

РОЛЬ TNF α /TNF-R1-СИГНАЛЬНОГО ПУТИ В РЕАЛИЗАЦИИ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ПРОТИВ ГЛИОБЛАСТОМНЫХ ЛИНИЙ

Тыринова Т.В.¹, Мишинов С.В.², Леплина О.Ю.¹, Альшевская А.А.¹,
Куручкина Ю.Д.¹, Олейник Е.А.¹, Калиновский А.В.³,
Лопатникова Ю.А.¹, Чернов С.В.³, Ступак В.В.², Сенников С.В.¹,
Останин А.А.¹, Черных Е.Р.¹

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»,
г. Новосибирск, Россия

² ФГБУ «Научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии имени Я.Л. Цивьяна»
Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

³ ФГБУ «Федеральный центр нейрохирургии» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

Резюме. Дендритные клетки (ДК) больных злокачественными глиомами головного мозга характеризуются нарушением экспрессии мембранной формы TNF α , что ассоциируется с угнетением цитотоксичности ДК против TNF-R1-экспрессирующей опухолевой линии Нер-2. Чтобы оценить клиническую значимость этого феномена, в настоящей работе исследовалась роль TNF α /TNF-R1-сигнального пути в реализации цитотоксической активности ДК против клеток глиобластомных линий, полученных из опухолевой ткани пациентов со злокачественными глиомами головного мозга. ДК генерировали путем культивирования прилипающей фракции МНК в присутствии GM-CSF и IFN α в течение 4 суток с последующим дозреванием с ЛПС в течение 24 ч (IFN-ДК). Опухолевые линии были получены из фрагментов опухоли 11 пациентов с внутримозговой глиобластомой. Показано, что клетки глиобластомных линий чувствительны к цитотоксическому действию IFN-ДК доноров. Выраженность цитотоксического эффекта IFN-ДК против глиобластомных линий, полученных от разных пациентов, варьировала от 20 до 72,2% и в культурах 8 из 11 линий превышала 40%. Клетки глиобластомных линий экспрессировали рецепторы TNF-R1 и TNF-R2, однако экспрессия TNF-R1 была выше. При этом растворимая форма gTNF α не обладала цитотоксическим действием на клетки глиобластомных линий. Блокирование TNF α /TNF-R1-сигнального пути путем обработки IFN-ДК доноров растворимым рецептором ghTNFR1 снижало цитотоксическую активность ДК против 5 из 6 тестируемых глиобластомных линий на 11–40% (медиана супрессии – 24%). ДК больных глиобластомой с дефектом TNF α /TNF-R1-сигнального пути лизировали клетки этих глиобластомных линий, однако медианный уровень цитотоксичности был на 30% ниже, чем аналогичный показатель у доноров (31,5 vs 45,1%; $p = 0,003$). В то же время цитотоксичность IFN-ДК больного глиобластомой против

Адрес для переписки:

Тыринова Тамара Викторовна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (383) 228-21-01.
Факс: 8 (383) 222-70-28.
E-mail: ct_lab@mail.ru; tyrinova@bk.ru

Address for correspondence:

Tyrinova Tamara V.
Institute of Fundamental and Clinical Immunology
630099, Russian Federation, Novosibirsk,
Yadrintsevskaia str., 14.
Phone: 7 (383) 228-21-01.
Fax: 7 (383) 222-70-28.
E-mail: ct_lab@mail.ru; tyrinova@bk.ru

Образец цитирования:

Т.В. Тыринова, С.В. Мишинов, О.Ю. Леплина,
А.А. Альшевская, Ю.Д. Куручкина, Е.А. Олейник,
А.В. Калиновский, Ю.А. Лопатникова, С.В. Чернов,
В.В. Ступак, С.В. Сенников, А.А. Останин, Е.Р. Черных
«Роль TNF/TNF-R1-сигнального пути в реализации
цитотоксического эффекта дендритных клеток против
глиобластомных линий» // Медицинская иммунология,
2018. Т. 20, № 3. С. 353–364.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-3-353-364

© Тыринова Т.В. и соавт., 2018

For citation:

T.V. Tyrinova, S.V. Mishinov, O.Yu. Leplina, A.A. Alshevskaya,
Yu.D. Kurochkina, E.A. Oleynik, A.V. Kalinovskiy,
Yu.A. Lopatnikova, S.V. Chernov, V.V. Stupak, S.V. Sennikov,
A.A. Ostanin, E.R. Chernykh "Role of TNF/TNF-R1-signaling
pathway in cytotoxic activity of dendritic cells against glioblastoma
cell lines", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya*, 2018, Vol. 20, no. 3, pp. 353–364.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-3-353-364

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-3-353-364

аутологичных опухолевых клеток единственной линии, резистентной к $\text{TNF}\alpha/\text{TNF-R1}$ -зависимому пути, была сопоставима с уровнем цитотоксической активности ДК доноров. Таким образом, опухолевые клетки глиобластомных линий чувствительны к цитотоксическому эффекту ДК, опосредованному через $\text{TNF}\alpha/\text{TNF-R1}$ -сигнальный путь, и дефектность данного механизма у больных детерминирует значимое снижение цитотоксической активности ДК против глиобластомных клеток.

Ключевые слова: дендритные клетки, интерферон-альфа, фактор некроза опухоли альфа, TNF-R1 , глиобластома

ROLE OF $\text{TNF}\alpha/\text{TNF-R1}$ -SIGNALING PATHWAY IN CYTOTOXIC ACTIVITY OF DENDRITIC CELLS AGAINST GLIOBLASTOMA CELL LINES

Tyrinova T.V.^a, Mishinov S.V.^b, Leplina O.Yu.^a, Alshevskaya A.A.^a, Kurochkina Yu.D.^a, Oleynik E.A.^a, Kalinovskiy A.V.^c, Lopatnikova Yu.A.^a, Chernov S.V.^c, Stupak V.V.^b, Sennikov S.V.^a, Ostanin A.A.^a, Chernykh E.R.^a

^a Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

^b Novosibirsk Research Ya.L. Tsivyan Institute of Traumatology and Orthopedics, Novosibirsk, Russian Federation

^c Federal Neurosurgical Center, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. Dendritic cells (DCs) of patients with high-grade brain glioma exhibit impaired expression of membrane $\text{TNF}\alpha$ associated with low DC cytotoxicity against TNF-R1 -expressing tumor cell line HEp-2. To assess the significance of these findings, we investigated a role of $\text{TNF}\alpha/\text{TNF-R1}$ -signaling pathway in DC cytotoxic activity against allogenic and autologous cell lines obtained from high-grade glioma tissues. DCs were generated by culturing of plastic-adherent peripheral blood mononuclear cells in presence of GM-CSF and $\text{IFN}\alpha$ for 4 d followed by LPS addition for 24 h (IFN-DCs). The tumor cell lines were obtained from tissues of 11 patients with glioblastoma multiforme. According our findings glioblastoma cells were sensitive to lysis mediated by donor IFN-DCs. The level of DC cytotoxic effect against cell lines obtained from different glioma patient tissues varied from 20 to 72.2%. DC lysis of 8 out of 11 glioblastoma cell lines exceeded 40%. Glioblastoma cell lines expressed both TNF-R1 and TNF-R2 receptors, but mostly – TNF-R1 . However, r $\text{TNF}\alpha$ did not show cytotoxic activity towards glioblastoma cell lines. Blocking of $\text{TNF}\alpha/\text{TNF-R1}$ -signaling pathway by treating of donor IFN-DCs with soluble rh TNFR1 receptor led to partial decrease of DC cytotoxic activity against 5 out of 6 tested glioblastoma cell lines by 11-40% (median of suppression 24%). Glioblastoma patient IFN-DCs which were characterized by an impairment of $\text{TNF}\alpha/\text{TNF-R1}$ -signaling pathway lysed these glioblastoma cell lines, however median of DC cytotoxicity was 30% lower than that of donor values (31.5 vs 45.1%; $p = 0.003$). Cytotoxic activity of IFN-DCs of the glioblastoma patient against autologous tumor cells resistance to $\text{TNF}\alpha/\text{TNF-R1}$ -signaling pathway was comparable with level of cytotoxicity of donor IFN-DCs. Thus, glioblastoma cells are sensitive to cytotoxic activity of DCs mediated via $\text{TNF}\alpha/\text{TNF-R1}$ -signaling pathway, but the defect of this mechanism in IFN-DCs of glioblastoma patients determines significant decrease of DC cytotoxicity towards glioblastoma cells.

Keywords: dendritic cells, interferon-alpha, tumor necrosis factor alpha, TNF-R1 , glioblastoma multiforme

Проведенное исследование поддержано грантом Президента Российской Федерации в конкурсе государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук (МК-7611.2016.7) и грантом РФФИ № 14-04-00446-а.

Введение

Дендритные клетки (ДК), наряду с запуском иммунного ответа против различных антигенов,

в том числе и опухолевых, способны проявлять свойства эффекторных клеток и напрямую индуцировать гибель опухолевых клеток [11, 22]. Противоопухолевая цитотоксическая активность ДК реализуется с вовлечением рецептор-опосредованного и грануло-зависимого механизмов, которые типичны для всех цитотоксических клеток (NK-клеток, цитотоксических CD8^+ Т-лимфоцитов) [14, 20].

Согласно данным литературы, индукторами цитотоксической активности ДК являются интерфероны I типа (IFN I) [7, 15]. Проведенные нами ранее исследования показали, что ДК здоровых доноров, генерируемые в культуре *in vitro* в присутствии IFN α (IFN-ДК), экспрессируют широкий спектр цитотоксических медиаторов (TNF α , TRAIL, FasL, перфорин, гранзим Б) и обладают дозозависимой цитотоксической активностью против TRAIL-, FasL- и TNF α -чувствительных опухолевых линий [21].

В отличие от ДК здоровых доноров, IFN-ДК больных внутримозговыми глиальными опухолями высокой степени злокачественности характеризуются низким уровнем экспрессии гена TNF α , а также высокой активностью TNF α -конвертирующего фермента, участвующего в превращении мембранной формы TNF α (mTNF α) в растворимую форму TNF α (sTNF α) [1]. Выявленные изменения ассоциируются с низким уровнем экспрессии mTNF α на ДК и угнетением цитотоксичности ДК больных против опухолевой линии Нер-2. Поскольку ведущую роль в реализации цитотоксической активности IFN-ДК против мишеней Нер-2 играет TNF α /TNF-R1-сигнальный путь [21], слабая цитотоксическая активность ДК свидетельствует о нарушении данного механизма цитотоксичности ДК у больных злокачественными глиомами. Учитывая эти факты, важным представляется вопрос, может ли обнаруженный дефект цитотоксической функции IFN-ДК больных глиомами снижать эффективность лизиса аутологичных опухолевых клеток.

Предварительные данные демонстрируют, что в ряде случаев IFN-ДК больных злокачественными глиомами характеризуются почти полным отсутствием цитотоксической активности против глиобластных клеток, полученных непосредственно из ткани опухоли [21]. IFN-ДК доноров, напротив, способны проявлять выраженный цитотоксический эффект против первичных глиобластных культур. Однако действительно ли обнаруженный феномен связан с дефектом TNF α -опосредованного сигнального пути, остается неясным.

В связи с этим **целью настоящей работы** явилось изучение роли TNF α /TNF-R1-сигнального пути в реализации цитотоксической активности IFN-ДК против аллогенных и аутологичных клеточных линий, полученных из фрагментов опухоли пациентов с злокачественными глиомами головного мозга.

Материалы и методы

В исследование были включены 30 здоровых доноров, 11 больных опухолями головного мозга с гистологически верифицированной глио-

бластомой (Grade IV). Обследование всех пациентов проводилось при наличии письменного информированного согласия. Мононуклеарные клетки (МНК) получали центрифугированием гепаринизированной венозной крови в градиенте плотности фикола-верографина. ДК получали путем культивирования прилипающей фракции МНК в 6-луночных планшетах (Nunclon, Дания) в течение 3-4 суток в среде RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, США), дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 5мМ HEPES-буфера, 100 мкг/мл гентамицина и 2,5% эмбриональной телячьей сыворотки (FCS, Биолот, Санкт-Петербург), в присутствии GM-CSF (40 нг/мл, Sigma-Aldrich) и IFN α (1000 ед/мл, Роферон-А, Roche, Швейцария) с последующим дозреванием в течение 24 ч с липополисахаридом (10 мкг/мл, LPS *E. coli* 0114:B4, Sigma-Aldrich).

Культуры глиобластных клеток были получены путем механической и последующей ферментативной (0,3% коллагеназы I, Sigma-Aldrich) дезагрегации фрагмента ткани опухоли, полученной хирургическим путем от 11 пациентов с гистологически верифицированной глиобластомой (Grade IV), проходивших обследование и лечение в отделении нейрохирургии Новосибирского НИИТО и Федеральном нейрохирургическом центре. 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 (Gibco, UK), дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 5 мМ HEPES-буфера, 10⁻⁴М меркаптэтанол, 100 мкг/мл гентамицина и 10% FCS, обновляя питательную среду два раза в неделю. Пассирование клеток осуществлялось при достижении субконфлюэнтного роста адгезивных клеток посредством 0,25% трипсина (Sigma-Aldrich) и 0,02% ЭДТА (ICN, США). Количество пассажей для клеточных линий варьировало от 3 до 15.

Цитотоксическая активность ДК оценивалась против полученных глиобластных клеточных линий с помощью МТТ-теста в течение 24 часов в соотношении «эффектор:мишень» 1:1. Для изучения роли TNF α /TNF-R1-сигнального пути в реализации цитотоксической активности ДК в отдельных экспериментах IFN-ДК доноров предварительно инкубировали в течение 60 мин с химерной молекулой rhTNFR1/TNFRSF1A Fc chimera (10 мкг/мл; R&D Systems, США).

Расчет цитотоксической активности проводился по стандартной формуле:

$$(\%) = [1 - (\text{ОПэ} + \text{м} - \text{ОПм}) / \text{ОПм}] \times 100\%,$$

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

ние оптической плотности в лунках с мишенями. Оптическая плотность измерялась при длине волны 492 нм на мультилуночном спектрофотометре (Thermo Scientific Multiskan FC, Финляндия).

Оценку экспрессии рецепторов TNF-R1 и TNF-R2 на глиобластомных клетках проводили методом проточной цитофлуориметрии (FACS Calibur, Becton Dickinson, США) с использованием APC- или PE-меченых моноклональных анти-TNF-R1 и -TNF-R2 антител (BD PharMingen, США).

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета прикладных программ Statistica 6.0 для Windows. Данные представлены в виде среднего арифметического значения (m) и стандартной ошибки среднего (SE), а также в виде медианы (Me) и диапазона 25–75% квартильных значений ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Для выявления значимых различий сравниваемых показателей использовали непараметрический U-критерий Вилкоксона–Манна–Уитни. Для анализа взаимосвязей между исследуемыми параметрами использовали коэффициент корреляции Спирмена. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

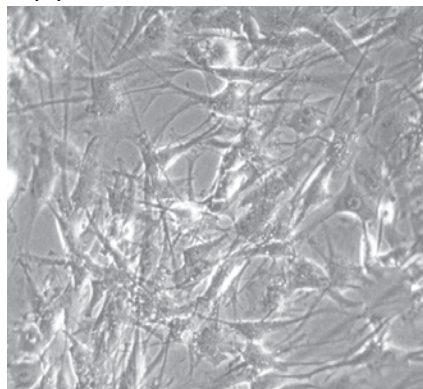
В качестве модели для изучения цитотоксического потенциала IFN-ДК нами были использованы клеточные линии, полученные из первичных культур опухолевых клеток (рис. 1). Несмотря на то что в первичных культурах сохраняются специфические свойства самой опухоли и присущие ей клеточные взаимодействия, пролиферация опухолевых клеток в таких культурах снижена, что влияет на воспроизводимость результатов и ограничивает возможность проведения различ-

ных исследований. Генерация клеточных линий из первичных культур позволила нам увеличить количество опухолевых клеток после нескольких пассажей, а также получить морфологически однородные клеточные популяции.

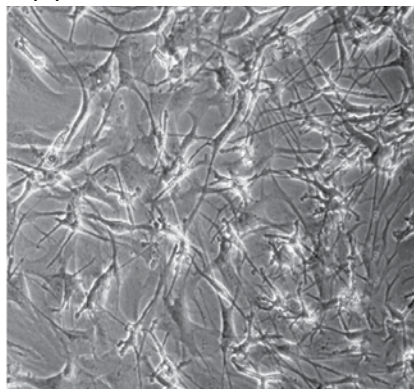
Как видно из рисунка 2, все тестируемые глиобластомные линии были чувствительны к цитотоксическому действию IFN-ДК здоровых доноров. В зависимости от клеточной линии значения цитотоксичности IFN-ДК варьировали от 20 до 72,2%, что может свидетельствовать о разной степени чувствительности глиобластомных линий, полученных от различных пациентов. Тем не менее в большинстве случаев ДК доноров обладали выраженной способностью лизировать глиобластомные клетки. Уровень цитотоксичности IFN-ДК против 8 из 11 опухолевых линий был выше 40%.

Прежде чем оценить роль TNF α /TNF-R1-сигнального пути в реализации цитотоксической активности IFN-ДК против глиобластомных клеток, был проведен анализ экспрессии двух типов рецепторов к TNF α , TNF-R1 и TNF-R2, на клетках глиобластомных линий. Проведенные исследования показали, что оба типа рецепторов представлены на клетках опухолевых линий. Количество клеток, которые экспрессировали рецептор TNF-R1, участвующий в проведении сигнала к апоптозу [2], варьировало от 44 до 89% в зависимости от клеточной линии (Me 82%). В то же время рецептор TNF-R2, лишенный домена смерти (DD) и не обладающий проапоптогенной активностью [2], был представлен на глиобластомных клетках в меньшей степени (от 2 до 68%). Количество опухолевых клеток, экспрессирующих TNF-R2, среди всех анализируемых линий составляло 17,5% (Me). В качестве

А (A)



Б (B)



В (C)

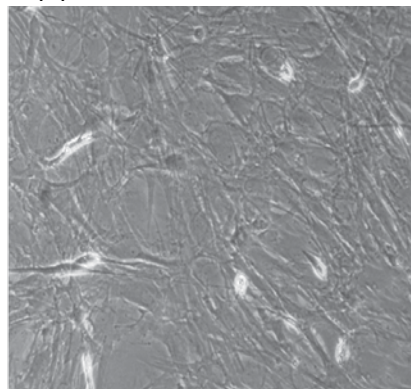


Рисунок 1. Клеточные линии, полученные из фрагментов опухоли пациентов с глиобластомами

Примечание. На рисунке представлены нативные препараты трех репрезентативных глиобластомных линий (увеличение $\times 250$) после 3–6 пассажа.

Figure 1. Cell lines obtained from tumor tissues of patients with glioblastoma multiforme

Note. The figures show representative phase contrast images ($\times 250$ magnification) of cell lines derived from three glioblastoma multiforme tissues after 3–6 passages.

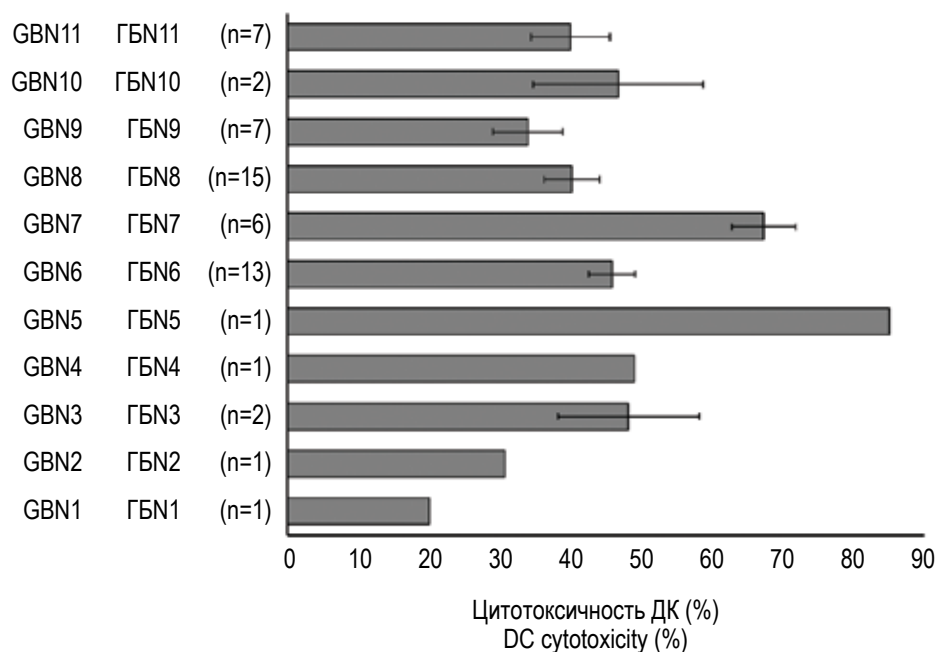


Рисунок 2. Цитотоксическая активность IFN-ДК доноров против клеточных линий, полученных из опухоли пациентов с глиобластомами

Примечание. Данные представлены в виде средних значений и ошибки среднего ($M \pm SE$) или индивидуальных значений (для линий ГБН1, ГБН2, ГБН4) цитотоксической активности ЛПС-стимулированных IFN-ДК здоровых доноров против глиобластомных культур (ГБ). Цитотоксическую активность оценивали с помощью МТТ-теста при соотношении «эффektоры (ДК): мишени (опухолевые клетки)» – 1:1.

Figure 2. Cytotoxic activity of donor IFN-DCs against cell lines obtained from glioblastoma multiforme tissues

Note. Data of cytotoxic activity of healthy donor's LPS-stimulated IFN-DCs against glioblastoma cell lines (GB) are presented as mean ($M \pm SE$) or individual values (for GBN1, GBN2, GBN4). Cytotoxic activity was determined using MTT-assay at a ratio of effectors (DCs):targets (tumor cells) as 1:1.

примера на рисунке 3 приведены индивидуальные значения распределения (дот-плот) 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.

На следующем этапе было проведено исследование чувствительности глиобластомных линий к рекомбинантному TNF α человека (rTNF α). Как видно из рисунка 4, несмотря на высокую экспрессию рецепторов TNF-R на поверхности опухолевых клеток, rTNF α не оказывал цитотоксического эффекта на опухолевые линии при всех исследуемых концентрациях. Супернатанты IFN-ДК доноров (как источник нативного TNF α) обладали слабой или умеренной цитотоксической активностью против глиобластомных линий, медианный уровень которой составлял 9,8% при добавлении супернатантов в дозе 25% (v/v) (рис. 4). Эти данные позволили заключить, что для реализации цитотоксической активности IFN-ДК против глиобластомных линий необходимо контактное взаимодействие ДК с опухолевыми клетками. При этом умеренная цитотоксичность супернатантов ДК позволяет полагать,

что киллерная активность IFN-ДК против глиобластомных клеток-мишеней может опосредоваться с участием растворимых факторов, не связанных с TNF α .

Чтобы оценить вклад TNF α -зависимого сигнального пути в опосредование цитотоксической активности ДК против глиобластомных клеток, IFN-ДК доноров предварительно инкубировали с растворимым рецептором rhTNFR1. Такой подход позволил нейтрализовать действие мембранной формы TNF α , экспрессируемой на ДК, и блокировать TNF α /TNF-R1-сигнальный путь в клетках-мишенях. Исследование было проведено на 6 глиобластомных линиях, чувствительных к цитотоксическому действию IFN-ДК доноров (ГБН6, ГБН7, ГБН8, ГБН9, ГБН10, ГБН11; рис. 5). Блокирующий эффект rhTNFR1 на цитотоксичность ДК отмечался против пяти из шести тестируемых глиобластомных линий. Обработка IFN-ДК молекулой rhTNFR1 снижала цитотоксическую активность ДК против чувствительных линий на 24,0 % (Me) (Me с 53 до 39%; $p = 0,0009$). При этом выраженность блокирующего эффекта rhTNFR1 в культурах различных глиобластомных линий варьировала, свидетельствуя об индиви-

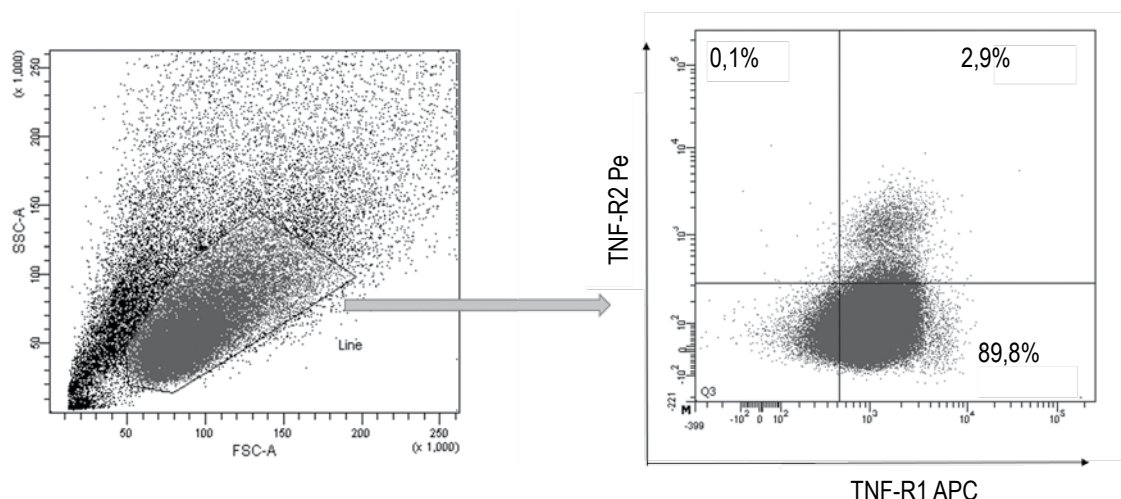


Рисунок 3. Экспрессия рецепторов TNF-R на глиобластомных клетках

Примечание. 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 DotPlot гистограммы распределения опухолевых клеток по флуоресценции APC-меченых анти-TNF-R1 антител и PE-меченых 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.

Figure 3. TNF-R expression on glioblastoma cell lines

Note. Flow cytometric dot plots of representative glioblastoma cell line are presented. The left figure shows the gating region of glioblastoma cells to determine TNF-R expression. The dot plot on the right demonstrates co-staining of APC-conjugated anti-TNF-R1 monoclonal antibody and PE-conjugated anti-TNF-R2 monoclonal antibody on tumor cells. Upper left quadrant – TNF-R1⁺ TNF-R2⁺ cells, upper right quadrant – TNF-R1⁺ TNF-R2⁺ cells, lower right quadrant – TNF-R1⁺ TNF-R2⁻ cells.

дуальных различиях в чувствительности опухолевых клеток к лизису, опосредованному через TNF α /TNF-R1-сигнальный путь. В одной из шести опухолевых линий (ГБН9) блокирующий эффект rhTNFR1 не выявлялся, т.е. опухолевые клетки были не чувствительны к TNF α /TNF-R1-опосредованной цитотоксичности IFN-ДК. При этом отсутствие корреляционной связи между экспрессией рецепторов к TNF α на опухолевых клетках и блокирующим эффектом rhTNFR1 ($R = 0,50$; $p = 0,6$ для TNFR1 и $R = 0,50$; $p = 0,67$ для TNFR2) свидетельствовало, что вариации в чувствительности опухолевых клеток к TNF α /TNF-R1-опосредованному лизису не связаны с особенностями экспрессии TNF-R. Таким образом, опухолевые клетки глиобластомных линий в большинстве случаев чувствительны к TNF α /TNF-R1-опосредованному цитотоксическому действию IFN-ДК, что подтверждается ослаблением цитотоксической активности ДК при блокировании данного пути. С другой стороны, только частичное подавление цитотоксической активности ДК (на 24%) при блокировании TNF α /TNF-R1-сигнального пути, а также отсутствие эффекта rhTNFR1 в культурах клеток одной из шести линий свидетельствуют о существовании TNF α -независимых механизмов цитотоксического действия IFN-ДК против глиобластомных клеток.

Поскольку IFN-ДК больных злокачественными глиомами характеризуются низкой экспрессией mTNF α и, как следствие, угнетением TNF α -опосредованной цитотоксичности против клеток HEp-2 [21], на следующем этапе было проанализировано, насколько сохранна киллерная активность IFN-ДК больных против собственных опухолевых клеток.

Цитотоксическая активность IFN-ДК больных против аутологических опухолевых клеток была на 30% (Me) ниже, чем цитотоксичность ДК доноров в аналогичных культурах (Me 31,5 vs 45,1%; $p = 0,003$). При этом степень снижения цитотоксической активности ДК больных была сопоставима с уровнем блокирующего эффекта (Δ блокирования) растворимого rhTNFR1 при добавлении последнего к ДК доноров. В то же время киллерная активность IFN-ДК больного, опухолевые клетки которого оказались не чувствительны к TNF α /TNF-R1-сигнальному пути (ГБН9), была сопоставима с уровнем цитотоксичности IFN-ДК доноров (табл. 1).

Таким образом, можно заключить, что цитотоксический эффект IFN-ДК против глиобластомных клеток реализуется с участием TNF α /TNF-R1-сигнального пути. Этот механизм обеспечивает почти четверть цитотоксического потенциала ДК (24%), но, по-видимому, не является основным. ДК больных глиобластомой обладают

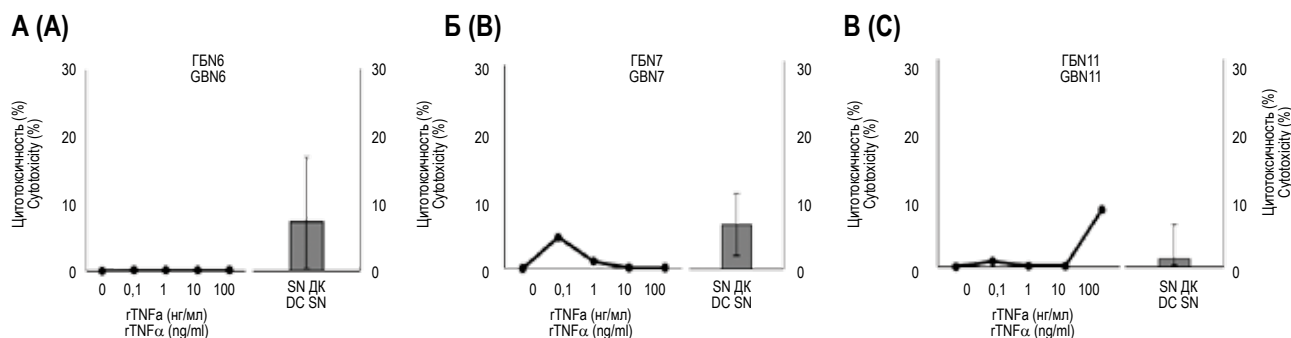


Рисунок 4. Чувствительность клеток глиобластомных линий к цитотоксическому действию растворимых факторов
Примечание. На рисунке представлены цитотоксическая активность rTNFα в указанных дозах (левые графики) и медианные (Me) и диапазон 25-75% квартильных значений ($Q_{0.25}$ - $Q_{0.75}$) цитотоксической активности супернатантов (v/v 25%) IFN-ДК доноров (правые графики) против клеток трех репрезентативных глиобластомных линий ГБН6 (А), ГБН7 (Б), ГБН11 (В) в 24 ч МТТ-тесте.

Figure 4. Sensitivity of glioblastoma cell lines to cytotoxic activity of soluble factors

Note. The figure demonstrates cytotoxic activity of rTNFα at different doses (left graphics) and median (Me) and interquartile range ($Q_{0.25}$ - $Q_{0.75}$) of cytotoxic activity of donor IFN-DC supernatants (v/v 25%) (right graphics) against cells of three representative glioblastoma lines GBN6 (A), GBN7 (B), GBN11 (C) in 24h MTT-assay.

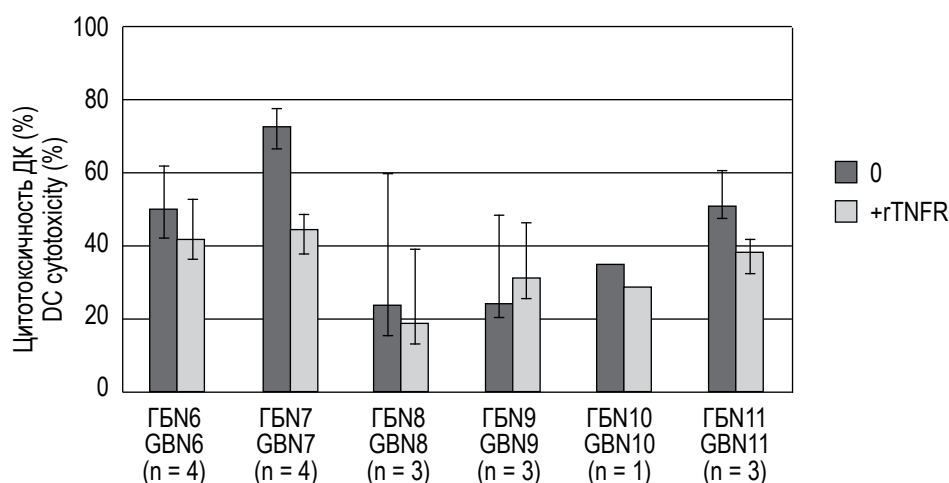


Рисунок 5. Влияние rhTNFR1 на цитотоксическую активность IFN-ДК доноров против клеточных линий, полученных из опухоли пациентов со злокачественными глиомами

Примечание. Данные представлены в виде медианных (Me) и диапазона 25-75% квартильных значений ($Q_{0.25}$ - $Q_{0.75}$) (для линий ГБН6, ГБН7, ГБН8, ГБН9, ГБН11) и индивидуальных значений (для линии ГБН10) цитотоксической активности ЛПС-стимулированных IFN-ДК здоровых доноров против глиобластомных культур (ГБ) в 24 ч МТТ-тесте в соотношении «эфффекторы:мишени» 1:1. ДК предварительно инкубировали в течение 1 часа rhTNFR1:Fc (+rhTNFR; 10 мкг/мл).

Figure 5. The effect of rhTNFR1 on cytotoxic activity of donor IFN-DCs against glioblastoma cell lines

Note. Data are presented as median (Me) and interquartile range ($Q_{0.25}$ - $Q_{0.75}$) (for GBN6, GBN7, GBN8, GBN9, GBN11) or individual values (for GBN10) of cytotoxic activity of healthy donor LPS-stimulated IFN-DCs against glioblastoma cell lines (GB) in 24h MTT-assay at a ratio of effectors:targets as 1:1. IFN-DCs were pre-incubated for 1 h with rhTNFR1 (+rhTNFR; 10 μg/ml) before co-culturing with tumor cells.

меньшей способностью лизировать опухолевые клетки, поскольку характеризуются нарушением экспрессии mTNFα на ДК и, соответственно, дефектом TNFα/TNF-R1-сигнального пути. Дефект TNFα/TNF-R1-сигнального пути не приводит к полному подавлению цитотоксической функции ДК больных против аутологичных опухолевых клеток, однако на треть ослабляет цитотоксическую активность ДК.

Обсуждение

Способность ДК к лизису опухолевых клеток имеет, по всей видимости, большое значение. Наряду с элиминацией опухолевых клеток, высвобождающиеся опухолевые антигены могут сразу же презентироваться Т-лимфоцитам и индуцировать противоопухолевый иммунный ответ в самом раннем периоде. Действительно, при многих ти-

ТАБЛИЦА 1. ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ДК ПРОТИВ ГЛИОБЛАСТОМНЫХ КЛЕТОК

TABLE 1. CYTOTOXIC ACTIVITY OF DCs AGAINST GLIOBLASTOMA CELLS

Линия Cell line	ДК доноров Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) (%) Donor DCs	Аутологичные ДК больных (%) Autologous patient DCs (%)	Степень снижения цитотоксичности IFN-ДК больных (%) Impairment index of cytotoxicity of patient IFN-DCs (%)
ГБН6 GBN6	44,7 (41-52,7)	22,7	49,2
ГБН7 GBN7	68 (63,4-76,2)	46,6	31,5
ГБН8 GBN8	37,5 (30,5-50)	27,6	26,4
ГБН9 GBN9	29 (23-48,3)	32,7	0
ГБН10 GBN10	48,1 (34,8-58,7)	37,5	22
ГБН11 GBN11	43,6 (29,6-50,7)	27,8	36,2

Примечание. Представлены медианные (Me) и диапазон 25-75% квартильных ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) значений цитотоксической активности (%) IFN-ДК доноров и индивидуальные значения цитотоксической активности ДК больных против глиобластомных линий (ГБ). В крайнем правом столбце указана степень дефекта цитотоксичности ДК больных, рассчитанная по формуле:
 $[1 - (\text{цитотоксичность ДК}_{\text{больной}} / \text{Me цитотоксичности ДК}_{\text{доноры}})] \times 100\%$.

Note. Median (Me) and interquartile range ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) of cytotoxic activity (%) of donor IFN-DCs and individual values of cytotoxic activity (%) of patient IFN-DCs against glioblastoma cell lines (GB) are presented. Meanings of impairment of patient IFN-DC cytotoxic activity towards glioblastoma cell lines are shown in right-hand column and calculated as:
 $[1 - (\text{cytotoxicity of DC}_{\text{patient}} / \text{Me cytotoxicity of DC}_{\text{donor}})] \times 100\%$.

пах опухолей (аденокарцинома толстой кишки, легких, щитовидной железы, рак желудка) большее количество ДК в опухолевом микроокружении ассоциировано с более благоприятным прогнозом [3, 10, 18]. С другой стороны, снижение цитотоксической функции ДК может ассоциироваться с большей степенью злокачественности опухолевых клеток и худшим прогнозом. Так, согласно полученным нами ранее данным, больные глиобластомой (в отличие от пациентов с глиомами низкой степени злокачественности) характеризуются дефектом цитотоксической активности ДК против опухолевых клеток HEp-2, опосредованной через TNF α /TNF-R1-сигнальный путь [21]. Чтобы выяснить клиническую значимость этого феномена, настоящее исследование было сфокусировано на изучении чувствительности опухолевых клеток больных глиобластомой к цитотоксическому действию ДК и роли TNF α /TNF-R1-сигнального пути в реализации лизиса глиобластомных клеток.

Полученные результаты продемонстрировали, что ДК доноров, генерированные в присутствии IFN α , лизировали клетки всех исследуемых пер-

вичных глиобластомных линий. В большинстве случаев IFN-ДК демонстрировали достаточно высокий уровень цитотоксичности (> 40%), хотя линии опухолевых клеток от разных пациентов различались по чувствительности к лизису, что могло быть связано с особенностями экспрессии проапоптогенных рецепторов (TNF-R, Fas, TRAIL-R и др.), участвующих в индукции гибели опухолевых клеток. Согласно данным литературы, клетки глиобластомы обладают низкой чувствительностью к NK-опосредованному лизису, поскольку несут на своей поверхности лиганды для ингибиторного рецептора NK-клеток, но слабо экспрессируют лиганды к активационным NK-рецепторам [8, 23, 24]. В то же время сведения о чувствительности глиобластомных клеток к лизису, опосредованному ДК, отсутствуют. С этой точки зрения нами впервые получены данные о чувствительности первичных опухолевых клеток при глиобластоме к цитотоксическому эффекту IFN-ДК.

Вторым важным заключением, следующим из результатов работы, является то, что цитотоксический эффект IFN-ДК против глиобластом-

ных клеток реализуется с вовлечением TNF α /TNF-R1-сигнального пути. На это указывают данные об экспрессии клетками глиобластомных линий рецепторов TNF-R1 и TNF-R2 (с явным преобладанием TNF-R1) и снижением цитотоксической активности IFN-ДК при блокировании мембранной формы TNF α на ДК растворимым рецептором rhTNFR1. Важно отметить, что для реализации цитотоксического эффекта через TNF α /TNF-R1-сигнальный путь необходим клеточный контакт, поскольку растворимая форма rTNF α не оказывала цитотоксического эффекта на глиобластомные клетки, а супернатанты IFN-ДК обладали умеренной цитотоксичностью, которая, по-видимому, была обусловлена действием других факторов.

В литературе имеются данные о высоком уровне экспрессии TNF-R1 и низком уровне или отсутствии TNF-R2 на клетках перевиваемых глиобластомных линий человека (SF-126, SF-188, U-138MG, LN235 и др.) [13]. В то же время полученные нами результаты впервые характеризуют экспрессию рецепторов к TNF α на клетках глиобластомных линий. Как известно, TNF α представляет собой плеiotропный цитокин, способный, с одной стороны, индуцировать гибель опухолевых клеток, а с другой — поддерживать рост глиальных опухолей, стимулируя пролиферацию опухолевых клеток, их инвазию и метастазирование [4, 5], а также процесс ангиогенеза в опухоли [16]. По данным литературы, клетки глиобластомы устойчивы к цитотоксическому действию растворимой формы TNF α (sTNF α) [17], что согласуется с нашими данными. Резистентность глиобластомных клеток к sTNF α может быть связана с высокой TNF-R1-зависимой активностью транскрипционного фактора NF- κ B, обеспечивающего выживаемость и пролиферацию опухолевых клеток [17]. Кроме того, недавние исследования выявили изменение в опухолевых клетках больных глиобластомой соотношения CLIPR-59 и Spy-1 [6, 9], играющих ключевую роль в регуляции TNF α -опосредованного апоптоза. При этом снижение экспрессии CLIPR-59 (активатор каспаз) ассоциировалось с большей степенью злокачественности и меньшей выживаемостью больных [6].

Ранее нами было показано, что основную роль в реализации цитотоксической активности IFN-ДК против TNF-R1-экспрессирующих опухолевых клеток линии Нер-2 играет мембранная форма TNF α (mTNF α), а не sTNF α [1]. В этом аспекте полученные в настоящем исследовании данные, во-первых, подтверждают резистентность глиобластомных клеток к цитотоксическо-

му действию sTNF α и, во-вторых, демонстрируют важную роль ДК в индукции гибели глиобластомных клеток за счет mTNF α . 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 [19]. Данный эффект объясняется способностью mTNF α вызывать конформационные изменения рецептора, которые ведут к более эффективной активации проапоптогенных сигнальных путей [12].

Важно отметить, что блокирование mTNF α на ДК с помощью rhTNFR1 вызывало только 24% снижение цитотоксической активности ДК против клеток глиобластомных линий, означая, что, наряду с вовлечением TNF α /TNF-R1-сигнального пути, лизис дендритными клетками глиобластомных клеток опосредуется и другими механизмами.

Поскольку предыдущие исследования выявили дефектность цитотоксической активности IFN-ДК больных против клеток Нер-2, опосредованной через TNF α /TNF-R1-сигнальный путь [1, 21], представлялось важным оценить, будет ли данный дефект сказываться на цитотоксичности ДК против глиобластомных клеток. Результаты настоящего исследования показали, что IFN-ДК больных характеризовались сниженной цитотоксической активностью, причем степень снижения соответствовала выраженности блокирующего эффекта rhTNFR1, то есть той доле цитотоксического потенциала, который реализуется с вовлечением TNF α /TNF-R1-зависимого механизма.

Ранее нами было показано, что ДК больных глиобластомой характеризуются сниженной экспрессией mTNF α , и это является причиной дефекта цитотоксичности ДК против клеток линии Нер-2 [1]. Основываясь на этих фактах, можно заключить, что низкая экспрессия mTNF α на ДК больных имеет важное патогенетическое значение и уменьшает цитотоксический потенциал ДК против аутологичных опухолевых клеток. Дополнительным аргументом в пользу этого предположения является тот факт, что в редких случаях, когда опухолевые клетки оказываются резистентными к TNF α /TNF-R1-опосредованному лизису (глиобластомная линия пациента N9), ДК больных не отличаются по цитотоксической активности от ДК доноров.

В целом проведенное нами исследование демонстрирует, что IFN-ДК здоровых доноров обладают цитотоксическим действием в отношении глиобластомных клеток, уровень которого

варьирует в зависимости от чувствительности самих опухолевых культур, полученных от разных пациентов. В подавляющем большинстве случаев в реализацию лизиса глиобластомных клеток дендритными клетками вовлечен TNF α /TNF-R1-зависимый механизм, который обеспечивает существенный вклад в цитоток-

сический потенциал IFN-ДК. IFN-ДК больных злокачественными глиомами, характеризующиеся нарушением экспрессии mTNF α , способны лизировать аутологичные опухолевые клетки, однако эта функция ослаблена у них на 30%, что свидетельствует о важности TNF α -зависимого механизма цитотоксичности ДК.

Список литературы / References

1. Тыринова Т.В., Леплина О.Ю., Мишинов С.В., Тихонова М.А., Калиновский А.В., Чернов С.В., Долгова Е.В., Поттер Е.А., Богачев С.С., Ступак В.В., Останин А.А., Черных Е.Р. Нарушение цитотоксической активности дендритных клеток у больных с опухолями головного мозга: механизмы и возможности коррекции // Иммунология, 2016. Т. 37, № 5. С. 246-252. [Tyrinova T.V., Leplina O.Yu., Mishinov S.V., Tikhonova M.A., Kalinovskiy A.V., Chernov S.V., Dolgova E.V., Potter E.A., Bogachev S.S., Stupak V.V., Ostanin A.A., Chernykh E.R. The impairment of cytotoxic activity of dendritic cells in glioma patients: mechanisms and approaches to correction. *Immunologiya = Immunology*, 2016, Vol. 37, no. 5, pp. 246-252. (In Russ.)]
2. Aggarwal B.B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nature Reviews Immunology*, 2003, Vol. 3, no. 9, pp. 745-756.
3. Bigotti G., Coli A., Castagnola G. Distribution of Langerhans cells and HLA class II molecules in prostatic carcinomas of different histopathological grade. *Prostate*, 1991, Vol. 19, pp. 73-87.
4. Cheng S.M., Xing B., Li J. C.B., Cheung B.K.W., Lau A.S.Y. Interferon- γ regulation of TNF α -induced matrix metalloproteinase 3 expression and migration of human glioma T98G cells. *The International Journal of Cancer*, 2007, Vol. 121, pp. 1190-1196.
5. Chuang M.-J., Sun K.-H., Tang S.-J., Deng M.-W., Wu Y.-H., Sung J.-S., Cha T.-L., Sun G.-H. Tumor-derived tumor necrosis factor- α promotes progression and epithelial-mesenchymal transition in renal cell carcinoma cells. *Cancer Science*, 2008, Vol. 99, pp. 905-913.
6. Ding Z., Liu Y., Yao L., Wang D., Zhang J., Cui G., Yang X., Huang X., Liu F., Shen A. Spy1 induces deubiquitinating of RIP1 arrest and confers glioblastoma's resistance to tumor necrosis factor (TNF- α)-induced apoptosis through suppressing the association of CLIPR-59 and CYLD. *Cell Cycle*, 2015, Vol. 14, no. 13, pp. 2149-2159.
7. Fanger N.A., Maliszewski C.R., Schooley K., Griffith T.S. Human dendritic cells mediate cellular apoptosis via tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *The Journal of Experimental Medicine*, 1999, Vol. 190, pp. 1155-1164.
8. Friese M.A., Platten M., Lutz S.Z., Naumann U., Aulwurm S., Bischof F., Buhning H. J., Dichgans J., Rammensee H.G., Steinle A., Weller M. MICA/NKG2D-mediated immunogene therapy of experimental gliomas. *Cancer Research*, 2003, Vol. 63, pp. 8996-9006.
9. Fujikura D., Ito M., Chiba S., Harada T., Perez F., Reed J.C., Uede T., Miyazaki T. CLIPR-59 regulates TNF- α -induced apoptosis by controlling ubiquitination of RIP1. *Cell Death and Differentiation*, 2012, Vol. 3, e264. doi:10.1038/cddis.2012.3.
10. Hart D.N. Dendritic cells: unique leukocyte population which control the primary immune response. *Blood*, 1997, Vol. 90, pp. 3245-3287.
11. Janjic B.M., Lu G., Pimenov A., Whiteside T.L., Storkus W.J., Vujanovic N.L. Innate direct anticancer effector function of human immature dendritic cells. I. Involvement of an apoptosis-inducing pathway. *The Journal of Immunology*, 2002, Vol. 168, pp. 1823-1830.
12. Jiang Y., Yu M., Hu X., Han L., Yang K., Ba H., Zhang Z., Yin B., Yang X.P., Li Z., Wang J. STAT1 mediates transmembrane TNF- α -induced formation of death-inducing signaling complex and apoptotic signaling via TNFR1. *Cell Death and Differentiation*, 2017, Vol. 24, no. 4, pp. 660-671.
13. Kato T., Sawamura Y., Tada M., Sakuma S., Sudo M., Abe H. p55 and p75 tumor necrosis factor receptor expression on human glioblastoma cells. *Neurologia Medico-Chirurgica (Tokyo)*, 1995, Vol. 35, no. 8, pp. 567-574.
14. Korthals M., Safaian N., Kronenwett R., Maihöfer D., Schott M., Papewalis C., Diaz Blanco E., Winter M., Czibere A., Haas R., Kobbe G., Fenk R. Monocyte derived dendritic cells generated by IFN- α acquire mature dendritic and natural killer cell properties as shown by gene expression analysis. *Journal of Translational Medicine*, 2007, Vol. 5, p. 46.
15. Liu Sh., Yu Y., Zhang M., Wang W., Cao X. The involvement of TNF- α -related apoptosis-inducing ligand in the enhanced cytotoxicity of IFN- β -stimulated human dendritic cells to tumor cells. *The Journal of Immunology*, 2001, Vol. 166, no. 9, pp. 5407-5415.

16. Nabors L.B., Suswam E., Huang Y., Yang X., Johnson M.J., King P.H. Tumor necrosis factor α induces angiogenic factor up-regulation in malignant glioma cells. *Cancer Research*, 2003, Vol. 63, no. 14, pp. 4181-4187.
17. Sakuma S., Sawamura Y., Tada M., Aida T., Abe H., Suzuki K., Taniguti N. Responses of human glioblastoma cells to human natural tumor necrosis factor- α ; susceptibility, mechanism of resistance and cytokine production studies. *The Journal of Neuro-Oncology*, 1993, Vol. 15, pp. 197-208.
18. Schroder S., Schwarz W., Rehpenning W., Loning T., Bocker W. Dendritic/Langerhans cells and prognosis in patients with papillary carcinoma. Immunohistochemical study of 106 thyroid neoplasm correlated to follow up data. *American Journal of Clinical Pathology*, 1988, Vol. 99, pp. 295-300.
19. Shi W., Li Z.Y., Gong F.L., Xiong P., Xu Y. Comparison of the cytotoxic effect induced by transmembrane and secreted TNF- α . *Chinese Journal of Microbiology and Immunology*, 1998, Vol. 18, pp. 499-504.
20. Stary G., Bangert C., Tauber M., Strohal R., Kopp T., Stingl G. Tumorcidal activity of TLR7/8-activated inflammatory dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 2007, Vol. 204, pp. 1441-1451.
21. Tyrinova T.V., Leplina O.Y., Mishinov S.V., Tikhonova M.A., Shevela E.Y., Stupak V.V., Pendyurin I.V., Shilov A.G., Alyamkina E.A., Rubtsova N.V., Bogachev S.S., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Cytotoxic activity of ex-vivo generated IFN α -induced monocyte-derived dendritic cells in brain glioma patients. *Cell Immunology*, 2013, Vol. 284, pp. 146-153.
22. Vanderheyde N., Vandenabeele P., Goldman M., Willems F. Distinct mechanisms are involved in tumoricidal and tumoricidal activities of monocyte-derived dendritic cells. *Immunology Letters*, 2004, Vol. 91, no. 2-3, pp. 99-101.
23. Wischhusen J., Friese M.A., Mittelbronn M., Meyermann R., Weller M. HLA-E protects glioma cells from NKG2D-mediated immune responses *in vitro*: implications for immune escape *in vivo*. *The Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 2005, Vol. 64, pp. 523-528.
24. Wu A., Wiesner S., Xiao J., Ericson K., Chen W., Hall W. A., Low W. C., Ohlfest J. R. Expression of MHC I and NK ligands on human CD133 glioma cells: possible targets of immunotherapy. *The Journal of Neuro-Oncology*, 2007, Vol. 83, pp. 121-131.

Авторы:

Тыринова Т.В. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Мишинов С.В. — к.м.н., врач-нейрохирург отделения нейрохирургии ФГБУ «Научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии имени Я.Л. Цивьяна» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

Леплина О.Ю. — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Альшевская А.А. — к.м.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Курочкина Ю.Д. — аспирант лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Олейник Е.А. — аспирант лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Калиновский А.В. — к.м.н., заведующий операционным блоком ФГБУ «Федеральный центр нейрохирургии» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

Authors:

Tyrinova T.V., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Mishinov S.V., PhD (Medicine), Clinical Neurosurgeon, Neurosurgery Department, Novosibirsk Research Ya.L. Tsivyan Institute of Traumatology and Orthopedics, Novosibirsk, Russian Federation

Leplina O. Yu., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Alshevskaya A.A., PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Kurochkina Yu.D., Postgraduate Student, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Oleynik E.A., Postgraduate Student, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Kalinovskiy A.V., PhD (Medicine), Head, Surgical Unit, Federal Neurosurgical Center, Novosibirsk, Russian Federation

Лопатникова Ю.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Чернов С.В. — к.м.н., заведующий отделением нейроонкологии ФГБУ «Федеральный центр нейрохирургии» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

Ступак В.В. — д.м.н., профессор, заведующий отделением нейрохирургии ФГБУ «Научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии имени Я.Л. Цивьяна» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

Сенников С.В. — д.м.н., профессор, заведующий лабораторией молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Останин А.А. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Черных Е.Р. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, заведующая лабораторией клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Lopatnikova Yu.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Chernov S.V., PhD (Medicine), Head, Neurooncology Department, Federal Neurosurgical Center, Novosibirsk, Russian Federation

Stupak V.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Neurosurgery Department, Novosibirsk Research Ya.L. Tsiyvan Institute of Traumatology and Orthopedics, Novosibirsk, Russian Federation

Sennikov S.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Molecular Immunology, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Ostanin A.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Main Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Chernykh E.R., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 09.10.2017
Принята к печати 20.10.2017

Received 09.10.2017
Accepted 20.10.2017