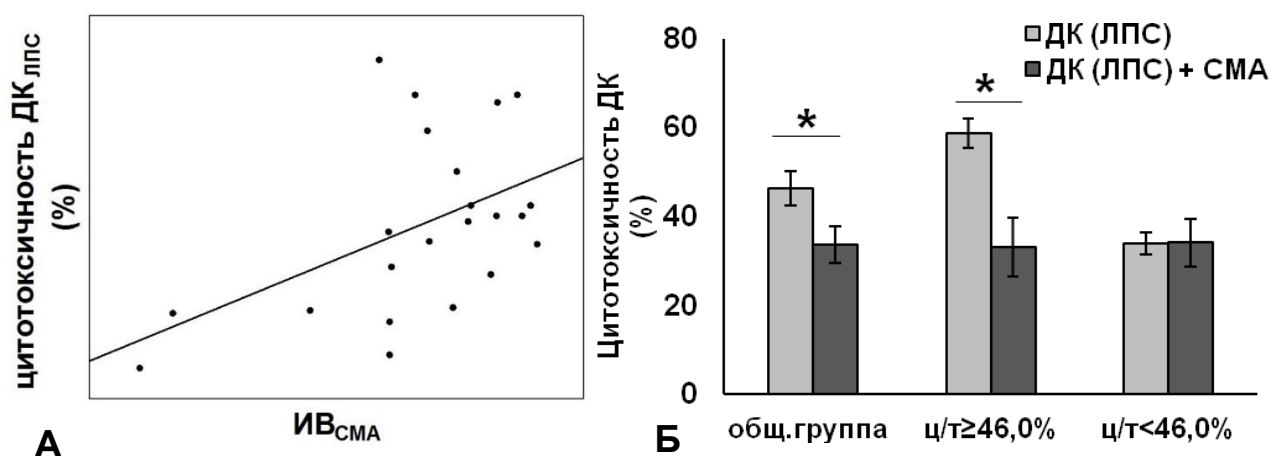


Рисунок 3.3.6 - Связь блокирующего эффекта конканамицина А и цитотоксической активности ИФН-ДК доноров против клеток глиобластомы

А) представлена корреляционная взаимосвязь между цитотоксической активностью интактных ЛПС-стимулированных ИФН-ДК доноров (ДК_{ЛПС}) против клеток глиобластомных линий, полученных их первичных опухолевых культур, и уровнем блокирующего эффекта СМА (ИБ_{СМА}), рассчитанного как $\left[1 - \frac{\text{цитотоксичность ДК (ЛПС+СМА)}}{\text{цитотоксичность ДК(ЛПС)}}\right]$; Б) Представлены данные в виде средних значений ($m \pm SE$) цитотоксической активности (%) интактных ЛПС-стимулированных (ДК (ЛПС)) и СМА-обработанных (ДК (ЛПС) + СМА) ИФН-ДК здоровых доноров против клеточных линий, полученных из опухоли пяти пациентов с глиобластомой, в общей группе ($n = 22$), а также в подгруппах с высокой (ц/т $\geq 46,0$ %, $n = 11$) и низкой (ц/т $< 46,0$ %, $n = 11$) цитотоксической активностью ИФН-ДК. * - $p_w \leq 0,05$ – достоверность различий.

Если принять за точку сравнения медианное значение (46,0 %) цитотоксической активности ДК против всех пяти тестируемых глиобластомных линий в целом, то можно было отметить следующую тенденцию. При исходно высокой цитотоксической активности ДК ($\geq 46,0$ %)

СМА оказывал наиболее выраженный эффект, что проявлялось почти двукратным снижением киллерной функции ИФН-ДК в среднем с 58,8 % до 33,2 %, $p = 0,004$ (Рисунок 3.3.6Б). В тоже время СМА не оказывал ингибирующего действия на ДК с относительно низким ($< 46,0$ %) уровнем цитотоксичности.

Механизм грануло-опосредованной цитотоксичности сопровождается не только высвобождением содержимого литических гранул в межклеточное пространство, но также процессом слияния мембраны гранул с поверхностной мембраны клетки. В этом случае на поверхности клеток-эффекторов обнаруживается компонент мембраны литических гранул молекула CD107a, относящаяся к группе лизосомально-ассоциированных мембранных белков (LAMP) [13]. Поскольку процесс дегрануляции индуцируется активационными стимулами, в том числе и опухолевыми антигенами, на примере одной из глиобластомных линий было проведено исследование экстернализации CD107a на поверхности ДК при их взаимодействии с опухолевыми мишенями. Как видно из Рисунка 3.3.7, совместное культивирование ИФН-ДК доноров с клетками глиобластомной линии сопровождалось увеличением экспрессии CD107a на ДК более чем в три раза, что свидетельствует о дегрануляции ДК и, соответственно, является еще одним подтверждением вовлеченности грануло-опосредованного механизма цитотоксической активности ДК против глиобластомных линий.

Таким образом, способность ИФН-ДК доноров эффективно лизировать клетки глиобластомы опосредуется с вовлечением перфорин/гранзим Б-зависимого пути. При этом удельный вклад этого механизма в общий уровень цитотоксической активности ДК против глиобластомных линий, полученных от разных пациентов, в зависимости от линии различен и не совпадает с аналогичным показателем против клеток линии U-87. В то же время подавление высокой цитотоксической активности ДК только на 50 %, а также отсутствие эффекта СМА в культурах ДК с исходно низкой цитотоксичностью свидетельствует о том, что перфорин/гранзим Б-зависимый механизм

цитотоксического действия ИФН-ДК против глиобластомных клеток является только одним из множества существующих механизмов сложного взаимодействия ДК и опухолевых клеток.

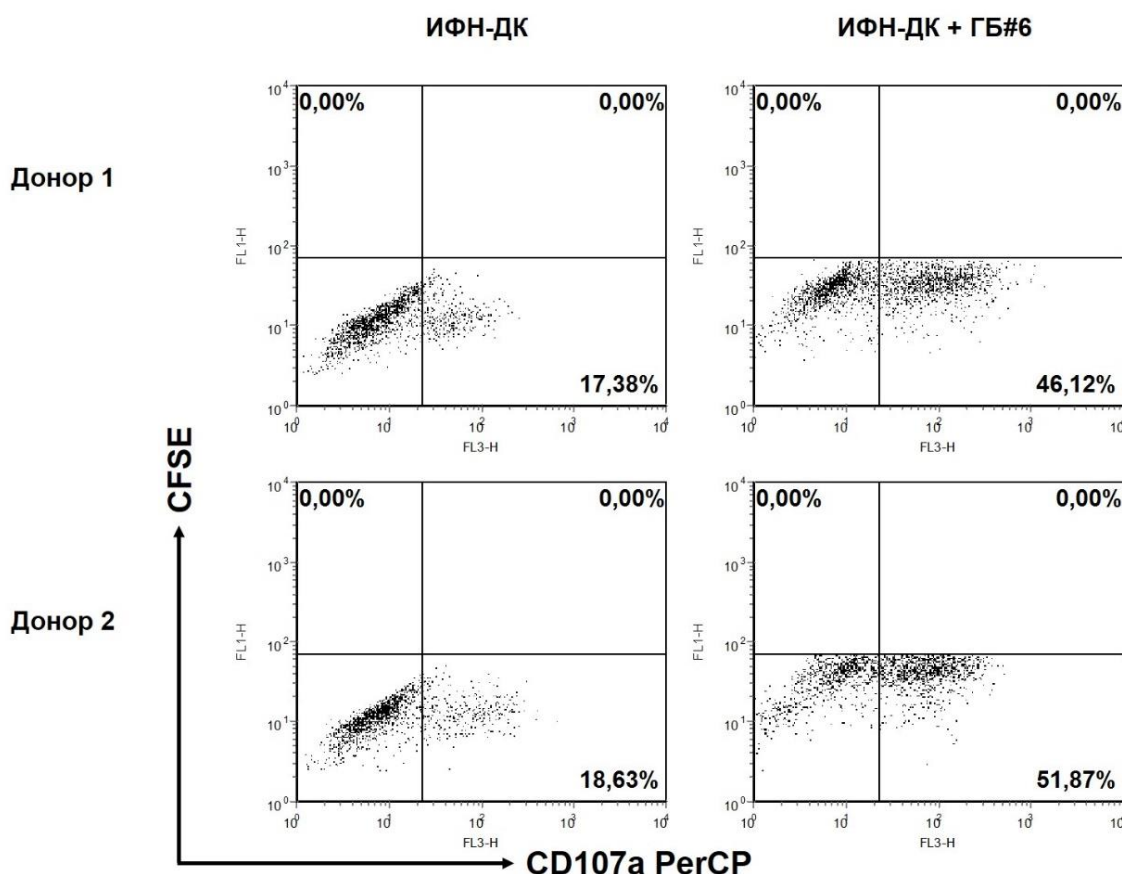


Рисунок 3.3.7 – Индукция процесса дегрануляции ИФН-ДК доноров при взаимодействии с глиобластомными клетками

Представлены DotPlot гистограммы распределения ИФН-ДК двух доноров до (ИФН-ДК) и после со-культивирования в соотношении 10:1 с CFSE-мечеными клетками глиобластомной линии #6 (ИФН-ДК + ГБ#6) по флуоресценции PerCP-меченных анти-CD107a-антител и CFSE. Левый верхний квадрант – CD107a⁻CFSE⁺ клетки, правый верхний квадрант – CD107a⁺CFSE⁺ клетки, правый нижний квадрант – CD107a⁺CFSE⁻ клетки. О процессе дегрануляции ДК судили по увеличению относительного количества CD107a⁺CFSE⁻ клеток.

Суммируя полученные в Главе 3.3 данные, можно сделать следующие выводы о роли основных механизмов в реализации цитотоксической активности (Рисунок 3.3.8).

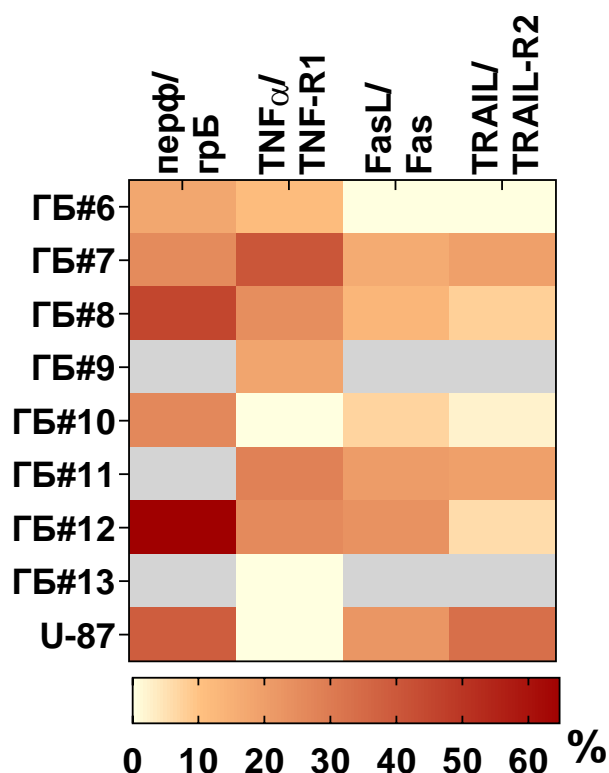


Рисунок 3.3.8 – Удельный вклад основных сигнальных путей в реализацию цитотоксической активности ИФН-ДК доноров против клеток глиобластомы

На тепловой карте представлены данные, отражающие средние значения (m, %) блокирующего эффекта СМА, rTNF-R1, rFas или rTRAIL-R2 на цитотоксичность ИФН-ДК доноров против глиобластомных линий как показателя степени вовлеченности изучаемых сигнальных путей. Блокирующий эффект нейтрализующих агентов (НА) рассчитывали как

$$\left[1 - \frac{\text{цитотоксичность ДК (ЛПС + НА)}}{\text{цитотоксичность ДК(ЛПС)}} \right] \times 100 \%$$
 и представляли согласно указанной градиентной шкале. Серые поля – анализ не проводился.

Два основных механизма, которые обеспечивают реализацию цитотоксической активности ИФН-ДК против большинства глиобластомных линий, полученных из фрагментов опухоли пациентов, связаны с грануло-опосредованным и TNFα/TNF-R1-зависимым сигнальными путями, о чем свидетельствует значимое снижение цитотоксической активности ДК при блокировании данных путей. FasL/Fas- и TRAIL/TRAIL-R2-сигнальные пути, относящиеся как и TNFα/TNF-R1-сигнальный путь к рецепторно-опосредованному механизму цитотоксичности, также вовлечены в реализацию цитотоксической активности ДК, однако не являются ключевыми, поскольку

блокирование этих сигнальных путей не приводит к статистически значимому ослаблению цитотоксического действия ДК против глиобластомных линий. При этом не исключено, что существуют дополнительные механизмы (грануло-независимые и рецепторно-независимые), которые ДК могут использовать для осуществления киллерного действия в отношении глиобластомных клеток. Кроме того, полученные данные свидетельствуют о том, что несмотря на принадлежность к одной нозологической группе, опухолевые клетки больных глиобластомой отличаются от клеток стандартной иммортализованной глиобластомной линии U-87 с точки зрения чувствительности к лизису, индуцированному дендритными клетками, и сигнальных путей, вовлеченных в этот процесс. Эти различия могут иметь важное значение при поиске молекулярных мишеней и разработке новых стратегий, направленных на элиминацию опухолевых клеток у пациентов с злокачественными глиомами головного мозга.

3.4 Противоопухолевая цитотоксическая активность ИФН-ДК больных глиобластомой

Известно, что ИФН-ДК больных злокачественными глиомами способны лизировать FasL- и TRAIL-чувствительные опухолевые линии Jurkat (Т-клеточная лимфома) и U-87, однако характеризуются нарушением цитотоксической активности против линии HEP-2 (аденокарцинома гортани), лизис которой опосредуется через активацию TNF α /TNF-R1-сигнального пути [183]. Учитывая данные, полученные в предыдущих главах, о чувствительности глиобластомных клеток к цитотоксическому действию ИФН-ДК здоровых доноров, а также роли TNF α -зависимого механизма в реализации этой функции, на следующем этапе представлялось важным оценить цитотоксическую активность ДК больных глиобластомой против аутологичных опухолевых клеток.

Цитотоксическая активность ДК исследовалась против восьми клеточных линий, полученных из первичных культур опухоли пациентов с глиобластомой. Согласно полученным нами данным, в целом по группе цитотоксическая активность ИФН-ДК больных против аутологичных опухолевых клеток была почти на 30 % (Me снижения 29,2 %) ниже, чем цитотоксичность ДК доноров в аналогичных культурах (Me цитотоксичности 30,3 % vs 44,9 %; $p = 0,05$).

Поскольку особый интерес представлял вопрос о сохранности TNF α -зависимой киллерной активности ДК у больных глиобластомой, был проведен индивидуальный анализ цитотоксичности ИФН-ДК с учетом полученных в предыдущей главе данных о чувствительности опухолевых линий к различным апоптоз-индуцирующим механизмам. Как видно из Таблицы 3.4.1, уровень дефекта цитотоксической активности ИФН-ДК части пациентов против аутологичных опухолевых клеток был сопоставим (ГБ#7, ГБ#8, ГБ#9) с уровнем блокирующего эффекта (Δ блокирования) растворимого rTNF-R1 при добавлении последнего к ДК доноров. В то же время киллерная

активность ИФН-ДК двух больных, опухолевые клетки которых оказались не чувствительны к TNF α /TNF-R1-сигнальному пути (ГБ#10 и ГБ#13), была сопоставима с уровнем цитотоксичности ИФН-ДК доноров.

Таблица 3.4.1 - Цитотоксическая активность ДК против глиобластомных клеток

линия	ДК доноров Me (LQ-UQ) (%)	Ауто-ДК (%)	Дефект цитотоксичности ДК больных (%)	Уд.вклад TNF α /TNF-R1- пути (Me, %)
ГБ#6	45,4 (41 – 55)	22,7	50,0	11
ГБ#7	69,8 (63,4 – 76,2)	46,6	33,2	40,1
ГБ#8	36,9 (23,6 – 49,5)	27,6	25,2	24,2
ГБ#9	46,8 (34,8 – 58,7)	37,5	19,9	17,5
ГБ#10	29,1 (23,0 – 43,5)	32,7	0	0
ГБ#11	47,2 (40,0 – 50,7)	27,8	41,1	27,7
ГБ#12	45,5 (37,3 – 49,4)	24,8	45,5	23,2
ГБ#13	60,8 (58,2 – 63,3)	75,9	0	0

Примечание: представлены медианные (Me) и диапазон 25-75% квартильных (LQ-UQ) значений цитотоксической активности (%) ИФН-ДК доноров и индивидуальные значения цитотоксической активности ДК больных против глиобластомных линий (ГБ). Дефект цитотоксичности ДК больных рассчитывали по формуле $\left[1 - \frac{\text{цитотоксичность ДК больного}}{\text{Me цитотоксичности ДК доноров}}\right] \times 100\%$. В крайнем правом столбце в качестве удельного вклада TNF α /TNF-R1-сигнального пути в реализацию цитотоксической активности ИФН-ДК доноров указан блокирующий эффект rTNF-R1, который рассчитывали как $\left[1 - \frac{\text{цитотоксичность ДК (ЛПС+rTNF-R1)}}{\text{цитотоксичность ДК(ЛПС)}}\right] \times 100\%$

Полученные результаты указывают на то, что TNF α /TNF-R1-зависимый механизм имеет важное патогенетическое значение с точки зрения цитотоксического потенциала ДК против аутологичных опухолевых клеток. По-видимому, дефект этого механизма участвует в ослаблении этой функции

ДК больных, тогда как резистентность опухолевых клеток к $\text{TNF}\alpha/\text{TNF-R1}$ -сигнальному пути позволяет дендритным клеткам больных эффективно лизировать аутологичные опухолевые клетки. В то же время нельзя исключать вовлеченность других механизмов в нарушение цитотоксической функции ДК больных глиобластомой, о чем свидетельствует более высокий уровень дефекта этой функции ИФН-ДК некоторых больных по сравнению с уровнем ингибирующего эффекта $\text{TNF}\alpha/\text{TNF-R1}$ -блокирующих антител (ГБ#6, ГБ#11, ГБ#12, Таблица 3.4.1). Однако, какой-либо четкой взаимосвязи между степенью дефекта цитотоксичности ДК больных и чувствительностью соответствующих линий к $\text{TNF}\alpha/\text{TNF-R1}$ -независимым механизмам не прослеживалось.

Наряду с изучением цитотоксической активности аутологичных ДК была проведена оценка этой функции у аллогенных ИФН-ДК больных глиобластомой против тестируемых опухолевых линий (Рисунок 3.4.1).

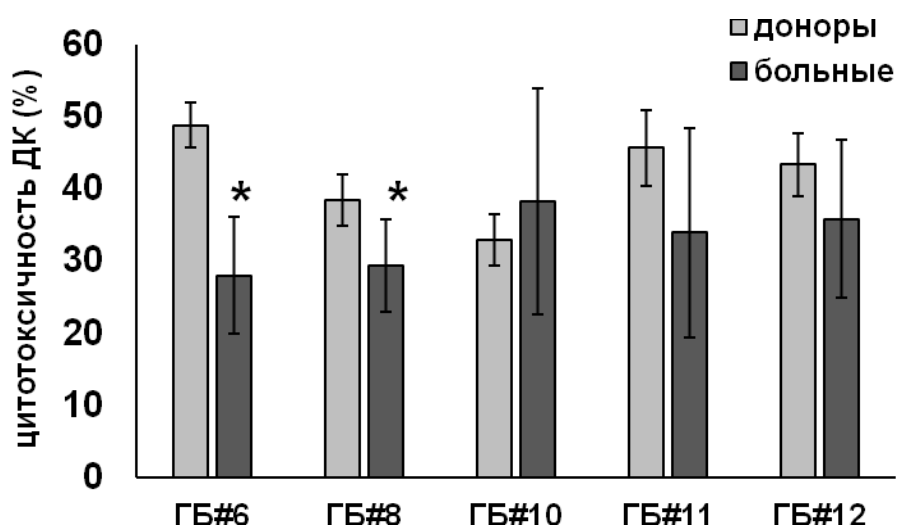


Рисунок 3.4.1 - Цитотоксическая активность ДК против аллогенных глиобластомных клеток

Представлены данные в виде средних значений ($m \pm SE$) цитотоксической активности (%) ИФН-ДК здоровых доноров (доноры, $n = 4 - 18$ для каждой из линий) и ИФН-ДК больных глиобластомой (больные, $n = 3 - 7$ для каждой из линий) против глиобластомных линий (ГБ), полученных из аллогенных первичных опухолевых культур. * - $p_U < 0,05$ - достоверность различий между ДК доноров и больных; n - число наблюдений.

Как видно из Рисунка 3.4.1, только в случае, когда опухолевые клетки были резистентными к $\text{TNF}\alpha/\text{TNF-R1}$ -опосредованному лизису (ГБ#10), ДК больных не отличались по цитотоксической активности от ДК доноров (глиобластомная линия пациента #13 в анализе не участвовала), во всех остальных случаях цитотоксичность ДК больных против аллогенных глиобластомных линий была ниже по сравнению с группой ИФН-ДК доноров ($p = 0,0017$ в общей группе линий).

Таким образом, выявленный дефект цитотоксической активности ДК против опухолевых линий, чувствительных к $\text{TNF}\alpha/\text{TNF-R1}$ -зависимому лизису, является общим свойством для всех больных с глиобластомой, независимо от факта гистосовместимости (аутологичные и аллогенные культуры).

Согласно полученным нами данным, низкая цитотоксическая активность ИФН-ДК больных глиобластомой проявлялась не только против клеток линии, растущей в стандартных условиях в виде монослоя, но также регистрировалась в отношении клеток нейросфер как для аутологичных ДК, так и аллогенных ДК (Рисунок 3.4.2). При этом цитотоксичность ДК против клеток нейросфер для аутологичных ИФН-ДК была ниже в среднем на 76 %, а для аллогенных ИФН-ДК – на 42,0 % ($p = 0,042$) в сравнении с ИФН-ДК здоровых доноров.

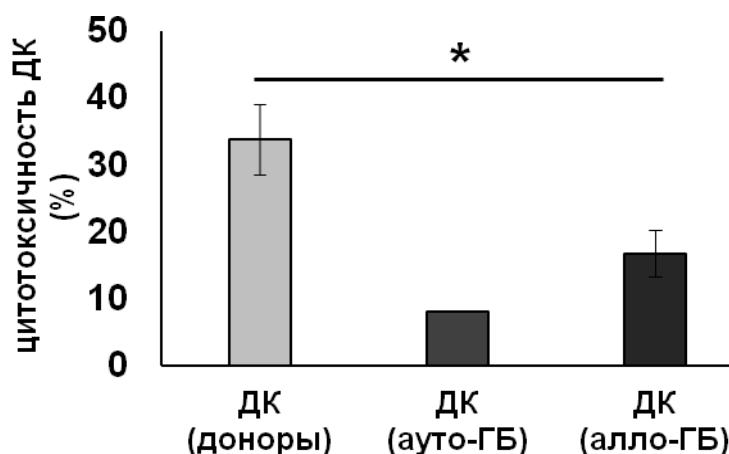


Рисунок 3.4.2 – Цитотоксическая активность ИФН-ДК доноров и больных глиобластомой против клеток нейросфер

Представлены данные в виде средних значений ($m \pm SE$) цитотоксической активности (%) ИФН-ДК здоровых доноров (доноры, $n=8$), аллогенных ИФН-ДК больных глиобластомой (алло-ГБ, $n=8$), а также индивидуальные значения цитотоксической активности аутологичных ИФН-ДК больного (ауто-ГБ) против клеток нейросфер глиобластомной линии пациента #6. n - число наблюдений. * - $p_U < 0,05$ - достоверность различий.

Таким образом, представленные в Главе 3.4 данные демонстрируют, что ИФН-ДК больных глиобластомой характеризуются угнетением цитотоксической активности против аутологичных и аллогенных линий, полученных из первичных культур глиобластомы, а также против клеток нейросфер. При этом цитотоксическая функция ДК больных ослаблена в том случае, когда в реализацию лизиса глиобластомных клеток дендритными клетками вовлечен $TNF\alpha/TNF-R1$ -зависимый механизм. Выявленная закономерность схожа с ранее установленным селективным нарушением $TNF\alpha/TNF-R1$ -медируемой цитотоксичности ДК больных злокачественными глиомами головного мозга, наблюдаемой против клеток линии аденокарциномы гортани человека HEP-2. С одной стороны, эти факты демонстрируют общую природу выявленного дефекта цитотоксической активности ДК больных глиобластомой, а с другой стороны, - свидетельствуют о важности $TNF\alpha$ -зависимого механизма цитотоксичности ДК. Дополнительным аргументом в пользу этого предположения является тот факт, что в редких случаях, когда опухолевые клетки оказываются

резистентными к $\text{TNF}\alpha/\text{TNF-R1}$ -опосредованному лизису, ДК больных не отличаются по цитотоксической активности от ДК доноров. В то же время у части пациентов низкая цитотоксическая активность ДК против клеток глиобластомных линий не ограничивается исключительно нарушением $\text{TNF}\alpha/\text{TNF-R1}$ -зависимого механизма, о чем свидетельствует более выраженный уровень дефекта цитотоксичности ДК больных по сравнению с удельным вкладом этого сигнального пути в реализацию цитотоксической активности ДК доноров против соответствующих опухолевых линий.

3.5 Экспрессия цитотоксических молекул дендритными клетками больных глиобластомой

Учитывая ведущую роль грануло- и $\text{TNF}\alpha/\text{TNF-R1}$ -опосредованного механизма в реализации цитотоксической активности ИФН-ДК доноров против клеток глиобластомных линий, полученных из первичных культур опухолей, можно было предположить, что выявленный дефект цитотоксичности ИФН-ДК больных злокачественными глиомами связан с нарушением экспрессией одного или нескольких цитотоксических лигандов, вовлеченных в реализацию этих механизмов. В связи с этим задачей следующего этапа являлось сравнительное исследование экспрессии основных молекул, участвующих в индукции лизиса опухолевых клеток, в культурах ИФН-ДК доноров и больных глиобластомой.

Поскольку грануло-опосредованная цитотоксичность представляла собой один из ведущих механизмов цитотоксической активности ИФН-ДК против глиобластомных линий, прежде всего была изучена экспрессия молекул цитолитических гранул.

ЛПС, добавляемый в культуры ДК в качестве активационного и индуцирующего созревание стимула, потенциально может также стимулировать процесс неспецифической дегрануляции, то есть высвобождение содержимого цитотоксических гранул во внеклеточное пространство, что в свою очередь могло бы снижать цитотоксический потенциал ИФН-ДК. Фенотипический анализ показал, что среди незрелых ИФН-ДК здоровых доноров в среднем $(13,3 \pm 2,2)$ и $(17,9 \pm 2,7)$ % клеток внутриклеточно экспрессировали перфорин и гранзим Б, соответственно (Рисунок 3.5.1). Средний уровень внутриклеточной экспрессии перфорины и гранзима Б в популяции незрелых ИФН-ДК больных злокачественными глиомами был даже выше по сравнению с аналогичными показателями в группе доноров $((17,3 \pm 6,0)$ и $(22,2 \pm 4,6)$ %, соответственно), однако значимых статистических различий не регистрировалось.

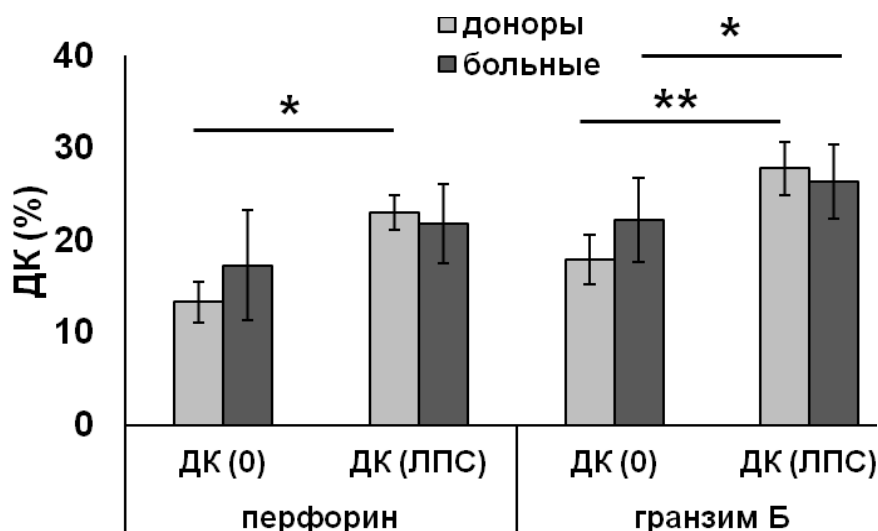


Рисунок 3.5.1 - Внутриклеточная экспрессия перфорина и гранзима Б дендритными клетками

Представлены данные в виде средних значений ($m \pm SE$) внутриклеточной экспрессии перфорина и гранзима Б в гейте $HLA-DR^+$ клеток среди интактных (0) и ЛПС-стимулированных (ЛПС) ИФН-ДК здоровых доноров ($n=10$) и больных злокачественными глиомами ($n = 4 - 8$). * - $p_w < 0,05$ и ** - $p_w < 0,01$ - достоверность различий между интактными и ЛПС-стимулированными ИФН-ДК.

Как видно из Рисунка 3.5.1, конечное дозревание ИФН-ДК доноров в присутствии ЛПС сопровождалось двукратным увеличением количества перфорин⁺ ($p = 0,028$) и гранзим-Б⁺ клеток ($p = 0,005$). Среди ЛПС-стимулированных ИФН-ДК больных глиобластомой содержание клеток, экспрессирующих гранзим Б, также достоверно возрастало ($p = 0,018$), однако в этом случае прирост доли гранзим Б⁺ ДК был менее выражен по сравнению с ДК доноров и составлял не более 20 %. В то же время уровень экспрессии перфорина в ИФН-ДК больных в ответ на стимуляцию ЛПС значимо не менялся ($p = 0,14$).

Таким образом, индукция созревания ДК под действием ЛПС ассоциировалась с накоплением гранзима Б в популяции ИФН-ДК доноров и больных глиобластомой, а также перфорина – в ИФН-ДК доноров, но не влияла на уровень внутриклеточной экспрессии перфорина в ИФН-ДК больных. В результате в условиях активации ЛПС ИФН-ДК доноров и больных были сопоставимы по экспрессии как перфорина, так и гранзима Б.

Важно отметить, что наряду с высвобождением содержимого литических гранул в иммунологический синапс процесс дегрануляции сопровождается слиянием мембраны литических гранул с поверхностной мембраной клетки, о чем было сказано в Главе 3.3.2. Одним из белков мембраны гранул является лизосомально-ассоциированный мембранный белок - 1 (LAMP-1, CD107a), который в процессе дегрануляции обнаруживается на поверхности клеток-эффекторов и, соответственно, может выступать в качестве маркера цитотоксической функции этих клеток [13]. Поэтому наряду с анализом перфорина и гранзима Б в ДК была также исследована экспрессия CD107a. Экспрессия CD107a на ДК также оценивалась до и после активации ЛПС.

Как видно из рисунка 3.5.2, в ответ на стимуляцию ЛПС относительное количество ИФН-ДК здоровых доноров и больных глиобластомой, внутриклеточно экспрессирующих и несущих на поверхности молекулу CD107a, значимо не менялось и было сопоставимо между анализируемыми группами.

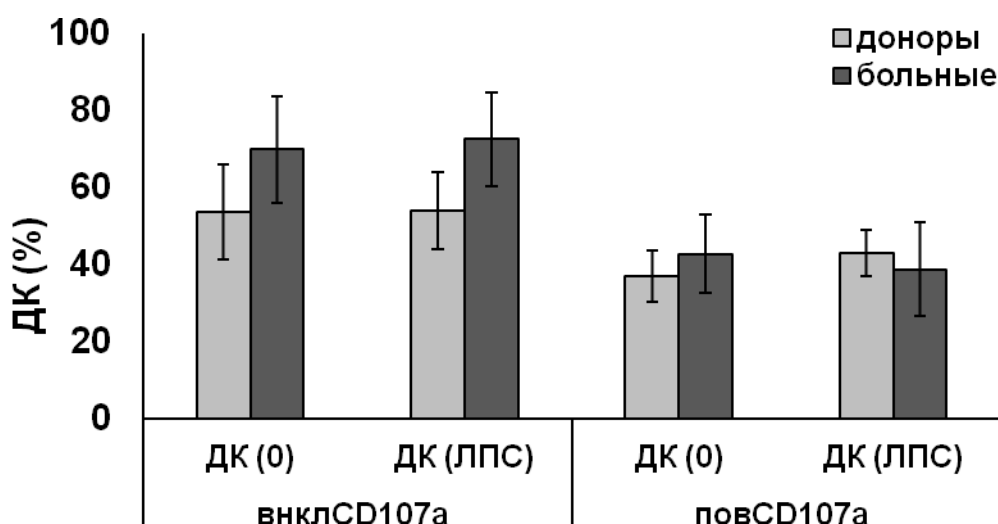


Рисунок 3.5.2 - Экспрессия CD107a дендритными клетками здоровых доноров

Представлены данные в виде средних значений ($m \pm SE$) внутриклеточной (внклCD107a) и поверхностной (повCD107a) экспрессии CD107a в гейте HLA-DR⁺ клеток среди интактных (0) и ЛПС-стимулированных (ЛПС) ИФН-ДК здоровых доноров ($n = 10$) и больных злокачественными глиомами ($n = 4 - 6$).

В популяции ЛПС-стимулированных ИФН-ДК доноров и больных обнаруживалась сильная корреляционная взаимосвязь между внутриклеточной экспрессией перфорины и CD107a ($R_s=0,899$; $p=0,015$ и $R_s=0,949$; $p=0,05$, соответственно).

Таким образом, ИФН-ДК доноров и больных глиобластомой сопоставимы по уровню экспрессии молекул цитолитических гранул – перфорины, гранзима Б и CD107a, что указывает на сохранность грануло-опосредованного механизма цитотоксической активности ИФН-ДК больных глиомами. При этом активация ЛПС индуцирует в популяции ИФН-ДК больных возрастание экспрессии гранзима Б, не сопровождаясь усилением процессов дегрануляции литических гранул.

Далее был проведен анализ поверхностной экспрессии цитотоксических молекул, которые являются лигандами к проапоптогенным рецепторам семейства TNF, присутствующим на глиобластомных клетках, в частности молекул TNF α , FasL и TRAIL (Рисунок 3.5.3).

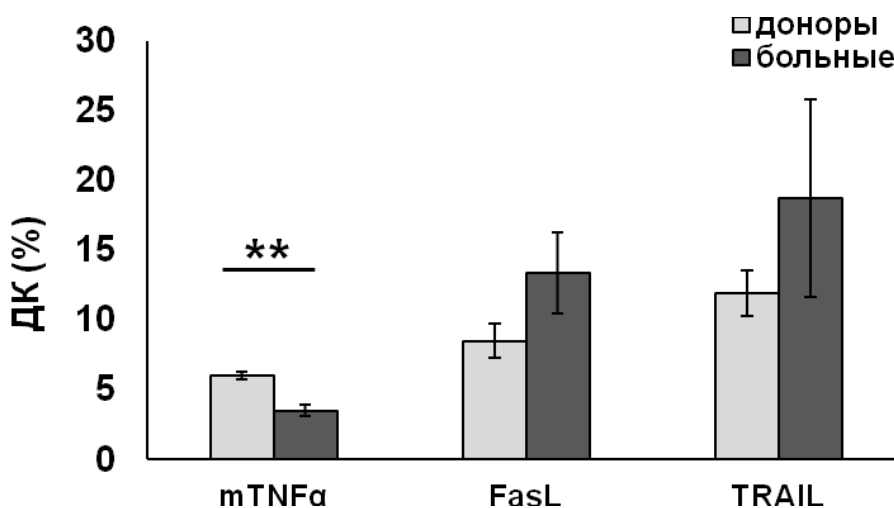


Рисунок 3.5.3 – Экспрессия цитотоксических лигандов семейства TNF на ИФН-ДК

Представлены данные в виде средних значений ($m \pm SE$) экспрессии мембранно-связанных форм TNF α (mTNF α), FasL и TRAIL в гейте HLA-DR⁺ клеток среди ЛПС-стимулированных ИФН-ДК здоровых доноров ($n = 9 - 24$) и больных глиобластомой ($n = 10 - 28$). ** - $p_U < 0,01$ - достоверность различий между ДК доноров и больных.

Как видно из Рисунка 3.5.3, ИФН-ДК больных глиобластомой характеризовались почти двукратно меньшим ($(3,5 \pm 0,4)$ vs $(6,0 \pm 0,3)$ %; $p = 0,00005$) количеством mTNF α -позитивных клеток по сравнению с ИФН-ДК здоровых доноров. Доля пациентов со сниженным уровнем экспрессии mTNF α на ДК (здесь и далее - меньше нижней границы LQ = 5,3 % экспрессии mTNF α на ИФН-ДК доноров) составляла 79 %. При этом низкая экспрессия mTNF α в культурах ИФН-ДК наблюдалась как в подгруппе пациентов с впервые выявленной опухолью (14/20), так и в подгруппе пациентов с рецидивом (8/8) опухоли (Me 3,4 и 3,0 %, соответственно; $p = 0,44$). В то же время уровень экспрессии молекул FasL и TRAIL на ИФН-ДК больных был сохранен и даже превышал аналогичные показатели группы здоровых доноров, однако статистически значимых различий между анализируемыми группами не выявлялось ($p = 0,2$ и $p = 0,8$, соответственно).

Принимая во внимание тот факт, что одним из ключевых механизмов цитотоксической активности ДК против глиобластомных клеток был TNF α /TNF-R1-опосредованный сигнальный путь, можно предположить, что выявленный дефект цитотоксичности ИФН-ДК больных глиобластомой связан с низким уровнем экспрессии mTNF α на ДК. Однако, известно, что TNF α может существовать не только в виде мембранной формы, но и секретироваться в виде растворимой формы (sTNF α). Обе формы TNF α взаимодействуют с TNF-R1, индуцируя различные биологические эффекты, в том числе и апоптоз клеток. В связи с этим была проведена оценка продукции sTNF α в культурах ИФН-ДК больных злокачественными глиомами.

Как видно из рисунка 3.5.4, ИФН-ДК больных при низком уровне экспрессии mTNF α продуцировали sTNF α (в пересчете на 10^5 ДК) в три раза больше по сравнению с ИФН-ДК доноров ((1597 ± 327) vs (539 ± 98) пг/мл; $p = 0,043$). При этом корреляционный анализ не выявил связи между соотношением экспрессии mTNF α и sTNF α в группе больных ($R_s = 0,233$; $p = 0,55$).

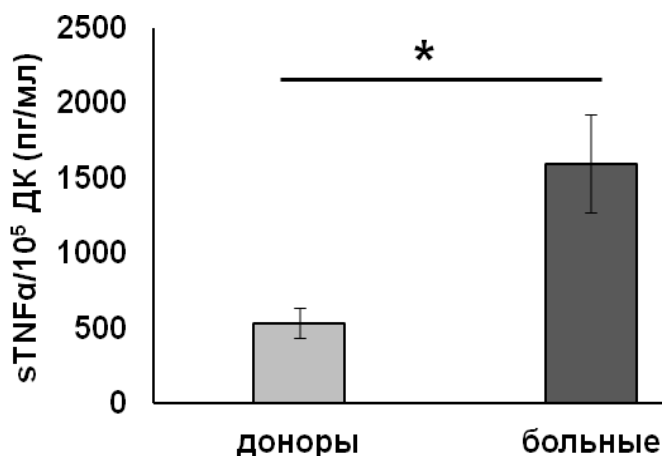


Рисунок 3.5.4 – Продукция растворимой формы TNFα культурами ИФН-ДК

Представлены данные в виде средних значений ($m \pm SE$) концентрации sTNFα/10⁵ДК в супернатантах цельных культур интактных ЛПС-стимулированных ИФН-ДК здоровых доноров (n=8) и больных глиобластомой (n=9). * - $p_U < 0,05$ - достоверность различий между ДК доноров и больных.

Проведенные нами ранее исследования показали, что супернатанты ИФН-ДК доноров не обладают или проявляют слабую киллерную активность против клеток глиобластомных линий (см. Глава 3.1.2), что указывает на клеточно-контактный механизм реализации цитотоксической активности ИФН-ДК. По-видимому, выявленные различия между донорами и больными в продукции sTNFα в данном случае не имеют значения, а цитотоксичность ДК детерминирована уровнем mTNFα. В пользу этого предположения также свидетельствуют данные серии экспериментов, в которых было проведено исследование чувствительности глиобластомных линий к рекомбинантному TNFα человека (rTNFα). В качестве мишеней были выбраны линии, продемонстрировавшие высокую чувствительность к TNFα/TNF-R1-зависимой цитотоксичности, медируемой дендритными клетками. Как видно из Рисунка 3.5.5, rTNFα не оказывал цитотоксического эффекта на опухолевые линии при всех исследуемых концентрациях.

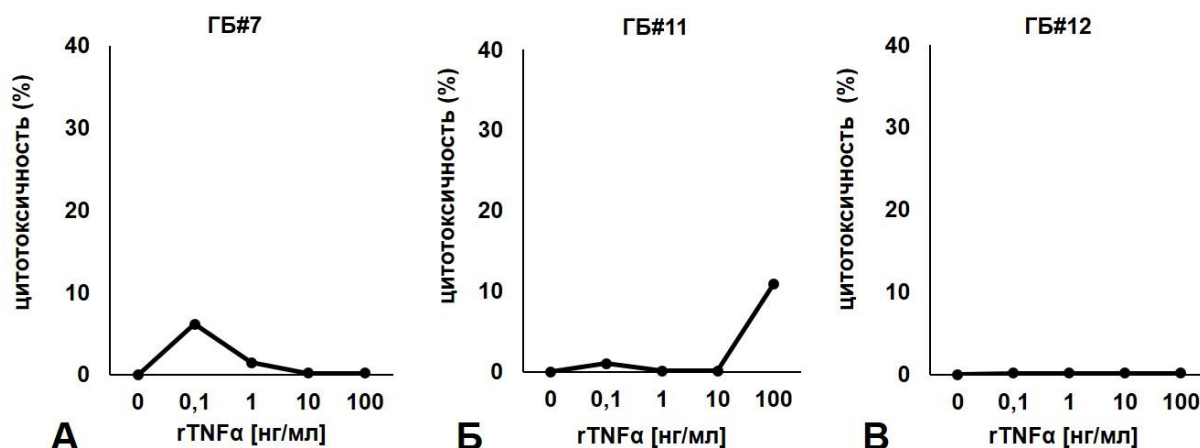


Рисунок 3.5.5 - Чувствительность клеток глиобластомных линий к цитотоксическому действию растворимой формы TNFα

На рисунке представлена цитотоксическая активность рекомбинатного TNFα (rTNFα) в указанных дозах против клеток трех репрезентативных глиобластомных линий ГБ#7 (А), ГБ#11 (Б), ГБ#12 (В) в 24ч МТТ-тесте.

Наконец, учитывая тот факт, что не все пациенты с глиобластомой характеризовались низким уровнем экспрессии mTNFα, важным представлялось выяснить, действительно ли нарушение экспрессии mTNFα может оказывать критическое влияние на выраженность противоопухолевой цитотоксичности ИФН-ДК. Для решения этого вопроса была выбрана опухолевая линия НЕР-2 (аденокарцинома гортани человека). Опухолевая линия НЕР-2 часто используется в качестве модели для изучения TNFα-опосредованных сигнальных путей, поскольку клетки линии экспрессируют рецептор первого типа TNF-R1 (p55) [53]. Ранее нами было показано что ИФН-ДК больных глиомами высокой степени злокачественности характеризуются нарушенной цитотоксической активностью против опухолевой линии НЕР-2 [183], что указывает на общий характер дефекта TNFα-опосредованной цитотоксичности ДК анализируемых больных независимо от гистологической принадлежности опухоли, а также позволяет использовать клетки НЕР-2 в качестве модели при изучении данного механизма.

Как оказалось, ИФН-ДК больных глиобластомой с низкой экспрессией mTNFα (<5,3 %) проявляли слабую цитотоксическую активность против

опухолевых клеток НЕР-2 ($10,5 \pm 3,6$ %; Рисунок 3.5.6). ИФН-ДК пациентов с сохранной экспрессией mTNF α ($>5,3$ %) индуцировали лизис клеток НЕР-2 на уровне донорских значений (уровень цитотоксичности ($45,5 \pm 10,2$) и ($42,1 \pm 4,5$) %, соответственно). Таким образом, низкая экспрессия mTNF α действительно определяла слабую цитотоксическую активность ИФН-ДК больных глиобластомой.

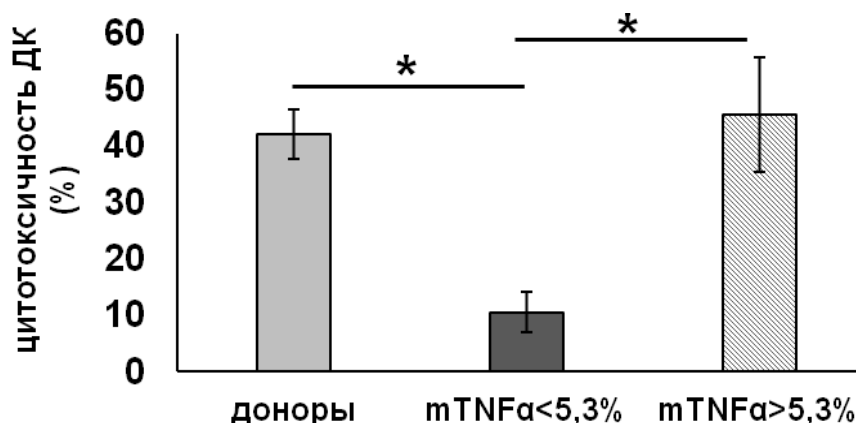


Рисунок 3.5.6 – Связь экспрессии мембранной формы TNF α с уровнем цитотоксической активности ДК

Представлены данные в виде средних значений ($m \pm SE$) цитотоксической активности (%) ЛПС-стимулированных ИФН-ДК здоровых доноров ($n=18$), а также подгрупп пациентов с низким ($mTNF\alpha < 5,3\%$; $n=14$) и высоким ($mTNF\alpha > 5,3\%$; $n=5$) уровнем экспрессии мембранной формы TNF α на ДК против клеточной линии НЕР-2. * - $p_U < 0,05$ - достоверность различий между указанными группами.

Множественный регрессионный анализ показал выраженную зависимость (коэффициент детерминации R^2 83 %, F-критерий 9,8, $p = 0,029$) цитотоксической активности ИФН-ДК больных глиобластомой от уровня экспрессии mTNF α на ИФН-ДК ($p = 0,012$). При этом уровень продукции sTNF α , согласно регрессионному анализу, не определял способность ИФН-ДК к лизису опухолевых клеток НЕР-2 ($p = 0,33$).

В целом, результаты, представленные в Главе 3.5, свидетельствуют о том, что ИФН-ДК больных глиобластомой характеризуются сопоставимым с ИФН-ДК доноров уровнем экспрессии цитотоксических лигандов FasL, TRAIL и молекул цитолитических гранул перфорина, гранзима Б и CD107a, однако отличаются изменением соотношения экспрессии mTNF α и sTNF α , в

частности снижением экспрессии mTNF α и увеличением продукции sTNF α . При этом именно mTNF α и, следовательно, контактное взаимодействие с клетками-мишенями, играет определяющую роль в реализации цитотоксической функции ИФН-ДК против TNF-R1-экспрессирующих опухолевых клеток. Соответственно, снижение экспрессии mTNF α на ИФН-ДК больных глиобластомой является ключевым фактором дефекта цитотоксической функции ДК против опухолевых клеток, чувствительных к TNF α /TNF-R1-зависимому механизму лизиса. В то же время нарушение экспрессии mTNF α и, следовательно, проведения апоптотического сигнала при взаимодействии этой молекулы с рецептором TNF-R1 не приводит к полному подавлению, но ослабляет цитотоксическую функцию ИФН-ДК больных против аутологичных опухолевых клеток. В этом аспекте важно то, что сохранность экспрессии других лигандов и, прежде всего, перфорина и гранзима Б, обеспечивает возможность для ДК больных глиобластомой лизировать опухолевые клетки, но на более низком уровне по сравнению с ИФН-ДК доноров. В целом, полученные данные не только указывают на причины снижения цитотоксического потенциала ДК больных глиобластомой, но также позволяют определить основные мишени для дальнейшего исследования регуляции цитотоксической функции и возможности коррекции цитотоксических свойств ДК у больных с онкопатологией.

3.6 Роль регуляции экспрессии мембранной формы TNF α в реализации цитотоксической активности ИФН-ДК больных глиобластомой

Выявленное нарушение экспрессии mTNF α , приводящее в конечном итоге к селективному дефекту TNF α -опосредованной цитотоксической функции ИФН-ДК у больных злокачественными глиомами против аутологичных опухолевых клеток, может быть обусловлено различными причинами, связанными с регуляцией экспрессией этого цитокина. С одной стороны, низкое количество mTNF α ⁺ клеток в культурах ИФН-ДК может определяться исходно низким уровнем экспрессии гена *TNF α* в ДК больных глиомой. С другой стороны, низкая экспрессия mTNF α при сохранной, и даже повышенной, продукции sTNF α в культурах ДК больных указывает на изменения/нарушения механизмов, регулирующих соотношение этих двух форм TNF α и препятствующих накоплению mTNF α на клеточной мембране ДК. В этом случае причиной таких изменений может быть высокая активность TNF α -конвертирующего фермента (TACE), который осуществляет шеддинг mTNF α , срезая внеклеточную часть этой молекулы в позиции Ala76-Val77 и приводя к образованию секретируемой формы TNF α (sTNF α) [42]. Известно, что для опухолевых клеток злокачественных глиом характерна высокая активность и экспрессия этого фермента, что ассоциируется с опухолевой прогрессией и плохим прогнозом [341, 354]. Однако в отношении ДК такие данные об активности TACE отсутствуют. Учитывая выше изложенные факты, на следующем этапе было проведено изучение экспрессии молекул, относящихся к транскрипционному и посттрансляционному этапам экспрессии TNF α в ИФН-ДК больных злокачественными глиомами.

При сравнительном анализе экспрессии мРНК TNF α в культурах ИФН-ДК здоровых доноров и больных глиобластомой была проведена оценка значений пороговых циклов в ДК в ответ на стимуляцию ЛПС (Таблица 3.6.1). Количество пороговых циклов в образцах ДК доноров было ниже по сравнению с аналогичным показателем в культурах ДК больных

злокачественными глиомами ($p = 0,05$). Поскольку величина порогового цикла зависит от эффективности амплификации ДНК и обратно коррелирует с исходным количеством копий матрицы, полученные нами результаты могут свидетельствовать о меньшем количестве мРНК $TNF\alpha$ в ИФН-ДК больных злокачественными глиомами по сравнению с ИФН-ДК здоровых доноров.

Таблица 3.6.1 – Значения пороговых циклов для гена $TNF\alpha$ в ЛПС-стимулированных ИФН-ДК доноров и больных глиобластомой

Анализируемый ген	Показатель пороговых циклов	ИФН-ДК _{доноры}	ИФН-ДК _{больные}
$TNF\alpha$	Me (LQ – UQ)	28,96 (28,94 – 29,26)	36,24* (30,78 – 38,21)
	$m \pm SE$	$29,05 \pm 0,1$	$34,50 \pm 3,13$
$RPLP0$	Me (LQ – UQ)	31,52 (31,36 – 38,18)	33,94 (28,05 – 36,71)
	$m \pm SE$	$33,67 \pm 2,25$	$32,90 \pm 2,55$

Примечание: в виде медианы (Me), диапазона 25-75% квартильных значений (LQ – UQ) и средних значений ($m \pm SE$) представлены данные о количестве пороговых циклов экспрессии гена $TNF\alpha$ и референсного гена $RPLP0$ в культурах ИФН-ДК здоровых доноров (ИФН-ДК_{доноры}) и больных глиобластомой (ИФН-ДК_{больные}). * – $p_U < 0,05$ – достоверность различий показателей ИФН-ДК больных и доноров.

Для того, чтоб рассчитать относительный уровень экспрессии гена $TNF\alpha$ в ДК больных злокачественными глиомами был применен метод сравнения пороговых уровней амплификации ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). При этом уровень экспрессии этого гена в ИФН-ДК доноров был принят за 1. Согласно полученным нами данным (рисунок 3.6.1) ЛПС-стимулированные ИФН-ДК больных глиобластомой характеризовались более чем двукратно сниженной экспрессией мРНК $TNF\alpha$ по сравнению с ИФН-ДК донорами ($Me\ 2^{-\Delta\Delta Ct} = 0,35$; $p = 0,05$).

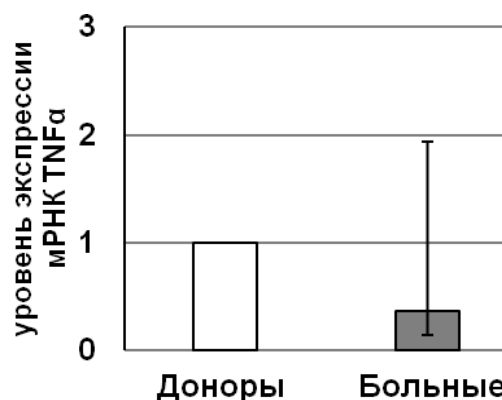


Рисунок 3.6.1 – Экспрессия мРНК TNFα в ЛПС-стимулированных ИФН-ДК доноров и больных глиобластомой

Представлены медианные (Me) и диапазон 25-75% кватильных значений (LQ – UQ) относительного уровня экспрессии мРНК TNFα в ЛПС-стимулированных ИФН-ДК больных глиобластомой, нормализованного по методу $2^{-\Delta\Delta C_t}$ с референс-геном *RPLP0*, уровень экспрессии мРНК TNFα в ЛПС-стимулированных ИФН-ДК здоровых доноров принят за 1.

Одним из ключевых участников различных сигнальных путей, включая и те, что связаны с синтезом TNFα, является транскрипционный фактор NF-κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) [355]. Известно, что ЛПС индуцирует диссоциацию комплекса NF-κB и ингибиторного белка IκBα (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha) [224], что приводит к активации NF-κB и его дислокации в ядро с последующей активацией экспрессии генов, связанных с синтезом TNFα [69].

Для того, чтобы выяснить, связано ли нарушение экспрессии гена *TNFα* в ИФН-ДК больных глиобластомой с особенностями регуляции этого процесса, методом проточной цитометрии была проведена оценка экспрессии активной, фосфорилированной, формы NF-κB (pNF-κB p65) в ИФН-ДК.

Для определения наиболее оптимальной временной точки детекции активной формы NF-κB на этапе созревания ДК была изучена динамика экспрессии pNF-κB p65 в культурах ЛПС-стимулированных ИФН-ДК здоровых доноров. Как видно из рисунка 3.6.2, уровень экспрессии активной формы NF-κB в ДК доноров в ответ на добавление ЛПС возрастал и достигал максимальных значений через 30 мин после стимуляции, после чего снижался, но оставался детектируемым через 24 часа после добавления ЛПС.

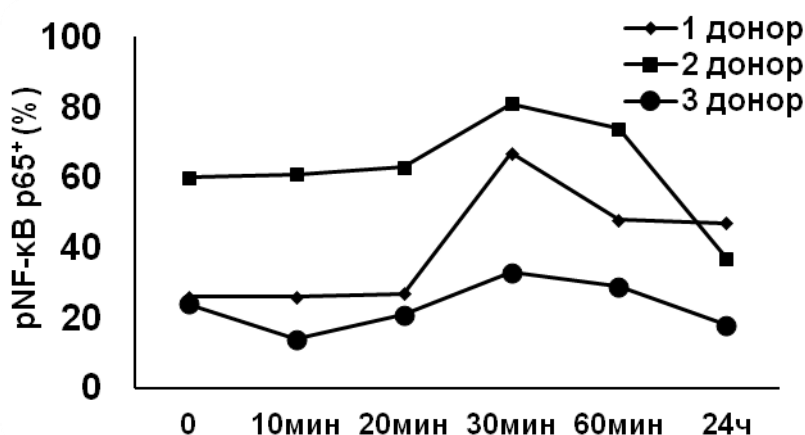


Рисунок 3.6.2 – Кинетика активации pNF-κB в культурах ЛПС-стимулированных ИФН-ДК здоровых доноров

Представлены индивидуальные значения количества pNF-κB p65⁺ клеток в HLA-DR⁺-гейте нестимулированных (0) ИФН-ДК трех здоровых доноров и в ответ на добавление ЛПС через 10, 20, 30, 60 мин и через 24 ч.

Исходя из полученных данных, последующий анализ pNF-κB p65⁺-клеток в популяции ИФН-ДК больных проводился через 30 мин после стимуляции соответствующими агентами. Как видно из рисунка 3.4.3, ЛПС стимулировал экспрессию активной формы NF-κB в ИФН-ДК здоровых доноров ($p = 0,028$) и больных глиобластомой ($p = 0,02$). Причем группы доноров и больных значимо не различались между собой по количеству pNF-κB p65⁺-клеток как в популяциях незрелых ДК, так и в ЛПС-стимулированных ДК.

В целом, полученные данные свидетельствуют о том, что ИФН-ДК больных глиобластомой характеризуются низким уровнем экспрессии самого гена *TNFα*, однако обнаруженный дефект является NF-κB-независимым.

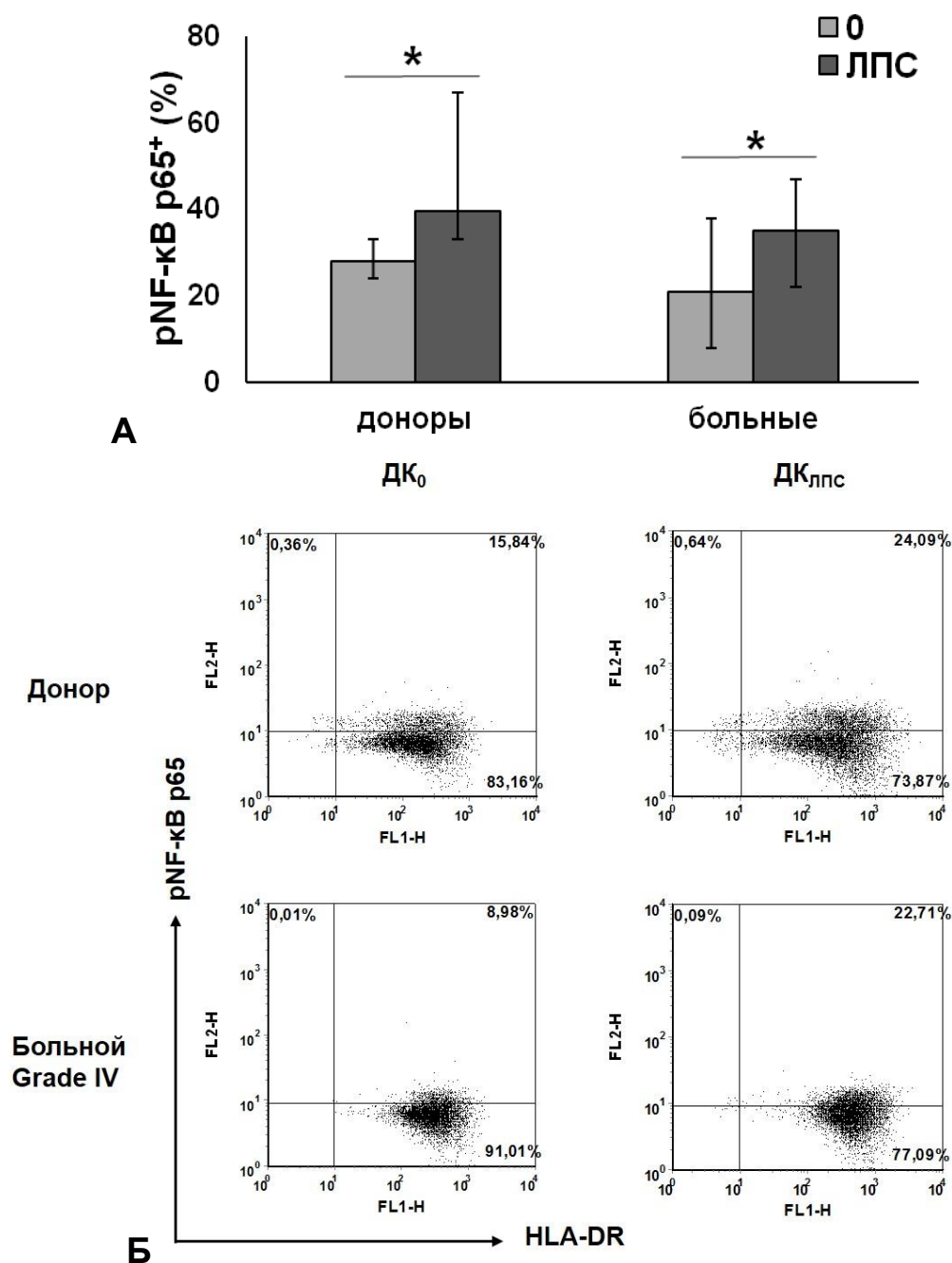


Рисунок 3.6.3 – Экспрессия активной формы pNF-κB в ИФН-ДК доноров и больных глиобластомой

А) Представлены данные в виде средних значений ($m \pm SE$) относительного количества pNF-κB p65⁺ клеток в HLA-DR⁺-гейте в нестимулированных (0) и ЛПС-стимулированных ИФН-ДК здоровых доноров (n=7) и больных глиобластомой (n=11). Б) Представлены индивидуальные DotPlot гистограммы распределения нестимулированных (ДК₀) и ЛПС-стимулированных (ДК_{ЛПС}) ИФН-ДК здорового донора (верхний ряд гистограмм) и пациента с глиобластомой (нижний ряд гистограмм) по флуоресценции FITC-меченных анти-HLA-DR- и Ре-меченных анти-pNF-κB p65-антител. Левый верхний квадрант – pNF-κB p65⁺HLA-DR⁻ клетки, правый верхний квадрант – pNF-κB p65⁺HLA-DR⁺ клетки, правый нижний квадрант – pNF-κB p65⁻HLA-DR⁺ клетки. * - $p_w < 0,05$ - достоверность различий.

Экспрессия молекулы mTNF α может регулироваться не только на транскрипционном уровне и определяться экспрессией самого гена *TNF α* , но и зависит от интенсивности процессов шеддинга. Известно, что стимуляция ДК через рецептор TLR-4 с помощью ЛПС сопровождается увеличением активности фермента TACE, что в свою очередь приводит к усилению продукции sTNF α и снижению уровня mTNF α [207].

В связи с этим на следующем этапе была проведена сравнительная оценка экспрессии фермента TACE, а также его активности в культурах ИФН-ДК доноров и больных глиобластомой.

Для того, чтобы выбрать наиболее подходящий интервал определения экспрессии TACE на ДК в ответ на добавление дозревающего стимула, был проведен фенотипический анализ экспрессии фермента на ДК доноров до стимуляции ЛПС и в течение 24 часов культивирования в присутствии ЛПС (Рисунок 3.6.4). При добавлении ЛПС в культуры ИФН-ДК доноров в первые 60 мин отмечалось резкое падение экспрессии TACE, после чего уровень экспрессии изучаемого фермента повышался и достигал максимального уровня через 2 часа после начала стимуляции и далее продолжал определяться вплоть до 24 часов культивирования с постепенным снижением.

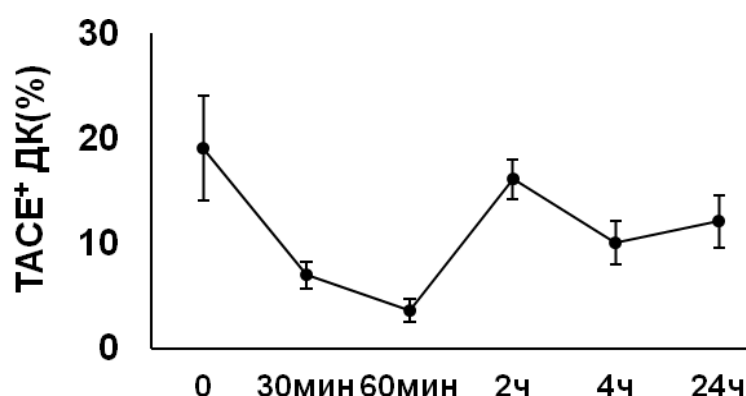


Рисунок 3.6.4 – Динамика экспрессии TNF α -конвертирующего фермента на клеточной мембране ИФН-ДК доноров

Представлены данные в виде средних значений ($m \pm SE$) относительной экспрессии фермента TACE в нестимулированных (0) ИФН-ДК здоровых доноров и в ответ на добавление ЛПС через 30 мин, 60 мин, 2 ч, 4 ч и через 24 ч ($n = 5$).

Исходя из полученных данных, дальнейшая сравнительная оценка экспрессии TACE на ДК доноров и больных глиобластомой проводилась через 2 часа после добавления ЛПС. Как видно из Рисунка 3.6.5, интактные (нестимулированные) ДК больных характеризовались более выраженной экспрессией фермента TACE по сравнению с ДК доноров ($(28,8 \pm 10,9)$ vs $(18,1 \pm 3,9)$ %, соответственно; $p = 0,17$).

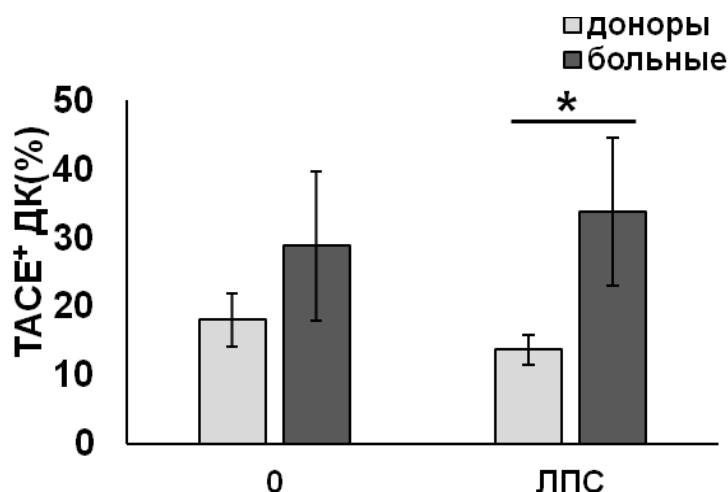


Рисунок 3.6.5 – Экспрессия TNF α -конвертирующего фермента на ИФН-ДК доноров и больных глиобластомой

Представлены данные в виде средних значений ($m \pm SE$) относительной экспрессии фермента TACE в нестимулированных (0) и ЛПС-стимулированных ИФН-ДК здоровых доноров ($n = 7$) и больных глиобластомой ($n = 6$). * - $p_U < 0,05$ - достоверность различий между ДК доноров и больных.

Добавление ЛПС в культуры ДК доноров и больных (Рисунок 3.6.5) не сопровождалось значимыми изменениями в экспрессии TACE, однако различия в изучаемом показателе между ЛПС-стимулированными ИФН-ДК доноров и пациентов с глиобластомой достигали статистической значимости ($(33,8 \pm 10,8)$ vs $(13,7 \pm 2,2)$ %, соответственно; $p = 0,046$).

На следующем этапе было проведено изучение активности фермента TACE в культурах ИФН-ДК. Как и в случае с экспрессией TACE, была установлена наиболее оптимальная временная точка для оценки активности фермента в ИФН-ДК в ответ на стимуляцию ЛПС. Активность TACE в ДК здоровых доноров в ответ на добавление ЛПС возрастала и достигала максимальных значений в первые 1 - 2 часа после стимуляции (Рисунок 3.6.6).

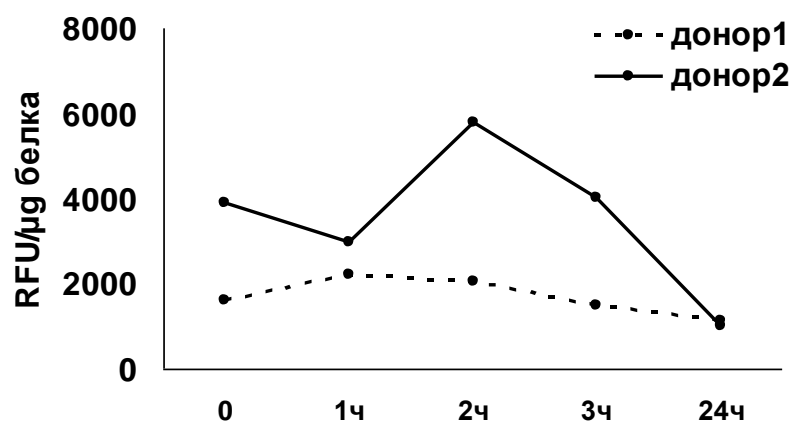


Рисунок 3.6.6 – Динамика протеолитической активности TNF α -конвертирующего фермента в культурах ИФН-ДК здоровых доноров
 Представлены индивидуальные значения активности фермента TACE в нестимулированных (0) ИФН-ДК двух здоровых доноров и в ответ на добавление ЛПС через 1 ч, 2 ч, 4 ч и через 24 ч.

Полученные данные позволяют судить о том, что пик наибольшего уровня экспрессии фермента TACE совпадал с интервалом увеличения его протеолитической активности в ответ на добавление ЛПС в культуры ИФН-ДК доноров. Исходя из полученных данных, последующий сравнительный анализ активности фермента в популяции ИФН-ДК доноров и больных злокачественными глиомами проводился также через 2 часа после добавления ЛПС.

Как видно из рисунка 3.6.7, ЛПС-стимулированные ИФН-ДК больных глиобластомой отличались почти трехкратно большей активностью TACE по сравнению с ИФН-ДК доноров ($(1245,3 \pm 650)$ и $(385,7 \pm 115)$ RFU/ μ g белка, соответственно). Эти различия регистрировались в виде выраженного тренда ($p = 0,08$). Кроме того, при индивидуально анализе более чем у половины пациентов (5/9, 56 %) активность фермента выходила за границы верхнего квартильного значения ($LQ = 578,6$ RFU/ μ g белка) активности TACE в группе здоровых доноров.

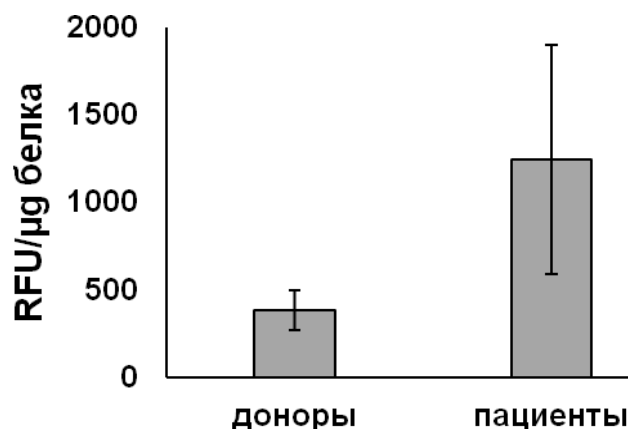


Рисунок 3.6.7 – Протеолитическая активность TNF α -конвертирующего фермента в культурах ИФН-ДК

Представлены данные в виде средних значений ($m \pm SE$) активности фермента TACE в ЛПС-стимулированных ИФН-ДК здоровых доноров ($n = 8$) и больных глиобластомой ($n = 8$).

Полученные результаты указывают на тот факт, что низкий уровень экспрессии mTNF α на ДК больных глиобластомой обусловлен не только нарушенной экспрессией мРНК TNF α , но также высокой экспрессией и активностью TACE, срезающего mTNF α с мембраны ДК.

Чтобы подтвердить значимость TACE в регуляции экспрессии mTNF α и цитотоксической активности ДК, была проведена серия экспериментов с использованием синтетического ингибитора металлопротеиназ TAPI-0, блокирующего активность TACE (Рисунок 3.6.8).

Поскольку блокирование фермента TACE может приводить к снижению продукции sTNF α и накоплению на поверхности клетки mTNF α , данный подход позволил оценить, как изменение экспрессии TNF α ассоциировано с изменением цитотоксической активности ИФН-ДК больных глиобластомой. Для того чтобы подтвердить эффект TAPI-0 на экспрессию и продукцию TNF α , была проведена серия экспериментов, включающих фенотипический анализ и оценку уровня продукции sTNF α в культурах ИФН-ДК больных. Добавление TAPI-0 в дозе 25 мкг/мл на этапе конечного созревания ДК совместно с ЛПС действительно приводило к более чем двукратному увеличению mTNF α -позитивных клеток в культурах ИФН-ДК больных глиобластомой (с $(3,7 \pm 0,4)$ до $(7,6 \pm 0,7)$ %; $p = 0,02$; Рисунок 3.6.8А).

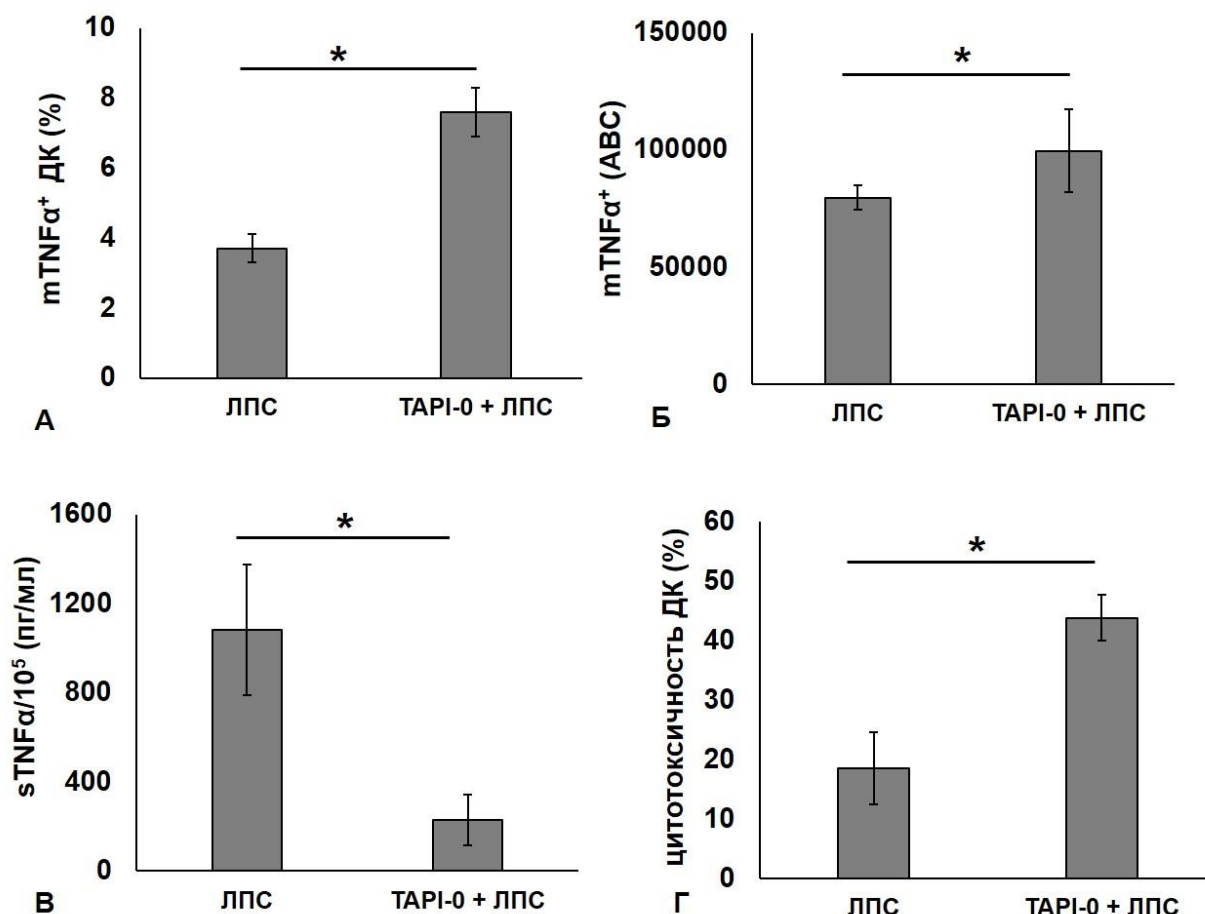


Рисунок 3.6.8 – Влияние ТАPI-0 на экспрессию TNFα и цитотоксичность ЛПС-стимулированных ИФН-ДК больных глиобластомой

Представлены данные в виде средних значений ($m \pm SE$) относительного количества клеток, экспрессирующих mTNFα (А), плотности экспрессии mTNFα (ABC) (Б), концентрации sTNFα/10⁵ДК в супернатантах цельных культур (В) и уровня цитотоксической активности (Г) интактных ЛПС-стимулированных и ТАPI-0-обработанных культурах ИФН-ДК больных глиобластомой (n=8) против опухолевых клеток Нер-2 в МТТ-тесте. * - $p_w < 0,05$ - достоверность различий показателей между интактными и ТАPI-0-обработанными ИФН-ДК.

Кроме того, при блокировании фермента TACE наблюдался более высокий уровень плотности экспрессии mTNFα на ИФН-ДК ($p = 0,04$; Рисунок 3.6.8Б). При этом продукция sTNFα в культурах ИФН-ДК снижалась более чем в четыре раза, с (1083 ± 294) до (230 ± 113) пг/мл ($p = 0,046$; Рисунок 3.6.8В). Как видно из рисунка 3.6.8Г, изменение соотношения sTNFα и mTNFα в сторону накопления на поверхности ДК mTNFα за счет блокирования фермента приводило к более чем двукратному увеличению цитотоксической

активности ИФН-ДК больных против клеток TNF α -чувствительной линии HEp-2 ($p = 0,05$).

Таким образом, направленная регуляция экспрессии TNF α на посттрансляционном уровне за счет снижения шеддинга mTNF α позволила усилить цитотоксический потенциал ИФН-ДК больных глиобластомой, а также подтвердила преобладающую роль mTNF α в реализации лизиса TNF α -чувствительных опухолевых клеток дендритными клетками.

В целом, представленные в Главе 3.6 данные свидетельствуют о том, что низкий уровень экспрессии мембранной формы TNF α , ведущий к дефекту цитотоксической функции ДК больных глиобластомой против опухолевых клеток, обусловлен рядом нарушений, являющихся критически важными на разных этапах экспрессии молекулы TNF α . Во-первых, нарушение экспрессии TNF α проявляется на транскрипционном уровне и затрагивает экспрессию самого гена *TNF α* , о чем свидетельствует низкое количество мРНК TNF α в ИФН-ДК больных глиобластомой. Характерно, что в данном случае обнаруженный низкий уровень мРНК TNF α не был связан с транскрипционным фактором NF-kB, поскольку стимулирующее влияние дозревающего стимула ЛПС на активацию NF-kB одинаково проявлялось в ИФН-ДК доноров и больных глиобластомой. Второй важный вывод состоит в том, что нарушение экспрессии TNF α существует в ИФН-ДК больных глиобластомой на посттрансляционном этапе и связано с высокой экспрессией и, как следствие, высокой активностью TNF α -конвертирующего фермента, переводящего mTNF α в sTNF α . В то же время увеличение экспрессии mTNF α на ИФН-ДК больных, индуцированное ингибцией изучаемого фермента, ассоциировалось с усилением противоопухолевой цитотоксической активности ИФН-ДК больных глиобластомой. В этом аспекте полученные данные о причинах дефекта TNF α -опосредованной цитотоксичности ДК представляют большой интерес, поскольку обозначили новые молекулярные мишени для направленной коррекции и регуляции этой функции ДК больных глиобластомой.

3.7 Влияние растворимых факторов, продуцируемых глиобластомными клетками, на цитотоксическую активность ИФН-ДК

Развитие и рост опухоли связаны с различными механизмами, которые позволяют ей ускользать от иммунного надзора и создают оптимальные условия для опухолевой прогрессии. В этом аспекте обнаруженный нами дефект цитотоксической активности ДК моноцитарного происхождения в группе больных глиобластомой против аутологичных опухолевых клеток подтверждает этот факт. Известно, что клетки злокачественных глиом и клетки опухолевого микроокружения секретируют цитокины и различные ростовые факторы, которые стимулируют рост и пролиферацию опухолевых клеток, ангиогенез, метастазирование, а также индуцируют генерацию клеток с иммуносупрессорной активностью (Трег, М2-подобные макрофаги, миелоидные супрессорные клетки) [208, 227]. В связи с этим можно полагать, что растворимые продукты опухолевых клеток выступают в качестве негативных регуляторов цитотоксической активности ДК.

Для проверки этой гипотезы была проведена оценка цитотоксической активности ИФН-ДК здоровых доноров, обработанных супернатантами первичных клеточных культур опухолей пациентов с глиобластомой. Поскольку моноцитарные предшественники ДК больных глиобластомой уже скомпрометированы с точки зрения влияния опухоли и продуцируемых ею различных медиаторов, супернатанты глиобластомных клеток добавляли в культуры ДК доноров на этапе дифференцировки (т.е. с первых суток культивирования). Учитывая тот факт, что наиболее выраженный дефект цитотоксической активности ДК больных глиобластомой был связан с экспрессией $mTNF\alpha$, в качестве клеток-мишеней в этой серии экспериментов использовали клетки линии НЕр-2 как модель $TNF\alpha/TNF-R1$ -опосредованной цитотоксичности ДК. Как видно из Рисунка 3.7.1, добавление супернатантов первичных глиобластомных культур, полученных от различных пациентов, разнонаправлено влияло на уровень цитотоксической активности ДК.

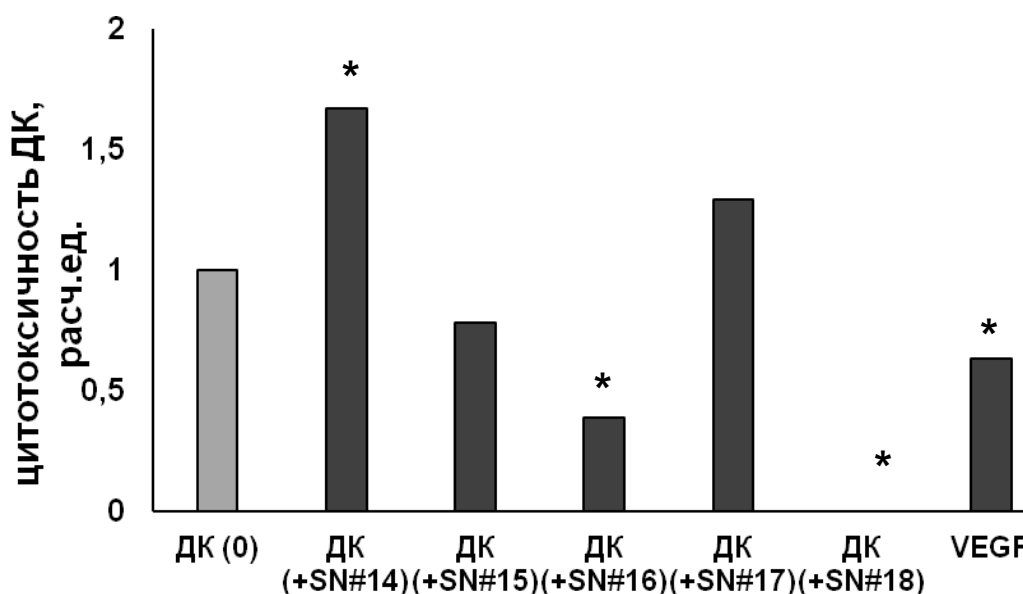


Рисунок 3.7.1 – Влияние растворимых факторов, продуцируемых клетками глиобластомы, на цитотоксическую активность ИФН-ДК здоровых доноров

На рисунке представлены данные уровня цитотоксической активности ИФН-ДК здоровых доноров ($n=3-5$) против клеток НЕР-2, где за 1 приняты индивидуальные значения цитотоксической активности интактных ЛПС-стимулированных ДК (ДК(0)), относительно которых рассчитывалась цитотоксическая активность ДК, предобработанных на стадии дифференцировки супернатантами (25 % v/v) первичных культур опухоли пяти пациентов с глиобластомой (SN#14, SN#15, SN#16, SN#17, SN#18), а также VEGF (20 нг/мл) согласно формуле

$$\frac{\text{Цитотоксичность ДК (+SN или VEGF)}}{\text{Цитотоксичность ДК(0)}} \quad (\text{Me, расч.ед.}). \quad * - p_w < 0,05 - \text{достоверность различий с ДК(0).}$$

Эффекты, оказываемые супернатантами на ДК, можно было условно разделить на три группы. Так, часть тестируемых супернатантов (SN#18 и SN#16) обладала выраженным супрессорным действием на цитотоксичность ДК доноров, существенно подавляя эту функцию (Me ингибирования 1 и 0,61 расч.ед., соответственно). Оппозитное влияние оказывали супернатанты двух других первичных культур (от пациентов #14 и #17), которые, наоборот, стимулировали цитотоксическую активность ДК доноров против клеток НЕР-2. Наконец, к третьей группе можно было отнести умеренно выраженное супрессорное действие (Me ингибирования 0,23 расч.ед.) на цитотоксичность

ДК доноров, которым обладали супернатанты одной из пяти тестируемых первичных культур.

Наряду с супернатантами был изучен эффект фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), который продуцируется клетками злокачественных глиом на высоком уровне и рассматривается как один из ключевых цитокинов в негативной регуляции функциональных свойств клеток иммунной системы и индукции иммуносупрессии [251]. Согласно полученным нами данным, добавление VEGF на этапе дифференцировки в культуры ИФН-ДК доноров сопровождалось ослаблением цитотоксической активности ДК против клеток Нер-2 почти на 40 % (Me ингибирования 0,37 расч.ед., $p = 0,04$,; Рисунок 3.7.1).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что продуцируемые опухолевыми клетками различные медиаторы могут выступать в роли негативных регуляторов цитотоксической активности ДК. В то же время обнаруженное нами стимулирующее влияние супернатантов первичных опухолевых культур указывает на существующие различия в спектре секретируемых факторов среди глиобластом.

Для того, чтобы полно охарактеризовать цитокиновый профиль клеток глиобластомы, был проведен мультиплексный анализ 27 различных цитокинов (Рисунок 3.7.2), включая про-/противовоспалительные цитокины (TNF α , IL-1b, IL-1ra, IL-10), иммунорегуляторные цитокины (IL-2, IFN γ , IL-12, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13, IL-15, IL-17), ростовые факторы (G-CSF, GM-CSF, IL-7, FGF-b, PDGF, VEGF) и хемокины (IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, Eotaxin). Поскольку нарушения цитотоксической активности ДК были характерны для пациентов с глиомами высокой степени злокачественности [183] (Grade III, анапластическая астроцитома; Grade IV, глиобластома), тогда как ДК больных с глиомами низкой степени злокачественности характеризовались сохранной киллерной активностью, в исследование были включены супернатанты первичных культур глиальных опухолей головного мозга разной степени злокачественности (низкой - Grade II и высокой - Grade

III, Grade IV), а также стандартной линии U-87. Для удобства описания продукции цитокинов за низкий уровень была принята концентрация цитокинов с Me 10 - 100 пг/мл, за средний уровень 100 - 1000 пг/мл, за высокий 1000 - 10000 пг/мл, очень высокий - >10000 пг/мл.

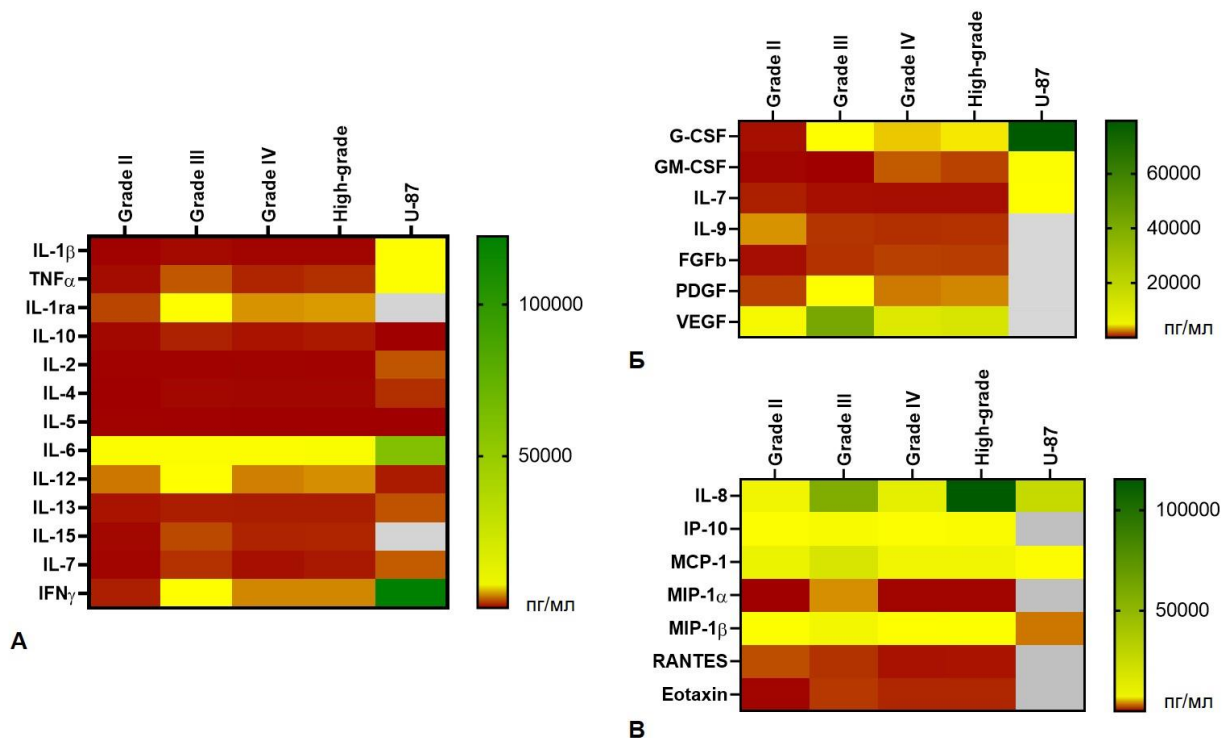


Рисунок 3.7.2 – Цитокиновый профиль клеток глиом головного мозга

На тепловой карте представлены медианные значения концентрации указанных цитокинов (пг/мл), в том числе группы про-/противовоспалительных и иммунорегуляторных цитокинов (А), ростовых факторов (Б) и хемокинов (В) в супернатантах первичных клеточных культур низкой (Grade II, n=7) и высокой (Grade III, n=4; Grade IV, n=26; high-grade (Grade III + Grade IV), n=30) степени злокачественности, а также линии U-87.

Как видно из Таблицы 3.7.1 и Рисунка 3.7.2А, клетки первичных культур глиом как с высокой, так и низкой степенью злокачественности на низком уровне секретируют медиаторы из группы про- и противовоспалительных цитокинов (IL-1 β , TNF α и IL-10), за исключением противовоспалительного цитокина IL-1ra, уровень которого регистрировался в диапазоне средних концентраций. В то же время для культур клеток глиом высокой степени злокачественности был характерен более высокий уровень продукции анализируемых цитокинов по сравнению с глиомами низкой степени злокачественности.

Известно, что высокая продукция $\text{TNF}\alpha$ часто является триггером для запуска продукции IL-1ra [166]. Согласно полученным нами данным, между двумя этими цитокинами отмечалась сильная корреляционная связь как в группе глиом низкой степени злокачественности ($R_s = 0,986$, $p = 0,0003$), так и в группе глиом высокой степени злокачественности ($R_s = 0,867$, $p = 0,000$). При этом отмечалась тенденция ($p = 0,07$) к увеличению индекса соотношения этих двух цитокинов ($\text{TNF}\alpha/\text{IL-1ra}$) в группе глиом высокой степени злокачественности, что свидетельствует о смещении баланса в сторону провоспалительной активности.

Таблица 3.7.1 - Продукция про- и противовоспалительных цитокинов клетками первичных культур глиомных опухолей

	Grade II (n=7)	Grade III (n=4)	Grade IV (n=26)	High-grade (III+IV) n=30	U-87
IL-1β	3,4 (2-7)	16 (6-53)	6,5 (5-18)	7* (5-22)	484
TNFα	19 (6-60)	138* (85-184)	58* (29-144)	73* (32-150)	966
IL-1ra	108 (13-279)	651 (222-796)	232 (121-729)	242 (125-729)	н/о
IL-10	13 (10-22)	53 (21-65)	32 (11-68)	39 (11-65)	1

Примечание: данные представлены в виде медианных и 25-75 % квартильных (в скобках) значений концентрации указанных цитокинов (пг/мл) в супернатантах первичных клеточных культур. * - $p_U < 0,05$ - различия с первичными культурами Grade II. н/о - образцы не были включены в анализ.

В отличие от первичных культур, клетки линии U-87 характеризовались высокой продукцией провоспалительных цитокинов $\text{IL-1}\beta$ и $\text{TNF}\alpha$, которая превышала аналогичные показатели (Me) в группе первичных культур глиобластом в 69 и 17 раз, соответственно. При этом IL-10 практически не определялся в кондиционной среде опухолевой линии (был на уровне нижнего порога детекции).

Анализ продукции иммунорегуляторных цитокинов (Рисунок 3.7.2А, Таблица 3.7.2) выявил различия между глиомами высокой и низкой степени злокачественности. В отличие от глиомных культур высокой степени злокачественности в супернатантах культур опухолей Grade II большее количество цитокинов (IL-2, IL-4, IL-5, IL-15, IL-17) было на уровне нижнего порога детекции. В отношении IFN γ отмечался выраженный тренд к почти пятикратно более высокой его продукции клетками злокачественных глиом в целом ($p = 0,068$) и глиобластом в частности ($p = 0,06$) по сравнению с культурами Grade II.

Таблица 3.7.2 – Продукция иммунорегуляторных цитокинов клетками первичных культур глиомных опухолей

	Grade II (n=7)	Grade III (n=4)	Grade IV (n=26)	High-grade (III+IV) n=30	U-87
IL-2	3 (2-11)	4 (3,5-27)	5* (3-32)	4* (3-32)	133
IL-4	1 (1-6)	12 (5-17)	9* (5-14)	9* (5-15)	74
IL-5	4 (1-5)	2 (1-3)	1 (1-4.5)	1 (1-4)	1
IL-6	2302 (988-2399)	18343 (2150-45590)	2057 (1131-26069)	2626 (1130-26564)	59329
IL-12	186 (76-203)	424 (135-708)	201 (116-371)	222 (116-427)	42
IL-13	32 (18-74)	47 (22-55)	45 (21-65)	46 (21-62)	130
IL-15	12 (9-56)	115 (45-237)	56 (24-92)	58* (30-93)	н/о
IL-17	7 (7-42)	78* (67-107)	25 (6-78)	37 (7-89)	144
IFNγ	48 (8-69)	485 (21-1093)	211 (8-745)	211 (101-789)	122372

Примечание: данные представлены в виде медианных и 25-75%квартильных (в скобках) значений концентрации указанных цитокинов (пг/мл) в супернатантах первичных клеточных культур. * - $p_U < 0,05$ различия с первичными культурами Grade II. н/о - образцы не были включены в анализ.

Как известно, IL-6 и IFN γ проявляют оппозитное влияние в регуляции иммунного ответа, пролиферации клеток, а также в опухолевой прогрессии [258]. Индекс соотношения этих двух цитокинов (IL-6/IFN γ) в группе глиом низкой степени злокачественности составил в среднем 48 расч.ед., тогда как для группы глиобластом был равен 10 расч.ед. Анализ продукции цитокинов этой группы клетками U-87 показал, что только IL-5 не секретировался клетками линии. Концентрация большей части цитокинов (IL-2, IL-4, IL-6, IL-13, IL-17, IFN γ) в супернатантах U-87 превышал аналогичные показатели медианных значений в группе первичных культур глиобластом. При этом продукция IFN γ была настолько выраженной, что индекс соотношения IL-6/IFN γ был ниже 1 (0,48).

Особый интерес представляла характеристика профиля секретируемых ростовых факторов клетками глиальных опухолей. Как видно из Рисунка 3.7.2Б и Таблицы 3.7.3, большую часть анализируемых цитокинов (G-CSF, GM-CSF, IL-7, FGFb) клетки глиом низкой степени злокачественности продуцировали на низком уровне или ниже порога детекции. В то же время продукция проангиогенного цитокина VEGF была доминирующей среди всей группы анализируемых ростовых факторов. Для глиобластомных культур отмечалась тенденция к более высокой продукции GM-CSF по сравнению с клетками глиом низкой степени злокачественности ($p = 0,099$). IL-6 выступает в роли ко-фактора GM-CSF [186]. При проведении статистического анализа была выявлена прямая корреляционная связь в группе глиобластом (и всей группы глиом высокой степени злокачественности) между этими цитокинами ($R_s = 0,578$, $p = 0,002$). Статистически значимые различия были зарегистрированы для G-CSF и VEGF, продукция которых была в среднем в 10 ($p = 0,015$) и 6 ($p = 0,04$) раз, соответственно, выше клетками злокачественных глиом по сравнению с культурами глиом низкой степени злокачественности.

Что касается клеток линии U-87, то все ростовые факторы, которые были проанализированы, продуцировались в гораздо большем количестве по

сравнению с первичными глиобластомными культурами. Особенно высокими были значения продукции G-CSF.

Таблица 3.7.3 – Продукция ростовых факторов клетками первичных культур глиомных опухолей

	Grade II (n=7)	Grade III (n=4)	Grade IV (n=26)	High- grade (III+IV) n=30	U-87
G-CSF	9 (9-24)	225* (64-3875)	79* (25-880)	91* (25-880)	79287
GM-CSF	5 (2-5)	3 (1-5)	37 (2-136)	28 (2-134)	899
IL-7	15 (2-16)	9 (2-17)	8 (2-44)	8 (2-32)	177
IL-9	59 (19-80)	23 (15-41)	21 (14-31)	22 (14-31)	н/о
FGFb	8 (4-25)	22 (18-79)	27 (7-58)	26 (13-58)	н/о
PDGF	27 (16-65)	118 (10-333)	49 (3-156)	54 (10-156)	н/о
VEGF	2584 (1004- 13229)	42212 (12480- 94024)	10266 (6316- 19764)	12480* (6409- 24349)	н/о

Примечание: данные представлены в виде медианных и 25-75%квартильных (в скобках) значений концентрации указанных цитокинов (пг/мл) в супернатантах первичных клеточных культур. * - $p_U < 0,05$ различия с первичными культурами Grade II. н/о - образцы не были включены в анализ.

В отличие от цитокинов трех описанных выше групп большая часть анализируемых хемокинов (Рисунок 3.7.2В, Таблица 3.7.4) регистрировалась в супернатантах первичных культур на среднем (RANTES, MIP1 β) и высоком (IL-8, IP-10, MCP1) уровнях, в том числе и в культурах, полученных из опухолей пациентов с глиомами низкой степени злокачественности. Среди наиболее значимых различий в продукции хемокинов можно отметить более чем в 6 раз высокую концентрацию Eotaxin ($p = 0,05$), а также тенденцию к более высокой продукции IL-8 ($p = 0,07$) культурами глиом высокой степени злокачественности по сравнению с глиомами низкой степени

злокачественности. Как известно, IP-10 – это IFN γ -индуцибельный хемокин [97]. Согласно полученным нами данным, между двумя этими медиаторами отмечалась прямая корреляционная связь ($R_s = 0,563$, $p = 0,006$), но только в группе глиобластом (и всех глиомах высокой степени злокачественности).

Таблица 3.7.4 – Продукция хемокинов клетками первичных культур глиомных опухолей

	Grade II (n=7)	Grade III (n=4)	Grade IV (n=26)	High- grade (III+IV) n=30	U-87
IL-8	6467 (6050-8978)	57342 (6320-119098)	11635 (6533-19501)	11536 (6533-20338)	25727
IP-10	1696 (789-2863)	3351 (2629-5861)	1863 (649-5236)	2626 (746-5236)	н/о
MCP1	8734 (5326-10210)	18385 (5284-42949)	6584 (4663-9868)	6714 (4663-11240)	1248
MIP-1α	36 (12-71)	282 (25-3216)	12 (8-23)	12 (9-60)	н/о
MIP-1β	958 (462-2511)	5576 (1321-14068)	923 (496-1923)	1009 (496-2640)	235
RANTES	156 (84-231)	103 (37-70)	42 (24-69)	44 (25-88)	н/о
Eotaxin	13 (4-39)	115 (4-123)	81* (29-197)	81* (29-165)	н/о

Примечание: данные представлены в виде медианных и 25-75%квартильных (в скобках) значений концентрации указанных цитокинов (пг/мл) в супернатантах первичных клеточных культур. * - $p_U < 0,05$ различия с первичными культурами Grade II. н/о - образцы не были включены в анализ.

Для клеток линии U-87 продукция хемокинов характеризовалась более низким уровнем в сравнении с первичными культурами. По-видимому, такие особенности продукции хемокинов связаны с тем фактом, что клетки первичных культур сохраняют специфические свойства и межклеточные взаимодействия, присущие исходной опухоли и направленные на привлечение

различных типов иммунокомпетентных клеток, тогда как для immortalized линии U-87 на первый план выходят факторы, необходимые для поддержки роста и пролиферации клеток.

Таким образом, проведенный анализ продукции растворимых факторов позволяет заключить, что степень злокачественности глиальной опухоли ассоциируется с увеличением спектра, а также уровня продуцируемых цитокинов опухолевыми клетками. При этом профиль цитокинов, характерный для клеток первичных культур глиом высокой степени злокачественности не совпадает с аналогичным профилем, наблюдаемым для глиобластомной линии U-87, что может иметь важное значение с точки зрения дальнейшего выбора моделей исследования в решении ряда задач, связанных с изучением глиобластом.

Несмотря на то, что клетки первичных культур, полученных из опухоли пациентов с глиобластомой в целом характеризовались схожими особенностями продукции растворимых факторов, важно было выяснить, с чем связаны обнаруженные нами различия во влиянии супернатантов на цитотоксичность ИФН-ДК доноров. Как видно из Рисунка 3.7.3, супернатанты первичных культур глиобластом с высоким индексом супрессии ($IS_{\text{выс}}$) цитотоксической активности ДК характеризовались более высокой концентрацией большинства анализируемых цитокинов в сравнении с культурами, супернатанты которых не подавляли цитотоксичность ДК (IS_0). При этом супернатанты первичной культуры, обладающие умеренным супрессорным влиянием на цитотоксичность ДК доноров, по профилю цитокинов были близки к группе супернатантов с IS_0 . Наиболее значимые корреляционные взаимосвязи между концентрацией цитокинов в супернатантах и супрессорным влиянием последних на цитотоксичность ДК регистрировались для противовоспалительных цитокинов IL-1ra и IL-10 (для обоих $R_s = 0,70$; $p = 0,1$), а также для IFN γ ($R_s = 0,667$; $p = 0,19$).

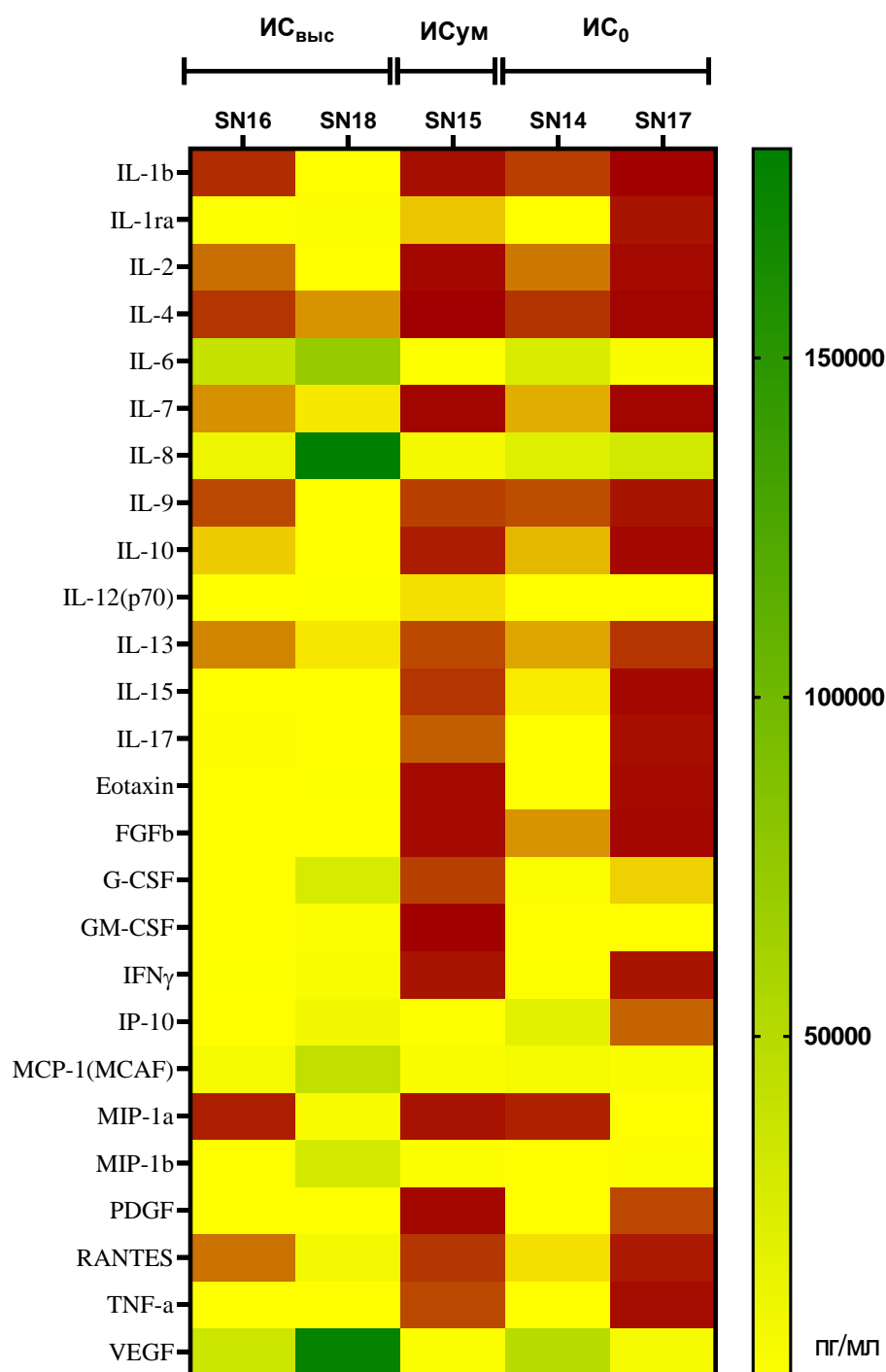


Рисунок 3.7.3 – Цитокиновый профиль первичных культур глиобластом в зависимости от супрессорного эффекта на цитотоксическую активность ИФН-ДК доноров

В виде тепловой карты представлены индивидуальные значения концентрации цитокинов (пг/мл) в супернатантах первичных культур глиобластом, обладающих выраженным (IC_{выс}), умеренным (IC_{сум}) или не оказывающих супрессорного эффекта (IC₀) на цитотоксическую активность ИФН-ДК здоровых доноров против клеток линии Нер-2.

Предположив, что дефект TNF α -опосредованной цитотоксической активности ДК и, соответственно, низкий уровень экспрессии mTNF α на ДК больных глиобластомой обусловлен паракринным влиянием самой опухоли, был также проведен корреляционный анализ между уровнем экспрессии mTNF α на ИФН-ДК больных глиомами головного мозга и продукцией растворимых факторов первичными культурами аутологичных опухолевых клеток (Таблица 3.7.5).

Таблица 3.7.5 – Корреляционная связь между экспрессией мембранной формы TNF α на ИФН-ДК больных глиомами головного мозга и продукцией растворимых факторов первичными культурами аутологичных опухолевых клеток

Группа	Медиатор	R _s	p
Про- /противовоспалительные цитокины	IL-1 β	-0,901	0,00003
	IL-1ra	-0,398	0,17
Иммунорегуляторные цитокины	IL-15	-0,398	0,18
	IL-17	-0,528	0,06
	IFN γ	-0,498	0,08
Ростовые факторы	G-CSF	-0,707	0,007
	PDGF	-0,606	0,038
Хемокины	IL-8	-0,597	0,03
	IP-10	-0,646	0,017
	MIP-1 β	-0,437	0,14

Примечание: представлены результаты корреляционного анализа методом ранговой корреляции Спирмена (R_s) между уровнем экспрессии mTNF α на ИФН-ДК больных глиомами головного мозга (n=13) и продукцией растворимых факторов первичными культурами аутологичных опухолевых клеток. p – статистическая значимость.

Поскольку первичные культуры отражают функциональные особенности исходной опухоли, такой подход позволил установить потенциальные факторы, секретируемые опухолевыми клетками, которые, по всей видимости, на системном уровне влияют на моноцитарные предшественники, результатом чего являются фенотипические и

функциональные нарушения ДК, в том числе и нарушение экспрессии TNF α . В анализ были включены как пациенты с низкой степенью злокачественности (Grade II), характеризующиеся сохранным уровнем цитотоксичности против TNF-R1-экспрессирующих клеток HEp-2 ($n = 2$), так и пациенты с высокой степенью злокачественности глиом (Grade III - IV; $n = 11$). Наиболее значимые корреляционные взаимосвязи приведены в Таблице 3.7.5. Обращает на себя внимание сильная корреляционная взаимосвязь между низкой экспрессией mTNF α на ДК больных глиомой головного мозга и высоким уровнем продукции аутологичными опухолевыми клетками IL-1 β и G-CSF, что может быть связано с участием этих цитокинов в воспалительных процессах и высвобождении различных провоспалительных медиаторов, в том числе и sTNF α . Кроме того, PDGF (фактор роста тромбоцитов), несмотря на низкий уровень продукции, демонстрирует значимую корреляционную связь с экспрессией mTNF α на ДК больных. Поскольку PDGF наряду с VEGF считается важным фактором, участвующим в индукции иммуносупрессии и прогрессировании глиобластом [131, 251], можно рассматривать его в качестве потенциального негативного регулятора цитотоксической активности ДК.

Стоит отметить, что для VEGF, экзогенная форма которого обладала ингибирующим влиянием на цитотоксичность ИФН-ДК доноров, не было зарегистрировано корреляционной взаимосвязи его концентрации в супернатантах первичных культур ни с уровнем цитотоксической активности ДК ($p = 0,56$), ни с уровнем экспрессии mTNF α на ДК больных глиомами головного мозга ($p = 0,60$). В данном случае уровень продукции VEGF опухолевыми клетками был ниже стандартной концентрации, обычно используемой для оценки влияния VEGF на фенотип и функции ДК (20 нг/мл) [179], что, по всей видимости, критично для проявления супрессорного эффекта на ДК.

Суммируя полученные в Главе 3.7 данные, можно заключить, что секретом клеток глиальных опухолей головного мозга высокой степени

злокачественности может выступать в роли негативного регулятора mTNF α -опосредованной цитотоксической активности ИФН-ДК. При этом свойства исходной популяции моноцитов периферической крови в условиях опухолевого роста могут обуславливать нарушения функциональной активности дифференцировавшихся из них ДК, о чем свидетельствует: 1) корреляционная взаимосвязь между низким уровнем экспрессии mTNF α на ИФН-ДК моноцитарного происхождения и высоким уровнем продукции ряда цитокинов аутологичными клетками первичных культур глиом головного мозга; 2) супрессорное влияние растворимых факторов отдельных первичных культур на цитотоксичность ДК при добавлении супернатантов опухолевых клеток в культуры ДК доноров на стадии дифференцировки из моноцитов.

3.8 Модуляция противоопухолевой цитотоксической активности ИФН-ДК больных глиобластомой

3.8.1 Влияние рекомбинантного интерлейкина 2 на цитотоксическую активность ИФН-ДК больных глиобластомой

Нарушение цитотоксического потенциала ДК больных глиобластомой против аутологичных опухолевых клеток диктует необходимость поиска возможных способов восстановления этой функции, что, по всей видимости, могло бы обеспечить более эффективный противоопухолевый цитотоксический ответ. Одним из модуляторов цитотоксической функции эффекторных клеток является интерлейкин-2 (IL-2). При этом известно, что IL-2 активирует не только классические клетки-эффекторы ($CD8^+$ Т-клетки, NK-клетки) [273], но также усиливает цитотоксический потенциал ИФН-ДК больных глиомами головного мозга высокой степени злокачественности (астроцитомы, глиобластома) против клеток линии HEP-2 [318]. Поскольку ведущим механизмом реализации цитотоксической активности ИФН-ДК против клеток HEP-2 является $TNF\alpha/TNF-R1$ -опосредованный сигнальный путь [318], можно предположить о роли IL-2 в качестве позитивного регулятора механизмов, определяющих экспрессию $mTNF\alpha$, а также о его потенциальной способности стимулировать ДК к лизису аутологичных опухолевых клеток.

Для проверки этой гипотезы было проведено исследование влияния рекомбинантного IL-2 на экспрессию $TNF\alpha$ в культурах ИФН-ДК больных глиобластомой (Рисунок 3.8.1). Согласно полученным данным, количество $mTNF\alpha^+$ ИФН-ДК в присутствии IL-2 возросло в 1,4 раза (с $(3,6 \pm 0,4)$ до $(5,0 \pm 0,4)$ %; $p = 0,0003$), приближаясь к донорским значениям ($(5,9 \pm 0,3)$ %). При индивидуальном анализе стимулирующий эффект IL-2 на экспрессию $mTNF\alpha$ наблюдался в культурах ИФН-ДК большинства больных (в 70 % случаев) и

проявлялся с одинаковой частотой у пациентов с впервые выявленной опухолью и рецидивом опухоли (в 69 и 75 % случаев, соответственно).

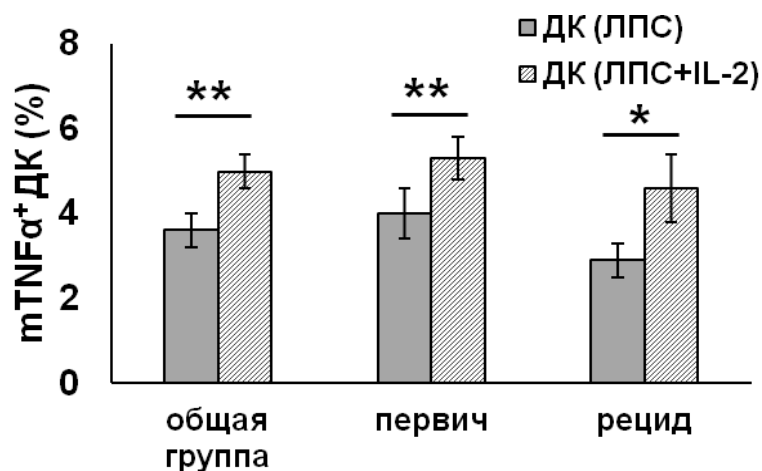


Рисунок 3.8.1 – Влияние IL-2 на экспрессию мембранной формы TNFα на ИФН-ДК больных глиобластомой

Представлены данные в виде средних значений ($m \pm SE$) экспрессии мембранной формы TNFα (mTNFα) в гейте HLA-DR⁺ клеток среди интактных ЛПС-стимулированных (ДК (ЛПС)) и IL-2-активированных (ДК (ЛПС+IL-2)) ИФН-ДК общей группы больных глиобластомой (n=27), а также в подгруппах с первичным ростом (первич, n=16) и рецидивом (рецид, n=11) опухоли. * - $p_w < 0,05$ и ** - $p_w \leq 0,01$ - достоверность различий.

Культивирование ИФН-ДК больных с IL-2 позволило таким образом сократить число пациентов со сниженной экспрессией mTNFα на ДК в целом по группе с 79 до 52 %, в том числе в подгруппе пациентов с впервые выявленной опухолью – с 69 до 50 %, в подгруппе пациентов с продолженным ростом опухоли - со 100 до 50 %.

Поскольку одними из основных механизмов нарушения экспрессии mTNFα, как было показано в Главе 3.5, являются низкий уровень экспрессии гена *TNFα*, а также высокая экспрессия и активность фермента TACE, для выяснения механизмов влияния IL-2 на экспрессию mTNFα была проведена сравнительная оценка перечисленных показателей в интактных и IL-2-стимулированных ИФН-ДК больных глиобластомой. Добавление IL-2 к ИФН-ДК в целом по группе значимо не меняло уровень экспрессии мРНК TNFα (Рисунок 3.8.2А). Культуры интактных и IL-2-модифицированных ИФН-ДК

всех исследуемых больных характеризовались одинаково низким уровнем экспрессии мРНК $\text{TNF}\alpha$.

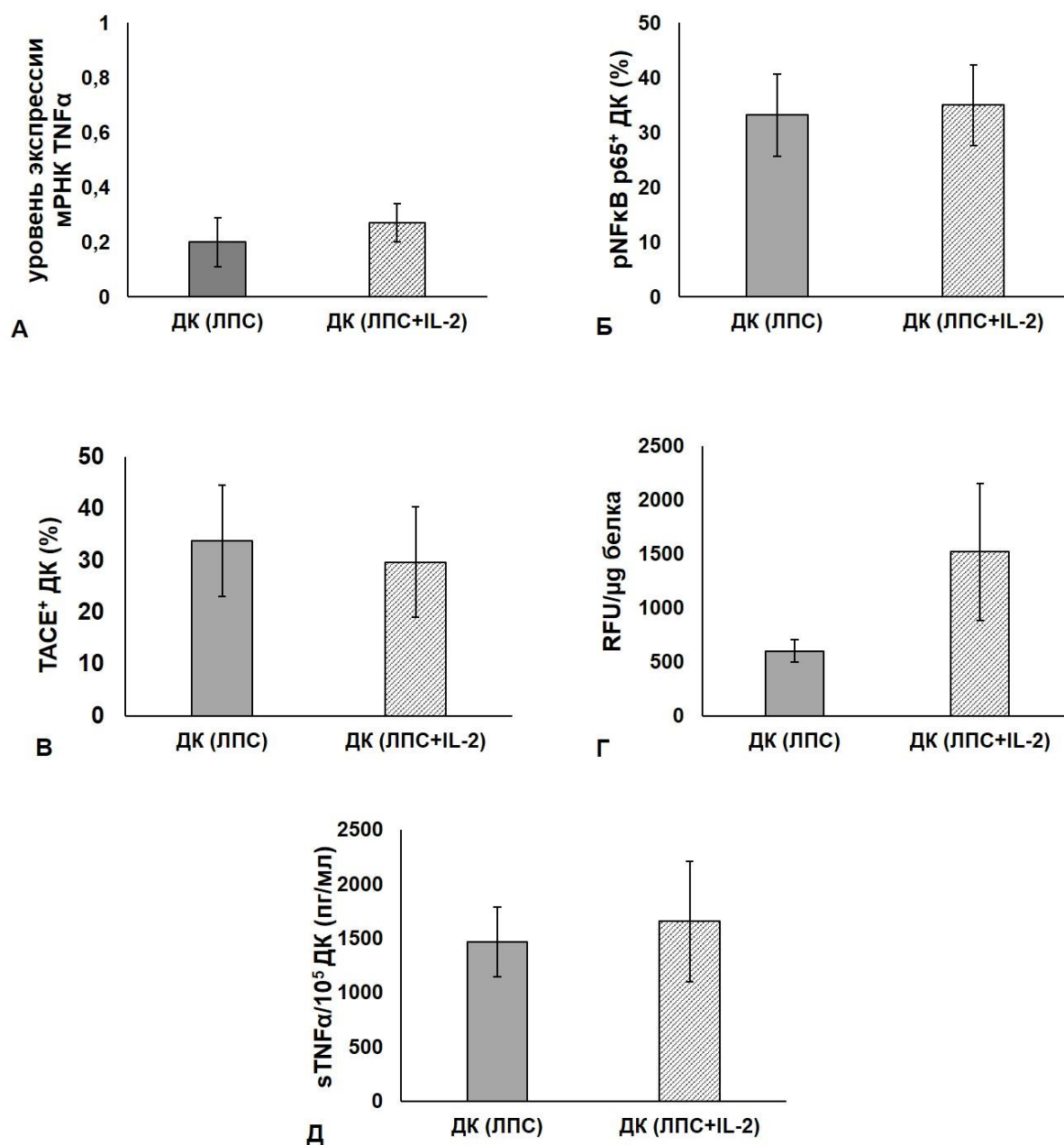


Рисунок 3.8.2 – Влияние IL-2 на регуляцию экспрессии $\text{TNF}\alpha$ в культурах ИФН-ДК больных глиобластомой

Представлены данные в виде средних значений ($m \pm SE$) относительного уровня экспрессии мРНК $\text{TNF}\alpha$, нормализованного по методу $2^{-\Delta\Delta C_t}$ с референсным геном *RPLP0* (А, $n=6$), относительного количества pNF-κB p65⁺ клеток в HLA-DR⁺-гейте среди ядродержащих 7AAD⁺ клеток (Б, $n=10$), поверхностной экспрессии фермента TACE в гейте HLA-DR⁺ клеток (В, $n=6$), активности фермента TACE (Г, $n=8$), а также продукции sTNFα/10⁵ДК в супернатантах цельных культур (Д, $n=10$) интактных ЛПС-стимулированных (ЛПС) и IL-2-модифицированных (ЛПС+IL-2) ИФН-ДК больных глиобластомой.

Кроме того, в присутствии IL-2 доля клеток, экспрессирующих активную форму транскрипционного фактора NF-κB, в культурах ИФН-ДК больных в среднем была сопоставима с аналогичным показателем в группе интактных ИФН-ДК этих же пациентов (Рисунок 3.8.2Б). Однако, стоит отметить, что в половине случаев (5/10) регистрировался стимулирующий эффект IL-2 на экспрессию pNF-κB p65 в ИФН-ДК больных. В этом случае относительное количество pNF-κB p65⁺ ДК возрастало в среднем почти на 30 % ((с $21,5 \pm 6,2$) до $(29,1 \pm 9,1)$ %). Этот эффект не был связан со статусом опухоли и наблюдался как у пациентов с первичным ростом ($n = 3$), так и рецидивом ($n = 2$) глиобластомы. Поскольку ген *TNFα* является одним из множества генов-мишеней для NF-κB, а IL-2 не влиял на экспрессию мРНК *TNFα*, обнаруженное увеличение экспрессии активной формы NF-κB в IL-2-стимулированных ДК части больных может свидетельствовать о вовлеченности данного транскрипционного фактора в активацию экспрессии других генов, связанных с процессами созревания ДК, продукции провоспалительных цитокинов или других сигнальных молекул [196]. Таким образом, стимулирующее влияние IL-2 на экспрессию mTNFα в культурах ИФН-ДК больных глиобластомами представляет собой NF-κB-независимый процесс, не связано с активацией транскрипции гена *TNFα* и, по-видимому, осуществляется на посттранскрипционном уровне.

Как видно из Рисунка 3.8.2В, экспрессия фермента TACE в целом по группе значимо не отличалась между интактными и IL-2-стимулированными ИФН-ДК больных ($p = 0,3$). В то же время индивидуальный анализ общей группы пациентов ($n = 6$) показал, что в пяти из шести случаев IL-2 приводил к умеренному снижению уровня экспрессии TACE на ИФН-ДК больных глиобластомой в среднем почти на 20 % ((с $42,8 \pm 14,1$) до $(36,0 \pm 14,6)$ %).

Активность TACE в ИФН-ДК, наоборот, в присутствии IL-2 в среднем возрастала более чем в 2 раза ($n = 8$). Однако, эти различия не были статистически значимыми ($p = 0,21$). Проведенный индивидуальный анализ показал, что IL-2 обладал разнонаправленным эффектом на активность TACE.

Независимо от исходного уровня активности фермента IL-2 в 5 случаях проявлял стимулирующий эффект, повышая активность фермента почти в 2 раза (Me с 680 до 1085 RFU/мкг белка), а в 3-х - ингибирующий эффект, снижая активность фермента в среднем на 40 % (Me с 558 до 399 RFU/мкг белка). Таким образом, в ответ на добавление IL-2 в ИФН-ДК больных глиобластомой экспрессия фермента TACE и его активность изменялись разнонаправленно.

В соответствии с полученными нами данным добавление IL-2 в культуры ИФН-ДК больных предположительно должно было ассоциироваться также с изменением экспрессии молекул, являющихся мишенями протеолитической активности TACE. В связи с этим наряду с оценкой уровня экспрессии мембранной формы TNF α было проведено исследование продукции растворимой формы TNF α в супернатантах IL-2-модифицированных ИФН-ДК больных глиобластомой. Как видно из рисунка 3.8.2Г, добавление экзогенного IL-2 в культуры ДК не оказывало в целом какого-либо значимого влияния на уровень продукции sTNF α , несмотря на увеличение экспрессии mTNF α на ДК.

Выявленный нами разнонаправленный эффект IL-2 на регуляцию экспрессии и активности TACE, по-видимому, связан с участием TACE в координации провоспалительной активности иммунных клеток [207]. Активность TACE находится под регулирующим влиянием sTNF α [114]. Не исключено, что для подавления избыточной продукции sTNF в ДК, обработанных IL-2, включается механизм обратной связи, и высокий уровень sTNF α служит сигналом для снижения экспрессии/активности TACE, что и было обнаружено у части больных глиобластомой.

Для того чтоб оценить вклад mTNF α в IL-2-индуцированное усиление противоопухолевой цитотоксической активности ИФН-ДК больных глиобластомой, была проведена серия экспериментов с использованием растворимого рецептора rTNF-R1, блокирующего TNF α /TNF-R1-сигнальный путь (Рисунок 3.8.3). В этом аспекте клетки опухолевой линии HEP-2 были

наиболее подходящими мишенями, поскольку лизис клеток Нер-2 при взаимодействии с ИФН-ДК доноров реализуется преимущественно через TNF α -зависимый механизм без вовлечения других рецепторно-опосредованных механизмов (в частности FasL/Fas- и TRAIL/TRAIL-R2-зависимых) [318]. Как видно из Рисунка 3.8.3, добавление rTNF-R1 в культуры интактных ЛПС-стимулированных ИФН-ДК не влияло на исходно низкий уровень цитотоксической активности ДК больных, что подтверждает отсутствие/дефект TNF α /TNF-R1-сигнального пути при взаимодействии ДК и Нер-2 клеток.

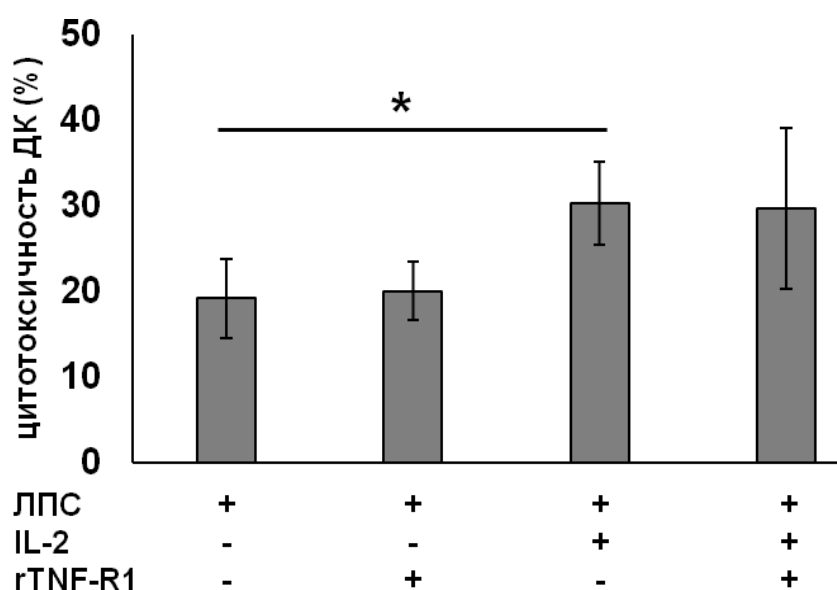


Рисунок 3.8.3 – Влияние rTNF-R1 на цитотоксическую активность IL-2-стимулированных ИФН-ДК больных глиобластомой

Представлены данные в виде средних значений ($m \pm SE$) цитотоксической активности (%) ЛПС-стимулированных и IL-2-модифицированных ИФН-ДК больных глиобластомой ($n=5$) против клеток линии Нер-2 в 24ч МТТ-тесте в соотношении эффекторы:мишени 1:1. ДК предварительно инкубировали в течение 1 часа растворимым рецептором rTNF-R1 (10 мкг/мл). * - $p_w < 0,05$ - достоверность различий между контрольной группой интактных ДК (ДК (ЛПС)) и ДК, генерируемых в присутствии IL-2.

Обработка rTNF-R1 IL-2-модифицированных ИФН-ДК больных, характеризующихся увеличением уровня экспрессии mTNF α , не отменяла стимулирующий эффект IL-2 на цитотоксичность ДК. Кроме того, в двух из пяти случаях регистрировался, наоборот, стимулирующий эффект rTNF-R1 на цитотоксическую активность IL-2-модифицированных ДК больных

глиобластомой. Учитывая известные данные о резистентности клеток НЕР-2 к FasL- и TRAIL-медируемому лизису [141, 222, 318], можно предположить, что экзогенный IL-2 активирует иные сигнальные пути реализации противоопухолевой цитотоксической активности, в том числе связанные с внутренними механизмами индукции апоптоза [320]. Кроме того, в условиях стимуляции IL-2 взаимодействие mTNF α с rTNF-R может сопровождаться изменением направления передачи сигнала в обратную сторону (реверсивный сигнал), то есть внутрь mTNF α -экспрессирующей клетки [97, 349], что, в свою очередь, ведет к дополнительной активации клеток, а не блокированию mTNF α -зависимых функций.

Фенотипический анализ ИФН-ДК больных глиобластомой показал, что наряду со стимуляцией экспрессии mTNF α добавление IL-2 в культуры ДК сопровождалось увеличением экспрессии молекул FasL ($p = 0,24$) и TRAIL ($p = 0,12$) (Рисунок 3.8.4).

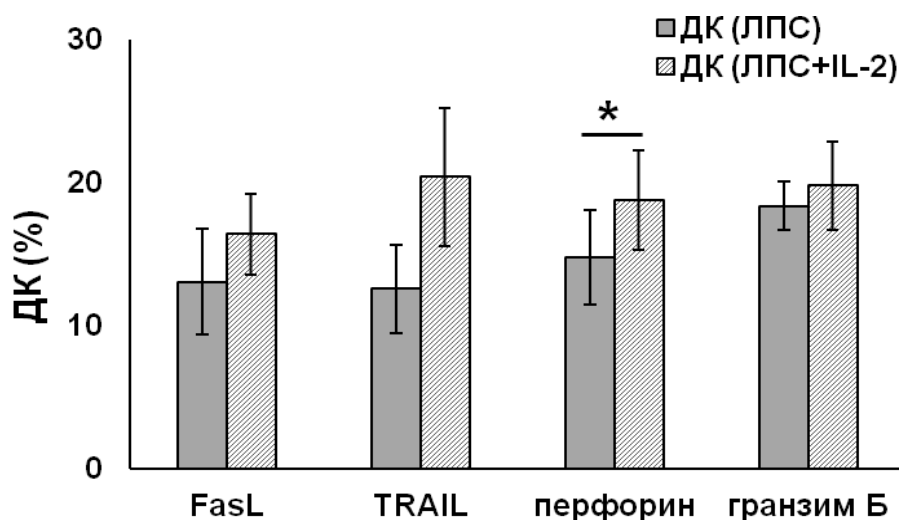


Рисунок 3.8.4 – Влияние IL-2 на экспрессию цитотоксических лигандов в культурах ИФН-ДК больных глиобластомой

Представлены данные в виде средних значений ($m \pm SE$) экспрессии мембранно-связанных форм FasL ($n=8$) и TRAIL ($n=6$), а также внутриклеточной экспрессии перфориона ($n=5$) и гранзима Б ($n=5$) в гейте HLA-DR⁺ клеток среди интактных ЛПС-стимулированных (ДК (ЛПС)) и IL-2-активированных (ДК (ЛПС+IL-2)) ИФН-ДК общей группы больных глиобластомой. * - $p_w \leq 0,05$ - достоверность различий.

Несмотря на отсутствие статистически значимых различий, стимулирующий эффект IL-2 на экспрессию FasL и TRAIL на ИФН-ДК больных наблюдался в большинстве случаев (6/8 и 4/6, соответственно). Кроме того, IL-2-модифицированные ИФН-ДК больных глиобластомой характеризовались присутствием достоверно большего относительного количества перфорин⁺ ДК по сравнению с контрольными культурами ИФН-ДК ($p = 0,043$). В то же время уровень экспрессии гранзима Б не менялся при добавлении IL-2 в культуры ИФН-ДК больных.

Учитывая тот факт, что в реализацию лизиса глиобластомных клеток дендритными клетками в той или иной степени вовлечены различные цитотоксические медиаторы, обнаруженный стимулирующий эффект IL-2 на экспрессию как мембранных молекул семейства TNF, так и молекул литических гранул может иметь важное значения с точки зрения усиления цитотоксического потенциала ДК больных глиобластомой против аутологичных опухолевых клеток.

Поскольку одна из основных задач этапа состояла в изучении возможных способов коррекции/усиления цитотоксической активности ИФН-ДК больных злокачественными глиомами против глиобластомных клеток, в завершающей части работы было проведено исследование роли IL-2 с точки зрения позитивного регулятора указанной функции. В этой серии экспериментов было протестированы ДК и аутологичные глиобластомные линии, полученные от пяти пациентов.

Как видно из Таблицы 3.8.1, цитотоксичность ДК всех пяти анализируемых больных с глиобластомой против аутологичных опухолевых клеток возрастала при активации IL-2 в среднем в $(1,5 \pm 0,1)$ раза ($p = 0,068$). Стимулирующий эффект IL-2 на цитотоксичность ДК больных варьировал от 33 до 62 %. В результате уровень цитотоксической активности IL-2-модифицированных ДК больных приближался к медианным значениям цитотоксической активности ИФН-ДК доноров против аналогичных опухолевых линий.

**Таблица 3.8.1 - Влияние IL-2 на цитотоксичность ИФН-ДК против
глиобластомных клеток**

линия	Аутологичные ДК		ДК _{доноры}
	ДК _{ЛПС}	ДК _{ЛПС+ IL-2}	
ГБ#6	22,7	34,8	45,4 (41-55)
ГБ#7	46,6	52,6	63,4 (39,5-76,2)
ГБ#9	37,5	45,3	46,8 (34,8-58,7)
ГБ#11	27,8	37,4	47,2 (40-50,7)
ГБ#12	24,8	40,1	45,5 (37,3 – 49,4)

Примечание: представлены индивидуальные значения цитотоксической активности (%) интактных ЛПС-стимулированных (ДК_{ЛПС}) и IL-2-модифицированных (ДК_{ЛПС+IL-2}) ИФН-ДК больных глиобластомой, а также медианные (Me) и диапазон 25-75% квартильных (LQ-UQ) значений цитотоксической активности (%) ИФН-ДК доноров против указанных глиобластомных линий (ГБ).

Таким образом, проведенное исследование эффекта IL-2 с точки зрения позитивного регулятора цитотоксической функции ИФН-ДК больных глиобластомой позволило установить, что IL-2 стимулирует экспрессию mTNF α , что может иметь важное значение для реализации TNF α -медируемого механизма противоопухолевой цитотоксической активности ДК. Тем не менее, согласно полученным нами данным, плеiotропность действия IL-2 как регулятора иммунного ответа не включает в себя воздействие на причины нарушенной экспрессии mTNF α на ДК больных глиобластомой, то есть не инициирует активацию экспрессии самого гена *TNF α* и не во всех случаях участвует в регуляции соотношения мембранной и растворимой форм TNF α в культурах ИФН-ДК анализируемых больных. По-видимому, регулирующее влияние IL-2 на экспрессию TNF α в ИФН-ДК больных осуществляется на других уровнях контроля синтеза данной молекулы. В то же время наблюдаемое в ответ на стимуляцию IL-2: 1) увеличение уровня экспрессии активной формы NF- κ B в ИФН-ДК 50 % больных; 2) значимое увеличение экспрессии внутриклеточного перфорина; 3) возрастание уровня экспрессии поверхностных молекул FasL, TRAIL и 4) изменение экспрессии и активности TACE в культурах ИФН-ДК большей части больных - указывает на существование других важных мишеней для IL-

2, что в конечном итоге может вносить вклад в усиление исходно сниженной цитотоксической активности ИФН-ДК больных глиобластомой против аутологичных опухолевых клеток.

3.8.2 Влияние двуцепочечной ДНК человека на цитотоксическую активность ИФН-ДК больных глиобластомой

Еще одним потенциальным модулятором киллерных свойств клеток человека является двуцепочечная ДНК (dsDNA), однако ее механизм действия до конца не известен [17]. В связи с этим нами был использован зарегистрированный фармакопейный препарат на основе dsDNA человека, представляющий собой смесь фрагментов ДНК, выделенных из плаценты здоровых рожениц, размером от 300 до 6000 п.н. [18]. Известно, что экзогенная dsDNA человека, проникая в цитозоль ИФН-ДК, практически сразу транспортируется в ядро ДК, активируя ДК и увеличивая их аллостимуляторную активность и цитотоксичность против опухолевых клеток Нер-2 [16, 318]. Учитывая стимулирующий эффект на ДК, dsDNA может рассматриваться как позитивный регулятор цитотоксической функции ИФН-ДК против глиобластомных клеток.

Как видно из Рисунка 3.8.5, dsDNA, как и IL-2, обладала стимулирующим влиянием на экспрессию mTNF α в культурах ИФН-ДК большинства больных глиобластомой, увеличивая долю mTNF α^+ ДК в 1,5 раза по сравнению с интактными ДК ((с $3,7 \pm 0,5$) до $(5,4 \pm 0,7)$ %; $p = 0,003$).

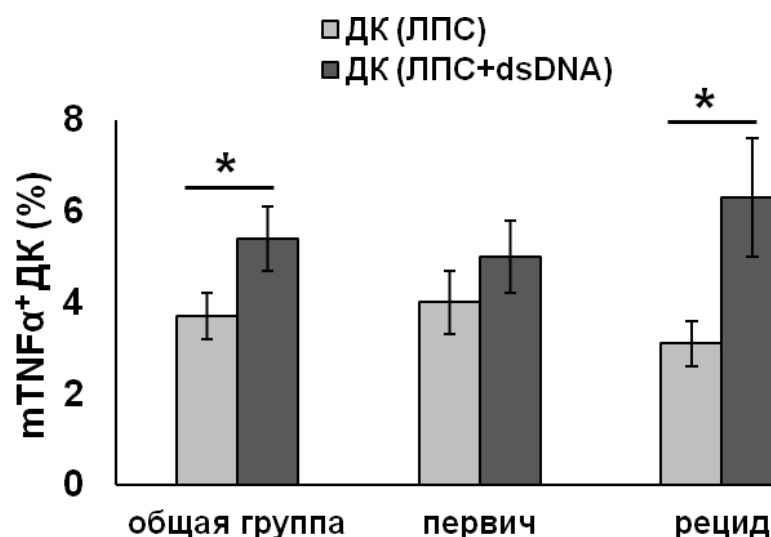


Рисунок 3.8.5 – Влияние dsDNA на экспрессию мембранной формы TNF α на ИФН-ДК больных глиобластомой

Представлены данные в виде средних значений ($m \pm SE$) экспрессии мембранной формы TNF α (mTNF α) в гейте HLA-DR⁺ клеток среди интактных ЛПС-стимулированных (ДК (ЛПС)) и dsDNA-активированных (ДК (ЛПС+dsDNA)) ИФН-ДК общей группы больных глиобластомой (n=27), а также в подгруппах с первичным ростом (первич, n=16) и рецидивом (рецид, n=11) опухоли. * - $p_w < 0,05$ - достоверность различий.

По аналогии с IL-2 стимулирующий эффект dsDNA на экспрессию mTNF α на ДК проявлялся у 67 % пациентов. Анализ экспрессии mTNF α с учетом типа опухоли показал, что в подгруппе больных с впервые выявленной опухолью dsDNA стимулировала экспрессию mTNF α на ИФН-ДК в 50 % случаев, тогда как ИФН-ДК всех больных с продолженным ростом опухоли (100 %) были чувствительны к стимулирующему действию dsDNA. Количество пациентов с низким уровнем экспрессии mTNF α на ДК в ответ на добавление dsDNA в целом по группе снижалось практически в 2 раза – с 78 до 44 %, у пациентов с впервые выявленной опухолью – с 67 до 50 %, у пациентов с рецидивом опухоли - со 100 до 33 %.

Далее нами было проведено исследование влияния dsDNA на регуляцию экспрессии TNF α (Рисунок 3.8.6). В отличие от IL-2, добавление dsDNA в культуры ИФН-ДК больных глиобластомой усиливало экспрессию мРНК TNF α в ДК ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($3,7 \pm 1,1$) vs ($0,2 \pm 0,9$) в dsDNA-модифицированных и интактных ДК, соответственно; $p = 0,05$; Рисунок 3.8.6А).

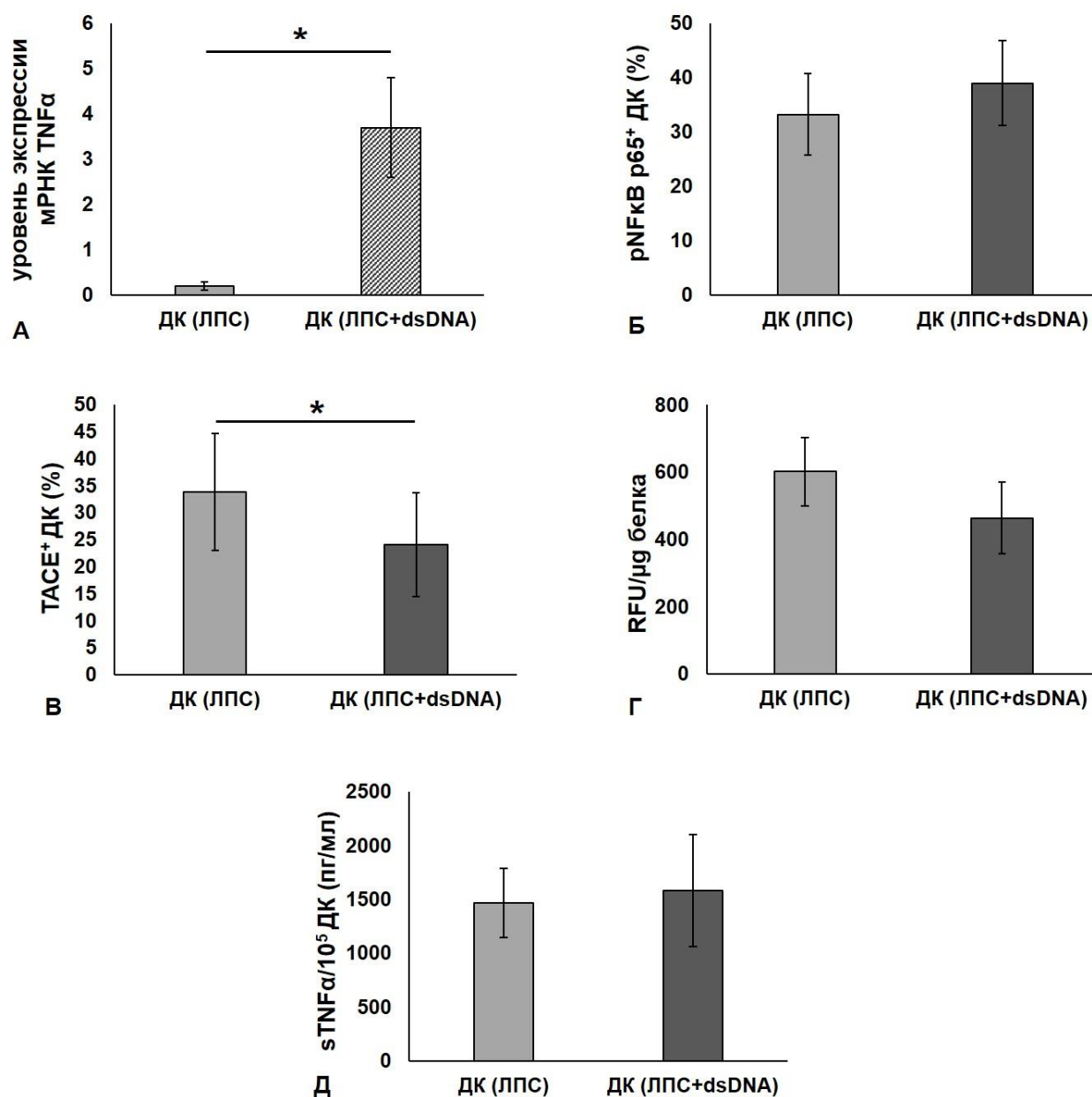


Рисунок 3.8.6 – Влияние dsDNA на регуляцию экспрессии TNFα в культурах ИФН-ДК больных глиобластомой

Представлены данные в виде средних значений ($m \pm SE$) относительного уровня экспрессии мРНК TNFα, нормализованного по методу $2^{-\Delta\Delta Ct}$ с референсным геном *RPLP0* (А, $n = 6$), относительного количества pNF-κB p65⁺ клеток в HLA-DR⁺-гейте клеток (Б, $n=10$), поверхностной экспрессии фермента TACE в гейте HLA-DR⁺ клеток (В, $n=6$), активности фермента TACE (Г, $n=8$), а также продукции sTNFα/10⁵ДК в супернатантах цельных культур (Д, $n=10$) интактных ЛПС-стимулированных (ЛПС) и dsDNA-модифицированных (ЛПС+dsDNA) ИФН-ДК больных глиобластомой. * - $p_w < 0,05$ - достоверность различий.

Кроме того, в dsDNA-модифицированных ДК больных регистрировался тренд к увеличению экспрессии активной формы транскрипционного фактора

NF- κ B ($p = 0,11$; Рисунок 3.8.6Б), тогда как для IL-2-модифицированных ДК статистически значимые различия в целом по группе отсутствовали по сравнению с интактными ИФН-ДК больных. Характерно, что стимулирующее влияние dsDNA на экспрессию pNF- κ B p65 в ИФН-ДК, как и в случае с IL-2, проявлялось и у пациентов с впервые выявленной глиобластомой (4/6), и при рецидиве глиобластомы (3/4). Таким образом, полученные данные позволяют заключить, что dsDNA участвует в регуляции экспрессии mTNF α на транскрипционном уровне, стимулируя экспрессию самого гена *TNF α* в ИФН-ДК, а также, учитывая данные об экспрессии активной формы NF- κ B, видимо, вовлекая в этот процесс транскрипционный фактор NF- κ B.

Исследование экспрессии TACE (Рисунок 3.8.6В) показало, что добавление dsDNA в культуры ИФН-ДК сопровождалось значимым снижением ($p = 0,043$) TACE⁺ ДК у всех анализируемых больных глиобластомой. Характерно, что уровень экспрессии TACE в культурах dsDNA-модифицированных ДК был близок к уровню незрелых (то есть до стимуляции ЛПС) ИФН-ДК больных ($24,0 \pm 9,6$) и ($28,8 \pm 10,9$) %, соответственно).

Обработка dsDNA ИФН-ДК больных позволила не только снизить экспрессию TACE, но также приводила к уменьшению протеолитической активности фермента более чем на 20 % (с 601 ± 101) до (464 ± 106) RFU/мкг белка; $p = 0,043$; Рисунок 3.8.6Г). В этом случае значения в группе dsDNA-модифицированных ДК больных глиомами были сопоставимы с аналогичными показателями в интактных ЛПС-стимулированных ИФН-ДК доноров.

Таким образом, dsDNA при добавлении вместе с ЛПС на стадии созревания оказывала корректирующее влияние на TACE, снижая исходно высокую экспрессию и активность фермента в культурах ИФН-ДК больных глиобластомой, что в свою очередь могло определять более высокую экспрессию mTNF α на ДК. В этом аспекте можно было предположить, что в dsDNA-модифицированных ДК изменяется соотношение экспрессии

мембранной и растворимой форм $\text{TNF}\alpha$ в сторону $\text{mTNF}\alpha$. Однако, согласно полученным нами данным добавление dsDNA в культуры ДК на фоне снижения активности TACE и повышения уровня экспрессии $\text{mTNF}\alpha$ не сопровождалось статистически значимым изменением продукции ДК $\text{sTNF}\alpha$ (Рисунок 3.8.6Д). По-видимому, такой эффект обусловлен стимулирующим влиянием dsDNA на экспрессию мРНК $\text{TNF}\alpha$ и, следовательно, увеличением экспрессии общего пула молекулы $\text{TNF}\alpha$, несмотря на снижение интенсивности процессов шеддинга $\text{mTNF}\alpha$.

Тем не менее, подтверждением того, что dsDNA действительно участвует в стимуляции $\text{TNF}\alpha$ -опосредованной цитотоксической активности ИФН-ДК больных глиобластомой, свидетельствуют полученные нами данные, приведенные в Рисунке 3.8.7.

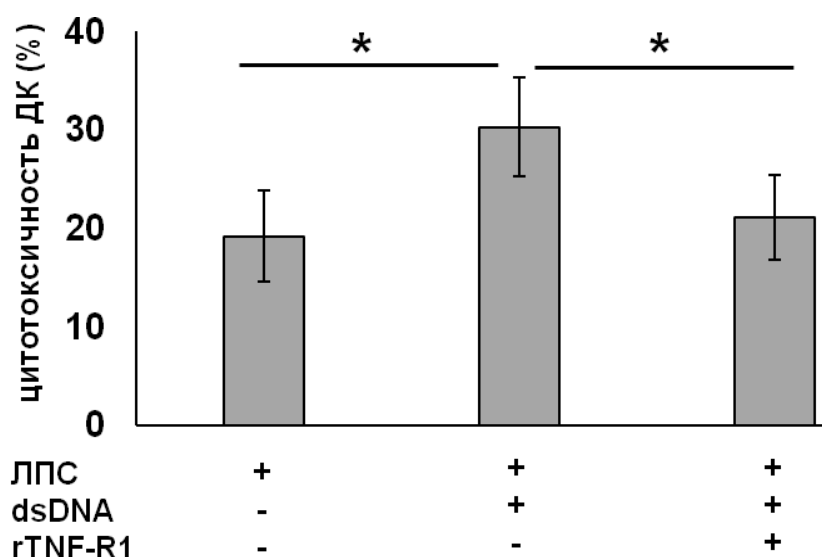


Рисунок 3.8.7 – Влияние rTNF-R1 на цитотоксическую активность dsDNA -стимулированных ИФН-ДК больных глиобластомой

Представлены данные в виде средних значений ($m \pm SE$) цитотоксической активности (%) ЛПС-стимулированных и dsDNA -модифицированных ИФН-ДК больных глиобластомой ($n=5$) против клеток линии HEp-2 в 24ч МТТ-тесте в соотношении эффекторы:мишени 1:1. ДК предварительно инкубировали в течение 1 часа растворимым рецептором rTNF-R1 (10 мкг/мл). * - $p_w < 0,05$ - достоверность различий между показателями.

Как видно, обработка dsDNA -модифицированных ДК растворимым рецептором rTNF-R1 нивелировала стимулирующий эффект dsDNA на цитотоксическую активность ИФН-ДК больных глиобластомой против клеток

Нер-2 в 100 % (5/5) случаев. В результате цитотоксичность ДК снижалась в среднем на 34 % ($p = 0,043$) и была сопоставима с исходно низкими показателями цитотоксичности. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что усиление цитотоксической активности ДК больных глиомами под действием dsDNA действительно связано с повышением экспрессии mTNF α .

По аналогии с IL-2 был проведен фенотипический анализ экспрессии других цитотоксических медиаторов в культурах dsDNA-модифицированных ИФН-ДК (Рисунок 3.8.8).

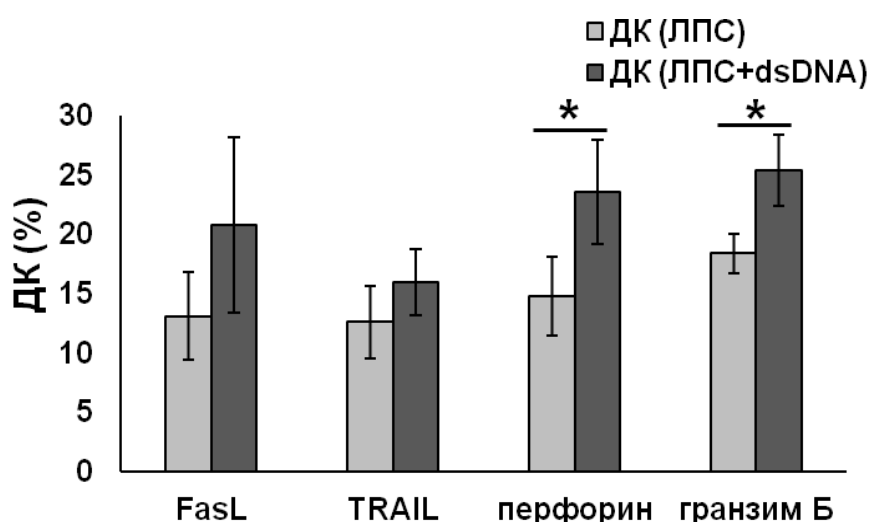


Рисунок 3.8.8 – Влияние dsDNA на экспрессию цитотоксических лигандов в культурах ИФН-ДК больных глиобластомой

Представлены данные в виде средних значений ($m \pm SE$) экспрессии мембранно-связанных форм FasL ($n=8$) и TRAIL ($n=6$), а также внутриклеточной экспрессии перфориона ($n=5$) и гранзима Б ($n=5$) в гейте HLA-DR⁺ клеток среди интактных ЛПС-стимулированных (ДК (ЛПС)) и dsDNA-активированных (ДК (ЛПС+ dsDNA)) ИФН-ДК больных глиобластомой. * - $p_w \leq 0,05$ - достоверность различий.

Согласно полученным нами данным, обработка dsDNA ИФН-ДК больных сопровождалась тенденцией к увеличению доли FasL⁺ ДК ($p = 0,06$) и TRAIL⁺ ДК ($p = 0,1$). Статистически значимые различия между интактными и dsDNA-модифицированными ДК больных регистрировались при сравнительном анализе внутриклеточной экспрессии перфориона ($p = 0,043$) и гранзима Б ($p = 0,043$).

Полученные данные указывают на то, что dsDNA, как и IL-2, является позитивным регулятором цитотоксической активности ДК, связанной как с рецепторно-опосредованным, так и грануло-зависимым механизмами лизиса клеток-мишеней, что может иметь важное значения с точки зрения лизиса аутологичных глиобластомных клеток.

Действительно, dsDNA стимулировал цитотоксическую активность ДК против аутологичных глиобластомных клеток (Таблица 3.8.2).

Таблица 3.8.2 - Влияние dsDNA на цитотоксичность ДК против глиобластомных клеток

линия	Аутологичные ДК		ДК _{доноры}
	ДК _{ЛПС}	ДК _{ЛПС+ dsDNA}	
ГБ#6	22,7	58,9	45,4 (41-55)
ГБ#8	27,6	34,5	36,9 (23,6-49,5)
ГБ#11	27,8	31,5	47,2 (40-50,7)
ГБ#12	24,8	25,6	45,5 (37,3 – 49,4)

Примечание: представлены индивидуальные значения цитотоксической активности (%) интактных ЛПС-стимулированных (ДК_{ЛПС}) и dsDNA-модифицированных (ДК_{ЛПС+dsDNA}) ИФН-ДК больных глиобластомой, а также медианные (Me) и диапазон 25-75% квартильных (LQ-UQ) значений цитотоксической активности (%) ИФН-ДК доноров против указанных глиобластомных линий (ГБ).

Цитотоксичность ДК анализируемых больных возрастала при активации ДК dsDNA в среднем в $(1,5 \pm 0,4)$ раза ($p = 0,068$). При этом прирост показателя цитотоксической активности ДК в ответ на стимуляцию dsDNA варьировал от 3 до 260 % в зависимости от пациентов. Обращает на себя внимание, что у части больных стимулирующий эффект dsDNA на цитотоксическую активность ИФН-ДК был меньше по сравнению с аналогичным показателем для IL-2 (Таблицы 3.8.1 и 3.8.2). Можно предположить, что в таких случаях стимулирующее влияние dsDNA на экспрессию других цитотоксических молекул помимо mTNF α не играло решающего значения в реализации цитотоксической активности ИФН-ДК больных против аутологичных глиобластомных клеток, поскольку интактные ДК больных характеризовались сохранной или даже более высокой

экспрессией изученных молекул в сравнении с аналогичными показателями в группе ИФН-ДК доноров.

Таким образом, исследование влияния dsDNA показало его стимулирующий эффект на TNF α -опосредованную цитотоксическую активность ИФН-ДК больных глиобластомой. При этом увеличение экспрессии mTNF α dsDNA-модифицированных ДК больных ассоциировалось как с активацией NF- κ B, так и с коррекцией причин исходно низкой экспрессии mTNF α на ИФН-ДК больных глиобластомой, то есть увеличением экспрессии мРНК TNF α , снижением экспрессии и активности фермента TACE. Кроме того, учитывая данные о dsDNA-индуцированной активации NF- κ B и увеличении внутриклеточных перфорина и гранзима Б, можно предположить, что dsDNA участвует в регуляции транскрипции и последующей экспрессии молекул цитолитических гранул.

В целом, данные, представленные в Главе 3.8, свидетельствуют о том, что нарушение mTNF α -опосредованной цитотоксичности ИФН-ДК против аутологических опухолевых клеток может корригироваться с помощью экзогенного IL-2 и внеклеточной dsDNA. Несмотря на то, что механизм действия IL-2 и dsDNA проявляется на разных уровнях регуляции экспрессии TNF α , оба модулятора стимулируют экспрессию мембранной формы TNF α , что позволяет рассматривать их как активаторов TNF α -медируемой цитотоксической активности. Кроме того, IL-2- и dsDNA-медируемое увеличение экспрессии других цитотоксических медиаторов грануло-зависимого и рецепторно-зависимых сигнальных путей киллерной активности ДК указывает на возможность генерации ИФН-ДК с высоким цитотоксическим потенциалом, что может стать новой стратегией противоопухолевой иммунотерапии.

Глава 4. Обсуждение

В настоящей работе впервые детально охарактеризована способность ДК, генерированных из моноцитов крови в присутствии IFN α , лизировать линии опухолевых клеток, полученные от пациентов с гистологически верифицированной глиобластомой. Глиальные опухоли высокой степени злокачественности, прежде всего глиобластомы, относятся к наиболее часто встречающимся и наиболее агрессивным формам опухолей головного мозга у взрослых [313]. Согласно данным литературы, клетки глиобластомы обладают низкой чувствительностью к НК-опосредованному лизису, поскольку несут на своей поверхности лиганды для ингибиторного рецептора НК-клеток и слабо экспрессируют лиганды к активационным НК-рецепторам [108, 337, 340]. В то же время сведения о чувствительности глиобластомных клеток к лизису, опосредованному ДК, отсутствуют. В этом аспекте полученные нами данные о цитотоксической активности ИФН-ДК против опухолевых клеток больных глиобластомой имеют несомненную значимость.

Несмотря на принадлежность к одной группе опухолей, глиобластомные линии, полученные из первичных культур, были гетерогенны по экспрессии ряда маркеров (CD133, CD73, CD271, HLA-DR), которые ассоциируются со степенью злокачественности и прогнозом выживаемости больных, а также в последнее время рассматриваются в качестве перспективных мишеней для направленного терапевтического воздействия на глиобластомы [11, 101]. Стоит отметить, что в большинстве случаев ИФН-ДК доноров демонстрировали достаточно высокий уровень цитотоксичности (> 40 %) против глиобластомных клеток.

Согласно полученным нами данным мишенями цитотоксической активности ИФН-ДК могут быть и клетки нейросфер. Способность к формированию нейросфер *in vitro* свойственна для опухолевых стволовых клеток, которые обнаруживают в большинстве типов опухолей, в том числе и в образцах глиобластомы человека [15]. Показано, что стволовые

глиобластомные клетки обладают выраженным пролиферативным потенциалом, способностью к самоподдержанию и дифференцировке, участвуют в стимуляции канцерогенеза и ангиогенеза [11, 67, 170]. Кроме того, эти клетки характеризуются резистентностью к химио- и радиотерапии [36, 98]. В этом аспекте полученные нами результаты могут иметь важное значение с точки зрения потенциальной роли ДК в качестве клеточных эффекторов, способных индуцировать гибель глиобластомных клеток различной степени дифференцировки.

Важно отметить, что для реализации цитотоксического эффекта ДК необходим клеточный контакт, поскольку супернатанты ИФН-ДК обладали умеренной цитотоксичностью против клеток глиобластомных линий, а также клеток нейросфер.

Полученные нами данные о различной чувствительности глиобластомных линий могут быть связаны с особенностями экспрессии проапоптогенных рецепторов (TNF-R1, Fas, TRAIL-R), участвующих в индукции гибели опухолевых клеток. В литературе имеются данные об экспрессии этих рецепторов на клетках перевиваемых глиобластомных линий человека (SF-126, SF-188, U-138MG, LN235 и др.) и на свежевыделенных клетках глиобластомы [155, 266, 329]. В то же время полученные нами результаты впервые характеризуют экспрессию рецепторов TNF-R, Fas, TRAIL-R2 на клетках глиобластомных линий, полученных из первичных культур опухоли пациентов. Однако, наши данные расходятся с результатами исследований, в которых была продемонстрирована прямая зависимость между чувствительностью глиобластомных клеток к рецептерно-опосредованным механизмам апоптоза и экспрессией соответствующих рецепторов [119, 329]. При изучении сигнальных путей, вовлеченных в реализацию цитотоксической активности ИФН-ДК доноров против глиобластомных клеток, не было выявлено корреляционных связей между экспрессией рецепторов к TNF α , FasL или TRAIL на опухолевых клетках и блокирующим эффектом растворимых рецепторов к этим лигандам. В то же

время эти факты согласуются с тем, что рецепторы TNF-R, Fas и TRAIL-R могут быть вовлечены не только в индукцию апоптоза, а опосредовать другие эффекты соответствующих лигандов. Так, например, показано, что рекомбинантный FasL может выступать как ростовой фактор для глибластомных клеток, увеличивая количество опухолевых клеток в S/G2 фазе клеточного цикла [295]. Кроме того, нужно отметить, что в нашем исследовании медиаторы цитотоксической активности ДК были не в растворимой форме, а экспрессировались на мембране клеток ИФН-ДК.

Согласно полученным нами данным, два основных механизма, которые обеспечивают реализацию цитотоксической активности ИФН-ДК против большинства глибластомных линий, полученных из фрагментов опухоли пациентов, связаны с грануло-опосредованным и TNF α /TNF-R1-зависимым сигнальными путями, и блокирование этих механизмов (с помощью СМА или rTNF-R1, соответственно) значительно ослабляет цитотоксическую активность ИФН-ДК доноров.

Грануло-опосредованная цитотоксичность может иметь большое значение в противоопухолевом иммунитете при глиальных опухолях головного мозга, поскольку глиомные линии могут быть резистентны к рецепторно-опосредованному апоптозу [39, 60]. В литературе имеются отдельные сообщения о чувствительности клеток глиобластомы к перфорин/гранзим Б-опосредованному лизису [82, 232]. Исследования *in situ* показали, что в области иммунологического синапса между глибластомными клетками человека и опухоль-инфильтрирующими CD8⁺ Т-лимфоцитами обнаруживается гранзим Б [5]. При этом в самих опухолевых клетках этой зоны наблюдаются нарушения полимеризации микротубулярной системы цитоскелета и высокий уровень экспрессии активной формы каспазы-3, что может свидетельствовать о чувствительности глибластомных клеток к гранзим Б-опосредованному цитолизу. Исследования Renner D. и соавт. показали, что в экспериментальных моделях перфорин опосредует не только прямое цитотоксическое действие CD8⁺ Т-клеток, но также способствует

нарушению сосудистой проницаемости в зоне опухоли [261]. При этом грануло-опосредованный механизм вносит значительный вклад в эффективный киллинг опухолевых клеток. Об этом свидетельствует отсутствие блокирующего эффекта СМА при исходно низком уровне цитотоксичности ИФН-ДК доноров против клеток глиобластомы и выраженный ингибирующий эффект СМА при высокой цитотоксической активности ИФН-ДК.

Важным результатом исследования является тот факт, что среди изученных нами рецепторно-опосредованных путей в подавляющем большинстве случаев в реализацию лизиса глиобластомных клеток дендритными клетками вовлечен $\text{TNF}\alpha/\text{TNF-R1}$ -зависимый механизм, который обеспечивает существенный вклад в цитотоксический потенциал ИФН-ДК. FasL/Fas - и $\text{TRAIL}/\text{TRAIL-R2}$ -сигнальные пути могут быть дополнительными механизмами цитотоксической активности ИФН-ДК против глиобластомных клеток.

Поскольку ИФН-ДК больных глиобластомой характеризуются дефектностью цитотоксической активности ИФН-ДК больных против клеток Нер-2, опосредованной через $\text{TNF}\alpha/\text{TNF-R1}$ -сигнальный путь [183], представлялось важным оценить, будет ли данный дефект сказываться на цитотоксичности ДК против аутологичных глиобластомных клеток. Результаты настоящего исследования показали, что ИФН-ДК больных характеризовались сниженной цитотоксической активностью против аутологичных опухолевых клеток, причем степень снижения в большинстве случаев соответствовала выраженности блокирующего эффекта rTNF-R1 , то есть той доле цитотоксического потенциала, который реализуется с вовлечением $\text{TNF}\alpha/\text{TNF-R1}$ -зависимого механизма. Эти факты свидетельствуют о важности $\text{TNF}\alpha$ -зависимого механизма цитотоксичности ДК. Характерно, что в тех случаях, когда опухолевые клетки были резистентны к $\text{TNF}\alpha/\text{TNF-R1}$ -опосредованному лизису (две глиобластомные линии), цитотоксическая активность ДК больных была сопоставима с

цитотоксической активностью ДК доноров в одних и тех же глиобластомных культурах. С другой стороны, в ряде случаев низкая цитотоксическая активность ДК больных против клеток глиобластомных линий могла быть связана не только с нарушением $\text{TNF}\alpha/\text{TNF-R1}$ -зависимого механизма, поскольку уровень дефекта цитотоксичности ДК больных превышал удельный вклад данного сигнального пути в реализацию цитотоксической активности ДК доноров против соответствующих опухолевых линий.

В этом аспекте важно отметить, что стандартная иммортилизованная линия U-87, несмотря на принадлежность к глиобластомным линиям, отличается от большинства неиммортизированных глиобластомных линий по фенотипу, чувствительности к цитотоксическому действию ИФН-ДК и механизмам лизиса, в частности, является резистентной к $\text{TNF}\alpha/\text{TNF-R1}$ -медируемой цитотоксичности ДК. Эти результаты позволяют заключить, что линия U-87 не может служить оптимальной моделью для изучения механизмов цитотоксической активности ДК, а также для поиска новых подходов в иммунотерапии злокачественных глиом головного мозга (в том числе и технологий с использованием ДК).

Анализ экспрессии цитотоксических молекул показал, что ИФН-ДК больных глиобластомой были сопоставимы с ИФН-ДК доноров по уровню экспрессии цитотоксических лигандов FasL, TRAIL и молекул цитолитических гранул перфорина, гранзима Б и CD107a, однако отличались низкой экспрессией mTNF α и высокой продукцией sTNF α . При этом именно нарушение экспрессии mTNF α , а не sTNF α является ключевым фактором дефекта цитотоксической функции ДК больных глиобластомой против опухолевых клеток, чувствительных к $\text{TNF}\alpha/\text{TNF-R1}$ -зависимому механизму лизиса. Схожие результаты о различиях в цитотоксической активности двух форм TNF α обнаружены Shi W. и соавт., которые показали, что mTNF α обладает цитотоксичностью против опухолевых клеток, резистентных к sTNF α -медируемому апоптозу [293]. Данный эффект объясняется способностью mTNF α вызывать конформационные изменения рецептора,

которые ведут к более эффективной активации проапоптогенных сигнальных путей [142].

По данным литературы клетки глиобластомы устойчивы к цитотоксическому действию $sTNF\alpha$ [267], что согласуется с нашими данными. Резистентность глиобластомных клеток к $sTNF\alpha$ может быть связана с высокой TNF-R1-зависимой активностью транскрипционного фактора NF- κ B, обеспечивающего выживаемость и пролиферацию опухолевых клеток [16, 267].

С другой стороны, нужно отметить, что, несмотря на нарушение экспрессии $TNF\alpha$, сохранность экспрессии других лигандов и, прежде всего, перфорины и гранзима Б, обеспечивает возможность для ИФН-ДК больных глиобластомой лизировать аутологичные опухолевые клетки, но на более низком уровне по сравнению с ИФН-ДК доноров в случае, если глиобластомные клетки чувствительны к $TNF\alpha$ /TNF-R1-медируемой цитотоксичности ДК.

Согласно полученным нами данным низкая экспрессия $mTNF\alpha$ на ИФН-ДК больных глиобластомой ассоциировалась с низким уровнем экспрессии мРНК $TNF\alpha$. Подобные нарушения зарегистрированы у больных с миелоидным лейкозом. Согласно данным Hira S. и соавт. ДК этих больных характеризуются слабой цитотоксической активностью против $TNF\alpha$ -чувствительных опухолевых мишеней, что связано с низкой экспрессией гена $TNF\alpha$ в ДК [132]. Полученные нами результаты являются еще одним подтверждением нарушения $TNF\alpha$ -опосредованной киллерной активности ДК у пациентов со злокачественными опухолями.

Транскрипционный фактор NF- κ B участвует в синтезе $TNF\alpha$ [355]. Известно, что ЛПС индуцирует диссоциацию комплекса NF- κ B и ингибиторного белка I κ Ba [224], что приводит к активации NF- κ B и его дислокации в ядро с последующей активацией экспрессии генов, связанных с синтезом $TNF\alpha$ [69]. В нашем исследовании для определения активной формы NF- κ B мы использовали метод проточной цитометрии, позволяющий

информативно оценить события, происходящие в клетке в ответ на активацию *in vitro* [168]. Проведенные в ходе настоящего проекта исследования показали, что в культурах ИФН-ДК как здоровых доноров, так и больных глиобластомой в ответ на стимуляцию ЛПС происходит увеличение активной формы NF-κB. Таким образом, обнаруженное нарушение экспрессии TNFα является NF-κB-независимым.

На фоне низкой экспрессии мРНК TNFα и mTNFα ИФН-ДК больных глиобластомой характеризовались высокой продукцией sTNFα. С одной стороны, это может быть результатом активации механизмов гомеостаза, направленных на поддержание провоспалительной активности ДК. С другой стороны, сохранная продукция sTNFα при низкой экспрессии гена TNFα в ДК больных может быть связана с измененной активностью фермента TACE, который обеспечивает превращение mTNFα в sTNFα. Действительно, настоящее исследование впервые продемонстрировало высокую экспрессию и активность TACE в ИФН-ДК больных глиобластомой. Характерно, что аналогичные изменения этого фермента обнаружены также в самих опухолевых клетках при злокачественных глиомах и ассоциируются с опухолевой прогрессией и плохим прогнозом [341]. В этом случае TACE участвует в образовании лигандов (TNFα, TGF-α, IL-6, L-селектина), активирующих рецептор эпидермального ростового фактора и поддерживающих опухолевый рост и метастазирование [47, 152, 276, 354]. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что изменения активности TACE при злокачественных глиомах происходит не только в опухолевых клетках, но и в клетках иммунной системы. В качестве одной из гипотез такого системного нарушения активности фермента можно предположить о влиянии самих опухолевых клеток и секретируемых ими растворимых медиаторов на функциональную активность ДК и их моноцитарных предшественников. В этом случае высокая активность TACE в ДК может также способствовать опухолевому росту, ингибируя цитотоксическую активность ДК через снижение экспрессии mTNFα.

Проведенное нами исследование показало, что блокирование TACE с помощью ингибитора TAPI-0 приводило к увеличению экспрессии mTNF α на ИФН-ДК больных и снижению продукции sTNF α . Важно отметить, что эти изменения сопровождались практически 3-кратным увеличением цитотоксической активности ИФН-ДК против клеток HEp-2, что еще раз подтверждает преобладающую роль mTNF α в реализации лизиса опухолевых клеток дендритными клетками.

Предположение о том, что опухолевые клетки действительно могут быть причастны к нарушению цитотоксической активности ИФН-ДК больных глиобластомой, подтверждают полученные нами данные об ингибирующем влиянии супернатантов первичных культур глиобластомы на цитотоксическую активность ИФН-ДК доноров против клеток HEp-2. Однако этот эффект проявлялся не во всех случаях и был связан с более высокой концентрацией в супернатантах опухолевых культур противовоспалительных цитокинов IL-1ra и IL-10, а также IFN γ . Кроме того, супрессорным эффектом обладал экзогенный VEGF. Несмотря на высокую продукцию VEGF клетками глиобластомы, по-видимому, концентрация этого фактора в супернатантах глиобластомных культур недостаточна, чтобы подавлять цитотоксичность ДК, поскольку нами не было выявлено корреляционной взаимосвязи между этими показателями.

Изучение профиля цитокинов и хемокинов с различной иммуномодулирующей активностью, продуцируемых клетками первичных культур глиальных опухолей головного мозга низкой (Grade II) и высокой (Grade III, Grade IV) степени злокачественности, показало, что более высокая степень злокачественности опухоли ассоциируется с более широким спектром и более высоким уровнем продукции цитокинов опухолевыми клетками. В литературе есть данные о том, что продукция различных иммуносупрессорных факторов (IL-6, IL-10, TGF- β , ПГЕ2, IL-1, bFGF и др.) клетками глиом сопряжена со степенью злокачественности и плохим прогнозом [105, 137, 242, 264]. В этом аспекте проведенное нами

исследование 27 цитокинов наиболее полно позволяет оценить цитокин-продуцирующую способность глиомных опухолей головного мозга. Кроме того, нами обнаружены статистически значимые корреляционные взаимосвязи между продукцией клетками первичных опухолевых культур IL-1 β , G-CSF, PDGF, IL-8 и IP-10 и уровнем экспрессии mTNF α на аутологичных ИФН-ДК, что свидетельствует о причастности опухолевых клеток к регуляции экспрессии TNF α на ДК у больных злокачественными глиомами. По-видимому, в условиях опухолевого роста моноцитарные предшественники находятся под негативным влиянием секретируемых опухолью растворимых факторов, что в дальнейшем отражается на свойствах дифференцировавшихся из них ДК.

Важными результатами исследования являются также данные о влиянии IL-2 и dsDNA на ИФН-ДК больных глиобластомой. Полученные результаты демонстрируют, что усиление цитотоксической активности ИФН-ДК больных под действием IL-2 и dsDNA ассоциировано с увеличением относительного количества mTNF α ⁺ ДК без значимого прироста продукции sTNF α . При этом взаимодействие с rTNF-R1 в 100 % отменяло стимулирующее влияние dsDNA на цитотоксичность ДК, что служит прямым доказательством вовлечения изучаемого сигнального пути в реализацию цитотоксической функции dsDNA-модифицированных ДК больных глиобластомой. Для IL-2 в аналогичной серии экспериментов было получены неожиданные результаты. Цитотоксическая активность IL-2-модифицированных ДК больных злокачественными глиомами усиливалась в ответ на обработку rTNF-R1. Известно, что mTNF α может быть не только лигандом для рецепторов TNF-R, но также в ряде случаев, наоборот, выступает в роли рецептора, который связываясь с TNF-R передает сигнал в обратном направлении, т.е. внутрь mTNF α -экспрессирующей клетки [96]. Полученные нами данные указывают на то, что взаимодействие mTNF α с rTNF-R1 приводит к активации IL-2-модифицированных ДК с последующим запуском других сигнальных путей индукции гибели опухолевых клеток. Эти предположения подтверждаются

результатами исследования цитотоксической активности НК-клеток Yu M. и соавт. [349]. Престимуляция НК-клеток с растворимой формой рецептора TNF-R1 в комбинации с IL-2 индуцирует экспрессию цитотоксических молекул TRAIL, FasL, а также перфорины и гранзима Б, что ведет, в свою очередь, к усилению цитотоксической активности НК-клеток против опухолевых клеток K562. Поскольку линия Нер-2 резистентна к цитотоксическим лигандам TRAIL и FasL [141, 222], увеличение лизиса клеток Нер-2 при обработке ДК молекулой rTNF-R1 может означать активацию других механизмов цитотоксической активности IL-2-модифицированных ДК.

Механизмы регуляции экспрессии mTNF α на ИФН-ДК в ответ на стимуляцию IL-2 и dsDNA были различны. Так, IL-2 в большинстве случаев не влиял на экспрессию мРНК TNF α в ДК. Полученные нами данные частично согласуются с результатами Sanarico N. и соавт. [270], которые также не обнаружили изменений экспрессии гена *TNF α* в IL-2-стимулированных ДК на фоне значимого увеличения продукции sTNF α . Известно, что синтез TNF α контролируется различными протеинкиназами (протеинкиназой С, р38 MAP-киназой), обеспечивающими стабильность мРНК TNF α [61, 74]. При этом IL-2 является позитивным регулятором этих киназ в активированных клетках иммунной системы [79, 99, 116]. В связи с этим можно предположить, что влияние IL-2 на экспрессию TNF α в ИФН-ДК больных первичными глиомами осуществляется на посттранскрипционном уровне и IL-2-индуцированное увеличение экспрессии mTNF α на ИФН-ДК больных глиомами связано с вовлечением ряда протеинкиназ.

Согласно полученным нами данным, добавление IL-2 в культуры ИФН-ДК больных злокачественными глиомами приводило к увеличению активности TACE в ДК части больных, что согласуется с участием TACE в координации провоспалительной активности иммунных клеток [207]. Тем не менее, почти в трети случаях добавление IL-2 в культуры ИФН-ДК больных злокачественными глиомами сопровождалось снижением активности TACE.

Фактором, регулирующим активность TACE, может быть непосредственно sTNF α [114]. Не исключено, что для подавления избыточной продукции sTNF в ДК, обработанных IL-2, включается механизм обратной связи, и высокий уровень sTNF служит сигналом для снижения активности TACE.

В отличие от IL-2, стимуляция dsDNA приводила к увеличению уровня экспрессии мРНК TNF α в ДК больных. Рецепторы и сигнальные пути, опосредующие взаимодействие клеток с dsDNA, остаются во многом не изученными. Показано, что экзогенная dsDNA, проникая в цитозоль ИФН-ДК, практически сразу транспортируется в ядро ДК [16]. По-видимому, интернализация dsDNA в ядерное пространство ИФН-ДК обеспечивает прямую активацию экспрессии различных генов, в том числе и гена *TNF α* .

При оценке влияния dsDNA на исходно высокую активность фермента TACE в ИФН-ДК больных злокачественными глиомами нами впервые был обнаружен ингибирующий эффект dsDNA. Поскольку основная часть экзогенной dsDNA проникает в ядро ДК, тогда как в цитоплазме обнаруживается лишь небольшое ее количество [16], можно предположить, что dsDNA снижает активность TACE не прямо, а опосредованно с вовлечением других регулирующих молекул.

Под действием IL-2 и dsDNA отмечается значимое увеличение экспрессии перфорины и гранзима Б (для dsDNA), а также FasL и TRAIL на уровне тенденции, что позволяет рассматривать IL-2 и dsDNA в качестве активаторов TNF α -независимой цитотоксической активности.

В целом, можно заключить, что способность ДК к лизису опухолевых клеток представляет собой важный феномен. В этом аспекте высвобождающиеся опухолевые антигены могут сразу же презентироваться Т-лимфоцитам и индуцировать противоопухолевый иммунный ответ в самом раннем периоде. Получение ДК, которые не только запускают иммунный ответ, но и сами проявляют высокий цитотоксический потенциал в отношении опухолевых клеток, может способствовать изменению подходов к режиму и

способам введения ДК-вакцин и получению более выраженных клинических эффектов при проведении иммунотерапии.

Заключение

Проведенные в данной работе исследования позволяют заключить, что IFN α -индуцированные ДК моноцитарного происхождения способны выступать в роли клеток-эффекторов и лизировать клетки глиобластомных линий. Клеточные линии, полученные из первичных культур опухоли пациентов с глиобластомой, обладая морфологическими и фенотипическими свойствами, присущими глиомам головного мозга высокой степени злокачественности (высокий уровень Ki-67⁺ клеток, экспрессия молекул HLA-DR, CD73, CD271, CD133), характеризуются разной степенью чувствительности к цитотоксическому действию ИФН-ДК, что в целом отражает индивидуальную гетерогенность глиобластомы. При этом установлено, что в большинстве случаев уровень цитотоксической активности ИФН-ДК против изучаемых глиобластомных линий превышает 40 %, что свидетельствует о возможности реализации цитотоксического потенциала ДК при проведении противоопухолевой иммунотерапии.

Еще одним важным результатом работы является тот факт, что мишенями цитотоксического действия ИФН-ДК могут быть клетки нейросфер, формирование которых в глиобластомных культурах в бессывороточных условиях в присутствии ростовых факторов (EGF, FGFb) рассматривается как признак присутствия опухолевых стволовых клеток.

Продemonстрировано, что реализация цитотоксической активности ИФН-ДК против глиобластомных линий, а также клеток нейросфер связана с индукцией апоптоза в опухолевых клетках, о чем свидетельствует увеличение количества Annexin V⁺ клеток в фазе раннего и позднего апоптоза при со-культивировании опухолевых клеток и ДК. Вклад растворимых факторов, секретируемых ИФН-ДК, в цитотоксическую функцию ДК минимален, тогда как основной киллерный эффект в отношении глиобластомных клеток больных осуществляется при непосредственном контакте ДК с опухолевыми клетками, что может иметь важное значение с точки зрения разработки

подходов к режиму и способам введения ДК-вакцин и получению более выраженных клинических эффектов при проведении иммунотерапии.

Экспрессия проапоптогенных рецепторов TNF-R1, Fas, TRAIL-R2 на клетках глиобластомных линий, полученных из первичных культур, демонстрирует, что цитотоксический эффект ИФН-ДК может опосредоваться через TNF α /TNF-R1-, FasL/Fas-, TRAIL/TRAIL-R2-зависимые механизмы апоптоза. Однако уровень экспрессии перечисленных рецепторов не позволяет оценить вклад соответствующих сигнальных путей в реализацию лизиса опухолевых клеток. Использование подхода с блокированием цитотоксических лигандов/медиаторов выявило наибольшую роль двух путей, опосредующих цитотоксическую активность ИФН-ДК доноров против большинства глиобластомных клеток - грануло-опосредованного и TNF α /TNF-R1-зависимого сигнального пути. Дополнительными механизмами цитотоксической активности ИФН-ДК против глиобластомных клеток со значительно меньшим вкладом могут быть FasL/Fas- и TRAIL/TRAIL-R2-сигнальные пути. При этом не исключена вовлеченность других, рецепторно- и грануло-независимых, механизмов цитотоксичности ДК.

ИФН-ДК больных глиобластомой характеризуются угнетением цитотоксической активности против аутологичных и аллогенных опухолевых клеток, чувствительных к TNF α /TNF-R1-медируемой цитотоксичности. С другой стороны, в ряде случаев снижение цитотоксической активности ДК больных против клеток глиобластомных линий превышает ингибирующий эффект TNF α /TNF-R1-блокирующих антител, что свидетельствует о нарушении иных механизмов цитотоксичности ДК.

В этом аспекте важно отметить, что стандартная иммортилизованная линия U-87, несмотря на принадлежность к глиобластомным линиям, отличается от большинства неиммортизированных глиобластомных линий по фенотипу, чувствительности к цитотоксическому действию ИФН-ДК и механизмам лизиса, в частности, является резистентной к TNF α /TNF-R1-медируемой цитотоксичности ДК. Эти результаты позволяют заключить, что

клетки линии U-87 не являются витральным аналогом клеток глиобластомы и оптимальной моделью для изучения механизмов подавления пролиферации клеток глиобластомы, а также для поиска новых подходов к элиминации опухолевых клеток у пациентов со злокачественными глиомами головного мозга.

Проведенный фенотипический анализ ДК выявил низкую экспрессию mTNF α на ИФН-ДК больных глиобластомой, что, по всей видимости, является ключевым фактором дефекта цитотоксической функции ДК против опухолевых клеток, чувствительных к TNF α /TNF-R1-зависимому механизму лизиса. Однако, полного подавления цитотоксической активности против аутологичных опухолевых клеток в связи с нарушением экспрессии mTNF α не происходит, поскольку экспрессия других медиаторов (перфорина, гранзима Б, FasL, TRAIL) в культурах ИФН-ДК больных глиобластомой сохранна и сопоставима с аналогичными показателями для ДК доноров.

Низкий уровень экспрессии mTNF α на ИФН-ДК больных глиобластомой связан, во-первых, с низким количеством мРНК TNF α в ИФН-ДК больных глиомами и, во-вторых, – с повышенной экспрессией и активностью TNF α -конвертирующего фермента, переводящего mTNF α в sTNF α . Блокирование этого фермента позволяет снизить шеддинг mTNF α на мембране ИФН-ДК больных и усилить цитотоксическую активность ДК против TNF α /TNF-R1-чувствительных опухолевых клеток.

Одной из возможных причин, обуславливающих низкую экспрессию mTNF α и низкую цитотоксическую активность ДК, может быть ингибирующее действие опухолевых клеток. Полученные результаты показали, что супернатанты первичных культур глиобластомы способны ингибировать цитотоксическую активность ИФН-ДК доноров против клеток линии HEp-2 (как модели опухолевых клеток, чувствительных к TNF α /TNF-R1-опосредованному лизису). Однако, такая супрессорная активность супернатантов характерна не для всех первичных культур и сопряжена с более высокой продукцией IL-1 α и IL-10, а также IFN γ глиобластомными клетками.

Первичные культуры, в отличие от полученных из них в дальнейшем клеточных линий, в целом отражают специфические свойства исходной опухоли. Соответственно, обнаруженные нами корреляционные взаимосвязи между низким уровнем экспрессии mTNF α на ИФН-ДК моноцитарного происхождения и высоким уровнем продукции ряда цитокинов (IL-1 β , G-CSF, PDGF, IL-8, IP-10 и др.) аутологичными клетками первичных культур глиом головного мозга позволяют сделать предположение о негативном влиянии опухоли на mTNF α -опосредованную цитотоксичность ДК.

Усиление экспрессии mTNF α и цитотоксической активности ИФН-ДК больных глиобластомой против аутологичных опухолевых клеток с помощью IL-2 и внеклеточной dsDNA позволяет рассматривать данные медиаторы в качестве активаторов mTNF α -опосредованной цитотоксической активности. Несмотря на схожий стимулирующий эффект, механизм действия IL-2 и dsDNA на экспрессию дендритными клетками mTNF α различен. Стимулирующий эффект dsDNA на экспрессию mTNF α связан с увеличением исходно низкой экспрессии мРНК TNF α , а также со снижением исходно высокой экспрессии и активности фермента TACE, тогда как действие IL-2 не связано со значимым усилением экспрессии мРНК TNF α и подавлением активности TACE, что указывает на вовлечение иных механизмов регуляции экспрессии mTNF α . Важно отметить, что наряду со способностью IL-2 и dsDNA усиливать экспрессию mTNF α , данные медиаторы стимулируют экспрессию перфорина и гранзима Б (для dsDNA). Это свидетельствует о возможности усиления не только рецепторно-, но и грануло-опосредованной цитотоксичности ИФН-ДК больных против аутологичных опухолевых клеток.

В целом, полученные данные характеризуют прямой цитотоксический эффект ИФН-ДК против клеток глиобластомных линий, включая клетки нейросфер; демонстрируют селективный (TNF α /TNF-R1-опосредованный) дефект этой функции ДК у пациентов с глиобластомой, раскрывают механизмы нарушения цитотоксической активности и обосновывают подходы к коррекции сниженной цитотоксичности ДК, что создает новые возможности

использования ДК в противоопухолевой иммунотерапии злокачественных глиом.

Выводы

1. ИФН-ДК здоровых доноров обладают цитотоксической активностью против линий опухолевых клеток, полученных от пациентов с глиобластомой, которая, несмотря на вариации, в большинстве случаев превышает 40 %, что свидетельствует о чувствительности глиобластомных клеток к цитотоксическому действию ИФН-ДК и индивидуальной гетерогенности больных по этому параметру.
2. Клетки глиобластомных линий экспрессируют проапоптогенные рецепторы TNF-R1, Fas и TRAIL-R2, что свидетельствует о возможности реализации цитотоксической активности ИФН-ДК через рецепторно-опосредованные механизмы.
3. Цитотоксическая активность ИФН-ДК здоровых доноров против глиобластомных линий в наибольшей степени снижается при нейтрализации перфорина/гранзима Б и mTNF α , и в меньшей степени - при блокировании TRAIL и FasL, что свидетельствует о преобладающей роли грануло- и TNF α /TNF-R1-зависимых механизмов в реализации цитотоксической активности ИФН-ДК.
4. ИФН-ДК больных глиобластомой характеризуются сниженной цитотоксической активностью против аутологичных и аллогенных глиобластомных линий, чувствительных к TNF α /TNF-R1-зависимому лизису, и сохранной цитотоксичностью против резистентных к TNF α /TNF-R1-опосредованному лизису, что свидетельствует о селективном нарушении TNF α /TNF-R1-медируемой цитотоксической активности ДК.
5. По сравнению с ДК доноров ИФН-ДК больных глиобластомой характеризуются низкой экспрессией мембранной формы TNF α при сохранной экспрессии FasL, TRAIL, перфорина, гранзима Б, что

свидетельствует о причастности мембранной формы TNF α к дефекту TNF α /TNF-R1-опосредованной цитотоксичности ДК против глиобластомных клеток, а с другой стороны, - о сохранном цитотоксическом потенциале ИФН-ДК больных глиобластомой, опосредованном TNF α -независимыми механизмам.

6. ИФН-ДК больных глиобластомой характеризуются низкой экспрессией мРНК TNF α , а также высокой экспрессией и протеолитической активностью TNF α -конвертирующего фермента, блокирование которого ведет к увеличению экспрессии mTNF α и усилению цитотоксической активности ИФН-ДК, что свидетельствует о нарушении экспрессии мембранной формы TNF α на транскрипционном и посттрансляционном уровнях.
7. Низкая экспрессия мембранной формы TNF α на ИФН-ДК больных ассоциирована с высокой продукцией аутологичными опухолевыми клетками IL-1 β , G-CSF, PDGF, IL-8 и IP-10, что указывает на причастность опухолевых клеток к цитокин-опосредованной регуляции экспрессии TNF α на ДК у больных злокачественными глиомами.
8. Добавление экзогенного IL-2 и внеклеточной dsDNA в культуры ИФН-ДК больных глиобластомой на этапе созревания приводит к повышению цитотоксической активности ДК против аутологичных опухолевых клеток; увеличению экспрессии мембранной формы TNF α , перфорина и гранзима Б (для dsDNA), что свидетельствует о корректирующем влиянии IL-2 и dsDNA на mTNF α -опосредованную цитотоксичность ИФН-ДК, а также о возможности генерации ИФН-ДК с высоким цитотоксическим потенциалом против опухолевых клеток, чувствительных к грануло-зависимому механизму лизиса.

Список сокращений

АГ	Антиген
АПК	Антигенпрезентирующие клетки
ГБ	Глиобластома
ГСК	Гемопозитическая стволовая клетка
ДК	Дендритные клетки
ДК-вакцины	Вакцины на основе дендритных клеток
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
ИЛ4-ДК	Интерлейкин-4-индуцированные дендритные клетки
ИФН-ДК	Интерферон-альфа-индуцированные дендритные клетки
КМ	Костный мозг
ЛПС	Липополисахарид
мДК	Миелоидные дендритные клетки
МНК	Мононуклеарные клетки
Мо-ДК	Дендритные клетки моноцитарного происхождения
мРНК	Матричная рибонуклеиновая кислота
МТТ	бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолия
МФ	Макрофаги
пДК	Плазмоцитоподобные дендритные клетки

ПГЕ2	Простагландин E2
ПК	Периферическая кровь
Трег	Регуляторные Т-клетки
ЦТЛ	Цитотоксические Т-лимфоциты
BDCA	Антиген дендритных клеток крови
CD	Кластер дифференцировки
CD40L	лиганд к CD40
CMA	Конканамицин А
DD	Домен смерти
dsDNA	Двухцепочечная дезоксирибонуклеиновая кислота
dsRNA	Двухцепочечная рибонуклеиновая кислота
FADD	Fas-ассоциированный домен смерти
FasL	Fas-лиганд
FCS	Эмбриональная телячья сыворотка
rFas	Растворимая форма рецептора к FasL
GM-CSF	Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
HLA-DR	DR антигены главного комплекса гистосовместимости
IFN	Интерферон
IL-2, IL-4 и др.	Интерлейкин-2, интерлейкин-4 и др.
Ig	Иммуноглобулин

MHC I, MHC II	Молекулы I и II класса главного комплекса гистосовместимости
NF-κB	Ядерный фактор κB
NK-клетки	Натуральные киллерные клетки
PD-1	Рецептор смерти 1
PDGF	Фактор роста тромбоцитов
SN	Супернатант
TACE	Фермент, конвертирующий фактор некроза опухоли α
TGF-β	Трансформирующий ростовой фактор β
Th0, Th1, Th2, Th17	Субпопуляции Т-хелперных клеток
TLR	Toll-like рецептор
TNFα	Фактор некроза опухоли α
mTNFα	Мембранная форма фактор некроза опухоли α
sTNFα	Растворимая форма фактор некроза опухоли α
rTNF-R1	Растворимая форма рецептора 1 к TNFα
TRAIL	TNF-связанный апоптоз-индуцирующий лиганд
rTRAIL- R2	Растворимая форма рецептора 2 к TRAIL
VEGF	Фактор роста эндотелия сосудов

Список литературы

1. Горяйнов С.А. Феномен длительной выживаемости пациентов с глиобластомами. Часть I: роль клинико-демографических факторов и мутации IDH1 (R 132 H) / С.А. Горяйнов, М.Ф. Годьдберг, А.В. Голанов и др. // Журнал вопросы нейрохирургии им.Н.Н.Бурденко. – 2017. – Т. 81 – № 3. – С. 5–16.
2. Кит О.И. Мультиформная глиобластома: патогенез и молекулярные маркеры / О.И. Кит, Д.И. Водолажский, Э.Е. Расторгуев и др. // Вопросы онкологии. – 2017. – Т. 63. – № 5. – С. 694–701.
3. Мацко М.В. Влияние клинических характеристик и объема циторедукции у больных с первичной глиобластомой на общую выживаемость / М.В. Мацко, Д.Е. Мацко, Н.М. Волков, А.Ю. Улитин, А.Г. Иевлева // Вопросы онкологии. – 2017. – Т. 63 – № 6. – С. 907–914.
4. Недоспасов С.А. Нобелевские премии 2018 г. по медицинской иммунологии / С.А. Недоспасов // Медицинская иммунология. – 2019. – Т. 21. – № 1. – С. 7–8.
5. Сехвейл Салах М.М. Иммунная защита при злокачественных опухолях головного мозга: краткий обзор литературы / М.М. Сехвейл Салах // Национальное здоровье. – 2018. – Т. 1. – С. 83–94.
6. Синайко В.В. Комплексное лечение пациентов с глиобластомой с использованием различных режимов приема темозоломида при послеоперационной химиолучевой терапии / В.В. Синайко, Э.А. Жаврид, П.Д. Демешко, Н.А. Артемова // Вопросы онкологии. – 2017. – Т. 63. – № 6. – С. 915–919.
7. Талаев В. Ю. Фенотипическая характеристика классических дендритных клеток крови и их субпопуляций в норме и при остеомиелите / В. Ю. Талаев, М.В. Талаева, М.Ю. Лебедев и др. // Иммунология. – 2017. – Т. 38. – № 4. – С. 229–234.
8. Талаев В.Ю. Оценка эффективности рекомбинантных цитокинов человека отечественного производства (sci-store.ru) при получении моноцитарных дендритных клеток / В.Ю. Талаев, М.В. Талаева, Е.В. Воронина, И.Е. Заиченко // Медицинская иммунология. – 2018. – Т. 20. – № 4. – С. 535–542.
9. Achard C. Oncolytic measles virus induces tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated cytotoxicity by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells / C. Achard, J.-B. Guillaume, D. Bruni, et al. //

Oncoimmunology. – 2017. – Vol. 6. – № 1. – e1261240.

10. Aggarwal B.B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword / B. B. Aggarwal // *Nat. Rev. Immunol.* – 2003. – Vol. 3. – № 9. – P. 745–756.

11. Ahn B.Y. Glioma invasion mediated by the p75 neurotrophin receptor (p75(NTR)/CD271) requires regulated interaction with PDLIM1 / B. Y. Ahn, R. F. G. Saldanha-Gama, J. J. Rahn, et al. // *Oncogene.* – 2016. – Vol. 35. – № 11. – P. 1411–1422.

12. Akiyama Y. α -type-1 polarized dendritic cell-based vaccination in recurrent high-grade glioma: a phase I clinical trial / Y. Akiyama, C. Oshita, A. Kume, et al. // *BMC Cancer.* – 2012. – Vol. 12. – P. 623. – doi:10.1186/1471-2407-12-623.

13. Aktas E. Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity / E. Aktas, U. C. Kucuksezer, S. Bilgic, G. Erten, G. Deniz // *Cell. Immunol.* – 2009. – Vol. 254. – № 2. – P. 149–154.

14. Albert M.L. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs / M. L. Albert, B. Sauter, N. Bhardwaj // *Nature.* – 1998. – Vol. 392. – № 6671. – P. 86–89.

15. Alifieris C. Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment / C. Alifieris, D. T. Trafalis // *Pharmacol. Ther.* – 2015. – Vol. 152. – P. 63–82.

16. Alyamkina E.A. Exogenous allogenic fragmented double-stranded DNA is internalized into human dendritic cells and enhances their allostimulatory activity / E. A. Alyamkina, E. V. Dolgova, A. S. Likhacheva, et al. // *Cell. Immunol.* – 2010. – Vol. 262. – № 2. – P. 120–126.

17. Alyamkina E.A. Combined therapy with cyclophosphamide and DNA preparation inhibits the tumor growth in mice / E. A. Alyamkina, E. V Dolgova, A. S. Likhacheva, et al. // *Genet. Vaccines Ther.* – 2009. – Vol. 7 – P. 12.

18. Alyamkina E.A. Combination of cyclophosphamide and double-stranded DNA demonstrates synergistic toxicity against established xenografts / E. A. Alyamkina, V. P. Nikolin, N. A. Popova, et al. // *Cancer Cell Int.* – 2015. – Vol. 15. – P. 32.

19. Anguille S. Interleukin-15-induced CD56⁺ myeloid dendritic cells combine potent tumor antigen presentation with direct tumoricidal potential / S. Anguille, E. Lion, J. Tel, M. Walch // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7. – № 12. – e51851c.

20. Anguille S. Short-term cultured, interleukin-15 differentiated dendritic cells have potent immunostimulatory properties / S. Anguille, E. L. J. M. Smits, N. Cools, et al. // *J. Transl. Med.* – 2009. – Vol. 7. – P. 109. – doi:10.1186/1479-5876-7-109.

21. Ashkenazi A. Death receptors: signaling and modulation / A. Ashkenazi, V. M. Dixit // *Science.* – 1998. – Vol. 281. – № 5381. – P. 1305–1308.

22. Aspod C. Imiquimod inhibits melanoma development by promoting pDC

- cytotoxic functions and impeding tumor vascularization / C. Aspod, L. Tramcourt, C. Leloup, et al. // *J. Invest. Dermatol.* – 2014. – Vol. 134. – № 10. – P. 2551–2561.
23. Austyn J.M. Dendritic cells / J. M. Austyn // *Curr. Opin. Hematol.* – 1998. – Vol. 5. – № 1. – P. 3–15.
24. Bachem A. Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c⁺ CD141⁺ cells as homologues of mouse CD8⁺ dendritic cells / A. Bachem, S. Güttler, E. Hartung, et al. // *J. Exp. Med.* – 2010. – Vol. 207. – № 6. – P. 1273–1281.
25. Badie B. Differential expression of MHC class II and B7 costimulatory molecules by microglia in rodent gliomas / B. Badie, B. Bartley, J. Schartner // *J. Neuroimmunol.* – 2002. – Vol. 133. – № 1–2. – P. 39–45.
26. Badie B. Expression of Fas ligand by microglia: possible role in glioma immune evasion / B. Badie, J. Schartner, S. Prabakaran, J. Paul, J. Vorpahl // *J. Neuroimmunol.* – 2001. – Vol. 120. – № 1–2. – P. 19–24.
27. Baharom F. Dendritic cells and monocytes with distinct inflammatory responses reside in lung mucosa of healthy humans / F. Baharom, S. Thomas, G. Rankin, R. et al. // *J. Immunol.* – 2016. – Vol. 196. – № 11. – P. 4498–4509.
28. Bakdash G. Expansion of a BDCA1+CD14⁺ myeloid cell population in melanoma patients may attenuate the efficacy of dendritic cell vaccines / G. Bakdash, S. I. Buschow, M. A. J. Gorris, et al. // *Cancer Res.* – 2016. – Vol. 76. – № 15. – P. 4332–4346.
29. Balaji K.N. Surface cathepsin B protects cytotoxic lymphocytes from self-destruction after degranulation / K. N. Balaji, N. Schaschke, W. Machleidt, M. Catalfamo, P. A. Henkart // *J. Exp. Med.* – 2002. – Vol. 196. – № 4. – P. 493–503.
30. Banchereau J. Dendritic cells and the control of immunity / J. Banchereau, R. M. Steinman // *Nature.* – 1998. – Vol. 392. – № 6673. – P. 245–252.
31. Barcia C. Infiltrating CTLs in human glioblastoma establish immunological synapses with tumorigenic cells / C. Barcia, A. Gómez, J. M. Gallego-Sanchez, et al. // *Am. J. Pathol.* – 2009. – Vol. 175. – № 2. – P. 786–798.
32. Barry K.C. A natural killer–dendritic cell axis defines checkpoint therapy–responsive tumor microenvironments / K. C. Barry, J. Hsu, M. L. Broz, et al. // *Nat. Med.* – 2018. – Vol. 24. – № 8. – P. 1178–1191.
33. Batich K.A. Long-term survival in glioblastoma with cytomegalovirus pp65-targeted vaccination / K. A. Batich, E. A. Reap, G. E. Archer, et al. // *Clin. Cancer Res.* – 2017. – Vol. 23. – № 8. – P. 1898–1909.
34. Beaulieu S. Characterization of the cytotoxic factor(s) released from thymic dendritic cells upon human immunodeficiency virus type 1 infection / S. Beaulieu, M. Lafontaine, M. Richer, I. Courchesne, E. A. Cohen, D. Bergeron // *Virology.* – 1998. – Vol. 241. – № 2. – P. 285–297.
35. Beauvillain C. Neonatal and adult microglia cross-present exogenous antigens /

- C. Beauvillain, S. Donnou, U. Jarry, et al. // *Glia*. – 2008. – Vol. 56. – № 1. – P. 69–77.
36. Beier D. Chemoresistance of glioblastoma cancer stem cells--much more complex than expected / D. Beier, J. B. Schulz, C. P. Beier // *Mol. Cancer*. – 2011. – Vol. 10. – P. 128. – doi:10.1186/1476-4598-10-128.
37. Belcaid Z. FocaPdiation therapy combined with 4-1BB activation and CTLA-4 blockade yields long-term survival and a protective antigen-specific memory response in a murine glioma model / Z. Belcaid, J. A. Phallen, J. Zeng, et al. // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9. – № 7. –doi:10.1371/journal.pone.0101764
38. Bella S. Della Functional repertoire of dendritic cells generated in granulocyte macrophage-colony stimulating factor and interferon- α / S. Della Bella, S. Nicola, A. Riva, et al. // *J. Leukoc. Biol.* – 2004. – Vol. 75. – № 1. – P. 106–116.
39. Bellail A.C. DR5-mediated DISC controls caspase-8 cleavage and initiation of apoptosis in human glioblastomas / A. C. Bellail, M. C. L. Tse, J. H. Song, et al. // *J. Cell. Mol. Med.* – 2010. – Vol. 14. – № 6a. – P. 1303–1317.
40. Bergh J.M.J. Van den HPV vaccine stimulates cytotoxic activity of killer dendritic cells and natural killer cells against HPV-positive tumour cells / J. M. J. Van den Bergh, K. Guerti, Y. Willemen, et al. // *J. Cell. Mol. Med.* – 2014. – Vol. 18. – № 7. – P. 1372–1380.
41. Bigley V. Langerin-expressing dendritic cells in human tissues are related to CD1c⁺ dendritic cells and distinct from Langerhans cells and CD141^{high} XCR1⁺ dendritic cells / V. Bigley, N. McGovern, P. Milne, et al. // *J. Leukoc. Biol.* – 2015. – Vol. 97. – № 4. – P. 627–634.
42. Black R.A. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells / R. A. Black, C. T. Rauch, C. J. Kozlosky, et al. // *Nature*. – 1997. – Vol. 385. – № 6618. – P. 729–733.
43. Blasius A.L. Intracellular Toll-like Receptors / A. L. Blasius, B. Beutler // *Immunity*. – 2010. – Vol. 32. – № 3. – P. 305–315.
44. Bluman E.M. Human natural killer cells produce abundant macrophage inflammatory protein-1 alpha in response to monocyte-derived cytokines. / E. M. Bluman, K. J. Bartynski, B. R. Avalos, M. A. Caligiuri // *J. Clin. Invest.* – 1996. – Vol. 97. – № 12. – P. 2722–2727.
45. Bogunovic M. Origin of the lamina propria dendritic cell network / M. Bogunovic, F. Ginhoux, J. Helft, et al. // *Immunity*. – 2009. – Vol. 31. – № 3. – P. 513–525.
46. Boring L. Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice. / L. Boring, J. Gosling, S. W. Chensue, et al. // *J. Clin. Invest.* – 1997. – Vol. 100. – № 10. – P. 2552–2561.
47. Borrell-Pagès M. TACE is required for the activation of the EGFR by TGF- α in tumors / M. Borrell-Pagès, F. Rojo, J. Albanell, J. Baselga, J. Arribas //

EMBO J. – 2003. – Vol. 22. – № 5. – P. 1114–1124.

48. Böttcher J.P. NK Cells stimulate recruitment of cDC1 into the tumor microenvironment promoting cancer immune control / J. P. Böttcher, E. Bonavita, P. Chakravarty, et al. // *Cell*. – 2018. – Vol. 172. – № 5. – P. 1022–1037.

49. Bratke K. Functional expression of granzyme B in human plasmacytoid dendritic cells: a role in allergic inflammation / K. Bratke, J. Nielsen, F. Manig, et al. // *Clin. Exp. Allergy*. – 2010. – Vol. 40. – № 7. – P. 1015–1024.

50. Bratton S.B. Apoptotic death sensor: an organelle's alter ego? / S. B. Bratton, G. M. Cohen // *Trends Pharmacol. Sci.* – 2001. – Vol. 22. – № 6. – P. 306–315.

51. Brescia P. CD133 Is essential for glioblastoma stem cell maintenance / P. Brescia, B. Ortensi, L. Fornasari, et al. // *Stem Cells*. – 2013. – Vol. 31. – № 5. – P. 857–869.

52. Breton G. Human dendritic cells (DCs) are derived from distinct circulating precursors that are precommitted to become CD1c⁺ or CD141⁺ DCs / G. Breton, S. Zheng, R. Valieris, I. Tojal da Silva, R. Satija, M. C. Nussenzweig // *J. Exp. Med.* – 2016. – Vol. 213. – № 13. – P. 2861–2870.

53. Brockhaus M. Identification of two types of tumor necrosis factor receptors on human cell lines by monoclonal antibodies / M. Brockhaus, H. J. Schoenfeld, E. J. Schlaeger, et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1990. – Vol. 87. – № 8. – P. 3127–3131.

54. Broz M. Dissecting the tumor myeloid compartment reveals rare activating antigen presenting cells, critical for T cell immunity / M. Broz, M. Binnewies, B. Boldajipour, et al. // *Cancer Cell*. – 2014. – Vol. 26. – № 5. – P. 638–652.

55. Bryant C. A CD2 high-expressing stress-resistant human plasmacytoid dendritic-cell subset / C. Bryant, P. D. Fromm, F. Kupresanin, et al. // *Immunol. Cell Biol.* – 2016. – Vol. 94. – № 5. – P. 447–457.

56. Buelens C. Human dendritic cell responses to lipopolysaccharide and CD40 ligation are differentially regulated by interleukin-10 / C. Buelens, V. Verhasselt, D. De Groote, et al. // *Eur. J. Immunol.* – 1997. – Vol. 27. – № 8. – P. 1848–1852.

57. Cameron P.U. Infection and Apoptotic Cell Death of CD4⁺ T Cells during an Immune Response to HIV-1-Pulsed Dendritic Cells / P. U. Cameron, M. Pope, S. Gezelter, R. M. Steinman // *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. – 1994. – Vol. 10. – № 1. – P. 61–71.

58. Caminschi I. The dendritic cell subtype-restricted C-type lectin Clec9A is a target for vaccine enhancement / I. Caminschi, A. I. Proietto, F. Ahmet, et al. // *Blood*. – 2008. – Vol. 112. – № 8. – P. 3264–3273.

59. Cappel C. Cytotoxic potential of IL-15-activated cytokine-induced killer cells against human neuroblastoma cells / C. Cappel, S. Huenecke, A. Suemmerer, et al. // *Pediatr. Blood Cancer*. – 2016. – Vol. 63. – № 12. – P. 2230–2239.

60. Capper D. Stem-cell-like glioma cells are resistant to TRAIL/Apo2L and exhibit

- down-regulation of caspase-8 by promoter methylation / D. Capper, T. Gaiser, C. Hartmann, et al. // *Acta Neuropathol.* – 2009. – Vol. 117. – № 4. – P. 445–456.
61. Carpenter S. Post-transcriptional regulation of gene expression in innate immunity / S. Carpenter, E. P. Ricci, B. C. Mercier, M. J. Moore, K. A. Fitzgerald // *Nat. Rev. Immunol.* – 2014. – Vol. 14. – № 6. – P. 361–376.
62. Cella M. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon / M. Cella, D. Jarrossay, F. Facchetti, et al. // *Nat. Med.* – 1999. – Vol. 5. – № 8. – P. 919–923.
63. Chaperot L. Virus or TLR agonists induce TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells / L. Chaperot, A. Blum, O. Manches, et al. // *J. Immunol.* – 2006. – Vol. 176. – № 1. – P. 248–55.
64. Chen J. Malignant glioma: lessons from genomics, mouse models, and stem cells / J. Chen, R. M. McKay, L. F. Parada // *Cell.* – 2012. – Vol. 149. – № 1. – P. 36–47.
65. Chen W.-J. Ki-67 is a valuable prognostic factor in gliomas: evidence from a systematic review and meta-analysis / W.-J. Chen, D.-S. He, R.-X. Tang, F.-H. Ren, G. Chen // *Asian Pac. J. Cancer Prev.* – 2015. – Vol. 16. – № 2. – P. 411–420.
66. Chen W. Thrombopoietin cooperates with FLT3-ligand in the generation of plasmacytoid dendritic cell precursors from human hematopoietic progenitors / W. Chen, S. Antonenko, J. M. Sederstrom, et al. // *Blood.* – 2004. – Vol. 103. – № 7. – P. 2547–2553.
67. Chen X. ADAM17 promotes U87 glioblastoma stem cell migration and invasion / X. Chen, L. Chen, J. Chen, et al. // *Brain Res.* – 2013. – Vol. 1538. – P. 151–158.
68. Chiang M.-C. Differential uptake and cross-presentation of soluble and necrotic cell antigen by human DC subsets / M.-C. Chiang, K. M. Tullett, Y. S. Lee, et al. // *Eur. J. Immunol.* – 2016. – Vol. 46. – № 2. – P. 329–339.
69. Chiao P.J. Autoregulation of IicBa activity / P. J. Chiao, S. Miyamoto, I. M. Verma // *Biochemistry.* – 1994. – Vol. 91. – P. 28–32.
70. Cho D.-Y. Adjuvant immunotherapy with whole-cell lysate dendritic cells vaccine for glioblastoma multiforme: a phase II clinical trial / D.-Y. Cho, W.-K. Yang, H.-C. Lee, et al. // *World Neurosurg.* – 2012. – Vol. 77. – № 5–6. – P. 736–744.
71. Chopin M. RUNX2 mediates plasmacytoid dendritic cell egress from the bone marrow and controls viral immunity / M. Chopin, S. P. Preston, A. T. L. Lun, et al. // *Cell Rep.* – 2016. – Vol. 15. – № 4. – P. 866–878.
72. Chowdhury D. Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death / D. Chowdhury, J. Lieberman // *Annu. Rev. Immunol.* – 2008. – Vol. 26. – P. 389–420.
73. Chu C.-C. Resident CD141 (BDCA3)+ dendritic cells in human skin produce IL-10 and induce regulatory T cells that suppress skin inflammation / C.-C. Chu, N.

- Ali, P. Karagiannis, et al. // *J. Exp. Med.* – 2012. – Vol. 209. – № 5. – P. 935–945.
74. Chung Y.-J. Transcriptional and posttranscriptional roles for p38 mitogen-activated protein kinase in upregulation of TNF- α expression by deoxynivalenol (vomitoxin) / Y.-J. Chung, H.-R. Zhou, J. J. Pestka // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2003. – Vol. 193. – № 2. – P. 188–201.
75. Cisse B. Transcription factor E2-2 is an essential and specific regulator of plasmacytoid dendritic cell development / B. Cisse, M. L. Caton, M. Lehner, et al. // *Cell.* – 2008. – Vol. 135. – № 1. – P. 37–48.
76. Clark G.J. The cell surface phenotype of human dendritic cells / G. J. Clark, P. A. Silveira, P. M. Hogarth, D. N. J. Hart // *Semin. Cell Dev. Biol.* – 2019. – Vol. 86. – P. 3–14.
77. Cohn L. Antigen delivery to early endosomes eliminates the superiority of human blood BDCA3⁺ dendritic cells at cross presentation / L. Cohn, B. Chatterjee, F. Esselborn, et al. // *J. Exp. Med.* – 2013. – Vol. 210. – № 5. – P. 1049–1063.
78. Colisson R. Free HTLV-1 induces TLR7-dependent innate immune response and TRAIL relocalization in killer plasmacytoid dendritic cells / R. Colisson, L. Barblu, C. Gras, et al. // *Blood.* – 2010. – Vol. 115. – № 11. – P. 2177–2185.
79. Crawley J.B. T cell proliferation in response to interleukins 2 and 7 requires p38MAP kinase activation / J. B. Crawley, L. Rawlinson, F. V. Lali, et al. // *J. Biol. Chem.* – 1997. – Vol. 272. – P. 15023–15027.
80. Crispe I.N. Fatal interactions: Fas-induced apoptosis of mature T cells / I. N. Crispe // *Immunity.* – 1994. – Vol. 1. – № 5. – P. 347–349.
81. Crozat K. Cutting edge: expression of XCR1 defines mouse lymphoid-tissue resident and migratory dendritic cells of the CD8 α ⁺ type / K. Crozat, S. Tamoutounour, T.-P. Vu Manh, et al. // *J. Immunol.* – 2011. – Vol. 187. – № 9. – p. 4411–4415.
82. Cullen S.P. Granzymes in cancer and immunity / S. P. Cullen, M. Brunet, S. J. Martin // *Cell Death Differ.* – 2010. – Vol. 17. – № 4. – P. 616–623.
83. Cullen S.P. Mechanisms of granule-dependent killing / S. P. Cullen, S. J. Martin // *Cell Death Differ.* – 2008. – Vol. 15. – № 2. – P. 251–262.
84. Cuturi M.C. Production of hematopoietic colony-stimulating factors by human natural killer cells / M. C. Cuturi, I. Anegón, F. Sherman, et al. // *J. Exp. Med.* – 1989. – Vol. 169. – № 2. – P. 569–583.
85. Dauer M. Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors / M. Dauer, B. Obermaier, J. Hertel, et al. // *J. Immunol.* – 2003. – Vol. 170. – № 8. – P. 4069–4076.
86. Demoulin S. Tumor microenvironment converts plasmacytoid dendritic cells into immunosuppressive/tolerogenic cells: insight into the molecular mechanisms / S. Demoulin, M. Herfs, P. Delvenne, P. Hubert // *J. Leukoc. Biol.* – 2012. – Vol. 93.

– P. 343–352.

87. Desch A.N. Flow cytometric analysis of mononuclear phagocytes in nondiseased human lung and lung-draining lymph nodes / A. N. Desch, S. L. Gibbings, R. Goyal, et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2016. – Vol. 193. – № 6. – P. 614–626.

88. Diamandis P. World Health Organization 2016 classification of central nervous system tumors / P. Diamandis, K. Aldape // *Neurol. Clin.* – 2018. – Vol. 36. – № 3. – P. 439–447.

89. Diao J. Overexpression of HLA-DR is associated with prognosis of glioma patients / J. Diao, T. Xia, H. Zhao, J. Liu, B. Li, Z. Zhang // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* – 2015. – Vol. 8. – № 5. – P. 5485–5490.

90. Ding Y. FLT3-ligand treatment of humanized mice results in the generation of large numbers of CD141+ and CD1c+ dendritic cells in vivo / Y. Ding, A. Wilkinson, A. Idris, et al. // *J. Immunol.* – 2014. – Vol. 192. – № 4. – P. 1982–1989.

91. Dong H. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion / H. Dong, S. E. Strome, D. R. Salomao, et al. // *Nat. Med.* – 2002. – Vol. 8. – № 8. – P. 793–800.

92. Drobits B. Imiquimod clears tumors in mice independent of adaptive immunity by converting pDCs into tumor-killing effector cells / B. Drobits, M. Holcman, N. Amberg, et al. // *J. Clin. Invest.* – 2012. – Vol. 122. – № 2. – P. 575–585.

93. Dzionic A. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood / A. Dzionic, A. Fuchs, P. Schmidt, et al. // *J. Immunol.* – 2000. – Vol. 165. – № 11. – P. 6037–6046.

94. Eagles M.E. Dendritic cell vaccines for high-grade gliomas / M. E. Eagles, F. Nassiri, J. H. Badhiwala, et al. // *Ther. Clin. Risk Manag.* – 2018. – Vol. 14. – P. 1299–1313.

95. Eguíluz-Gracia I. Rapid recruitment of CD14 + monocytes in experimentally induced allergic rhinitis in human subjects / I. Eguíluz-Gracia, A. Bosco, R. Dollner, et al. // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2016. – Vol. 137. – № 6. – P. 1872–1881.

96. Eissner G. Ligands working as receptors: reverse signaling by members of the TNF superfamily enhance the plasticity of the immune system / G. Eissner, W. Kolch, P. Scheurich // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2004. – Vol. 15. – № 5. – P. 353–366.

97. Enderlin M. TNF- α and the IFN- γ -inducible protein 10 (IP-10/CXCL-10) delivered by parvoviral vectors act in synergy to induce antitumor effects in mouse glioblastoma / M. Enderlin, E. V Kleinmann, S. Struyf, et al. // *Cancer Gene Ther.* – 2009. – Vol. 16. – № 2. – P. 149–160.

98. Eramo A. Chemotherapy resistance of glioblastoma stem cells / A. Eramo, L. Ricci-Vitiani, A. Zeuner, et al. // *Cell Death Differ.* – 2006. – Vol. 13. – № 7. – P. 1238–1241.

99. Fairhurst R.M. Activation of mitogen-activated protein kinase/ERK-2 in phytohaemagglutinin blasts by recombinant interleukin-2: contrasting features with CD3 activation / R. M. Fairhurst, M. Daeipour, M. C. Amaral, A. E. Nel // *Immunology*. – 1993. – Vol. 79. – № 1. – P. 112–118.
100. Fan X. Expression of HLA-DR genes in gliomas: correlation with clinicopathological features and prognosis / X. Fan, J. Liang, Z. Wu, et al. // *Chinese Neurosurg. J.* – 2017. – Vol. 3. – № 1. – P. 27.
101. Fanger N.A. Human dendritic cells mediate cellular apoptosis via tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) / N. A. Fanger, C. R. Maliszewski, K. Schooley, T. S. Griffith // *J. Exp. Med.* – 1999. – Vol. 190. – № 8. – P. 1155–1164.
102. Fauriat C. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition / C. Fauriat, E. O. Long, H.-G. Ljunggren, Y. T. Bryceson // *Blood*. – 2010. – Vol. 115. – № 11. – P. 2167–2176.
103. Fecci P.E. Systemic CTLA-4 blockade ameliorates glioma-induced changes to the CD4⁺ T cell compartment without affecting regulatory T-cell function / P. E. Fecci, H. Ochiai, D. A. Mitchell, et al. // *Clin. Cancer Res.* – 2007. – Vol. 13. – № 7. – P. 2158–2167.
104. Flügel A. Microglia only weakly present glioma antigen to cytotoxic T cells / A. Flügel, M. S. Labeur, E. M. Grasbon-Frodl, G. W. Kreutzberg, M. B. Graeber // *Int. J. Dev. Neurosci.* – Vol. 17. – № 5–6. – P. 547–556.
105. Fontana A. Expression of TGF-beta 2 in human glioblastoma: a role in resistance to immune rejection? / A. Fontana, S. Bodmer, K. Frei, U. Malipiero, C. Siepl // *Ciba Found. Symp.* – 1991. – Vol. 157. – P. 232–238.
106. Franklin R.A. The cellular and molecular origin of tumor-associated macrophages / R. A. Franklin, W. Liao, A. Sarkar, et al. // *Science*. – 2014. – Vol. 344. – № 6186. – P. 921–925.
107. Fraser S.A. Perforin lytic activity is controlled by calreticulin / S. A. Fraser, R. Karimi, M. Michalak, D. Hudig // *J. Immunol.* – 2000. – Vol. 164. – № 8. – P. 4150–4155.
108. Friese M.A. MICA/NKG2D-mediated immunogene therapy of experimental gliomas / M. A. Friese, M. Platten, S. Z. Lutz, et al. // *Cancer Res.* – 2003. – Vol. 63. – № 24. – P. 8996–9006.
109. Fugier-Vivier I. Measles virus suppresses cell-mediated immunity by interfering with the survival and functions of dendritic and T cells / I. Fugier-Vivier, C. Servet-Delprat, P. Rivaller, et al. // *J. Exp. Med.* – 1997. – Vol. 186. – № 6. – P. 813–823.
110. Fulcher J.A. Galectin-1 co-clusters CD43/CD45 on dendritic cells and induces cell activation and migration through Syk and protein Kinase C signaling / J. A. Fulcher, M. H. Chang, S. Wang, et al. // *J. Biol. Chem.* – 2009. – Vol. 284. – № 39.

– P. 26860–26870.

111. Furth R. van Mononuclear phagocytic system: new classification of macrophages, monocytes and of their cell line / R. van Furth, Z. A. Cohn, J. G. Hirsch, et al. // *Bull. World Health Organ.* – 1972. – Vol. 47. – № 5. – P. 651–658.

112. Gadani S.P. IL-4 in the brain: a cytokine to remember / S. P. Gadani, J. C. Cronk, G. T. Norris, J. Kipnis // *J. Immunol.* – 2012. – Vol. 189. – № 9. – P. 4213–4219.

113. Garg A.D. Preclinical efficacy of immune-checkpoint monotherapy does not recapitulate corresponding biomarkers-based clinical predictions in glioblastoma / A. D. Garg, L. Vandenberg, M. Van Woensel, et al. // *Oncoimmunology.* – 2017. – Vol. 6. – № 4. –doi:10.1080/2162402X.2017.1295903.

114. Ge L. Soluble TNF regulates TACE via AP-2 α transcription factor in mouse dendritic cells / L. Ge, N. L. Vujanovic // *J. Immunol.* – 2017. – Vol. 198. – № 1. – P. 417–427.

115. Gessani S. Type I interferons as regulators of human antigen presenting cell functions / S. Gessani, L. Conti, M. Del Cornò, F. Belardelli // *Toxins (Basel).* – 2014. – Vol. 6. – № 6. – P. 1696–1723.

116. Gollob J.A. The functional synergy between IL-12 and IL-2 involves p38 mitogen-activated protein kinase and is associated with the augmentation of STAT serine phosphorylation / J. A. Gollob, C. P. Schnipper, E. A. Murphy, J. Ritz, D. A. Frank // *J. Immunol.* – 1999. – Vol. 162. – № 8. – P. 4472–4481.

117. González-Navajas J.M. Immunomodulatory functions of type I interferons / J. M. González-Navajas, J. Lee, M. David, E. Raz // *Nat. Rev. Immunol.* – 2012. – Vol. 12. – № 2. – P. 125–135.

118. Goudot C. Aryl hydrocarbon receptor controls monocyte differentiation into dendritic cells versus macrophages / C. Goudot, A. Coillard, A.-C. Villani, et al. // *Immunity.* – 2017. – Vol. 47. – № 3. – P. 582–596.

119. Gratas C. Fas Ligand expression in glioblastoma cell lines and primary astrocytic brain tumors / C. Gratas, Y. Tohma, E. G. Van Meir, et al. // *Brain Pathol.* – 1997. – Vol. 7. – № 3. – P. 863–869.

120. Green S.J. Cytotoxic activity and production of toxic nitrogen oxides by macrophages treated with IFN-gamma and monoclonal antibodies against the 73-kDa lipopolysaccharide receptor / S. J. Green, T. Y. Chen, R. M. Crawford, et al. // *J. Immunol.* – 1992. – Vol. 149. – № 6. – P. 2069–2075.

121. Grimm M.C. Direct evidence of monocyte recruitment to inflammatory bowel disease mucosa / M. C. Grimm, W. E. Pullman, G. M. Bennett, et al. // *J. Gastroenterol. Hepatol.* – Vol. 10. – № 4. – P. 387–395.

122. Grouard G. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand / G. Grouard, M. C. Rissoan, L. Filgueira, et al. // *J. Exp. Med.* – 1997. – Vol. 185. – № 6. – P. 1101–1111.

123. Groves M.D. Two phase II trials of temozolomide with interferon-alpha2b (pegylated and non-pegylated) in patients with recurrent glioblastoma multiforme / M. D. Groves, V. K. Puduvalli, M. R. Gilbert, et al. // *Br. J. Cancer*. – 2009. – Vol. 101. – № 4. – P. 615–620.
124. Guilliams M. Unsupervised high-dimensional analysis aligns dendritic cells across tissues and species / M. Guilliams, C.-A. Dutertre, C. L. Scott, et al. // *Immunity*. – 2016. – Vol. 45. – № 3. – P. 669–684.
125. Gustafson M.P. Systemic immune suppression in glioblastoma: the interplay between CD14+HLA-DRlo/neg monocytes, tumor factors, and dexamethasone / M. P. Gustafson, Y. Lin, K. C. New, et al. // *Neuro. Oncol.* – 2010. – Vol. 12. – № 7. – P. 631–644.
126. Guttman-Yassky E. Major differences in inflammatory dendritic cells and their products distinguish atopic dermatitis from psoriasis / E. Guttman-Yassky, M. A. Lowes, J. Fuentes-Duculan, et al. // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2007. – Vol. 119. – № 5. – P. 1210–1217.
127. Hanif F. Glioblastoma multiforme: A review of its epidemiology and pathogenesis through clinical presentation and treatment / F. Hanif, K. Muzaffar, K. Perveen, S. M. Malhi, S. U. Simjee // *Asian Pac. J. Cancer Prev.* – 2017. – Vol. 18. – № 1. – P. 3–9.
128. Haniffa M. Human tissues contain CD141hi cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103+ nonlymphoid dendritic cells / M. Haniffa, A. Shin, V. Bigley, et al. // *Immunity*. – 2012. – Vol. 37. – № 1. – P. 60–73.
129. Hanke N. Dendritic cell tumor killing activity and its potential applications in cancer immunotherapy / N. Hanke, D. Alizadeh, E. Katsanis, N. Larmonier // *Crit. Rev. Immunol.* – 2013. – Vol. 33. – № 1. – P. 1–21.
130. Hart D.N. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response / D. N. Hart // *Blood*. – 1997. – Vol. 90. – № 9. – P. 3245–3287.
131. Heldin C.-H. Targeting the PDGF signaling pathway in tumor treatment / C.-H. Heldin // *Cell Commun. Signal.* – 2013. – Vol. 11. – P. 97. - doi:10.1186/1478-811X-11-97.
132. Hira S.K. Downregulation of STAT3 phosphorylation enhances tumoricidal effect of IL-15-activated dendritic cell against doxorubicin-resistant lymphoma and leukemia via TNF- α / S. K. Hira, I. Mondal, D. Bhattacharya, K. K. Gupta, P. P. Manna // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2015. – Vol. 67. – P. 1–13.
133. Holcmann M. How imiquimod licenses plasmacytoid dendritic cells to kill tumors / M. Holcmann, B. Drobits, M. Sibilio // *Oncoimmunology*. – 2012. – Vol. 1. – № 9. – P. 1661–1663.
134. Howley R. Comparative genomic and proteomic analysis of high grade glioma

- primary cultures and matched tumor in situ / R. Howley, P. Kinsella, P. G. Buckley, et al. // *Exp. Cell Res.* – 2012. – Vol. 318. – № 17. – P. 2245–2256.
135. Hu S.-J. Effects of apoptosis on liver aging / S.-J. Hu, S.-S. Jiang, J. Zhang, et al. // *World J. Clin. Cases.* – 2019. – Vol. 7. – № 6. – P. 691–704.
136. Hunn M.K. Dendritic cell vaccination combined with temozolomide retreatment: results of a phase I trial in patients with recurrent glioblastoma multiforme / M. K. Hunn, E. Bauer, C. E. Wood, et al. // *J. Neurooncol.* – 2015. – Vol. 121. – № 2. – P. 319–329.
137. Jackson C. Challenges in immunotherapy presented by the glioblastoma multiforme microenvironment / C. Jackson, J. Ruzevick, J. Phallen, Z. Belcaid, M. Lim // *Clin. Dev. Immunol.* – 2011. – Vol. 2011. – P. 1–20.
138. Jahrsdörfer B. Granzyme B produced by human plasmacytoid dendritic cells suppresses T-cell expansion / B. Jahrsdörfer, A. Vollmer, S. E. Blackwell, et al. // *Blood.* – 2010. – Vol. 115. – № 6. – P. 1156–1165.
139. Janjic B.M. Innate direct anticancer effector function of human immature dendritic cells. I. Involvement of an apoptosis-inducing pathway / B. M. Janjic, G. Lu, A. Pimenov, et al. // *J. Immunol.* – 2002. – Vol. 168. – № 4. – P. 1823–1830.
140. Jarry U. Efficiently stimulated adult microglia cross-prime naive CD8⁺ T cells injected in the brain / U. Jarry, P. Jeannin, L. Pineau, et al. // *Eur. J. Immunol.* – 2013. – Vol. 43. – № 5. – P. 1173–1184.
141. Jiang M. Synergistic antitumor effect of AAV-mediated TRAIL expression combined with cisplatin on head and neck squamous cell carcinoma / M. Jiang, Z. Liu, Y. Xiang, et al. // *BMC Cancer.* – 2011. – Vol. 11. – P. 54.
142. Jiang Y. STAT1 mediates transmembrane TNF- α -induced formation of death-inducing signaling complex and apoptotic signaling via TNFR1 / Y. Jiang, M. Yu, X. Hu, et al. // *Cell Death Differ.* – 2017. – Vol. 24. – № 4. – P. 660–671.
143. Jin Z. Comparison of morphology, phenotypes and function between cultured human IL-4-DC and IFN-DC / Z. Jin, J. Fan, Y. Zhang, et al. // *Mol. Med. Rep.* – 2017. – Vol. 16. – № 5. – P. 7345–7354.
144. Joffre O.P. Cross-presentation by dendritic cells / O. P. Joffre, E. Segura, A. Savina, S. Amigorena // *Nat. Rev. Immunol.* – 2012. – Vol. 12. – № 8. – P. 557–569.
145. Johnston A.L.M. The p75 neurotrophin receptor is a central regulator of glioma invasion / A. L. M. Johnston, X. Lun, J. J. Rahn, et al. // *PLoS Biol.* – 2007. – Vol. 5. – № 8. – doi:10.1371/journal.pbio.0050212.
146. Johnston J.A. Tyrosine phosphorylation and activation of STAT5, STAT3, and Janus kinases by interleukins 2 and 15 / J. A. Johnston, C. M. Bacon, D. S. Finbloom, et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1995. – Vol. 92. – № 19. – P. 8705–8709.
147. Jongbloed S.L. Human CD141⁺ (BDCA-3)⁺ dendritic cells (DCs) represent a

unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens / S. L. Jongbloed, A. J. Kassianos, K. J. McDonald, et al. // *J. Exp. Med.* – 2010. – Vol. 207. – № 6. – P. 1247–1260.

148. Kalb M.L. TRAIL(+) human plasmacytoid dendritic cells kill tumor cells in vitro: mechanisms of imiquimod- and IFN- α -mediated antitumor reactivity / M. L. Kalb, A. Glaser, G. Stry, F. Koszik, G. Stingl // *J. Immunol.* – 2012. – Vol. 188. – № 4. – P. 1583–1591.

149. Kamada N. Unique CD14⁺ intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN- γ axis / N. Kamada, T. Hisamatsu, S. Okamoto, et al. // *J. Clin. Invest.* – 2008. – Vol. 118. – № 6. – P. 2269–2280.

150. Karrich J.J. IL-21-stimulated human plasmacytoid dendritic cells secrete granzyme B, which impairs their capacity to induce T-cell proliferation / J. J. Karrich, L. C. M. Jachimowski, M. Nagasawa, et al. // *Blood.* – 2013. – Vol. 121. – № 16. – P. 3103–3111.

151. Kassianos A.J. Human CD1c (BDCA-1)⁺ myeloid dendritic cells secrete IL-10 and display an immuno-regulatory phenotype and function in response to *Escherichia coli* / A. J. Kassianos, M. Y. Hardy, X. Ju, et al. // *Eur. J. Immunol.* – 2012. – Vol. 42. – № 6. – P. 1512–1522.

152. Katakowski M. Tumorigenicity of cortical astrocyte cell line induced by the protease ADAM17 / M. Katakowski, F. Jiang, X. Zheng, et al. // *Cancer Sci.* – 2009. – Vol. 100. – № 9. – P. 1597–604.

153. Kataoka T. Concanamycin A, a powerful tool for characterization and estimation of contribution of perforin- and Fas-based lytic pathways in cell-mediated cytotoxicity / T. Kataoka, N. Shinohara, H. Takayama, et al. // *J. Immunol.* – 1996. – Vol. 156. – № 10. – P. 3678–3686.

154. Kataoka T. Acidification is essential for maintaining the structure and function of lytic granules of CTL. Effect of concanamycin A, an inhibitor of vacuolar type H⁺-ATPase, on CTL-mediated cytotoxicity / T. Kataoka, K. Takaku, J. Magae, et al. // *J. Immunol.* – 1994. – Vol. 153. – № 9. – P. 3938–3947.

155. Kato T. p55 and p 75 tumor necrosis factor receptor expression on human glioblastoma cells / T. Kato, Y. Sawamura, M. Tada, S. Sakuma, M. Sudo, H. Abe // *Neurol. Med. Chir. (Tokyo).* – 1995. – Vol. 35. – № 8. – P. 567–574.

156. Kawai T. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity / T. Kawai, S. Akira // *Immunity.* – 2011. – Vol. 34. – № 5. – P. 637–650.

157. Kelly J.M. Granzyme M mediates a novel form of perforin-dependent cell death / J. M. Kelly, N. J. Waterhouse, E. Cretney, et al. // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279. – № 21. – P. 22236–22242.

158. Kikuchi T. Results of a phase I clinical trial of vaccination of glioma patients with fusions of dendritic and glioma cells / T. Kikuchi, Y. Akasaki, M. Irie, et al. //

Cancer Immunol. Immunother. – 2001. – Vol. 50. – № 7. – P. 337–344.

159. Kim S.-S. Isolation and culturing of glioma cancer stem cells / S.-S. Kim, K. F. Pirollo, E. H. Chang // Curr. Protoc. cell Biol. – 2015. – Vol. 67. – P. 1-10.

160. Knight M.J. Analysis of FasL and TRAIL induced apoptosis pathways in glioma cells / M. J. Knight, C. D. Riffkin, A. M. Muscat, D. M. Ashley, C. J. Hawkins // Oncogene. – 2001. – Vol. 20. – № 41. – P. 5789–5798.

161. Kooyk Y. van A novel adhesion pathway that regulates dendritic cell trafficking and T cell interactions / Y. van Kooyk, T. B. H. Geijtenbeek // Immunol. Rev. – 2002. – Vol. 186. – P. 47–56.

162. Korthals M. Monocyte derived dendritic cells generated by IFN- α acquire mature dendritic and natural killer cell properties as shown by gene expression analysis / M. Korthals, N. Safaian, R. Kronenwett, et al. // J. Transl. Med. – 2007. – Vol. 5. – P. 46.

163. Koya T. Interferon- α -inducible dendritic cells matured with OK-432 exhibit TRAIL and Fas Ligand pathway-mediated killer activity / T. Koya, R. Yanagisawa, Y. Higuchi, K. Sano, S. Shimodaira // Sci. Rep. – 2017. – Vol. 7. – P. 42145.

164. Kru ger A. Human TLR8 senses UR/URR motifs in bacterial and mitochondrial RNA / A. Kru ger, M. Oldenburg, C. Chebrolu, et al. // EMBO Rep. – 2015. – Vol. 16. – № 12. – P. 1656–1663.

165. Kumar Hira S. Downregulation of endogenous STAT3 augments tumoricidal activity of interleukin 15 activated dendritic cell against lymphoma and leukemia via TRAIL / S. Kumar Hira, I. Mondal, D. Bhattacharya, P. P. Manna // Exp. Cell Res. – 2014. – Vol. 327. – № 2. – P. 192–208.

166. Kutsch C.L. Tumor necrosis factor- α induces interleukin-1 α and interleukin-1 receptor antagonist production by cultured human keratinocytes / C. L. Kutsch, D. A. Norris, W. P. Arend // J. Invest. Dermatol. – 1993. – Vol. 101. – № 1. – P. 79–85.

167. LaCasse C.J. Th-1 lymphocytes induce dendritic cell tumor killing activity by an IFN- γ -dependent mechanism / C. J. LaCasse, N. Janikashvili, C. B. Larmonier, et al. // J. Immunol. – 2011. – Vol. 187. – № 12. – P. 6310–6317.

168. Lafarge S. A flow cytometry technique to study intracellular signals NF- κ B and STAT3 in peripheral blood mononuclear cells / S. Lafarge, H. Hamzeh-Cognasse, P. Chavarin, et al. // BMC Mol. Biol. – 2007. – Vol. 8. – № 1 – P. 64. – doi:10.1186/1471-2199-8-64.

169. Lakomy D. Cytotoxic dendritic cells generated from cancer patients / D. Lakomy, N. Janikashvili, J. Fraszczak, et al. // J. Immunol. – 2011. – Vol. 187. – № 5. – P. 2775–2782.

170. Laks D.R. Neurosphere formation is an independent predictor of clinical outcome in malignant glioma / D. R. Laks, M. Masterman-Smith, K. Visnyei, et al. // Stem Cells. – 2009. – Vol. 27 – № 4 – P. 980–987.

171. Laman J.D. Drainage of cells and soluble antigen from the CNS to regional lymph nodes / J. D. Laman, R. O. Weller // *J. Neuroimmune Pharmacol.* – 2013. – Vol. 8. – № 4. – P. 840–856.
172. Langlet C. CD64 expression distinguishes monocyte-derived and conventional dendritic cells and reveals their distinct role during intramuscular immunization / C. Langlet, S. Tamoutounour, S. Henri, et al. // *J. Immunol.* – 2012. – Vol. 188. – № 4. – P. 1751–1760.
173. Laoui D. The tumour microenvironment harbours ontogenically distinct dendritic cell populations with opposing effects on tumour immunity / D. Laoui, J. Keirsse, Y. Morias, et al. // *Nat. Commun.* – 2016. – Vol. 7. – № 1. – doi:10.1038/ncomms13720.
174. Lapenta C. IFN- α -conditioned dendritic cells are highly efficient in inducing cross-priming CD8⁺ T cells against exogenous viral antigens / C. Lapenta, S. M. Santini, M. Spada, et al. // *Eur. J. Immunol.* – 2006. – Vol. 36. – № 8. – P. 2046–2060.
175. Lasky J.L. Autologous tumor lysate-pulsed dendritic cell immunotherapy for pediatric patients with newly diagnosed or recurrent high-grade gliomas / J. L. Lasky, E. H. Panosyan, A. Plant, et al. // *Anticancer Res.* – 2013. – Vol. 33. – № 5. – P. 2047–2056.
176. Lauterbach H. Mouse CD8 α ⁺ DCs and human BDCA3⁺ DCs are major producers of IFN- λ in response to poly IC / H. Lauterbach, B. Bathke, S. Gilles, et al. // *J. Exp. Med.* – 2010. – Vol. 207. – № 12. – P. 2703–2717.
177. Lavin Y. Innate immune landscape in early lung adenocarcinoma by paired single-cell analyses / Y. Lavin, S. Kobayashi, A. Leader, et al. // *Cell.* – 2017. – Vol. 169. – № 4. – P. 750–765.
178. Lavin Y. Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues / Y. Lavin, A. Mortha, A. Rahman, M. Merad // *Nat. Rev. Immunol.* – 2015. – Vol. 15. – № 12. – P. 731–744.
179. Laxmanan S. Vascular endothelial growth factor impairs the functional ability of dendritic cells through Id pathways / S. Laxmanan, S. W. Robertson, E. Wang, et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2005. – Vol. 334. – № 1. – P. 193–198.
180. Lee J.-K. Targeting the epithelial to mesenchymal transition in glioblastoma: the emerging role of MET signaling / J.-K. Lee, K. M. Joo, J. Lee, Y. Yoon, D.-H. Nam // *Onco. Targets. Ther.* – 2014. – Vol. 7. – P. 1933–1944.
181. Legrand F. Innate immune function of eosinophils / F. Legrand, G. Woerly, V. Driss, M. Capron // *Innate Immun.* – 2008. – P. 215–240.
182. León B. Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania* / B. León, M. López-Bravo, C. Ardavín // *Immunity* – 2007. – Vol. 26. – № 4. – P. 519–531.

183. Leplina O. Direct antitumor activity of interferon-induced dendritic cells of healthy donors and patients with primary brain tumors / O. Leplina, T. Tyrinova, M. Tikhonova, et al. // Glioma - Explor. Its Biol. Pract. Relev. – 2011. – P. 325–342.
184. Leplina O.Y. Interferon alpha induces generation of semi-mature dendritic cells with high pro-inflammatory and cytotoxic potential / O. Y. Leplina, T. V. Tyrinova, M. A. Tikhonova, A. A. Ostanin, E. R. Chernykh // Cytokine. – 2015. – Vol. 71. – № 1. – P. 1–7.
185. Li K. Expression of complement components, receptors and regulators by human dendritic cells / K. Li, H. Fazekasova, N. Wang, et al. // Mol. Immunol. – 2011. – Vol. 48. – № 9–10. – P. 1121–1127.
186. Li Y. Regulation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) receptors in a GM-CSF-dependent human myeloid leukemia cell line (AML-193) by interleukin-6 / Y. Li, F. Valeriote, B. Chen // Exp. Hematol. – 1996. – Vol. 24. – № 2. – P. 94–100.
187. Liao C.-T. Peritoneal macrophage heterogeneity is associated with different peritoneal dialysis outcomes / C.-T. Liao, R. Andrews, L. E. Wallace, et al. // Kidney Int. – 2017. – Vol. 91. – № 5. – P. 1088–1103.
188. Liao L.M. Dendritic cell vaccination in glioblastoma patients induces systemic and intracranial T-cell responses modulated by the local central nervous system tumor microenvironment / L. M. Liao, R. M. Prins, S. M. Kiertscher, et al. // Clin. Cancer Res. – 2005. – Vol. 11. – № 15. – P. 5515–5525.
189. Lichtner M. HIV Type 1-infected dendritic cells induce apoptotic death in infected and uninfected primary CD4 T lymphocytes / M. Lichtner, C. Marañón, O. Azocar, et al. // AIDS Res. Hum. Retroviruses. – 2004. – Vol. 20. – № 2. – P. 175–182.
190. Lieberman J. Granzyme A activates another way to die / J. Lieberman // Immunol. Rev. – 2010. – Vol. 235. – № 1. – P. 93–104.
191. Lindstedt M. Gene family clustering identifies functionally associated subsets of human in vivo blood and tonsillar dendritic cells / M. Lindstedt, K. Lundberg, C. A. K. Borrebaeck // J. Immunol. – 2005. – Vol. 175. – № 8. – P. 4839–4846.
192. Lipson E.J. Antagonists of PD-1 and PD-L1 in cancer treatment / E. J. Lipson, P. M. Forde, H.-J. Hammers, et al. // Semin. Oncol. – 2015. – Vol. 42. – № 4. – P. 587–600.
193. Liszewski M.K. Emerging roles and new functions of CD46 / M. K. Liszewski, C. Kemper, J. D. Price, J. P. Atkinson // Springer Semin. Immunopathol. – 2005. – Vol. 27. – № 3. – P. 345–358.
194. Liu K. In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis / K. Liu, G. D. Victora, T. A. Schwickert, et al. // Science. – 2009. – Vol. 324(5925). – P. 392–397.
195. Liu S. The involvement of TNF- α -related apoptosis-inducing ligand in the

enhanced cytotoxicity of IFN- β -stimulated human dendritic cells to tumor cells / S. Liu, Y. Yu, M. Zhang, W. Wang, X. Cao // *J. Immunol.* – 2001. – Vol. 166. – № 9. – P. 5407–5415.

196. Liu T. NF- κ B signaling in inflammation / T. Liu, L. Zhang, D. Joo, S.-C. Sun // *Signal Transduct. Target. Ther.* – 2017. – Vol. 2. – doi:10.1038/sigtrans.2017.23.

197. Liu Y. Intratumoral dendritic cells in the anti-tumor immune response / Y. Liu, X. Cao // *Cell. Mol. Immunol.* – 2015. – Vol. 12. – № 4. – P. 387–390.

198. Liu Y. Intratumoral administration of immature dendritic cells following the adenovirus vector encoding CD40 ligand elicits significant regression of established myeloma / Y. Liu, D. Xia, F. Li, C. Zheng, J. Xiang // *Cancer Gene Ther.* – 2005. – Vol. 12. – № 2. – P. 122–132.

199. Locksley R.M. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology / R. M. Locksley, N. Killeen, M. J. Lenardo // *Cell.* – 2001. – Vol. 104. – № 4. – P. 487–501.

200. Lozza L. Communication between human dendritic cell subsets in tuberculosis: requirements for naive CD4⁺ T cell stimulation / L. Lozza, M. Farinacci, M. Bechtle, et al. // *Front. Immunol.* – 2014. – Vol. 5(324) – doi:10.3389/fimmu.2014.00324.

201. Lu G. Innate direct anticancer effector function of human immature dendritic cells. II. Role of TNF, Lymphotoxin-1, Fas Ligand, and TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand / G. Lu, B. M. Janjic, J. Janjic, T. L. Whiteside, W. J. Storkus, N. L. Vujanovic // *J. Immunol.* – 2002. – Vol. 168. – № 4. – P. 1831–1839.

202. Lu L. Fas ligand (CD95L) and B7 expression on dendritic cells provide counter-regulatory signals for T cell survival and proliferation / L. Lu, S. Qian, P. A. Hershberger, et al. // *J. Immunol.* – 1997. – Vol. 158. – № 12. – P. 5676–5684.

203. Ma J.-H. Synergistic effects of interferon-alpha in combination with chemoradiation on human pancreatic adenocarcinoma / J.-H. Ma, E. Patrut, J. Schmidt, et al. // *World J. Gastroenterol.* – 2005. – Vol. 11. – № 10. – P. 1521–1528.

204. Macri C. Dendritic cell subsets / C. Macri, E. S. Pang, T. Patton, M. O’Keeffe // *Semin. Cell Dev. Biol.* – 2018. – Vol. 84. – P. 11–21.

205. Magnus T. Microglial expression of the B7 family member B7 homolog 1 confers strong immune inhibition: implications for immune responses and autoimmunity in the CNS / T. Magnus, B. Schreiner, T. Korn, et al. // *J. Neurosci.* – 2005. – Vol. 25. – № 10. – P. 2537–2546.

206. Mahrus S. Granzyme M is a regulatory protease that inactivates proteinase inhibitor 9, an endogenous inhibitor of Granzyme B / S. Mahrus, W. Kisiel, C. S. Craik // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279. – № 52. – P. 54275–54282.

207. Maltzan K. von Investigation of the role of TNF- α converting enzyme (TACE) in the inhibition of cell surface and soluble TNF- α production by acute ethanol

- exposure / K. von Maltzan, W. Tan, S. B. Pruetz // PLoS One. – 2012. – Vol. 7. – № 2. – e29890.
208. Mangani D. The network of immunosuppressive pathways in glioblastoma / D. Mangani, M. Weller, P. Roth // Biochem. Pharmacol. – 2017. – Vol. 130. – P. 1–9.
209. Manna P.P. IL-15 activated human peripheral blood dendritic cell kill allogeneic and xenogeneic endothelial cells via apoptosis / P. P. Manna, S. K. Hira, A. A. Das, S. Bandyopadhyay, K. K. Gupta // Cytokine. – 2013. – Vol. 61. – № 1. – P. 118–126.
210. Manna P.P. Human dendritic cell mediated cytotoxicity against breast carcinoma cells in vitro / P. P. Manna, T. Mohanakumar // J. Leukoc. Biol. – 2002. – Vol. 72. – № 2. – P. 312–320.
211. Matsui T. CD2 distinguishes two subsets of human plasmacytoid dendritic cells with distinct phenotype and functions / T. Matsui, J. E. Connolly, M. Michnevit, et al. // J. Immunol. – 2009. – Vol. 182. – № 11. – P. 6815–6823.
212. McDonnell A.M. Tumor antigen cross-presentation and the dendritic cell: where it all begins? / A. M. McDonnell, B. W. S. Robinson, A. J. Currie // Clin. Dev. Immunol. – 2010. – Vol. 2010. – P. 1–9.
213. McGovern N. Human dermal CD14+ cells are a transient population of monocyte-derived macrophages / N. McGovern, A. Schlitzer, M. Gunawan, et al. // Immunity. – 2014. – Vol. 41. – № 3. – P. 465–477.
214. McIlwain D.R. Caspase functions in cell death and disease / D. R. McIlwain, T. Berger, T. W. Mak // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. – 2013. – Vol. 5. – № 4. – a008656.
215. Merad M. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting / M. Merad, P. Sathe, J. Helft, J. Miller, A. Mortha // Annu. Rev. Immunol. – 2013. – Vol. 31. – № 1. – P. 563–604.
216. Messmer D. The global transcriptional maturation program and stimuli-specific gene expression profiles of human myeloid dendritic cells / D. Messmer, B. Messmer, N. Chiorazzi // Int. Immunol. – 2003. – Vol. 15. – № 4. – P. 491–503.
217. Mildner A. A Close Encounter of the Third Kind: monocyte-derived cells / A. Mildner, S. Yona, S. Jung // Adv. Immunol. – 2013. – Vol. 120. – 2013. – P. 69–103.
218. Min W. Fas ligand-transfected dendritic cells induce apoptosis of antigen-specific T cells / W. Min, X. Huang, R. Gorczynski, M. Catral // Transplant. Proc. – 2001. – Vol. 33. – № 1–2. – P. 234. – doi.org/10.1016/S0041-1345(00)01990-4.
219. Miyatake H. Impaired ability of interferon-alpha-primed dendritic cells to stimulate Th1-type CD4 T-cell response in chronic hepatitis C virus infection / H. Miyatake, T. Kanto, M. Inoue, et al. // J. Viral Hepat. – 2007. – Vol. 14. – № 6. – P. 404–412.

220. Mocellin S. Interferon alpha adjuvant therapy in patients with high-risk melanoma: a systematic review and meta-analysis / S. Mocellin, S. Pasquali, C. R. Rossi, D. Nitti // *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* – 2010. – Vol. 102. – № 7. – P. 493–501.
221. Mohty M. IFN- α skews monocyte differentiation into Toll-Like Receptor 7-expressing dendritic cells with potent functional activities / M. Mohty, A. Vialle-Castellano, J. A. Nunes, D. Isnardon, D. Olive, B. Gaugler // *J. Immunol.* – 2003. – Vol. 161. – № 12. – P. 6567–6574.
222. Morton E.R. Herpes simplex virus blocks Fas-mediated apoptosis independent of viral activation of NF- κ B in human epithelial HEp-2 cells / E. R. Morton, J. A. Blaho // *J. Interf. Cytokine Res.* – 2007. – Vol. 27. – № 5. – P. 365–376.
223. Munn D.H. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes / D. H. Munn, M. D. Sharma, D. Hou, et al. // *J. Clin. Invest.* – 2004. – Vol. 114. – № 2. – P. 280–290.
224. Muroi M. Effects of protease inhibitors on LPS-mediated activation of a mouse macrophage cell line (J774) / M. Muroi, Y. Muroi, N. Ito, N. R. Rice, T. Suzuki // *Innate Immun.* – 1995. – Vol. 2. – № 5. – P. 337–347.
225. Nagata S. Apoptosis by death factor / S. Nagata // *Cell.* – 1997. – Vol. 88. – № 3. – P. 355–365.
226. Nandagopal N. The critical role of IL-15-PI3K-mTOR pathway in natural killer cell effector functions / N. Nandagopal, A. K. Ali, A. K. Komal, S.-H. Lee // *Front. Immunol.* – 2014. – Vol. 5. – P. 187. – doi:10.3389/fimmu.2014.00187.
227. Nduom E.K. Immunosuppressive mechanisms in glioblastoma / E. K. Nduom, M. Weller, A. B. Heimberger // *Neuro. Oncol.* – 2015. – Vol. 17. – vii9-vii14.
228. Ni K. The role of dendritic cells in T cell activation / K. Ni, H. O'Neill // *Immunol. Cell Biol.* – 1997. – Vol. 75. – № 3. – P. 223–230.
229. O'Reilly E. The Janus face of death receptor signaling during tumor immunoediting / E. O'Reilly, A. Tirinci, S. E. Logue, E. Szegezdi // *Front. Immunol.* – 2016. – Vol. 7. – P. 446. – doi:10.3389/fimmu.2016.00446.
230. O'Keeffe M. Human dendritic cell subsets and function in health and disease / M. O'Keeffe, W. H. Mok, K. J. Radford // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2015. – Vol. 72. – № 22. – P. 4309–4325.
231. Očadlíková D. CD103 marks a subset of human CD34⁺-derived langerin⁺ dendritic cells that induce T-regulatory cells via indoleamine 2,3-dioxygenase-1 / D. Očadlíková, S. Trabanelli, V. Salvestrini, et al. // *Exp. Hematol.* – 2015. – Vol. 43. – № 4. – P. 268–276.
232. Ogbomo H. Myxoma virus infection promotes NK lysis of malignant gliomas in vitro and in vivo / H. Ogbomo, F. J. Zemp, X. Lun, E. Oldfield // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8. – № 6. – e66825.
233. Okada H. Induction of CD8⁺ T-cell responses against novel glioma-associated antigen peptides and clinical activity by vaccinations with α -type 1 polarized

dendritic cells and polyinosinic-polycytidylic acid stabilized by lysine and carboxymethylcellulose in patient / H. Okada, P. Kalinski, R. Ueda, et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2011. – Vol. 29. – № 3. – P. 330–336.

234. Okamoto Y. Cervical lymph nodes play the role of regional lymph nodes in brain tumour immunity in rats. / Y. Okamoto, J. Yamashita, M. Hasegawa, et al. // *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* – 1999. – Vol. 25. – № 2. – P. 113–122.

235. Ostrom Q.T. The epidemiology of glioma in adults: a “state of the science” review / Q. T. Ostrom, L. Bauchet, F. G. Davis, et al. // *Neuro. Oncol.* – 2014. – Vol. 16. – № 7. – P. 896–913.

236. Ostrom Q.T. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the united states in 2008-2012 / Q. T. Ostrom, H. Gittleman, J. Fulop, et al. // *Neuro. Oncol.* – 2015. – Vol. 17. – № suppl 4. – iv1-iv62.

237. Panda S.K. Plasmacytoid dendritic cells in autoimmunity / S. K. Panda, R. Kolbeck, M. A. Sanjuan // *Curr. Opin. Immunol.* – 2017. – Vol. 44. – P. 20–25.

238. Papewalis C. IFN- γ skews monocytes into CD56⁺-expressing dendritic cells with potent functional activities in vitro and in vivo / C. Papewalis, B. Jacobs, M. Wuttke, et al. // *J. Immunol.* – 2008. – Vol. 180. – № 3. – P. 1462–1470.

239. Paquette R.L. Interferon-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor differentiate peripheral blood monocytes into potent antigen-presenting cells / R. L. Paquette, N. C. Hsu, S. M. Kiertscher, et al. // *J. Leukoc. Biol.* – 1998. – Vol. 64. – № 3. – P. 358–367.

240. Parlato S. IFN- α regulates Blimp-1 expression via miR-23a and miR-125b in both monocytes-derived DC and pDC / S. Parlato, R. Bruni, P. Fragapane, et al. // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8. – № 8(8). – doi:10.1371/journal.pone.0072833.

241. Parlato S. Expression of CCR-7, MIP-3 β , and Th-1 chemokines in type I IFN-induced monocyte-derived dendritic cells: importance for the rapid acquisition of potent migratory and functional activities / S. Parlato, S. M. Santini, C. Lapenta, et al. // *Blood.* – 2001. – Vol. 98. – № 10. – P. 3022–3029.

242. Parney I. Cytokine and cytokine receptor mRNA expression in human glioblastomas: evidence of Th1, Th2 and Th3 cytokine dysregulation / I. Parney, K. Petruk, C. Hao, W. Roa, J. Turner, D. Ramsay // *Acta Neuropathol.* – 2002. – Vol. 103. – № 2. – P. 171–178.

243. Parsons D.W. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme / D. W. Parsons, S. Jones, X. Zhang, et al. // *Science.* – 2008. – Vol. 321. – № 5897. – P. 1807–1812.

244. Patel V.I. Transcriptional classification and functional characterization of human airway macrophage and dendritic cell subsets / V. I. Patel, J. L. Booth, E. S. Duggan, et al. // *J. Immunol.* – 2017. – Vol. 198. – № 3. – P. 1183–1201.

245. Paul Langerhans V. Xu Ueber die Nerven der menschlichen Haut / V. Paul

Langerhans, S. reed in Berlin // Archiv f. pathol. Anat. – 1868. – Vol. 44. – P. 325. – doi.org/10.1007/BF01959006.

246. Phuphanich S. Phase I trial of a multi-epitope-pulsed dendritic cell vaccine for patients with newly diagnosed glioblastoma / S. Phuphanich, C. J. Wheeler, J. D. Rudnick, et al. // Cancer Immunol. Immunother. – 2013. – Vol. 62. – № 1. – P. 125–135.

247. Pinto A. Plasmacytoid dendritic cells and their therapeutic activity in cancer / A. Pinto, A. Rega, T. R. Crother, R. Sorrentino // Oncoimmunology. – 2012. – Vol. 1. – № 5. – 726–734.

248. Pipkin M. Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works / M. Pipkin, J. Lieberman // Curr. Opin. Immunol. – 2007. – Vol. 19. – № 3. – P. 301–308.

249. Poole I.C. Le Langerhans cells and dendritic cells are cytotoxic towards HPV16 E6 and E7 expressing target cells / I. C. Le Poole, W. M. ElMasri, C. J. Denman, et al. // Cancer Immunol. Immunother. – 2008. – Vol. 57. – № 6. – P. 789–797.

250. Poot S.A.H. de Granzyme M: behind enemy lines / S. A. H. de Poot, N. Bovenschen // Cell Death Differ. – 2014. – Vol. 21. – № 3. – P. 359–368.

251. Popescu A.M. Targeting the VEGF and PDGF signaling pathway in glioblastoma treatment / A. M. Popescu, O. Alexandru, C. Brindusa, et al. // Int. J. Clin. Exp. Pathol. – 2015. – Vol. 8. – № 7. – P. 7825–7837.

252. Poulin L.F. DNGR-1 is a specific and universal marker of mouse and human Batf3-dependent dendritic cells in lymphoid and nonlymphoid tissues / L. F. Poulin, Y. Rey, H. Uronen-Hansson, et al. // Blood. – 2012. – Vol. 119. – № 25. – P. 6052–6062.

253. Poulin L.F. Characterization of human DNGR-1⁺ BDCA3⁺ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8 α ⁺ dendritic cells / L. F. Poulin, M. Salio, E. Griessinger, et al. // J. Exp. Med. – 2010. – Vol. 207. – № 6. – P. 1261–1271.

254. Prins R.M. Gene expression profile correlates with T-cell infiltration and relative survival in glioblastoma patients vaccinated with dendritic cell immunotherapy / R. M. Prins, H. Soto, V. Konkankit, et al. // Clin. Cancer Res. – 2011. – Vol. 17. – № 6. – P. 1603–1615.

255. Prins R.M. Comparison of glioma-associated antigen peptide-loaded versus autologous tumor lysate-loaded dendritic cell vaccination in malignant glioma patients / R. M. Prins, X. Wang, H. Soto, et al. // J. Immunother. – 2013. – Vol. 36. – № 2. – P. 152–157.

256. Proietto A. The equivalents of human blood and spleen dendritic cell subtypes can be generated in vitro from human CD34⁺ stem cells in the presence of fms-like tyrosine kinase 3 ligand and thrombopoietin / A. Proietto, D. Mittag, A. Roberts, N. Sprigg, L. Wu // Cell. Mol. Immunol. – 2012. – Vol. 9. – № 6. – P. 446–454.

257. Proietto A.I. Dendritic cells in the thymus contribute to T-regulatory cell induction / A. I. Proietto, S. van Dommelen, P. Zhou, et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2008. – Vol. 105. – № 50. – P. 19869–19874.
258. Qi Y. Elucidating the crosstalk mechanism between IFN-gamma and IL-6 via mathematical modelling / Y. Qi, Y. Huang, H. Wang, et al. // *BMC Bioinformatics.* – 2013. – Vol. 14. – P. 41. – doi:10.1186/1471-2105-14-41.
259. Qian B.-Z. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis / B.-Z. Qian, J. Li, H. Zhang, T. Kitamura, et al. // *Nature.* – 2011. – Vol. 475. – № 7355. – P. 222–225.
260. Reichert T.E. The number of intratumoral dendritic cells and zeta-chain expression in T cells as prognostic and survival biomarkers in patients with oral carcinoma / T. E. Reichert, C. Scheuer, R. Day, W. Wagner, T. L. Whiteside // *Cancer.* – 2001. – Vol. 91. – № 11. – P. 2136–2147.
261. Renner D. IB-10 * a duality of roles for perforin in CD8+ T cell- glioma interactions: contributions to cytotoxicity and altered vascular permeability / D. Renner, F. Jin, I. Parney, et al. // *Neuro. Oncol.* – 2014. – Vol. 16. – № suppl 5. – v109–v109.
262. Riboldi E. Engagement of BDCA-2 blocks TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells / E. Riboldi, R. Daniele, M. A. Cassatella, S. Sozzani, D. Bosisio // *Immunobiology.* – 2009. – Vol. 214. – № 9–10. – P. 868–876.
263. Rodero M.P. Detection of interferon alpha protein reveals differential levels and cellular sources in disease / M. P. Rodero, J. Decalf, V. Bondet, et al. // *J. Exp. Med.* – 2017. – Vol. 214. – № 5. – P. 1547–1555.
264. Rodrigues J.C. Normal human monocytes exposed to glioma cells acquire myeloid-derived suppressor cell-like properties / J. C. Rodrigues, G. C. Gonzalez, L. Zhang, G. Ibrahim, J. J. Kelly, M. P. Gustafson, Y. Lin, et al. // *Neuro. Oncol.* – 2010. – Vol. 12. – № 4. – P. 351–365.
265. Roux S. CD4+CD25+ Tregs control the TRAIL-dependent cytotoxicity of tumor-infiltrating DCs in rodent models of colon cancer / S. Roux, L. Apetoh, F. Chalmin, et al. // *J. Clin. Invest.* – 2008. – Vol. 118. – № 11. – P. 3751–3761.
266. Saggioro F.P. Fas, FasL, and cleaved caspases 8 and 3 in glioblastomas: a tissue microarray-based study / F. P. Saggioro, L. Neder, J. N. Stávale, et al. // *Pathol. - Res. Pract.* – 2014. – Vol. 210. – № 5. – P. 267–273.
267. Sakuma S. Responses of human glioblastoma cells to human natural tumor necrosis factor-?: Susceptibility, mechanism of resistance and cytokine production studies / S. Sakuma, Y. Sawamura, M. Tada, et al. // *J. Neurooncol.* – 1993. – Vol. 15. – № 3. – P. 197–208.
268. Sallusto F. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha / F. Sallusto, A.

- Lanzavecchia // J. Exp. Med. – 1994. – Vol. 179. – № 4. – P. 1109–1118.
269. Sallusto F. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation / F. Sallusto, P. Schaerli, P. Loetscher, et al. // Eur. J. Immunol. – 1998. – Vol. 28. – № 9. – P. 2760–2769.
270. Sanarico N. Human monocyte-derived dendritic cells differentiated in the presence of IL-2 produce proinflammatory cytokines and prime Th1 immune response / N. Sanarico, A. Ciaramella, A. Sacchi, et al. // J. Leukoc. Biol. – 2006. – Vol. 80. – № 3. – P. 555–562.
271. Sancho D. Tumor therapy in mice via antigen targeting to a novel, DC-restricted C-type lectin / D. Sancho, D. Mourão-Sá, O. P. Joffre, et al. // J. Clin. Invest. – 2008. – Vol. 118. – № 6. – P. 2098–2110.
272. Santini S.M. Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-Pbl-Scid mice / S. M. Santini, C. Lapenta, M. Logozzi, et al. // J. Exp. Med. – 2000. – Vol. 191. – № 10. – P. 1777–1788.
273. Sarina B. In vitro effects of IL-12 and IL-2 on NK cells, cytokine release and clonogenic activity in myelodysplastic syndromes (MDS) / B. Sarina, A. Cortelezzi, C. Cattaneo, et al. // Leukemia. – 1997. – Vol. 11. – P. 1726–1731.
274. Sathe P. Convergent differentiation: myeloid and lymphoid pathways to murine plasmacytoid dendritic cells / P. Sathe, D. Vremec, L. Wu, L. Corcoran, K. Shortman // Blood. – 2013. – Vol. 121. – № 1. – P. 11–19.
275. Schaefer U. TRAIL: a multifunctional cytokine / U. Schaefer, O. Voloshanenko, D. Willen, H. Walczak // Front. Biosci. – 2007. – Vol. 12. – P. 3813–3824.
276. Scheller J. ADAM17: a molecular switch to control inflammation and tissue regeneration / J. Scheller, A. Chalaris, C. Garbers, S. Rose-John // Trends Immunol. – 2011. – Vol. 32. – № 8. – P. 380–387.
277. Schlitzer A. Dendritic cells and monocyte-derived cells: Two complementary and integrated functional systems / A. Schlitzer, N. McGovern, F. Ginhoux // Semin. Cell Dev. Biol. – 2015. – Vol. 41. – P. 9–22.
278. Schlitzer A. IRF4 transcription factor-dependent CD11b⁺ dendritic cells in human and mouse control mucosal IL-17 cytokine responses / A. Schlitzer, N. McGovern, P. Teo, et al. // Immunity. – 2013. – Vol. 38. – № 5. – P. 970–983.
279. Schlitzer A. Identification of cDC1- and cDC2-committed DC progenitors reveals early lineage priming at the common DC progenitor stage in the bone marrow / A. Schlitzer, V. Sivakamasundari, J. Chen, et al. // Nat. Immunol. – 2015. – Vol. 16. – № 7. – P. 718–728.
280. Scholzen T. The Ki-67 protein: From the known and the unknown / T. Scholzen, J. Gerdes // J. Cell. Physiol. – 2000. – Vol. 182. – № 3. – P. 311–322.
281. Schreiber R.D. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in

- Cancer Suppression and Promotion / R. D. Schreiber, L. J. Old, M. J. Smyth // *Science*. – 2011. – Vol. 331. – № 6024. – P. 1565–1570.
282. Schug Z.T. BID is cleaved by caspase-8 within a native complex on the mitochondrial membrane / Z. T. Schug, F. Gonzalez, R. H. Houtkooper, F. M. Vaz, E. Gottlieb // *Cell Death Differ.* – 2011. – Vol. 18. – № 3. – P. 538–548.
283. Schultze J.L. Systems immunology allows a new view on human dendritic cells / J. L. Schultze, A. C. Aschenbrenner // *Semin. Cell Dev. Biol.* – 2019. – Vol. 86. – P. 15–23.
284. Scott C.L. CCR2+CD103– intestinal dendritic cells develop from DC-committed precursors and induce interleukin-17 production by T cells / C. L. Scott, C. C. Bain, P. B. Wright, et al. // *Mucosal Immunol.* – 2015. – Vol. 8. – № 2. – P. 327–339.
285. Sedger L.M. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants – past, present and future / L. M. Sedger, M. F. McDermott // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2014. – Vol. 25. – № 4. – P. 453–472.
286. See P. Mapping the human DC lineage through the integration of high-dimensional techniques / P. See, C.-A. Dutertre, J. Chen, et al. // *Science*. – 2017. – Vol. 356. – № 6342. – doi: 10.1126/science.aag3009
287. Segura E. Review of mouse and human dendritic cell subsets / E. Segura // *Methods Mo. Biol.* – 2016. – Vol. 1423. – P. 3–15.
288. Segura E. Inflammatory dendritic cells in mice and humans / E. Segura, S. Amigorena // *Trends Immunol.* – 2013. – Vol. 34. – № 9. – P. 440–445.
289. Segura E. Human inflammatory dendritic cells induce Th17 cell differentiation / E. Segura, M. Touzot, A. Bohineust, et al. // *Immunity*. – 2013. – Vol. 38. – № 2. – P. 336–348.
290. Shand F.H.W. Tracking of intertissue migration reveals the origins of tumor-infiltrating monocytes / F. H. W. Shand, S. Ueha, M. Otsuji, et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2014. – Vol. 111. – № 21. – P. 7771–7776.
291. Shi J. Activated human umbilical cord blood dendritic cells kill tumor cells without damaging normal hematological progenitor cells / J. Shi, K. Ikeda, N. Fujii, et al. // *Cancer Sci.* – 2005. – Vol. 96. – № 2. – P. 127–133.
292. Shi J. Identification of CD123+ myeloid dendritic cells as an early-stage immature subset with strong tumoristatic potential / J. Shi, K. Ikeda, Y. Maeda, et al. // *Cancer Lett.* – 2008. – Vol. 270. – № 1. – P. 19–29.
293. Shi W., Li Z.Y., Gong F.L., Xiong P. X.Y. Comparison of the cytotoxic effect induced by transmembrane and secreted TNF alpha / X. Y. Shi W., Li Z.Y., Gong F.L., Xiong P. // *Chinese J. Omi. Immunol.* – 1998. – Vol. 18. – P. 499–504.
294. Shibaki A. Activation through CD40 ligation induces functional Fas ligand expression by Langerhans cells / A. Shibaki, S. I. Katz // *Eur. J. Immunol.* – 2001. – Vol. 31. – № 10. – P. 3006–3015.

295. Shinohara H. Fas drives cell cycle progression in glioma cells via extracellular signal-regulated kinase activation / H. Shinohara, H. Yagita, Y. Ikawa, N. Oyaizu // *Cancer Res.* – 2000. – Vol. 60. – № 6. – P. 1766–1772.
296. Shiraki Y. Cytokine secretion profiles of human keratinocytes during *Trichophyton tonsurans* and *Arthroderma benhamiae* infections / Y. Shiraki, Y. Ishibashi, M. Hiruma, A. Nishikawa, S. Ikeda // *J Med Microbiol.* – 2006. – Vol. 55. – № Pt9. – P. 1175–1185.
297. Shortman K. Plasmacytoid dendritic cell development / K. Shortman, P. Sathe, D. Vremec, S. Naik, M. O’Keeffe // *Adv. Immunol.* – 2013. – Vol. 120. – P. 105–126.
298. Sichien D. Development of conventional dendritic cells: from common bone marrow progenitors to multiple subsets in peripheral tissues / D. Sichien, B. N. Lambrecht, M. Guillemins, C. L. Scott // *Mucosal Immunol.* – 2017. – Vol. 10. – № 4. – P. 831–844.
299. Sisirak V. Impaired IFN-production by plasmacytoid dendritic cells favors regulatory T-cell expansion that may contribute to breast cancer progression / V. Sisirak, J. Faget, M. Gobert, et al. // *Cancer Res.* – 2012. – Vol. 72. – № 20. – P. 5188–5197.
300. Smyth M.J. IL-8 gene expression and production in human peripheral blood lymphocyte subsets / M. J. Smyth, C. O. Zachariae, Y. Norihisa, et al. // *J. Immunol.* – 1991. – Vol. 146. – № 11. – P. 3815–3823.
301. Sood S.K. Osteoprotegerin (OPG) and related proteins (RANK, RANKL and TRAIL) in thyroid disease / S. K. Sood, S. Balasubramanian, S. Higham, M. Fernando, B. Harrison // *World J. Surg.* – 2011. – Vol. 35. – № 9. – P. 1984–1992.
302. Stry G. Tumoricidal activity of TLR7/8-activated inflammatory dendritic cells / G. Stry, C. Bangert, M. Tauber, et al. // *J. Exp. Med.* – 2007. – Vol. 204. – № 6. – P. 1441–1451.
303. Stry G. Plasmacytoid dendritic cells express TRAIL and induce CD4⁺ T-cell apoptosis in HIV-1 viremic patients / G. Stry, I. Klein, S. Kohlhofer, et al. // *Blood.* – 2009. – Vol. 114. – № 18. – P. 3854–3863.
304. Steinman R.M. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution / R. M. Steinman, Z. A. Cohn // *J. Exp. Med.* – 1973. – Vol. 137. – № 5. – P. 1142–1162.
305. Strbo N. Short-term cytolytic mediators’ expression in decidual lymphocytes is enhanced by interleukin-15 / N. Strbo, G. Laskarin, T. B. Crncic, et al. // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2006. – Vol. 55. – № 3. – P. 217–225.
306. Strle K. Interleukin-10 in the brain / K. Strle, J.-H. Zhou, W.-H. Shen, et al. // *Crit. Rev. Immunol.* – 2001. – Vol. 21. – № 5. – P. 427–449.
307. Süß G. A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis / G. Süß, K. Shortman // *J. Exp. Med.* – 1996. – Vol. 183. – № 4.

– P. 1789–1796.

308. Swiecki M. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells / M. Swiecki, M. Colonna // *Nat. Rev. Immunol.* – 2015. – Vol. 15. – № 8. – P. 471–485.

309. Tamang D.L. Induction of granzyme B and T cell cytotoxic capacity by IL-2 or IL-15 without antigens: Multiclonal responses that are extremely lytic if triggered and short-lived after cytokine withdrawal / D. L. Tamang, D. Redelman, B. N. Alves, et al. // *Cytokine.* – 2006. – Vol. 36. – № 3–4. – P. 148–159.

310. Tamoutounour S. Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin / S. Tamoutounour, M. Guillemins, F. Montanana Sanchis, et al. // *Immunity.* – 2013. – Vol. 39. – № 5. – P. 925–938.

311. Tang X. The advantages of PD1 activating chimeric receptor (PD1-ACR) engineered lymphocytes for PDL1(+) cancer therapy / X. Tang, Q. Li, Y. Zhu, et al. // *Am. J. Transl. Res.* – 2015. – Vol. 7. – № 3. – P. 460–473.

312. Tartaglia L.A. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death / L. A. Tartaglia, T. M. Ayres, G. H. W. Wong, D. V. Goeddel // *Cell.* – 1993. – Vol. 74. – № 5. – P. 845–853.

313. Thakkar J.P. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma / J. P. Thakkar, T. A. Dolecek, C. Horbinski, et al. // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* – 2014. – Vol. 23. – № 10. – P. 1985–1996.

314. Thomann S. Combined cytotoxic activity of an infectious, but non-replicative herpes simplex virus type 1 and plasmacytoid dendritic cells against tumour cells / S. Thomann, J. B. Boscheinen, K. Vogel, et al. // *Immunology.* – 2015. – Vol. 146. – № 2. – P. 327–338.

315. Thomson T.M. Expression of human nerve growth factor receptor on cells derived from all three germ layers / T. M. Thomson, W. J. Rettig, P. G. Chesa, et al. // *Exp. Cell Res.* – 1988. – Vol. 174. – № 2. – P. 533–539.

316. Tomiyama M. Mature dendritic cells are superior to immature dendritic cells in expanding antigen-specific naïve and memory CD8⁺ T cells / M. Tomiyama, M. Takahara, K. Egawa, M. Nieda // *Anticancer Res.* – 2004. – Vol. 24(5). – P. 3327–3333.

317. Trapani J.A. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway / J. A. Trapani, M. J. Smyth // *Nat. Rev. Immunol.* – 2002. – Vol. 2. – № 10. – P. 735–747.

318. Tyrinova T.V. Cytotoxic activity of ex-vivo generated IFN α -induced monocyte-derived dendritic cells in brain glioma patients / T. V. Tyrinova, O. Y. Leplina, S. V. Mishinov, et al. // *Cell. Immunol.* – 2013. – Vol. 284. – P. 146–153.

319. Udagawa M. Enhancement of immunologic tumor regression by intratumoral administration of dendritic cells in combination with cryoablative tumor pretreatment and bacillus calmette-guerin cell wall skeleton stimulation / M.

- Udagawa, C. Kudo-Saito, G. Hasegawa, et al. // Clin. Cancer Res. – 2006. – Vol. 12(24). – P. 7465–7475.
320. Vanderheyde N. Tumoricidal activity of monocyte-derived dendritic cells: evidence for a caspase-8-dependent, Fas-associated death domain-independent mechanism / N. Vanderheyde, E. Aksoy, Z. Amraoui, et al. // J. Immunol. – 2001. – Vol. 167. – № 7. – P. 3565–3569.
321. Vanderheyde N. Distinct mechanisms are involved in tumoristatic and tumoricidal activities of monocyte-derived dendritic cells / N. Vanderheyde, P. Vandenabeele, M. Goldman, F. Willems // Immunol. Lett. – 2004. – Vol. 91. – № 2–3. – P. 99–101.
322. Varol C. Intestinal lamina propria dendritic cell subsets have different origin and functions / C. Varol, A. Vallon-Eberhard, E. Elinav, et al. // Immunity. – 2009. – Vol. 31. – № 3. – P. 502–512.
323. Vento-Tormo R. IL-4 orchestrates STAT6-mediated DNA demethylation leading to dendritic cell differentiation / R. Vento-Tormo, C. Company, J. Rodríguez-Ubreva, et al. // Genome Biol. – 2016. – Vol. 17. – P. 4. – doi: 10.1186/s13059-015-0863-2.
324. Vidalain P.O. Measles virus induces functional TRAIL production by human dendritic cells / P. O. Vidalain, O. Azocar, B. Lamouille, et al. // J. Virol. – 2000. – Vol. 74. – № 1. – P. 556–559.
325. Vidalain P.O. Cytotoxic activity of human dendritic cells is differentially regulated by double-stranded RNA and CD40 ligand / P. O. Vidalain, O. Azocar, H. Yagita, C. Roubourdin-Combe, C. Servet-Delprat // J. Immunol. – 2001. – Vol. 167. – № 7. – P. 3765–3772.
326. Villani A.-C. Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors / A.-C. Villani, R. Satija, G. Reynolds, et al. // Science. – 2017. – Vol. 356. – № 6335. – doi: 10.1126/science.aah4573.
327. Walker D.G. T-cell apoptosis in human glioblastoma multiforme: Implications for immunotherapy / D. G. Walker, T. Chuah, M. J. Rist, M. P. Pender // J. Neuroimmunol. – 2006. – Vol. 175. – № 1–2. – P. 59–68.
328. Wang J. Nrf2 suppresses the function of dendritic cells to facilitate the immune escape of glioma cells / J. Wang, P. Liu, S. Xin, Z. Wang, J. Li // Exp. Cell Res. – 2017. – Vol. 360. – № 2. – P. 66–73.
329. Wang S.-S. miR-133a promotes TRAIL resistance in glioblastoma via suppressing death receptor 5 and activating NF- κ B signaling / S.-S. Wang, L. Feng, B.-G. Hu, et al. // Mol. Ther. Nucleic Acids. – 2017. – Vol. 8. – P. 482–492.
330. Watanabe-Fukunaga R. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis / R. Watanabe-Fukunaga, C. I. Brannan, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, S. Nagata // Nature. – 1992. – Vol. 356. – № 6367. – P. 314–317.

331. Watchmaker P.B. Comparative transcriptional and functional profiling defines conserved programs of intestinal DC differentiation in humans and mice / P. B. Watchmaker, K. Lahl, M. Lee, et al. // *Nat. Immunol.* – 2014. – Vol. 15. – № 1. – P. 98–108.
332. Wei B. The upregulation of programmed death 1 on peripheral blood T cells of glioma is correlated with disease progression / B. Wei, L. Wang, X. Zhao, et al. // *Tumor Biol.* – 2014. – Vol. 35. – № 4. – P. 2923–2929.
333. Wei J. Hypoxia potentiates glioma-mediated immunosuppression / J. Wei, A. Wu, L.-Y. Kong, et al. // *PLoS One.* – 2011. – Vol. 6. – № 1. – doi: 10.1371/journal.pone.0016195.
334. Westphal D. Building blocks of the apoptotic pore: how Bax and Bak are activated and oligomerize during apoptosis / D. Westphal, R. M. Kluck, G. Dewson // *Cell Death Differ.* – 2014. – Vol. 21. – № 2. – P. 196–205.
335. Wilmotte R. B7-homolog 1 expression by human glioma: a new mechanism of immune evasion / R. Wilmotte, K. Burkhardt, V. Kindler, et al. // *Neuroreport.* – 2005. – Vol. 16. – № 10. – P. 1081–1085.
336. Wilson T. Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics / T. Wilson, M. Karajannis, D. Harter // *Surg. Neurol. Int.* – 2014. – Vol. 5. – № 1. – P. 64. – doi:10.4103/2152-7806.132138.
337. Wischhusen J. HLA-E protects glioma cells from NKG2D-mediated immune responses in vitro: implications for immune escape in vivo / J. Wischhusen, M. A. Friese, M. Mittelbronn, R. Meyermann, M. Weller // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* – 2005. – Vol. 64. – № 6. – P. 523–528.
338. Wollenberg A. Expression and function of the mannose receptor CD206 on epidermal dendritic cells in inflammatory skin diseases / A. Wollenberg, T. Oppel, E.-M. Schottdorf, et al. // *J. Invest. Dermatol.* – 2002. – Vol. 118. – № 2. – P. 327–334.
339. Worah K. Proteomics of human dendritic cell subsets reveals subset-specific surface markers and differential inflammasome function / K. Worah, T. S. M. Mathan, T. P. Vu Manh, et al. // *Cell Rep.* – 2016. – Vol. 16. – № 11. – P. 2953–2966.
340. Wu A. Expression of MHC I and NK ligands on human CD133+ glioma cells: possible targets of immunotherapy / A. Wu, S. Wiesner, J. Xiao, et al. // *J. Neurooncol.* – 2007. – Vol. 83. – № 2. – P. 121–131.
341. Wu B. Diagnostic and prognostic value of a disintegrin and metalloproteinase-17 in patients with gliomas / B. Wu, L. Sha, Y. Wang, et al. // *Oncol. Lett.* – 2014. – Vol. 8. – № 6. – P. 2616–2620.
342. Wu P. TLR9/TLR7-triggered downregulation of BDCA2 expression on human plasmacytoid dendritic cells from healthy individuals and lupus patients / P. Wu, J. Wu, S. Liu, et al. // *Clin. Immunol.* – 2008. – Vol. 129. – № 1. – P. 40–48.

343. Yan J. Human polymorphonuclear neutrophils specifically recognize and kill cancerous cells / J. Yan, G. Kloecker, C. Fleming, et al. // *Oncoimmunology*. – 2014. – Vol. 3. – № 7. – doi:10.4161/15384101.2014.950163.
344. Yin X. Human blood CD1c⁺ dendritic cells encompass CD5^{high} and CD5^{low} subsets that differ significantly in phenotype, gene expression, and functions / X. Yin, H. Yu, X. Jin, et al. // *J. Immunol.* – 2017. – Vol. 198. – № 4. – P. 1553–1564.
345. Yoshio S. Human blood dendritic cell antigen 3 (BDCA3)⁺ dendritic cells are a potent producer of interferon- λ in response to hepatitis C virus / S. Yoshio, T. Kanto, S. Kuroda, et al. // *Hepatology*. – 2013. – Vol. 57. – № 5. – P. 1705–1715.
346. Young R.M. Current trends in the surgical management and treatment of adult glioblastoma / R. M. Young, A. Jamshidi, G. Davis, J. H. Sherman // *Ann. Transl. Med.* – 2015. – Vol. 3. – № 9. – P. 121. – doi:10.3978/j.issn.2305-5839.2015.05.10.
347. Yu J.S. Vaccination with Tumor Lysate-Pulsed Dendritic Cells Elicits Antigen-Specific, Cytotoxic T-Cells in Patients with Malignant Glioma / J. S. Yu, G. Liu, H. Ying, et al. // *Cancer Res.* – 2004. – Vol. 64. – № 14. – P. 4973–4979.
348. Yu J.S. Vaccination of malignant glioma patients with peptide-pulsed dendritic cells elicits systemic cytotoxicity and intracranial T-cell infiltration / J. S. Yu, C. J. Wheeler, P. M. Zeltzer, et al. // *Cancer Res.* – 2001. – Vol. 61. – № 3. – P. 842–847.
349. Yu M. Influence of reverse signaling via membrane TNF- α on cytotoxicity of NK92 cells / M. Yu, W. Shi, J. Zhang, et al. // *Eur. J. Cell Biol.* – 2009. – Vol. 88. – № 3. – P. 181–191.
350. Yu Y. Involvement of tumour necrosis factor-alpha-related apoptosis-inducing ligand in enhanced cytotoxicity of lipopolysaccharide-stimulated dendritic cells to activated T cells / Y. Yu, S. Liu, W. Wang, et al. // *Immunology*. – 2002. – Vol. 106. – № 3. – P. 308–315.
351. Zaba L.C. Psoriasis is characterized by accumulation of immunostimulatory and Th1/Th17 cell-polarizing myeloid dendritic cells / L. C. Zaba, J. Fuentes-Duculan, N. J. Eungdamrong, et al. // *J. Invest. Dermatol.* – 2009. – Vol. 129. – № 1. – P. 79–88.
352. Zeng J. Anti-PD-1 blockade and stereotactic radiation produce long-term survival in mice with intracranial gliomas / J. Zeng, A. P. See, J. Phallen, et al. // *Int. J. Radiat. Oncol.* – 2013. – Vol. 86. – № 2. – P. 343–349.
353. Zhang L. Plasmacytoid dendritic cells mediate synergistic effects of HIV and lipopolysaccharide on CD27⁺ IgD⁺ memory B cell apoptosis / L. Zhang, Z. Luo, S. F. Sieg, et al. // *J. Virol.* – 2014. – Vol. 88. – № 19. – P. 11430–11441.
354. Zheng X. ADAM17 promotes glioma cell malignant phenotype / X. Zheng, F. Jiang, M. Katakowski, Y. Lu, M. Chopp // *Mol. Carcinog.* – 2012. – Vol. 51. – № 2. – P. 150–164.
355. Zuckerman S.H. Endotoxin tolerance: In vivo regulation of tumor necrosis factor and interleukin-1 synthesis is at the transcriptional level / S. H. Zuckerman,

G. F. Evans // Cell. Immunol. – 1992. – Vol. 140. – № 2. – P. 513–519.