

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

доктора биологических наук

Новосибирск

2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (НИИФКИ)

Научный консультант:

доктор медицинских наук,
профессор, член-корреспондент РАН

Черных Елена Рэмовна

Официальные оппоненты:

Миронова Надежда Львовна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии нуклеиновых кислот, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» Сибирского отделения Российской академии наук

Повещенко Ольга Владимировна, доктор медицинских наук, заведующая лабораторией клеточных технологий, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»

Балдуева Ирина Александровна, доктор медицинских наук, заведующая научным отделом онкоиммунологии, Федеральное государственное бюджетное учреждение "Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», г. Томск

Защита диссертации состоится «___» _____ 2019 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 001.001.01 НИИФКИ по адресу:

630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИИФКИ и на сайте <http://www.niikim.ru/ru/диссовет/объявления-диссовета>

Автореферат разослан «___» _____ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

кандидат медицинских наук



Хантакова Юлия Николаевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Дендритные клетки (ДК) играют ключевую роль в противоопухолевом иммунном ответе, обладая способностью презентировать опухолевые антигены наивным Т-клеткам и индуцировать генерацию цитотоксических CD8⁺ Т-лимфоцитов [Ni K. et al., 1997; Austyn J.M., 1998]. Проведенные за последние 20 лет исследования показали, что наряду с антигенпрезентирующей функцией и способностью индуцировать иммунный ответ ДК наделены киллерной функцией, т.е. способны непосредственно вызывать гибель опухолевых клеток [Fanger N.A. et al., 1999; Hira S.K. et al., 2015]. Однако эта функция ДК является наименее изученной и вызывает много вопросов относительно ее роли в противоопухолевом иммунном ответе.

Противоопухолевая цитотоксическая активность ДК реализуется через два основных механизма (грануло- и рецепторно-опосредованные механизмы), характерных для профессиональных цитотоксических клеток (NK-клеток, цитотоксических CD8⁺ Т-лимфоцитов). Первый механизм связан с высвобождением из литических гранул ДК цитотоксических медиаторов перфорина и гранзима Б [Korthals M. et al., 2007; Stary G. et al., 2007; Bergh J. et al., 2014], второй – с экспрессией на поверхности ДК цитотоксических молекул семейства фактора некроза опухоли (TNF α , FasL, TRAIL и др.), взаимодействие которых с соответствующими рецепторами на опухолевых клетках вызывает гибель клеток-мишеней [Fanger N.A. et al., 1999; Lu G. et al., 2002; Korthals M. et al., 2007; Koya T. et al., 2017].

Различные типы ДК (миелоидные ДК, плазмцитоподобные ДК, ДК моноцитарного происхождения) характеризуются разным профилем экспрессии цитотоксических лигандов и, соответственно, разными механизмами реализации цитотоксической активности [Stary G. et al., 2007]. Кроме того, цитотоксический потенциал ДК может определяться типом самих клеток-мишеней и их чувствительностью к тем или иным механизмам лизиса [Stary G. et al., 2007; Tyrinova T. et al., 2013], а также регулироваться различными активационными стимулами (интерфероны (IFN) I типа, IL-15, IL-3, лиганды к паттерн-распознающим рецепторам TLR, в том числе липополисахарид, одно- и двуцепочечные РНК, метилированные CpG-олигонуклеотиды) [Fanger N.A. et al., 1999; Liu S. et al., 2001; Vidalain P.O. et al., 2001; Chaperot L. et al., 2006; Bratke K. et al., 2010; Lakomy D. et al., 2011; Manna P.P. et al., 2013].

Поскольку естественным «системным резервуаром» клеток-предшественников для ДК являются моноциты, значительная часть ДК в зоне опухолевого микроокружения имеет моноцитарное происхождение. Традиционными моделями для изучения таких ДК *in vitro* являются культуры ДК, генерированные из моноцитов в присутствии GM-CSF и IL-4 (ИЛ4-ДК) [Sallusto F. et al., 1994]. Вместе с тем, важную роль в генерации моноцитарных ДК играют интерфероны I типа, и прежде всего IFN α , который представляет сигнал опасности

и продуцируется большинством клеток в ответ на воспалительные стимулы [González-Navajas J.M. et al., 2012]. IFN α способен вызывать быструю дифференцировку циркулирующих моноцитов в ДК [Gessani S. et al., 2014]. Причем IFN α и активированные им транскрипционные факторы (STAT1, IRF7, ISGF3 и др.) контролируют не только большинство генов, участвующих в дифференцировке ДК [Gessani S. et al., 2014], но и генов цитотоксических молекул (TRAIL, перфорина и гранзимов) [Korthals M. et al, 2007]. Дифференцированные в присутствии IFN α ДК (ИФН-ДК) представляют уникальную популяцию ДК, которые отличаются от ИЛ4-ДК более выраженной антигенпрезентирующей способностью, большей миграционной активностью, а также более стабильным фенотипом [Paquette R.L. et al., 1998; Santini S.M. et al., 2000; Lapenta C. et al., 2006; Jin Z. et al., 2017]. Кроме того, ИФН-ДК обладают цитотоксической активностью против различных опухолевых линий, экспрессируют широкий спектр цитотоксических лигандов (TNF α , TRAIL, FasL, перфорин), а также секретируют гранзим Б, который почти не продуцируется ИЛ4-ДК [Korthals M. et al, 2007; Koya T. et al., 2017].

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, 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 [Tyrtanova T.V. et al., 2013].

Учитывая, что глиобластома, несмотря на комплексное лечение, характеризуется крайне неблагоприятным прогнозом [Hanif F. et al., 2017], можно предположить, что агрессивное течение опухолевого процесса при глиомах высокой степени злокачественности сопряжено с дефектом эффекторной функции ДК. Тем не менее, многие вопросы остаются открытыми. Так, до настоящего времени не исследовано, способны ли ИФН-ДК больных злокачественными глиомами проявлять цитотоксическую активность против аутологических опухолевых клеток, какие механизмы реализации этой функции являются доминирующими, а также насколько критичным может быть обнаруженный селективный дефект TNF α -опосредованного механизма цитотоксичности ИФН-ДК больных в отношении аутологических опухолевых клеток. Из данных литературы известно, что продуцируемые злокачественными глиомами растворимые факторы ингибируют созревание ДК и их антигенпрезентирующую способность [Wang J. et al., 2017]. Однако, способны ли компоненты секрета глиомных клеток подавлять цитотоксичность ДК, в том числе связанную с TNF α -опосредованным механизмом лизиса, остается неисследованным. С другой стороны, большой 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.

Учитывая изложенные выше факты была сформулирована **цель работы**: охарактеризовать тумороцидную функцию IFN 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-R-, 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 α , 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 α /TNF-R1-, FasL/Fas-, TRAIL/TRAIL-R2-зависимых) механизмов, так и перфорин/гранзим Б-зависимого механизма. При этом грануло-зависимый и TNF α /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 α /TNF-R1-опосредованной цитотоксичности. Селективный дефект TNF α -опосредованного механизма цитотоксичности ИФН-ДК обусловлен низкой экспрессией мембранной формы TNF α в результате снижения экспрессии гена *TNF α* и возрастания экспрессии и активности TNF α -конвертирующего фермента. Блокирование TNF α -конвертирующего фермента повышает экспрессию мембранной формы TNF α 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 α -опосредованную цитотоксическую активность ИФН-ДК. При этом показано, что низкая экспрессия мембранной формы TNF α 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 реализации 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. Продemonстрированная 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 TNF α в реализации цитотоксической активности ИФН-ДК. Кроме того, данные о влиянии растворимых факторов, продуцируемых клетками глиобластомы, на TNF α -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 со 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.

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 TNF α /TNF-R1-зависимые механизмы.
3. Снижение цитотоксической активности ИФН-ДК больных против аутологичных глиобластомных клеток обусловлено дефектностью TNF α /TNF-R1-зависимого механизма лизиса вследствие нарушения экспрессии мембранной формы TNF α 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 TNF α .

Степень достоверности, апробация результатов и личный вклад автора

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), а также современными 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-й ежегодной конференции Европейского научного сообщества по макрофагам и дендритным клеткам (Амстердам, Голландия, 2016 г.), 14-м (Шанхай, Китай, 2016 г.) и 15-м (Ахен, Германия, 2018 г.) международных симпозиумах 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.

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», грантов РФФИ №14-04-00446, №16-34-00711, 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, 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.

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.

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.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Характеристика пациентов. Диссертационная работа основана на выполненных за период 2012–2019 гг. результатах клинико-иммунологического обследования 109 больных внутримозговыми глиальными опухолями (62 мужчины и 47 женщин) в возрасте от 21 до 75 лет (медиана 51,5 года), которые были прооперированы и наблюдались в клинике нейрохирургии ФГБУ «Новосибирский НИИ травматологии и ортопедии» Минздрава РФ и Федерального нейрохирургического центра Минздрава РФ (г. Новосибирск). У 80 пациентов (74 %) была диагностирована гистологически верифицированная глиобластома (по классификации ВОЗ Grade IV), у 22 пациентов (20 %) – анапластическая астроцитома (Grade III), у 7 пациентов (6 %) – глиальные опухоли низкой степени злокачественности (Grade I-II). 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.

Генерация ДК. ДК генерировали путем культивирования адгезивной к пластику фракции моноклеарных клеток (МНК), выделенных из периферической крови в градиенте плотности фиколла-урографина ($\rho = 1,077$), в присутствии GM-CSF (Sigma-Aldrich, 40 нг/мл), IFN α (Роферон-А, Roche, Швейцария 1000 Ед/мл) и 2,5% сыворотки крови плодов коровы (БиолоТ, Санкт-Петербург) при 37 °С в CO₂-инкубаторе при 5 % CO₂ в течение 4 суток с последующим добавлением на 24 ч в качестве дозревающего стимула липополисахарида (ЛПС E.colli 0114:B4, Sigma-Aldrich, 10 мкг/мл). Жизнеспособность ДК (при окрашивании трипановым синим) составляла 93 – 95 %, клеточный выход – $(0,13 \pm 0,1) \times 10^6$ ДК/ 10^6 МНК.

В отдельной серии экспериментов ИФН-ДК на этапе созревания стимулировали рекомбинантным интерлейкином 2 (rIL-2, 50 ЕД/мл) или двуцепочечной ДНК человека (5 мкг/мл).

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

Опухолевые линии. Первичные культуры клеток глиальных опухолей головного мозга получали путем механической и последующей ферментативной (0,3 % коллагеназы I, Sigma-Aldrich) дезагрегации фрагмента ткани опухоли пациентов с гистологически верифицированными глиобластомой (Grade IV, n = 36), анапластической астроцитомой (Grade III, n = 5) и глиомами низкой степени злокачественности (Grade I-II; n = 7). Полученную суспензию клеток культивировали при 37 °C и 5 % CO₂ в среде DMEM/F-12 (Gibco, UK), дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 5мМ HEPES-буфера, 10⁻⁴ М меркаптэтанола, 100 мкг/мл гентамицина и 10 % FBS, обновляя питательную среду два раза в неделю до момента достижения субконфлюэнтного роста адгезивных клеток, 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 (Sigma-Aldrich) и 0,02 % ЭДТА (ICN, США) и продолжали вести как опухолевые клеточные линии (n = 13) в полной культуральной среде. Количество пассажей для клеточных линий варьировало от 3 до 7. Для получения нейросфер клетки первичной культуры после первого пассирования культивировали во флаконах (25 см³) в среде DMEM/F-12 (Gibco, UK), 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, ОАО «Синтез» Курган, Россия), N-2 Supplement (100 \times , Gibco, UK), B-27TM Supplement (50 \times , Gibco, UK) со сменой среды (1/3) каждые 7–10 дней. Диссоциацию образующихся агрегатов клеток в виде нейросфер в процессе пассирования культур проводили посредством 0,25 % трипсина и 0,02 % ЭДТА.

Клетки глиобластомы человека линии U-87 и эпителиальной карциномы гортани человека линии HEP-2 культивировали в среде α MEM (БиолоТ, Санкт-Петербург), дополненной 100 мкг/мл гентамицина и 10 % FBS при 37 °C и 5 % CO₂ с пассированием при достижении субконфлюэнтного роста (70 – 80 %)

Исследование субпопуляций клеток методом проточной цитофлуориметрии. Определение относительного содержания субпопуляций клеток, экспрессирующих поверхностные маркеры, проводили в соответствии с методикой Becton Dickinson, используя коммерческие моноклональные антитела, конъюгированные с флуоресцентными метками (флуоресцеинизотиоцианат (FITC), фикоэритрин (PE), перидининхлорофилл протеин (PerCP) или аллофикоцианин (APC)). В качестве негативного контроля использовали изотипические антитела, конъюгированные с аналогичными флуорохромами.

Для оценки внутриклеточных молекул проводили процедуру пермеабиллизации клеток, используя коммерческий набор растворов для фиксации/пермеабиллизации Transcription Factor Buffer Set (Becton Dickinson, США) и соответствующие моноклональные антитела, конъюгированные с флуоресцентными метками. В качестве негативного контроля использовали изотипические антитела, конъюгированные с аналогичными флуорохромами. Протоколы подготовки проб для определения поверхностной и/или внутриклеточной экспрессии молекул завершали фиксацией клеток путем добавления к клеточной суспензии 0,4–0,5 мл раствора FACS Lyse (Becton Dickinson, США), после чего определяли экспрессию молекул на лазерном клеточном сортире-анализаторе FACSCalibur (Becton Dickinson, США) с использованием программы Cell Quest (Becton Dickinson, США). Процент позитивных клеток, экспрессирующих соответствующие маркеры, рассчитывался на 10 000 клеток.

Фенотип ДК оценивали по экспрессии поверхностных молекул, используя флуорохром-меченые моноклональные антитела (BD PharMingen, США; R&D Systems, США) к антигенам TNF α (APC), FasL (PE), TRAIL (PE), CD107a (APC) или TACE (APC). Для исключения возможности связывания комплекса sTNF α -TNF-R с моноклональными анти-TNF α -антителами ДК предварительно обрабатывали (в течение 15 мин в темноте при комнатной температуре) глициновым буфером Gly-HCl (pH=3,0). Для ингибирования транспорта молекул и предотвращения интернализации комплекса CD107a с PerCP-анти-CD107a антителами одновременно с моноклональными антителами в культуры ДК добавляли монензин А (10^{-3} М, BD PharMingen, США). Относительное количество ДК, экспрессирующих анализируемые маркеры, оценивали среди HLA-DR⁺ клеток (FITC или PerCP).

Для оценки внутриклеточной экспрессии CD107a, гранзима Б, перфорина и активной формы pNF- κ B p65 ИФН-ДК инкубировали с FITC-конъюгированными анти-HLA-DR-антителами (BD PharMingen, США) согласно стандартной методике для определения поверхностных антигенов. Далее ДК инкубировали с APC-конъюгированными анти-CD107a- (BD PharMingen, США), PE-конъюгированными анти-гранзим Б- (BD PharMingen, США), анти-перфорин- (BioLegend, США) или анти-pNF- κ B p65- (Santa Cruz Biotechnology, США) антителами, используя методику оценки экспрессии внутриклеточных молекул. За час до проведения цитометрического анализа активной формы pNF- κ B p65 в пробы добавляли ядерный краситель 7-AAD (1 мг/мл клеток раствора 7-AAD в 3ФР; BioLegend, США) для исключения из анализа погибших клеток. Относительное количество ДК, экспрессирующих внутриклеточные молекулы, оценивали среди HLA-DR⁺ клеток.

Фенотип опухолевых клеток. Оценку поверхностной экспрессии молекул на клетках опухолевых линий проводили согласно стандартной методике после процедуры пассирования 0,25 % раствором трипсина/ЭДТА, используя FITC-, PE-, PerCP- или APC-меченные моноклональные анти-HLA-DR-, анти-CD73-, анти-CD271-, анти-Fas, анти-TRAIL-R2-антитела (все BD PharMingen, США), APC-меченные анти-CD133- (MACS[®], США), APC-меченные-анти-TNF-R1- и PE-

меченные анти-TNF-R2- (R&D Systems, США) антитела. Для оценки пролиферативной активности опухолевых клеток использовали РЕ-конъюгированные моноклональные анти-Ki-67-антитела (BD PharMingen, США) согласно методике оценки экспрессии внутриклеточных молекул.

Исследование продукции растворимых факторов

Определение продукции sTNF α . Концентрацию продуцируемого цитокина TNF α в супернатантах ИФН-ДК определяли методом иммуноферментного анализа, используя соответствующую тест-систему («Вектор-Бест», Россия). Анализ уровня продукции sTNF α в цельных супернатантах культур ИФН-ДК проводился в пересчете на 10^5 ДК.

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, FGF-basic, G-CSF, GM-CSF, IFN γ , IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF-BB, RANTES, TNF α , VEGF) в супернатантах первичных культур опухоли пациентов, 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/ 10^6 клеток.

Исследование цитотоксической активности ДК

MTT-тест. Клетки глиобластомных линий, полученных из первичных культур опухоли пациентов, а также линий U-87 и Нер-2 (5×10^4 /лунку) культивировали с ИФН-ДК в 96-луночных плоскодонных планшетах в течение 24 ч в соотношении эффе́ктор:мишень 1:1. За 3-4 ч до окончания инкубации в лунки вносили по 20 мкл раствора желтого бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-тетразолия (MTT, 5 мг/мл Sigma-Aldrich, Германия), после чего планшеты центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 мин, удаляли супернатант и добавляли по 150 мкл диметилсульфоксида (ДМСО, MP Boimedicals, LLC, Франция). Через 30 мин после полного растворения 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: $[1 - (\text{ОПэ} + \text{м} - \text{ОПэ}) / \text{ОПм}] \times 100$, где ОПэ+м – значение оптической плотности в опытных сериях; ОПэ – значение оптической плотности в лунках с эффе́кторами; ОПм – значение оптической плотности в лунках с мишенями

Для изучения роли отдельных рецепторов и медиаторов в реализации цитотоксической активности ИФН-ДК доноров 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).

Детекция апоптоза в опухолевых клетках. Опухолевые клетки, предварительно меченные витальным красителем CFSE (2 мкМ; Molecular probes, США), инкубировали в 96-луночных планшетах (10^4 /лунку) в присутствии ИФН-ДК в соотношении ДК:опухолевые клетки 10:1 в течение 18 ч. По окончании инкубации пробы переносили в цитометрические пробирки и исследовали апоптоз методом проточной цитометрии с помощью коммерческого набора AnnexinV-APC в комбинации с ДНК красителем PI согласно инструкции производителя (BioLegend, США) в гейте CFSE-позитивных клеток.

Дегрануляция ДК. Для определения уровня дегрануляции ИФН-ДК доноров инкубировали в 96-луночных планшетах (10^5 /лунку) в присутствии предварительно меченных CFSE (2 мкМ) клеток глиобластомной линии, полученной из первичной культуры пациента #6 (ГБ#6), в соотношении ДК:опухолевые клетки 10:1 в течение 18 ч. Для предупреждения интернализации CD107a в культуры клеток вместе с PerCP-анти-CD107a антителами также добавляли 10^{-3} М монензина А. 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).

Определение уровня экспрессии мРНК TNFa в ДК. Из образцов ДК через 2 ч после стимуляции ЛПС выделяли тотальную РНК с помощью коммерческого набора «РИБО-золь-В» (ФГУН ГИСК, Россия) согласно инструкции производителя. Количество РНК определяли на спектрофотометре Nanodrop ND-100 (NanoDrop Technologies, Inc., США). Реакцию обратной транскрипции для синтеза кДНК на матрице мРНК проводили с использованием амплификатора C1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad Inc.) и набора MMLV RT kit (Евроген) по протоколу производителя. Праймеры были подобраны с помощью программы "Vector NTI" и синтезированы фирмой ООО «БИОССЕТ». В качестве референсного гена использовали ген "домашнего хозяйства" большой субъединицы Р0 кислого рибосомного фосфорилированного белка (*RPLP0*). Последовательности праймеров, использованных при проведении количественных ПЦР в реальном времени (for – прямой праймер, rev – обратный праймер):

TNFa-for 5`- CCAATGGCGTGGAGCTGAGA - 3`

TNFa-rev 5`- TGATGGTGTGGGTGAGGAGCAC - 3`

RPLP0-for 5`- AGGCCTTCTTGGCTGATCCATCT - 3`

RPLP0-rev 5`- TATCCTCGTCCGACTCCTCCGA - 3`

ПЦР в реальном времени проводили в 96-ти луночных планшетах с помощью реагентов SYBR® Green PCR Master Mix на приборе ViiA™ (Applied Biosystems, США). Условия реакции включали первоначальную денатурацию (95°C) и последующие 40 циклов репликации (95 °C 15 сек, 58 °C 30 сек, 72 °C 60 сек). 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. Относительный уровень экспрессии гена *TNFa* определяли методом сравнения пороговых уровней

амплификации ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). В качестве группы контроля были использованы ДК здоровых доноров, в которых уровень экспрессии целевого гена *TNFα* принимался за 1. Значения порогового цикла (Ct) рассчитывали как среднее значение триплетов каждого образца по формуле $\Delta\Delta Ct(1,2) = (Ct\ TNF\alpha - Ct\ RPLP0)_1 - (Ct\ TNF\alpha - Ct\ RPLP0)_2$, где 1 – больные, 2 – контроль.

Определение активности фермента *TNFα*-конвертирующего фермента (TACE). Активность фермента TACE в ДК оценивали с помощью коммерческого набора SensoLyte®520 TACE Activity Assay Kit (Anaspec, Inc, Fremont, CA) согласно инструкции производителя. Субстратом для фермента выступал FRET (fluorescence resonance energy transfer)-пептид, содержащий специфичные для TACE сайты протеолитического расщепления и метки-красители QXL™520, гасящие флуоресценцию донора 5-FAM (флуоресцеина). Расщепление субстрата активным ферментом, сопровождаемое восстановлением флуоресценции 5-FAM, регистрировалось на спектрофлуориметре в спектре возбуждения/испускания 490нм/520нм. Тестируемые образцы представляли лизаты ДК, которые получали путем инкубации ДК в течение 10 мин при 4 °С в буферном растворе (Component C), содержащем 0,1 % (v/v) Triton-X 100 (Sigma Aldrich, США), с последующим центрифугированием в течение 10 мин при $2500 \times g$, 4 °С. Собранные супернатанты хранили при -80 °С до проведения теста. Параллельно со спектрофлуориметрическим анализом оценивали методом Бредфорд количество белка в образцах лизатов ДК. Результаты исследования активности фермента TACE рассчитывались в виде количества относительных флуоресцентных единиц к 1 мкг белка в образце (RFU/мкг белка).

Статистическая обработка полученных результатов. Математическая обработка полученных результатов проводилась методами описательной и непараметрической статистики с использованием программы «STATISTICA 6.0» и «GraphPad Prism 8». Таблицы и рисунки содержат информацию в виде средних арифметических величин (\bar{m}) и стандартной ошибки средних (SE), а также значений медианы (Me), интерквартильного диапазона и (IQR; LQ – UQ) и значений минимума – максимума (Min – max). Для выявления значимых различий использовали непараметрические критерии: W-критерий Вилкоксона для связанных, парных выборок и U-критерий Манна-Уитни – для независимых выборок. 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 Prism 8».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения цитотоксической активности ДК против глиобластомных клеток первоначально из фрагментов опухоли пациентов с гистологически верифицированной глиобластомой были получены клеточные линии. Несмотря на

то, что глиобластомные клетки первичных культур сохраняют специфические свойства самой опухоли, пролиферация клеток в таких культурах снижена, что ограничивает возможность проведения различных исследований. В то же время пассирование первичных культур позволяет увеличить количество опухолевых клеток и получить морфологически однородные клеточные популяции (линии), которые в течение первых восьми пассажей характеризуются низкой мутационной нагрузкой и слабой способностью к формированию неоантигенов [Garg A. et al., 2017], сохраняя генетические характеристики исходной опухоли [Howley R. et al., 2012]. Контрольными культурами служили клетки иммортализованной глиобластомной линии человека U-87.

Полученные из первичных культур опухолевых клеток пациентов 13 глиобластомных линий были морфологически схожи с клетками линии U-87 (Рисунок 1). В культурах клеточных линий присутствовали отростчатые клетки с фибробластоподобной, полигональной или сферической формой. Кроме того, в клеточных линиях отмечалось присутствие одноядерных и многоядерных клеток.

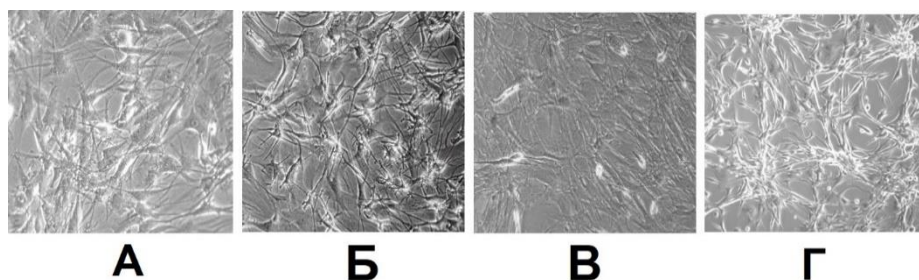


Рисунок 1 – Глиобластомные линии человека

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).

Фенотипический анализ восьми репрезентативных линий показал (Таблица 1), что, как и стандартная линия U-87, полученные глиобластомные линии обладали высокой способностью к пролиферации, судя по экспрессии ядерного белка Ki-67.

Таблица 1 – Фенотипическая характеристика клеток глиобластомных линий

Маркер	$m \pm SE$	Me	Min - max	U-87
Ki-67	$40,0 \pm 21,2$	33,6	4,3 – 88,7	53,3
CD271	$22,0 \pm 12,8$	8	0,9 – 96,0	5,9
CD73	$67,8 \pm 12,0$	73	0 – 95,0	98,0
HLA-DR	$3,5 \pm 0,8$	3	0,7 – 8	20,0
CD133	$1,0 \pm 0,5$	0	0 – 3,5	0,6

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.

Кроме того, клетки глиобластомных линий экспрессировали ряд маркеров, ассоциированных с высокой степенью злокачественности глиом: рецептор для фактора роста нервов CD271; мезенхимальный маркер CD73; молекулу HLA-DR, ассоциированную с низкой выживаемостью пациентов. Среди клеток линий присутствовала минорная субпопуляция клеток (1 – 2 %) с маркером стволовых опухолевых клеток CD133. При этом иммортализованная линия U-87 отличалась от глиобластомных линий, полученных из первичных культур, большим содержанием CD73⁺ и HLA-DR⁺ клеток.

Оценка цитотоксической активности ИФН-ДК здоровых доноров (Рисунок 2А) показала, что ДК лизировали клетки всех 13 тестируемых глиобластомных линий. В зависимости от клеточной линии значения цитотоксичности ИФН-ДК варьировали от 20 до 85 %, что свидетельствует об индивидуальных различиях в чувствительности глиобластомных линий к киллингу. В большинстве случаев (9 из 13 линий) ДК доноров обладали выраженной способностью лизировать глиобластомные клетки (цитотоксичность выше 40 %). Более того, цитотоксическая активность ИФН-ДК против многих неиммортализованных глиобластомных линий, полученных из первичных культур опухоли пациентов, была выше, чем против клеток линии U-87.

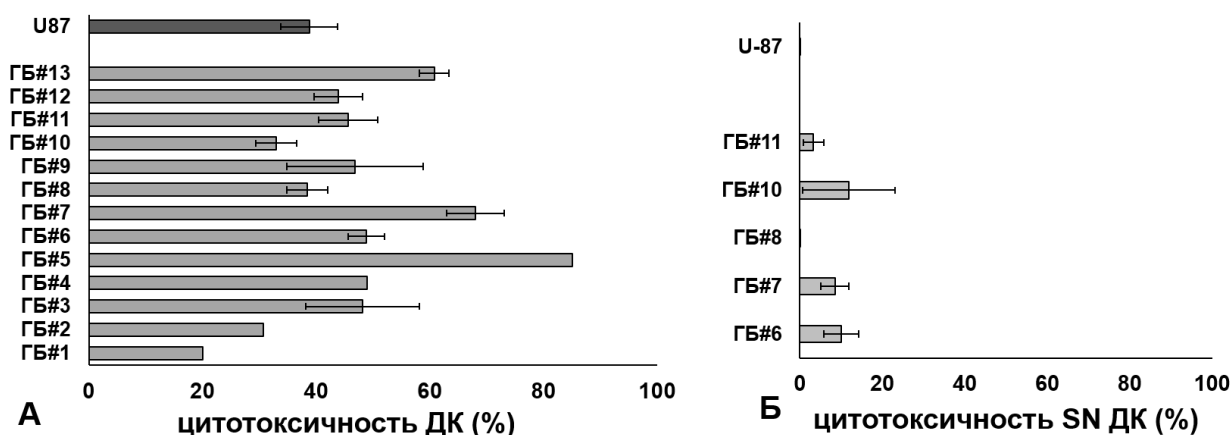


Рисунок 2 – Цитотоксическая активность ИФН-ДК здоровых доноров против клеток глиобластомных линий

Здесь и далее данные представлены в виде средних ($m \pm SE$) или индивидуальных значений. На рисунке А приведены данные цитотоксической активности (%) ИФН-ДК доноров, на рисунке Б – супернатантов (v/v 25 %) ИФН-ДК доноров против глиобластомных линий. ГБ – глиобластомные линии, полученные из первичных культур опухоли пациентов. Число наблюдений (количество тестируемых образцов ДК и супернатантов ДК, полученных от различных доноров) в культурах ГБ#3 – ГБ#13 составляло $n = 3 - 18$, в культурах U-87 – $n = 7$.

В отличие от ДК, супернатанты ИФН-ДК доноров (в дозе 25 % v/v) обладали слабой цитотоксической активностью против глиобластомных линий, не превышающей на уровне средних значений 12 % и не лизировали клетки линии U-87 (Рисунок 2Б). Таким образом, для реализации цитотоксической активности ИФН-ДК против глиобластомных линий необходимо было контактное взаимодействие ДК с опухолевыми клетками.

Исследование уровня апоптоза опухолевых клеток показало, что со-культивирование глиобластомных клеток, предварительно меченных витальным красителем CFSE, с ИФН-ДК доноров сопровождалось выраженным увеличением относительного количества Annexin V⁺ клеток, преимущественно за счет раннего апоптоза (Таблица 2). Таким образом, в основе цитотоксического действия ДК доноров лежал механизм индукции апоптоза в глиобластомных клетках.

Таблица 2 – 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 ч при соотношении эффекторов/мишеней 10:1. * $p_w < 0,05$ - значимость различий между контрольной и опытной группами.

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 и, по данным литературы, содержат популяцию клеток со свойствами стволовых опухолевых клеток [Laks D.R. et al., 2009; Kim S.-S. et al., 2015]. ИФН-ДК доноров обладали цитотоксической активностью не только против адгезивных к пластику глиобластомных клеток, но и против клеток нейросфер (Рисунок 3). При этом клетки нейросфер были слабо чувствительны к цитотоксическому действию супернатантов ИФН-ДК в сравнении с самими ДК ($p = 0,028$). Культивирование ДК с клетками нейросфер сопровождалась увлечением доли опухолевых клеток в фазе раннего (с $4,18 \pm 1,38$ % до $24,72 \pm 1,63$ %; $p = 0,08$) и позднего (с $0,02 \pm 0,01$ % до $4,00 \pm 3,02$ %; $p = 0,02$) апоптоза.

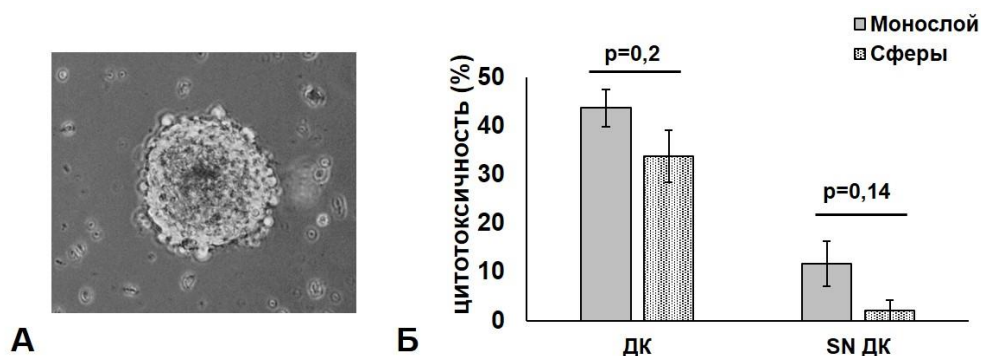


Рисунок 3 – Цитотоксическая активность ИФН-ДК доноров против клеток нейросфер

А) представлен нативный препарат (увеличение $\times 250$) одной из репрезентативных культур нейросфер, полученных из первичной глиобластомной культуры; Б) представлены данные цитотоксической активности ИФН-ДК ($n = 8$) и супернатантов ДК (SN ДК, $n = 6$) доноров против опухолевых клеток пациента с глиобластомой, культивируемых в стандартных условиях для всех глиобластомных линий (монослой) и в бессывороточной среде в виде нейросфер (сферы).

Поскольку одним из возможных механизмов цитотоксической активности ДК является экспрессия ДК проапоптогенных лигандов, представлялось важным охарактеризовать экспрессию рецепторов к проапоптогенным молекулам (TNF-R, Fas, TRAIL-R) на глиобластомных клетках. В среднем, более половины клеток глиобластомных линий экспрессировали рецепторы TNF-R1 и TRAIL-R2 ($56,0 \pm 18,0$ % и $54,8 \pm 18,8$ %, соответственно). Рецептор Fas, при активации которого также запускается апоптоз-иницирующий сигнальный путь, был представлен на клетках глиобластомных линий в меньшей степени (в среднем, на $19,6 \pm 8,1$ % клетках). Линия U-87 характеризовалась меньшей долей TNF-R1⁺ ($39,2 \pm 2,0$ %) и TRAIL-R2⁺ ($40,0 \pm 4,0$ %) клеток по сравнению с неиммortalизованными глиобластомными линиями, но более высоким уровнем экспрессии Fas ($36,0 \pm 4,0$ % клеток).

Чтобы выяснить роль отдельных апоптоз-иницирующих сигнальных путей в реализации цитотоксического эффекта ИФН-ДК, на следующем этапе была проведена серия экспериментов с блокированием лигандов TNF α , FasL или TRAIL с помощью предварительной обработки ИФН-ДК доноров растворимыми рецепторами rTNF-R1, rFas или rTRAIL-R2 (Рисунок 4). Наибольший блокирующий эффект отмечался при обработке ИФН-ДК доноров растворимым рецептором rTNF-R1. 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 значимому снижению цитотоксической активности ДК ($p = 0,12$ и $p = 0,27$, соответственно).

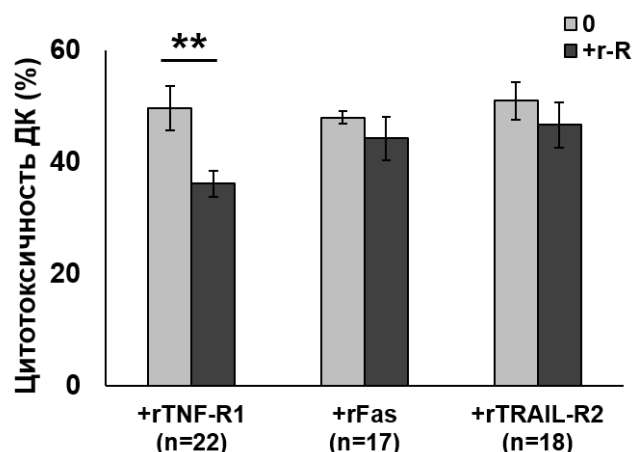


Рисунок 4 – Блокирование цитотоксической активности ИФН-ДК доноров против клеток глиобластомы растворимыми формами R:Fc, специфичными для лигандов, относящихся к TNF-семейству

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 (+r-R) в культурах каждой глиобластомной линии исследовался с использованием ИФН-ДК от 3 – 5 различных доноров. n – общее число наблюдений. ** $p_w < 0,01$ - значимость различий между показателями.

Блокирование проапоптогенных лигандов на ИФН-ДК выявило индивидуальные различия в чувствительности глиобластомных клеток к лизису, опосредованному различными медиаторами цитотоксичности (Рисунок 5).

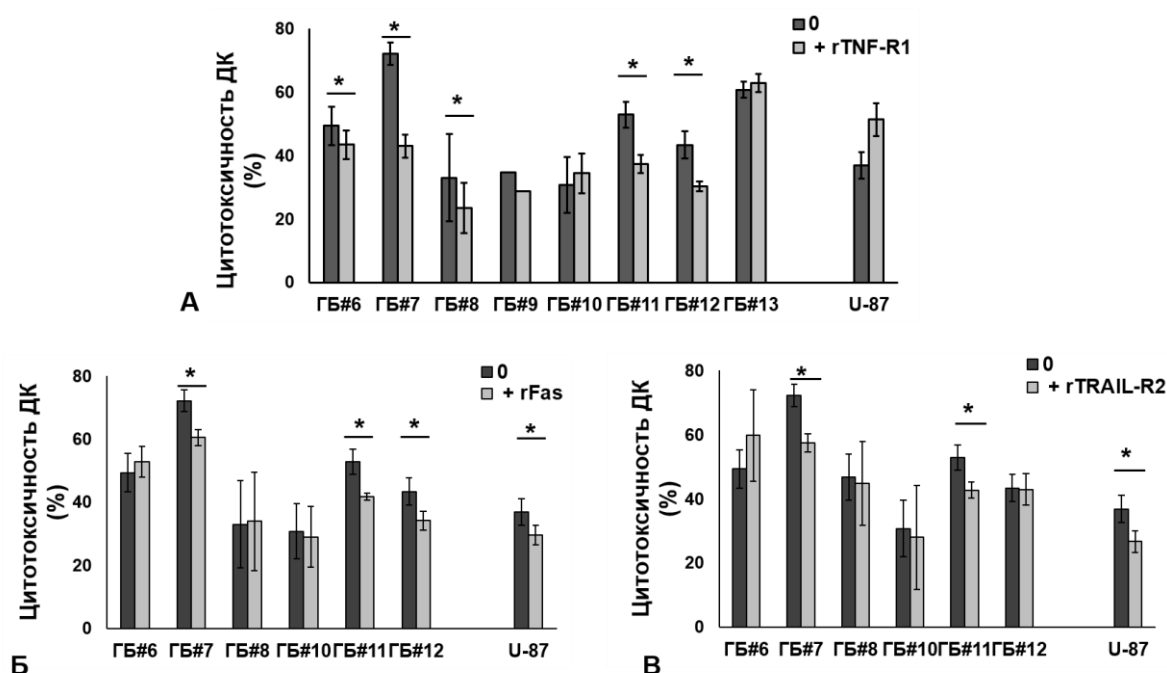


Рисунок 5 – Влияние блокирования проапоптогенных лигандов на цитотоксическую активность ИФН-ДК против глиобластомных линий

Представлены данные цитотоксической активности (%) интактных (0) ИФН-ДК и предварительно обработанных в течение 1 ч растворимыми рецепторами rTNF-R1 (А), rFas (Б) или rTRAIL-R2 (В) против глиобластомных линий (ГБ), полученных из фрагментов опухоли пациентов, а также против линии U-87. Число наблюдений для каждой из линий n = 3 – 5, кроме линии ГБ#9 (n=1). * $p_w < 0,05$ - значимость различий между показателями.

Так, при блокировании TNF α /TNF-R1-зависимого пути (Рисунок 5А) цитотоксическая активность ДК доноров снижалась в культурах 6 из 8 тестируемых линий с медианой супрессии 33 %. Тем не менее, против двух глиобластомных линий (ГБ#10 и ГБ#13) и линии U-87 снижения цитотоксичности ДК при обработке rTNF-R1 не наблюдалось, что свидетельствовало о резистентности этих линии к TNF α -зависимому лизису. Блокирование FasL/Fas-зависимого пути (Рисунок 5Б) снижало цитотоксическую активность ДК доноров против 3 из 6 тестируемых линий (ГБ#7, ГБ#11 и ГБ#12). Медиана ингибирующего эффекта rFas в культурах чувствительных линий составляла 19,6 %. Блокирующий эффект rFas в отношении цитотоксичности ДК проявлялся также в культурах клеток линии U-87, что согласуется с данными литературы о чувствительности данной линии к FasL-зависимому апоптозу [Knight M.J. et al., 2001]. Схожие результаты были получены и при блокировании TRAIL-зависимого пути. Подавление цитотоксической активности при обработке ИФН-ДК растворимым рецептором rTRAIL-R2 (Рисунок 5В) было выявлено только против 3 из 6 полученных глиобластомных линий (ГБ#7, ГБ#10 и ГБ#11) с медианой супрессии 21,0 % и против линии U-87, принадлежащей по данным литературы к группе TRAIL-чувствительных опухолевых клеток [Knight M.J. et al., 2001].

Наряду с изучением рецепторно-зависимого механизма цитотоксической активности ДК против глиобластомных линий, была также исследована роль грануло-опосредованного механизма в реализации цитотоксической активности ДК, который является одним из универсальных механизмов подавления опухолевого роста и индукции гибели клеток-мишеней. Для изучения вовлеченности грануло-опосредованной цитотоксичности исследовали эффект блокирования компонентов цитолитических гранул перфорина и гранзима Б с помощью конканамицина А (СМА).

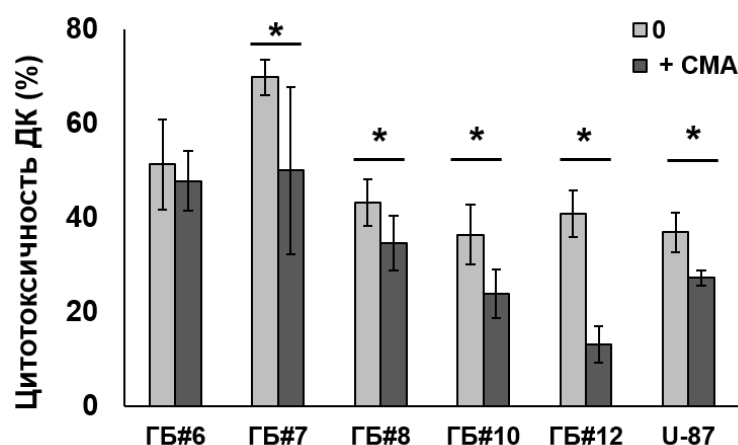


Рисунок 6 - Влияние конканамицина А на цитотоксическую активность ИФН-ДК доноров против клеток глиобластомы

Представлены данные цитотоксической активности интактных (0) или предобработанных конканамицином А (+ СМА) ДК, полученных от 3 – 9 доноров, против клеток пяти глиобластомных линий и клеток линии U-87. * $p_w < 0,05$ - значимость различий между показателями.

Обработка ДК конканамицином А (Рисунок 6) снижала цитотоксическую активность ДК против всех тестируемых линий (Ме блокирующего эффекта 37 %), а также против клеток линии U-87 (Ме блокирующего эффекта 27,3 %).

Подтверждением вовлеченности грануло-опосредованного механизма цитотоксической активности ИФН-ДК против глиобластомных линий служат также данные о дегрануляции ДК, то есть увеличение на поверхности ДК экспрессии молекулы CD107a, являющейся компонентом мембраны литических гранул. Так, взаимодействие ИФН-ДК доноров с клетками глиобластомной линии (Рисунок 7) сопровождалось более чем трехкратным возрастанием доли ДК, экспрессирующих молекулу CD107a (CD107a⁺CFSE⁻ клеток).

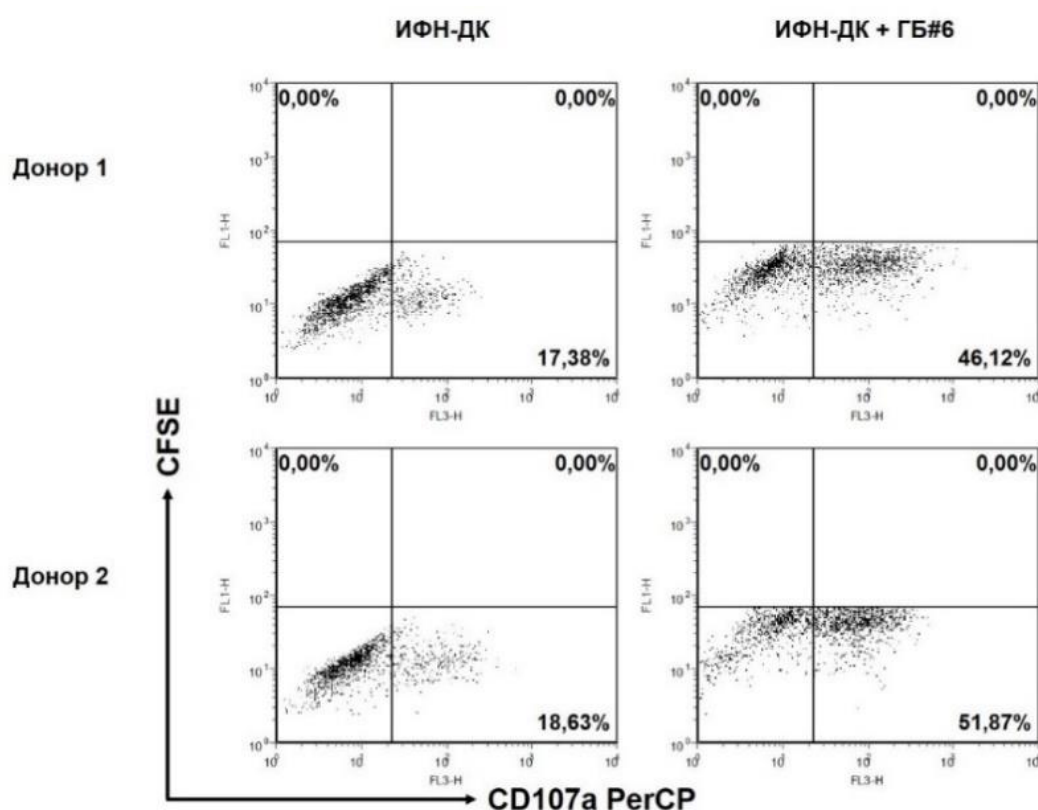


Рисунок 7 – Индукция процесса дегрануляции ИФН-ДК доноров при взаимодействии с глиобластомными клетками

Представлены DotPlot гистограммы распределения ИФН-ДК двух доноров до (ИФН-ДК) и после со-культивирования с CFSE-мечеными клетками глиобластомной линии #6 (ИФН-ДК + ГБ#6) в соотношении 10:1 по флуоресценции PerCP-меченных анти-CD107a-антител и CFSE.

Таким образом, можно заключить, что два основных механизма, которые обеспечивают реализацию цитотоксической активности ИФН-ДК против большинства полученных глиобластомных линий, связаны с грануло-опосредованным и TNF α /TNF-R1-зависимым сигнальными путями (Рисунок 8). FasL/Fas- и TRAIL/TRAIL-R2-сигнальные пути не являются ключевыми и вносят существенно меньший вклад в реализацию цитотоксической активности ИФН-ДК доноров против глиобластомных клеток.

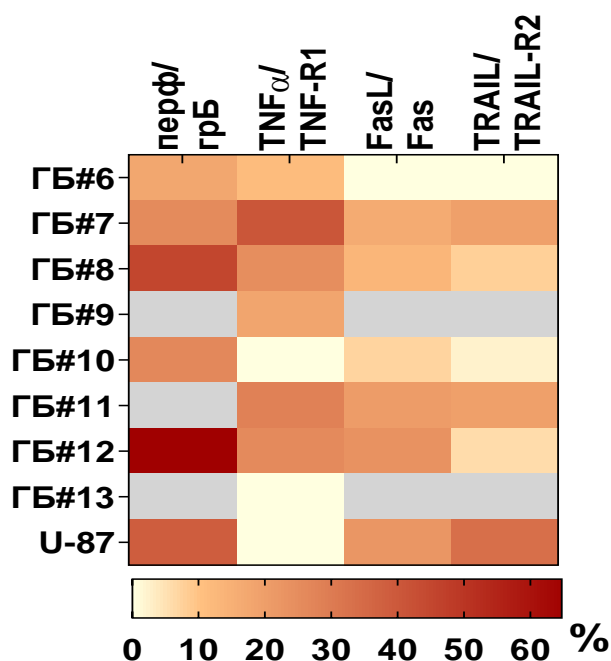


Рисунок 8 – Тепловая карта блокирующего эффекта СМА, rTNF-R1, rFas или rTRAIL-R2 на цитотоксичность ИФН-ДК доноров против глиобластомных линий

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.

Важно отметить, что между уровнем блокирующего эффекта используемых нейтрализующих молекул и экспрессией соответствующих рецепторов на опухолевых клетках не было корреляционных связей. Таким образом, различия в чувствительности опухолевых клеток к рецепторно-опосредованному лизису не связаны с особенностями экспрессии этих рецепторов. Кроме того, полученные данные свидетельствуют о том, что несмотря на принадлежность к одной группе опухолей, опухолевые клетки больных глиобластомой отличаются от клеток иммортализованной глиобластомной линии U-87 с точки зрения чувствительности к лизису, медируемому дендритными клетками, и сигнальных путей, вовлеченных в этот процесс.

Следующий этап работы был посвящен изучению цитотоксической активности ДК больных глиобластомой против опухолевых клеток. Тестирование ИФН-ДК больных против аутологичных клеток восьми глиобластомных линий выявило снижение на 30 % цитотоксической активности ДК по сравнению с цитотоксическим эффектом ДК доноров против клеток этих же линий (Ме цитотоксичности 30,3 vs 44,9 %, соответственно; $p = 0,05$; Рисунок 9). Образцы ДК доноров, цитотоксичность которых оценивали в культурах каждой линии, получали от 4 – 15 человек.

Ранее нами было показано, что ДК больных характеризуются селективным дефектом цитотоксической активности против опухолевых клеток Нер-2, лизис которых осуществляется через TNFα/TNF-R1-сигнальный путь [Leplina O.Yu et al., 2010]. Полученные в настоящем исследовании данные показали важную роль этого пути в реализации цитотоксической активности ДК доноров против глиобластомных клеток. Поэтому особый интерес представляло выяснение вопроса – связано ли снижение цитотоксической активности ДК больных против глиобластомных клеток с нарушением TNFα/TNF-R1-опосредованного механизма.

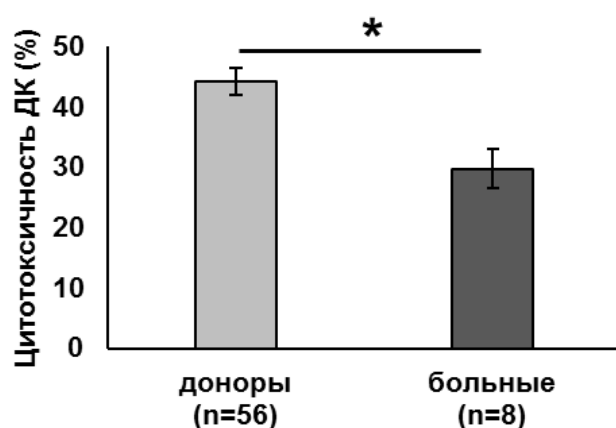


Рисунок 9 - Цитотоксическая активность ИФН-ДК больных против аутологичных глиобластомных линий

*- $p < 0,05$ - значимость различий между показателями. n – число наблюдений.

Дефект цитотоксической активности ИФН-ДК пациентов с глиобластомой против аутологичных опухолевых клеток выявлялся только в отношении тех глиобластомных линий, которые были чувствительны к $TNF\alpha/TNF-R1$ -опосредованному лизису (Таблица 3). В том случае, когда линии были не чувствительны к $TNF\alpha/TNF-R1$ -сигнальному пути (ГБ#10, ГБ#13) киллерная активность ИФН-ДК больных была сопоставима с уровнем цитотоксичности ИФН-ДК доноров.

Таблица 3 – Цитотоксическая активность ДК против глиобластомных клеток

линия	ДК доноров Me (LQ-UQ)	Ауто-ДК	Дефект цитотоксичности ДК больных (%)	Удельный вклад $TNF\alpha/TNF-R1$ - 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 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 $TNF\alpha/TNF-R1$ -сигнального пути в реализацию цитотоксической активности ИФН-ДК доноров указан блокирующий эффект $\gamma TNF-R1$, который рассчитывали как $\left[1 - \frac{\text{цитотоксичность ДК (ЛПС+}\gamma TNF-R1\text{)}}{\text{цитотоксичность ДК (ЛПС)}} \right] \times 100\%$

Аналогичные результаты были получены при оценке цитотоксической активности аллогенных ИФН-ДК больных глиобластомой против тестируемых опухолевых линий (Рисунок 10). Только в случае, когда опухолевые клетки были резистентны к $\text{TNF}\alpha$ -опосредованному лизису (ГБ #10), ДК больных не отличались по цитотоксической активности от ДК доноров. Во всех остальных случаях цитотоксичность ДК больных против аллогенных глиобластомных линий была ниже по сравнению с цитотоксическим эффектом ИФН-ДК доноров против этих же опухолевых клеток.

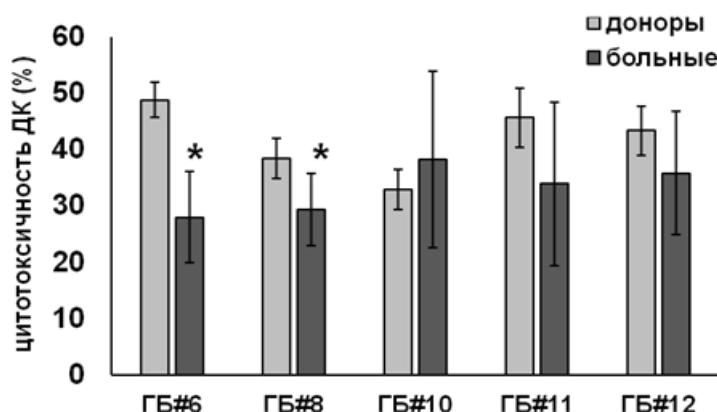


Рисунок 10 - Цитотоксическая активность ДК против аллогенных глиобластомных клеток

Представлены данные цитотоксической активности (%) ИФН-ДК здоровых доноров ($n = 4 - 18$) и больных глиобластомой ($n = 3 - 7$) против глиобластомных линий (ГБ), полученных из аллогенных первичных опухолевых культур. * - $p < 0,05$ - значимость различий; n - число наблюдений.

Таким образом, выявленные результаты указывают на то, что $\text{TNF}\alpha/\text{TNF-R1}$ -зависимый механизм имеет важное значение в реализации цитотоксической активности ДК против аутологичных опухолевых клеток, и дефект $\text{TNF}\alpha$ -опосредованной цитотоксичности ДК является причиной ослабления эффекторной функции ИФН-ДК больных.

Задачей следующего этапа явилось сравнительное исследование экспрессии основных цитотоксических молекул дендритными клетками доноров и больных глиобластомой (Рисунок 11). ИФН-ДК больных глиобластомой были сопоставимы по экспрессии внутриклеточных молекул цитолитических гранул – перфорины, гранзима Б и CD107a (Рисунок 11А), – что свидетельствует о сохранности грануло-опосредованного механизма цитотоксической активности ИФН-ДК больных. При этом в культурах ДК доноров и больных выявлялась 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).

Анализ поверхностной экспрессии цитотоксических лигандов к проапоптогенным рецепторам семейства TNF (Рисунок 11Б) показал, что доля FasL^+ и TRAIL^+ клеток среди ИФН-ДК больных глиобластомой была также на уровне донорских значений аналогичных показателей. В то же время ИФН-ДК больных

глиобластомой характеризовались почти двукратно меньшим ($p = 0,00005$) количеством mTNF α -позитивных клеток по сравнению с ИФН-ДК здоровых доноров. 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; $p = 0,44$) и прямо коррелировала со сниженным уровнем цитотоксической активности ДК пациентов против клеток опухолевой линии Нер-2, чувствительной к TNF α /TNF-R1-зависимому лизису ($R_s = 0,501$; $p = 0,015$).

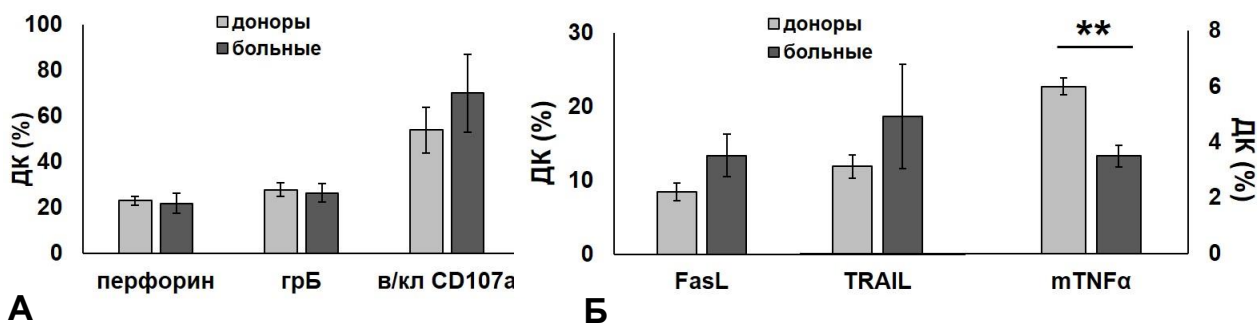


Рисунок 11 – Экспрессия цитотоксических лигандов ИФН-ДК здоровых доноров и больных глиобластомой

Представлены данные внутриклеточной экспрессии перфорины, гранзима Б, CD107a (А) и мембранно-связанных форм TNF α (mTNF α), FasL и TRAIL (Б) в гейте HLA-DR⁺клеток среди ИФН-ДК здоровых доноров ($n = 9 - 24$) и больных глиобластомой ($n = 5 - 28$). ** - $p < 0,01$ - значимость различий.

На следующем этапе было проведено изучение возможных причин нарушения экспрессии mTNF α , приводящих в конечном итоге к селективному дефекту TNF α -опосредованной цитотоксической функции ИФН-ДК у больных злокачественными глиомами против аутологичных опухолевых клеток. ИФН-ДК больных глиобластомой характеризовались более чем двукратно сниженной экспрессией мРНК TNF α по сравнению с ИФН-ДК донорами (Рисунок 12А). Одним из ключевых участников различных сигнальных путей, включая и те, что связаны с синтезом TNF α , является транскрипционный фактор NF- κ B. Однако, поскольку группы доноров и больных значимо не различались между собой по уровню экспрессии активной формы pNF- κ B в ДК, обнаруженное нарушение экспрессии гена *TNF α* являлось NF- κ B-независимым (Рисунок 12Б).

Учитывая, что экспрессия молекулы mTNF α может регулироваться не только на транскрипционном уровне, но и зависит от интенсивности шеддинга, было проведено исследование TNF α -конвертирующего фермента (TACE), который срезает внеклеточную часть молекулы mTNF α и переводит ее в биологически активную секретируемую форму TNF α (sTNF α). ИФН-ДК больных глиобластомой характеризовались более чем двукратно повышенной экспрессией ($p = 0,046$) и протеолитической активностью ($p = 0,08$) TACE по сравнению с культурами ДК доноров (Рисунок 13).

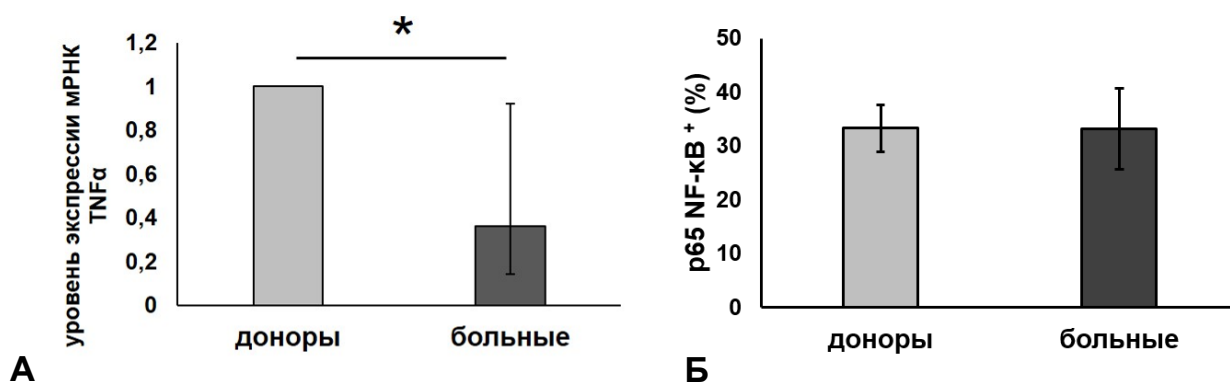


Рисунок 12 – Регуляция экспрессии TNFα в ИФН-ДК больных глиобластомой
 А) представлены медиана (Me) и диапазон 25-75% квартильных значений (LQ – UQ) относительного уровня экспрессии мРНК TNFα в ИФН-ДК больных глиобластомой (n = 7), нормализованного с референс-геном *RPLP0*; уровень экспрессии мРНК TNFα в ИФН-ДК здоровых доноров (n = 7) принят за 1. Б) Представлены данные в виде средних значений ($m \pm SE$) относительного количества p65 NF-κB⁺ клеток в HLA-DR⁺-гее в ИФН-ДК здоровых доноров (n = 7) и больных глиобластомой (n = 11). * - $p_U < 0,05$ - значимость различий.

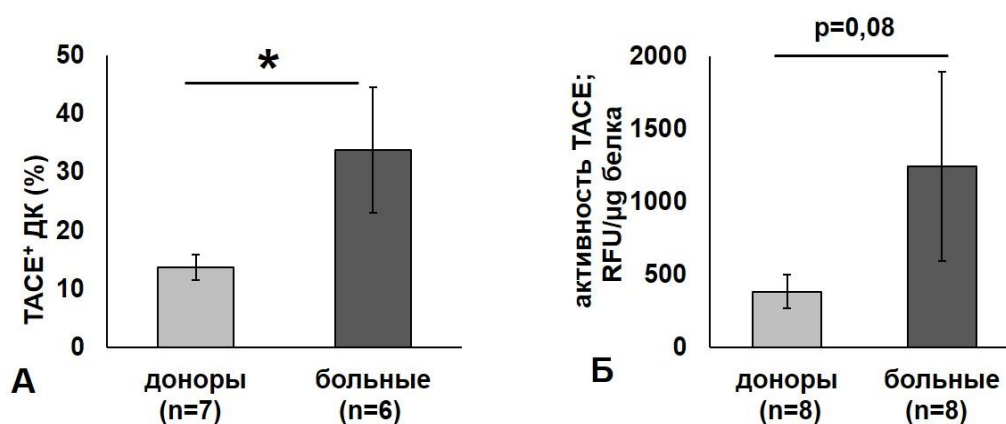


Рисунок 13 – TNFα-конвертирующий фермент в культурах ИФН-ДК доноров и больных глиобластомой

Представлены данные относительной экспрессии (А) и протеолитической активности (Б) фермента TACE в ИФН-ДК. * - $p_U < 0,05$ - значимость различий.

Чтобы подтвердить значимость фермента TACE в регуляции экспрессии mTNFα и цитотоксической активности ДК, была проведена серия экспериментов с использованием синтетического ингибитора металлопротеиназ ТАPI-0, блокирующего активность TACE (Рисунок 14). Добавление ТАPI-0 на этапе конечного созревания ДК совместно с ЛПС приводило к более чем двукратному увеличению mTNFα-позитивных клеток ($p = 0,04$; Рисунок 14А) и снижению более чем в четыре раза продукции sTNFα в культурах ИФН-ДК больных глиобластомой ($p = 0,046$; Рисунок 14Б). Повышение экспрессии mTNFα, обусловленное действием ТАPI-0, было ассоциировано с почти 3-кратным увеличением цитотоксической активности ИФН-ДК больных против TNFα-чувствительных клеток НЕр-2 ($p = 0,05$; Рисунок 14В).

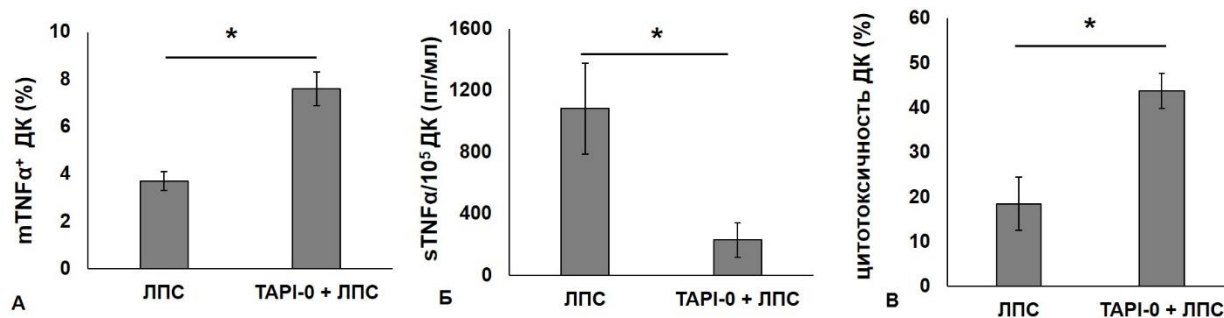


Рисунок 14 – Влияние ТАPI-0 на экспрессию TNFα и цитотоксичность ИФН-ДК больных глиобластомой

Представлены данные относительного количества клеток, экспрессирующих mTNFα (А), концентрации sTNFα/10⁵ДК (пг/мл) в супернатантах цельных культур (Б) и уровня цитотоксической активности (В) интактных и ТАPI-0-обработанных ИФН-ДК больных глиобластомой (n = 8) против опухолевых клеток НEr-2 в МТТ-тесте. * - p_w < 0,05 - значимость различий.

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

Чтобы оценить, могут ли глиобластомные клетки выступать в качестве негативных регуляторов цитотоксической активности ДК, исследовали влияние супернатантов пяти первичных культур глиобластом на ИФН-ДК доноров на этапе дифференцировки ДК (Рисунок 15).

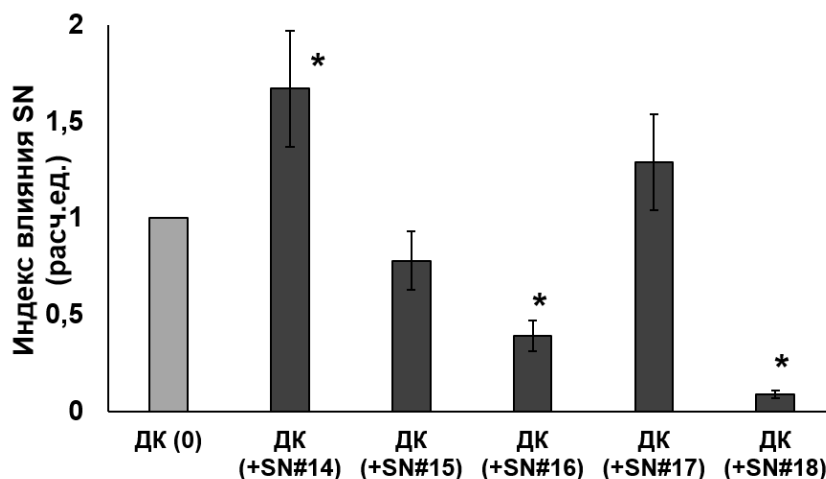


Рисунок 15 –Влияние растворимых факторов, продуцируемых клетками глиобластомы, на цитотоксическую активность ИФН-ДК здоровых доноров

На рисунке представлены данные цитотоксической активности ИФН-ДК здоровых доноров (n = 3 – 5) против клеток НEr-2, где за 1 приняты индивидуальные значения цитотоксической активности интактных ДК (ДК(0)), относительно которых рассчитывалась цитотоксическая активность ДК, предобработанных супернатантами (25 % v/v) первичных культур опухоли пяти пациентов с глиобластомой согласно формуле: [цитотоксичность ДК (+SN) / цитотоксичность ДК (0)] (расч.ед.). * - p_w < 0,05 - значимость различий с ДК(0).

Супернатанты трех культур обладали выраженным ($n = 2$) или умеренным ($n = 1$) ингибирующим эффектом на цитотоксичность ДК доноров против $\text{TNF}\alpha$ -чувствительных клеток, тогда как супернатанты от двух из пяти культур, наоборот, стимулировали цитотоксическую активность ИФН-ДК доноров.

Проведенный мультиплексный анализ 27 различных цитокинов показал (Рисунок 16), что супернатанты первичных культур глиобластом с высоким индексом супрессии ($\text{ИС}_{\text{выс}}$) характеризовались более высокой концентрацией большинства анализируемых цитокинов в сравнении с культурами, супернатанты которых не подавляли цитотоксичность ДК (ИС_0). Супернатанты первичной культуры, обладающие умеренным супрессорным влиянием на цитотоксичность ДК доноров, по профилю цитокинов были близки к группе супернатантов с ИС_0 . При этом концентрация IL-1ra и IL-10 (для обоих цитокинов $R_s = 0,70$; $p = 0,1$), а также $\text{IFN}\gamma$ ($R_s = 0,667$; $p = 0,19$) в супернатантах опухолевых клеток на уровне тренда коррелировала с супрессорным эффектом на цитотоксичность ДК доноров.

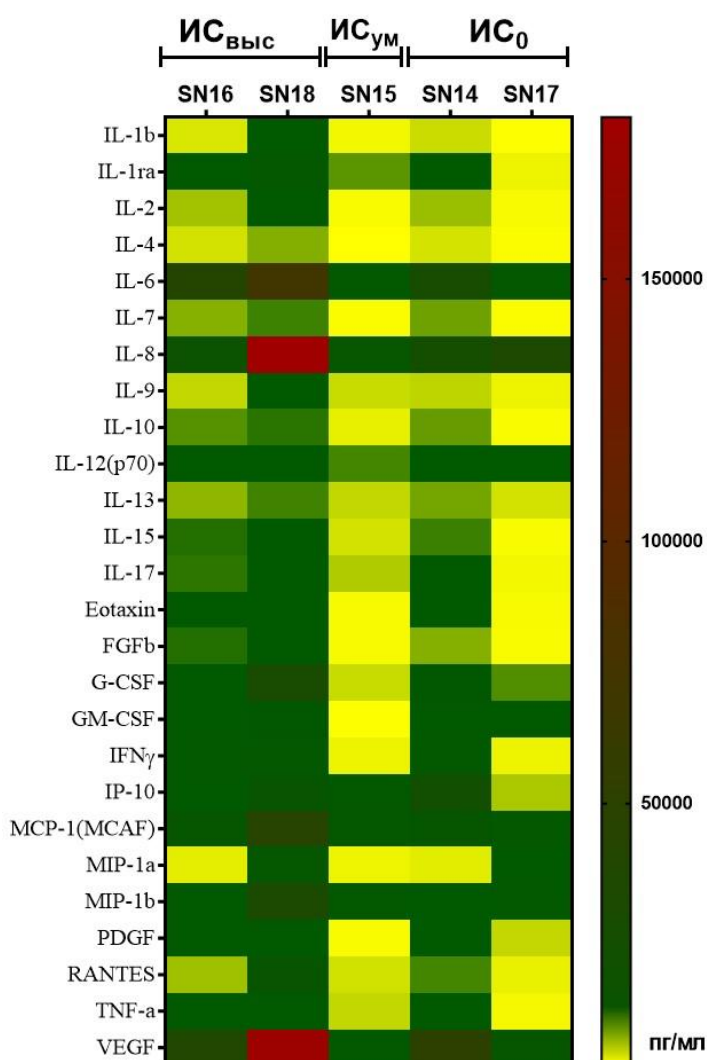


Рисунок 16 – Тепловая карта продукции цитокинов первичными культурами глиобластом

Представлены индивидуальные значения концентрации цитокинов (пг/мл) в супернатантах первичных культур глиобластом, обладающих выраженным ($\text{ИС}_{\text{выс}}$), умеренным ($\text{ИС}_{\text{ум}}$) или не оказывающих супрессорного эффекта (ИС_0) на цитотоксическую активность ИФН-ДК здоровых доноров против клеток линии HEp-2.

Кроме того, низкая экспрессия $\text{mTNF}\alpha$ на ИФН-ДК больных глиомами статистически значимо ассоциировалась с высокой продукцией аутологичными

опухолевыми клетками IL-1 β и G-CSF, PDGF, а также хемокинов IL-8 и IP-10 и на уровне тренда – с высокой продукцией IL-17 и IFN γ (Таблица 4).

Таблица 4 – 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	Rs	p
Провоспалительные цитокины	IL-1 β	-0,901	0,00003
Иммунорегуляторные цитокины	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

Примечание: представлены результаты корреляционного анализа методом ранговой корреляции Спирмена (Rs); n = 13.

На заключительном этапе было проведено исследование возможных способов коррекции нарушенной цитотоксической активности ДК больных глиобластомой против аутологичных опухолевых клеток. В качестве потенциальных модуляторов были выбраны иммуноактивные препараты на основе рекомбинантного интерлейкина 2 (IL-2) и двуцепочечной ДНК (dsDNA) человека (Рисунок 17). Известно, что эти агенты стимулируют цитотоксическую активность НК-клеток и ЦТЛ [Sarina B. et al., 1997; Alyamkina E.A. et al., 2009].

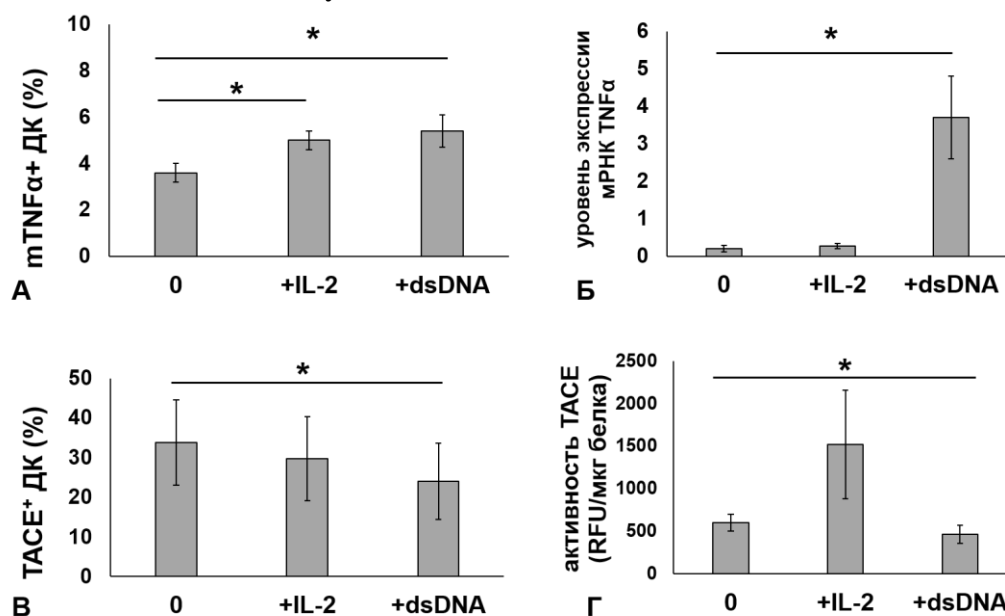


Рисунок 17 – Влияние IL-2 и dsDNA на экспрессию TNF α в культурах ИФН-ДК больных глиобластомой

Представлены данные относительного количества mTNF α -позитивных ИФН-ДК (n = 15) (А), уровня экспрессии мРНК TNF α , нормализованного с референсным геном *RPLP0* (Б; n = 6), поверхностной экспрессии (В, n = 6) и активности фермента TACE (Г, n = 8) в культурах интактных (0) и IL-2- и dsDNA-модифицированных ИФН-ДК больных глиобластомой. * - $p_w < 0,05$ - значимость различий.

Экспрессия mTNF α на ДК больных глиобластомой в присутствии IL-2 или dsDNA значимо возрастала в 1,5 – 2 раза (Рисунок 17А). При этом в отличие от IL-2, не влияющего на экспрессию мРНК TNF α , dsDNA значимо усиливала экспрессию мРНК TNF α в ДК ($p = 0,05$; Рисунок 17Б). Кроме того, dsDNA снижала экспрессию TACE в культурах ДК больных (Рисунок 17В), уменьшая протеолитическую активность фермента более чем на 20 % (Рисунок 17Г). IL-2 не оказывал такого эффекта на TACE в ИФН-ДК больных глиобластомой (Рисунок 17В, Г). Таким образом, IL-2 и dsDNA регулируют экспрессию mTNF α через различные механизмы.

Активация ИФН-ДК больных глиобластомой IL-2 и dsDNA сопровождалась также увеличением экспрессии других медиаторов рецепторно-зависимой, а также грануло-зависимой цитотоксичности (Рисунок 18). При этом наиболее значимые статистические различия были выявлены для экспрессии перфорина и гранзима Б (для dsDNA).

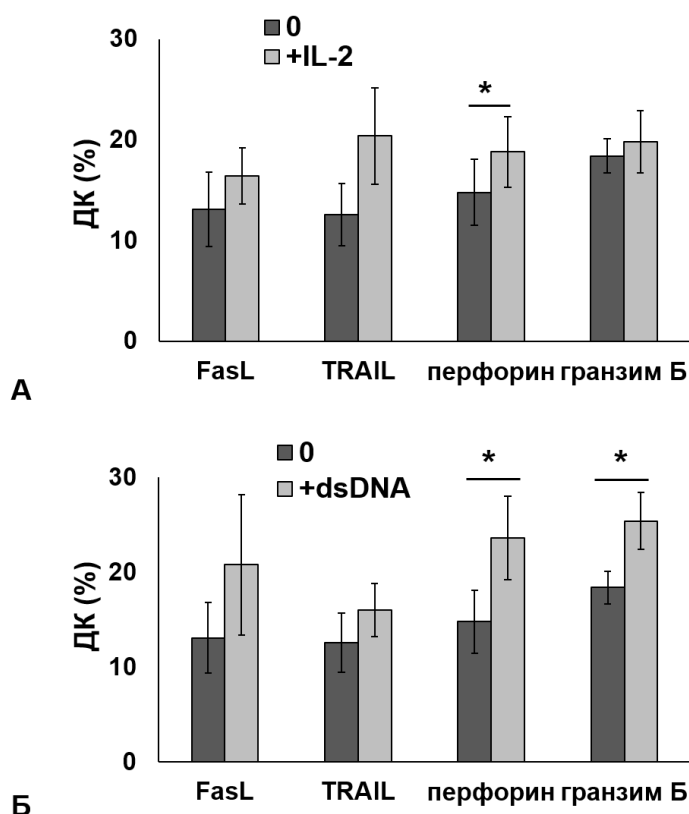


Рисунок 18 – Влияние IL-2 и dsDNA на экспрессию цитотоксических лигандов
Представлены данные экспрессии мембранно-связанных форм FasL ($n = 8$) и TRAIL ($n = 6$), а также внутриклеточной экспрессии перфорина ($n = 5$) и гранзима Б ($n = 5$) в культурах интактных ДК и IL-2- (А) или dsDNA-активированных (Б) ИФН-ДК больных глиобластомой. * - $p_w \leq 0,05$ - значимость различий.

Стимулирующий эффект IL-2 и dsDNA на экспрессию цитотоксических медиаторов ИФН-ДК больных ассоциировался с увеличением цитотоксической активности ДК больных глиобластомой против аутологических опухолевых клеток в среднем в 1,5 раза (Рисунок 19).

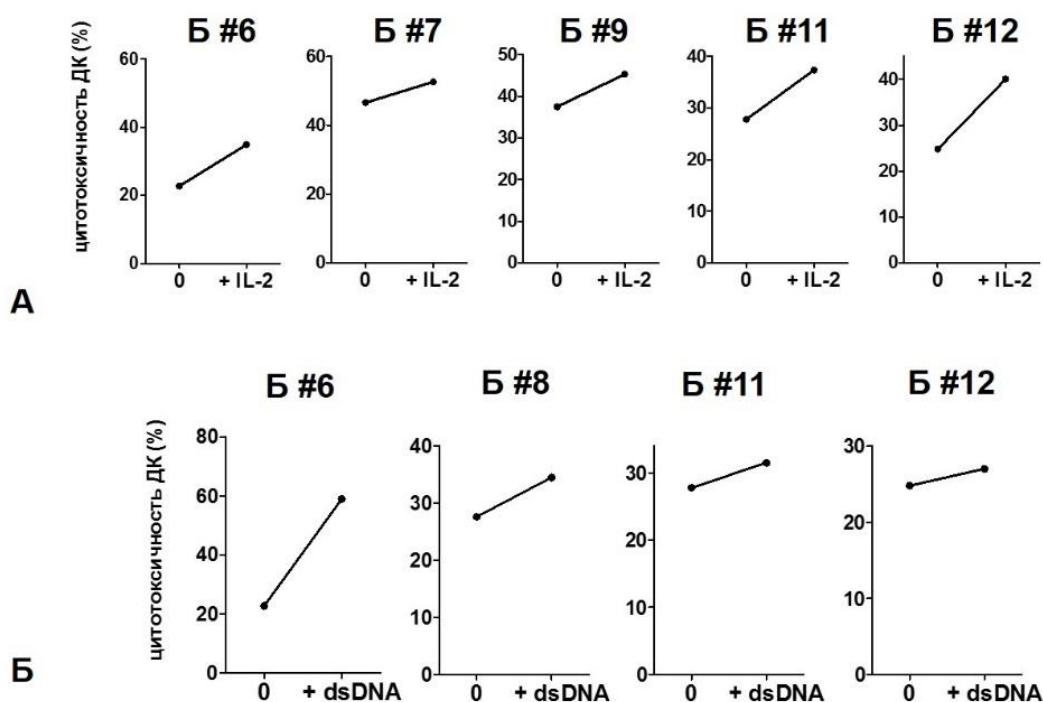


Рисунок 19 – Влияние IL-2 и dsDNA на цитотоксическую активность ИФН-ДК больных глиобластомой против аутологичных глиобластомных клеток

Представлены индивидуальные значения цитотоксической активности (%) интактных и IL-2- (А) или dsDNA- модифицированных (Б) ИФН-ДК больных глиобластомой против аутологичных глиобластомных линий.

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, полученных из первичных культур опухоли пациентов. Клетки глиобластомных линий, полученных от разных пациентов, характеризуются различной степенью чувствительности к цитотоксическому действию ИФН-ДК, что в целом отражает индивидуальную гетерогенность глиобластомы. При этом установлено, что в большинстве случаев цитотоксическая активность ИФН-ДК против глиобластомных линий превышает 40 %. Важно отметить, что наряду с лизисом опухолевых клеток, растущих в культуре *in vitro* в виде адгезивного монослоя, мишенями цитотоксического действия ИФН-ДК могут быть клетки нейросфер, формирование которых рассматривается как признак присутствия стволовых опухолевых клеток.

Реализация цитотоксической активности ИФН-ДК против глиобластомных линий, а также клеток нейросфер связана с индукцией апоптоза в опухолевых клетках. При этом киллерный эффект в отношении глиобластомных клеток больных осуществляется при непосредственном контакте ДК с опухолевыми клетками, что может иметь важное значение для оптимизации протоколов иммунотерапии с использованием ДК.

Наличие проапоптогенных рецепторов TNF-R1, Fas, TRAIL-R2 на клетках глиобластомных линий и экспрессия цитотоксических лигандов/медиаторов дендритными клетками свидетельствует, что цитотоксический эффект ИФН-ДК может опосредоваться через различные рецепторные механизмы (TNF α /TNF-R1-, FasL/Fas-, TRAIL/TRAIL-R2-зависимые пути) и грануло-опосредованный механизм апоптоза. Тем не менее, использование подхода с блокированием цитотоксических лигандов/медиаторов выявило наибольшую роль двух путей, опосредующих цитотоксическую активность ИФН-ДК доноров против большинства глиобластомных клеток: TNF α /TNF-R1-зависимого и грануло-опосредованного сигнальных путей. Причем у больных глиобластомой один из этих путей цитотоксичности ИФН-ДК (TNF α /TNF-R1-опосредованный) против глиобластомных линий оказался дефектным. В этом аспекте важно отметить, что стандартная иммортализованная линия U-87 отличается от большинства неиммортализованных глиобластомных линий по фенотипу, чувствительности к цитотоксическому действию ИФН-ДК и механизмам лизиса, в частности, является резистентной к TNF α /TNF-R1-медируемому цитотоксическому эффекту ИФН-ДК. Учитывая эти факты, можно заключить, что клетки U-87 не являются витральным аналогом клеток глиобластомы и оптимальной моделью для изучения механизмов подавления роста и пролиферации клеток глиобластомы, а также поиска новых подходов к элиминации опухолевых клеток. В этом аспекте предпочтительно использование неиммортализованных глиобластомных линий.

ИФН-ДК больных глиобластомой характеризуются сохранной экспрессией перфорины, гранзима Б, FasL и TRAIL, но низкой экспрессией mTNF α , что, по всей видимости, является ключевой причиной дефекта цитотоксической функции ДК. Низкий уровень экспрессии mTNF α на ИФН-ДК больных глиобластомой связан с низким количеством мРНК TNF α в ИФН-ДК больных глиомами и повышенной экспрессией и активностью TNF α -конвертирующего фермента. 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.

Супернатанты первичных культур глиобластомы способны ингибировать цитотоксическую активность ИФН-ДК доноров против клеток линии НЕр-2 (как модели опухолевых клеток, чувствительных к TNF α /TNF-R1-опосредованному лизису). Однако супрессорная активность супернатантов характерна не для всех первичных культур и сопряжена с более высокой продукцией IL-1 α , IL-10 и IFN γ глобластомными клетками.

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, IP-10, IL-8 и др.) аутологичными клетками первичных культур глиом головного мозга позволяют сделать предположение о негативном влиянии опухоли на дифференцировку и mTNF α -опосредованную цитотоксичность ДК.

Важно отметить, что снижение экспрессии mTNF α на ДК больных и цитотоксической активности ИФН-ДК больных против аутологических опухолевых клеток является обратимым и корректируется с помощью IL-2 и dsDNA, что позволяет рассматривать данные медиаторы в качестве активаторов mTNF α -медируемой цитотоксической активности. Несмотря на схожий стимулирующий эффект, механизм действия IL-2 и dsDNA на экспрессию дендритными клетками mTNF α различен. Эффект dsDNA 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 обусловлено вовлечением иных механизмов, не связанных с усилением экспрессии мРНК TNF α и подавлением активности TACE. Кроме того, стимуляция ДК IL-2 и dsDNA повышает экспрессию перфорина и гранзима Б (для dsDNA), что свидетельствует о возможности усиления не только рецепторно-, но и грануло-опосредованной цитотоксичности ИФН-ДК больных глиобластомой против аутологических 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, 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 перфорин/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 механизмами.
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 корригирующем 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 ПУБЛИКАЦИЙ

1. **Тыринова Т.В.** Цитотоксическая активность дендритных клеток больных злокачественными опухолями головного мозга против аутологичных и аллогенных опухолевых клеток *in vitro* / Т.В. Тыринова, О.Ю. Леплина, С.В. Мишинов, В.В. Ступак, А.Г. Шилов, Н.В. Рубцова, А.Л. Кривошапкин, А.А.

- Останин, Е.Р. Черных // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2012. – № 4 (41). – С. 63-64.
2. **Тыринова Т.В.** Цитотоксическая активность дендритных клеток против активированных CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов в культуре *in vitro* / Т.В. Тыринова, О.Ю. Леплина, М.А. Тихонова, А.А. Останин, Е.Р. Черных // Acta Biomedica Scientifica. – 2012. – № 3-2 (85). – С. 327-331.
 3. Леплина О.Ю. Сравнительная характеристика фенотипа и цитокинсекреторной активности дендритных клеток человека, генерированных *in vitro* в присутствии интерферона-α и интерлейкина-4 / О.Ю. Леплина, М.А. Тихонова, **Т.В. Тыринова**, Е.А. Алямкина, Е.В. Долгова, С.С. Богачев, А.А. Останин, Е.Р. Черных // Иммунология. – 2012. – Т. 33. – № 2. – С. 60-65.
 4. **Тыринова Т.В.** Характеристика сигнальных путей, опосредующих цитотоксический эффект дендритных клеток против активированных Т-лимфоцитов и NK-клеток / Т.В. Тыринова, О.Ю. Леплина, М.А. Тихонова, Л.В. Сахно, А.А. Останин, Е.Р. Черных // Медицинская иммунология. – 2012. – Т. 14. – № 1-2. – С. 43-50.
 5. **Tyrinova T.V.** Cytotoxic activity of ex-vivo generated IFNα-induced monocyte-derived dendritic cells in brain glioma patients / T.V. Tyrinova, O.Yu. Leplina, S.V. Mishinov, M.A. Tikhonova, E.Ya. Shevela, V.V. Stupak, I.V. Pendyurin, A.G. Shilov, E.A. Alyamkina, N.V. Rubtsova, S.S. Bogachev, A.A. Ostanin, E.R. Chernykh // Cellular Immunology. – 2013. – Vol. 284 (1-2). – P. 146-153.
 6. Леплина О.Ю. Функциональная активность IFNα и IL-4-индуцированных дендритных клеток человека: сравнительное исследование / О.Ю. Леплина, М.А. Тихонова, **Т.В. Тыринова**, Е.А. Алямкина, С.С. Богачев, А.А. Останин, Е.Р. Черных // Медицинская иммунология. – 2014. – Т. 16. – № 1. – С. 43-52.
 7. **Тыринова Т.В.** TNFα-ассоциированное нарушение цитотоксической функции дендритных клеток больных злокачественными глиомами головного мозга / Т.В. Тыринова, О.Ю. Леплина, С.В. Мишинов, В.В. Ступак // Российский иммунологический журнал. – 2014. – Т. 8(17). – № 3. – С. 411-413.
 8. 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.
 9. **Тыринова Т.В.** Изучение роли трансмембранной и секретируемой форм TNFα в реализации противоопухолевой цитотоксической активности дендритных клеток / Т.В. Тыринова, С.В. Мишинов, С.В. Чернов, В.В. Ступак, Е.Р. Черных // Медицинская иммунология. – 2015. – Т. 17. – № 3s. – P. 288-289.

10. **Tyrinova T.V.** Multiplex analysis of 27 cytokines produced by low-grade and high-grade glioma cells / T.V. Tyrinova, A.A. Ostanin, S.V. Mishinov, L.V. Sakhno, S.V. Chernov, V.V. Stupak, E.R. Chernykh // Материалы конференции «Клеточные и молекулярные механизмы взаимоотношения опухоли и микроокружения» («Cellular and molecular mechanisms of tumor-microenvironment crosstalk»). – Томск, 2015.
11. **Tyrinova T.V.** Glioma-derived soluble factors pose strong chemoattractants and partially change the cytotoxic activity of IFN- α -induced dendritic cells / T.V. Tyrinova, O.Yu. Leplina, M.A. Tikhonova, S.V. Mishinov, S.V. Chernov, L.V. Sakhno, V.V. Stupak, E.R. Chernykh // Материалы конференции «Клеточные и молекулярные механизмы взаимоотношения опухоли и микроокружения» («Cellular and molecular mechanisms of tumor-microenvironment crosstalk»). – Томск, 2015.
12. **Тыринова Т.В.** Угнетение противоопухолевой цитотоксической активности дендритных клеток у больных злокачественными лимфомами, обусловленное измененной экспрессией фактора некроза опухоли альфа / Т.В. Тыринова, О.Ю. Леплина, М.А. Тихонова, Д.С. Баторова, Г.Ю. Ушакова, В.В. Сергеевичева, С.А. Сизикова, И.В. Крючкова, А.А. Останин, Е.Р. Черных // Сибирский онкологический журнал. – 2015. – №5. – С. 51-58.
13. **Tyrinova T.V.** CCL19/CCL21-dependent chemotaxis of dendritic cells in healthy individuals and patients with brain tumors / T.V. Tyrinova, O.Yu. Leplina, M.A. Tikhonova, S.V. Mishinov, V.V. Stupak, A.A. Ostanin, E.R. Chernykh // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2015. – Vol. 158(6). – P. 785-788.
14. **Tyrinova T.** The impairments in TNF α expression underlie the defect of monocyte-derived dendritic cell cytotoxicity in Hodgkin's lymphoma patients / T. Tyrinova, O. Leplina, M. Tikhonova, D. Batorova, G. Ushakova, V. Sergeevicheva, S. Sizikova, I. Kryuchkova, A. Ostanin, E. Chernykh // Materials of the 30th Annual Conference of the EMDS. – Amsterdam, Netherlands, 2016. – P. 2239, p.72.
15. **Tyrinova T.** The increase of transmembrane TNF α expression leads to the restoration of altered antitumor cytotoxicity of monocyte-derived dendritic cells / T. Tyrinova, O. Leplina, S. Mishinov, M. Tikhonova, A. Kalinovskiy, S. Chernov, V. Stupak, A. Ostanin, E. Chernykh // Materials of the 14th International Symposium on Dendritic Cells in Fundamental and Clinical Immunology. - Shanghai, China, 2016.
16. **Тыринова Т.В.** Дефект противоопухолевой цитотоксической активности дендритных клеток у больных злокачественными глиомами, обусловленный нарушением экспрессии TNF α / Т.В. Тыринова, О.Ю. Леплина, С.В. Мишинов, М.А. Тихонова, С.В. Чернов, А.В. Калиновский, В.В. Ступак, Е.Р. Черных // Материалы II Петербургского онкологического форума «Белые Ночи – 2016». – Санкт-Петербург, 2016. – С. 242-243.

17. **Тыринова Т.В.** Нарушение цитотоксической активности дендритных клеток у больных с опухолями головного мозга: механизмы и возможности коррекции / Т.В. Тыринова, О.Ю. Леплина, С.В. Мишинов, М.А. Тихонова, А.В. Калиновский, С.В. Чернов, Е.В. Долгова, Е.А. Поттер, С.С. Богачев, В.В. Ступак, А.А. Останин, Е.Р. Черных // Иммунология. – 2016. – Т.37. - №5. – С. 246-252.
18. **Тыринова Т.В.** Участие перфорина/гранзим Б - зависимого механизма в реализации цитотоксического эффекта дендритных клеток против клеток глиобластомы человека / Т.В. Тыринова, О.Ю. Леплина, С.В. Мишинов, М.А. Тихонова, А.В. Калиновский, С.В. Чернов, В.В. Ступак, А.А. Останин, Е.Р. Черных // Медицинская иммунология. – 2017. – Т.19. - №4. – С. 421-430.
19. **Tyrinova T.** Impairment of membrane TNF α expression reduces cytotoxic activity of dendritic cells against autologous tumor cells in high-grade glioma patients / T. Tyrinova, O. Leplina, S. Mishinov, M. Tikhonova, A. Kalinovskiy, S. Chernov, V. Stupak, A. Ostanin, E. Chernykh // Annals of Oncology. – 2017. – Vol. 28. – Issue suppl. 11. - 86P. - doi.org/10.1093/annonc/mdx711.067.
20. **Тыринова Т.В.** Грануло-опосредованная цитотоксичность дендритных клеток против клеток глиобластомы человека / Т.В. Тыринова, О.Ю. Леплина, С.В. Мишинов, М.А. Тихонова, А.В. Калиновский, С.В. Чернов, В.В. Ступак, А.А. Останин, Е.Р. Черных // Российский нейрохирургический журнал имени профессора А.Л. Поленова. – 2017. – Т.9, специальный выпуск, сборник тезисов к XVI Всероссийской научно-практической конференции «Поленовские чтения». – С.248.
21. **Тыринова Т.В.** Механизмы дефектности TNF α -опосредованной цитотоксической активности дендритных клеток больных злокачественными глиомами головного мозга / Т.В. Тыринова, О.Ю. Леплина, С.В. Мишинов, Е.В. Долгова, А.С. Проскурякова, Е.В. Баторов, А.В. Калиновский, С.В. Чернов, В.В. Ступак, С.С. Богачев, Е.Р. Черных // Медицинская иммунология. – 2017. – Т.19, специальный выпуск. – С.166-167.
22. **Тыринова Т.В.** Роль TNF α /TNF-R1-сигнального пути в реализации цитотоксического эффекта дендритных клеток против глиобластомных линий / Т.В. Тыринова, С.В. Мишинов, О.Ю. Леплина, А.А. Альшевская, Ю.Д. Курочкина, Е.А. Олейник, А.В. Калиновский, Ю.А. Лопатникова, С.В. Чернов, В.В. Ступак, С.В. Сенников, А.А. Останин, Е.Р. Черных // Медицинская иммунология. – 2018. – Т.20. - № 3. – С. 353-364.
23. **Tyrinova T.** Interferon alpha-induced dendritic cells kill glioblastoma multiforme cells via TNF α /TNF-R1- signaling pathway / T. Tyrinova, O. Leplina, S. Mishinov, M. Tikhonova, A. Kalinovskiy, S. Chernov, V. Stupak, A. Ostanin, E. Chernykh // Eur. J. Immunol. - 2018. – Vol. 48, S1. – P. 78, P-91. – doi.org/10.1002/eji.201871000.

24. **Tyrinova T.** Defective dendritic cell cytotoxic activity of high-grade glioma patients' results from the low expression of membrane TNF α and can be corrected in vitro by treatment with recombinant IL-2 or exogenic double-stranded DNA / T. Tyrinova, O. Leplina, S. Mishinov, M. Tikhonova, A. Kalinovskiy, S. Chernov, E. Dolgova, V. Stupak, E. Voronina, S. Bogachev, E. Shevela, A. Ostanin, E. Chernykh // J. Interferon Cytokine Res. – 2018. – Vol.38. – № 7. – P.298-310.
25. **Tyrinova T. V.** Membrane TNF α : importance for the effector function of dendritic cells and potential ways of its targeted modulation / T.V. Tyrinova, S.V. Mishinov, O.Yu. Leplina, E.V. Dolgova, A.S. Proskurina, E.V. Batorov, M.A. Tikhonova, Yu.D. Kurochkina, E.A. Oleynik, A.V. Kalinovskiy, S.V. Chernov, V.V. Stupak, S.S. Bogachev, A.A. Ostanin, E.R. Chernykh // Biochemistry (Moscow), supplement series A: membrane and cell biology. – 2018. – Vol. 12. – № 3. – P. 247-254. – doi:10.1134/S199074781803008X.
26. **Tyrinova T.** Glioblastoma multiforme cells are sensitive to lysis mediated by killer dendritic cells via granule-dependent and death receptor-dependent mechanisms of cytotoxicity / T. Tyrinova, O. Leplina, S. Mishinov, M. Tikhonova, A. Kalinovskiy, S. Chernov, V. Stupak, A. Ostanin, E. Chernykh // Annals of Oncology. – 2018. – Vol. 29. - Issue suppl. 10. – 43P. – doi.org/10.1093/annonc/mdy485.012.
27. Долгова Е.В. Оценка эффективности эрадикации стволовых иницирующих раковых клеток на примере первичных культур глиобластомы человека /Е.В. Долгова, А.С. Проскурина, Е.А. Поттер, **Т.В. Тыринова**, О.С. Таранов, Я.Р. Ефремов, К.Е. Орищенко, С.В. Мишинов, В.В. Ступак, А.А. Останин, Е.Р. Черных, С.С. Богачев // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2018. – Т. 22. – № 7. – С. 825-836.

ПАТЕНТ

1. Ступак В.В., Мишинов С.В., Леплина О.Ю., **Тыринова Т.В.**, Останин А.А., Черных Е.Р. Способ диагностики глиобластомы головного мозга. Патент на изобретение RUS 2444732 28.06.2010 (опубл. 10.03.2012)

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ГБ	Глиобластома
ДК	Дендритные клетки
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
ИФН-ДК	Интерферон-альфа-индуцированные дендритные клетки
ЛПС	Липополисахарид
МНК	Мононуклеарные клетки
мРНК	Матричная рибонуклеиновая кислота

MTT	бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолия
ЦТЛ	Цитотоксические Т-лимфоциты
CMA	Конканамицин А
dsDNA	Двухцепочечная дезоксирибонуклеиновая кислота
FasL	Fas-лиганд
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.
MHC I, MHC II	Молекулы I и II класса главного комплекса гистосовместимости
NF-κB	Ядерный фактор κB
NK-клетки	Натуральные киллерные клетки
SN	Супернатант
TACE	Фермент, конвертирующий фактор некроза опухоли α
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