

СТИМУЛЯЦИЯ ДЕНДРИТНЫМИ КЛЕТКАМИ *IN VITRO* ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ

Курилин В.В.¹, Хантакова Ю.Н.¹, Облеухова И.А.¹, Шевченко Ю.А.¹,
Куликова Е.В.¹, Якушенко В.К.², Соколов А.В.³, Сенников С.В.¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт клинической иммунологии» Сибирского отделения РАМН, г. Новосибирск, Россия

² МБУЗ ГКБ № 11, Городской центр колопроктологии, г. Новосибирск, Россия

³ МБУЗ ГКБ № 1, 2-ое онкологическое отделение, г. Новосибирск, Россия

Резюме. В настоящей работе исследована способность аутологичных дендритных клеток, нагруженных антигенами опухолевого лизата, стимулировать цитотоксическую и секреторную активность эффекторных клеток *in vitro* при колоректальном раке. Для этого использовали генерированные из прилипшей фракции моноклеарных клеток периферической крови больных колоректальным раком праймированные антигеном дендритные клетки, которые впоследствии сокультивировались с моноклеарными клетками неприлипшей фракции в присутствии IL-12 и IL-18 или без них. Эффективность модуляции оценивалась по цитотоксической активности моноклеарных клеток против аутологичных опухолевых клеток, продукции IFN γ , IL-2, IL-4 и количеству перфорин-, гранзим В-содержащих лимфоцитов. Показана способность дендритных клеток стимулировать противоопухолевую цитотоксическую и секреторную активность эффекторных клеток *in vitro*, сочетание дендритных клеток и IL-12 с IL-18 усиливает оказываемый эффект в культуре моноклеарных клеток (увеличение процента гибели аутологичных опухолевых клеток, повышение количества перфорин-позитивных, гранзим В-позитивных лимфоцитов и уровня продукции IFN γ , IL-2).

Ключевые слова: дендритные клетки, колоректальный рак, цитотоксическая активность

Адрес для переписки:

Сенников Сергей Витальевич
д.м.н., профессор, заведующий лабораторией
молекулярной иммунологии ФГБУ «НИИ
клинической иммунологии» СО РАМН
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (383) 222-19-10.
Факс: 8 (383) 222-70-28.
E-mail: sennikov_sv@mail.ru

Авторы:

Курилин В.В. — к.м.н., старший научный сотрудник
лаборатории молекулярной иммунологии ФГБУ «НИИ
клинической иммунологии» СО РАМН, г. Новосибирск
Хантакова Ю.Н. — аспирант ФГБУ «НИИ клинической
иммунологии» СО РАМН, г. Новосибирск
Облеухова И.А. — младший научный сотрудник
лаборатории молекулярной иммунологии ФГБУ «НИИ
клинической иммунологии» СО РАМН, г. Новосибирск
Шевченко Ю.А. — к.б.н., научный сотрудник
лаборатории молекулярной иммунологии ФГБУ «НИИ
клинической иммунологии» СО РАМН, г. Новосибирск
Куликова Е.В. — аспирант ФГБУ «НИИ клинической
иммунологии» СО РАМН, г. Новосибирск
Якушенко В.К. — д.м.н., заведующий 2-м хирургическим
отделением МБУЗ ГКБ № 11, г. Новосибирск
Соколов А.В. — заведующий 2-м онкологическим
отделением МБУЗ ГКБ № 1, г. Новосибирск
Сенников С.В. — д.м.н., профессор, заведующий
лабораторией молекулярной иммунологии ФГБУ «НИИ
клинической иммунологии» СО РАМН, г. Новосибирск

Поступила 20.01.2013

Отправлена на доработку 30.01.2013

Принята к печати 31.01.2013

IN VITRO STIMULATION OF ANTITUMOR CYTOTOXIC ACTIVITY OF MONONUCLEAR CELLS FROM COLORECTAL CANCER PATIENTS

Kurilin V.V.^a, Khantakova Yu.N.^a, Obleukhova I.A.^a,
Shevchenko Yu.A.^a, Kulikova E.V.^a, Yakushenko V.K.^b, Sokolov A.V.^c,
Sennikov S.V.^a

^a Research Institute of Clinical Immunology, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

^b City Center of Coloproctology, Clinical Hospital No. 1, Novosibirsk, Russian Federation

^c Second Department of Oncology, City Clinical Hospital No. 1, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. In present study, we investigated the *in vitro* ability of autologous dendritic cells loaded with tumor lysate antigens to stimulate cytotoxic and secretory activity of effector cells from patients with colorectal cancer. To this purpose, we generated antigen-primed dendritic cells (DS) derived from adherent fraction of peripheral blood mononuclear cells (PBMSc) obtained from patients with colorectal cancer. The DCs were then co-cultured with non-adherent mononuclear cells, either in presence of IL-12 and IL-18, or without cytokines. The modulation efficiency was assessed as cytotoxic activity of mononuclear cells towards autologous tumor cells, production of IFN γ , IL-2, IL-4 and the number of perforin-, granzyme B-containing cells. We have demonstrated the ability of dendritic cells to stimulate the *in vitro* antitumor cytotoxic and secretory activity of effector cells in culture. A combination of dendritic cells with IL-12 and IL-18 is shown to enhance their effects in the mononuclear cells culture, as evidenced by increased percentage of dead autologous tumor cells, higher numbers of perforin(+), granzyme B(+) lymphocytes, and increased production of IFN γ , IL-2 increased. (*Med. Immunol.*, 2013, vol. 15, N 3, pp 235-246)

Keywords: dendritic cells, colorectal cancer, cytotoxic activity

Address for correspondence:

Sennikov Sergey V.
PhD, MD, Laboratory of Molecular Immunology,
Research Institute of Clinical Immunology, Siberian
Branch, Russian Academy of Medical Sciences
630099, Russian Federation, Novosibirsk,
Yadrintsevskaya str., 14.
Phone: 7 (383) 222-19-10.
Fax: 7 (383) 222-70-28.
E-mail: sennikov_sv@mail.ru

Authors:

Kurilin V.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate,
Laboratory of Molecular Immunology, Research Institute
of Clinical Immunology, Siberian Branch, Russian Academy
of Medical Sciences, Novosibirsk
Khantakova Yu.N., PhD Candidate, Research Institute
of Clinical Immunology, Siberian Branch, Russian Academy
of Medical Sciences, Novosibirsk
Obleukhova I.A., Research Associate, Laboratory
of Molecular Immunology, Research Institute of Clinical
Immunology, Siberian Branch, Russian Academy of Medical
Sciences, Novosibirsk
Shevchenko Yu.A., PhD (Biology), Research Associate,
Laboratory of Molecular Immunology, Research Institute
of Clinical Immunology, Siberian Branch, Russian Academy
of Medical Sciences, Novosibirsk
Kulikova E.V., PhD Candidate, Research Institute of Clinical
Immunology, Siberian Branch, Russian Academy of Medical
Sciences, Novosibirsk
Yakushenko V.C., PhD, MD (Medicine), Chief, Second
Surgical Department, City Hospital No. 11, Novosibirsk
Sokolov A.V., Chief, Second Department of Oncology, City
Hospital No. 1, Novosibirsk
Sennikov S.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief,
Laboratory of Molecular Immunology, Research Institute
of Clinical Immunology, Siberian Branch, Russian Academy
of Medical Sciences, Novosibirsk

Received 20.01.2013

Revision received 30.01.2013

Accepted 31.01.2013

Введение

Колоректальный рак занимает одно из ведущих мест в мире по причине смертности от онкологических заболеваний [2]. Классическими методами лечения больных колоректальным раком считается хирургическое вмешательство, химиотерапия и лучевая терапия, однако отдаленные результаты применения этих методов в целом остаются без значительных изменений. В настоящее время прогресс в лечении пациентов с онкологическими заболеваниями связан с существенным прорывом в молекулярной биологии, иммунологии, биотехнологии, а также с пониманием причин возникновения опухолевого роста и закономерностей патогенетических механизмов злокачественного перерождения. Многочисленными работами последних десятилетий показано, что при злокачественных опухолях не формируется адекватного клеточного иммунного ответа [4]. Это может быть обусловлено несколькими причинами: недостаточная иммуногенность опухолевых/опухоль-ассоциированных антигенов; способность опухоли вызывать местную или системную иммунодепрессию (IL-10, TGF- β , фактор роста эндотелия сосудов) со снижением активности Т-лимфоцитов; нарушение механизма представления опухоль-ассоциированного антигена [6, 8]. Именно коррекции нарушений презентации антигена в настоящее время уделяется большое внимание при разработке подходов иммунотерапии неопластических процессов [4].

Ключевое значение в активации противоопухолевого клеточного ответа принадлежит антиген-презентирующим клеткам, в том числе дендритным клеткам (ДК), являющимся одними из основных стимуляторов иммунных реакций в организме [8]. ДК способны распознавать и представлять антигены в комплексе с молекулами МНС I и II типа Т- и В-лимфоцитам. На своей поверхности ДК экспрессируют большое количество молекул МНС I и II классов, костимуляторных молекул (CD80, CD86) и демонстрируют высокую способность презентировать опухоль-ассоциированные антигены *in vitro* и *in vivo* [18]. Однако функциональная активность ДК у онкологических больных значительно снижена [14]. Основной причиной этого считают нарушения в процессе созревания дендритных клеток до функционально-активных форм. В связи с этим в настоящее время ведется активный поиск и разработка современных подходов получения функционально-активных ДК и использования их для модуляции

противоопухолевого иммунного ответа. Известно, что основную роль в развитии специфического противоопухолевого иммунного ответа относят к функции цитотоксических CD8⁺ Т-лимфоцитов (CTL). Одним из основных механизмов цитотоксичности является гранзим В-опосредованный путь апоптоза [14]. Проникающая внутрь клетки с помощью порообразующего белка перфорина, гранзим В расщепляет и активизирует или инактивирует различные белковые субстраты, приводя клетки к апоптозу [19]. Для успешной реализации киллерной функции CD8⁺ CTL необходимо нормальное функционирование CD4⁺Т-хелперов, которые, благодаря продукции цитокинов, регулируют функции CTL. Основным цитокином Т-хелперов 1 типа является IFN γ , в присутствии которого происходит увеличение иммуногенности клеток-мишеней посредством усиления экспрессии на их поверхности МНС I класса и усиления синтеза молекул, участвующих в презентации антигенов [7]. Продукция IFN γ зависит от уровня IL-12 и IL-18, секретлируемого ДК в ответ на различные патогены. Локальная продукция IL-12 способствует развитию местного воспаления и стимулирует местную выработку IFN γ эффекторными CD4⁺Т-клетками. В присутствии IL-12 происходит синтез рецепторного комплекса для IL-18, что приводит к усилению эффекта и увеличению продукции IFN γ [15]. Противоположные функции оказывает IL-4, снижая дифференцировку наивных Т-лимфоцитов в CD8⁺ CTL. При этом существует механизм кросс-регуляции дифференцировки Т-хелперов: при продукции IL-4 Т-хелперами 2 типа подавляются сигналы IL-12 на Т-хелперах 1 типа за счет уменьшения образования на их поверхности рецепторов к IL-12. И наоборот, продукция цитокинов Т-хелперами 1 типа подавляет активацию и дифференцировку Т-хелперов 2 типа [22].

Обобщая приведенные литературные данные, можно заключить, что возможность активации и регуляции собственных механизмов иммунной защиты является наиболее перспективным подходом в комплексном лечении колоректального рака. Исходя из этого, **целью данной работы** являлась индукция противоопухолевой цитотоксической активности в культуре мононуклеарных клеток больных колоректальным раком с помощью рекомбинантных цитокинов IL-12, IL-18 и зрелых дендритных клеток, нагруженных опухолевыми антигенами.

Материалы и методы

Объект исследования

В работе использовалась периферическая венозная кровь и образец опухоли, полученный во время проведения операции, у 48 больных аденокарциномой толстой или прямой кишки II-IV стадии, в возрасте 31-87 лет (средний возраст $60,53 \pm 1,29$ года), проходящих лечение на базе МБУЗ ГКБ № 1 г. Новосибирска и на базе МБУЗ ГКБ № 11 г. Новосибирска. Критерием отбора служило отсутствие химио- и/или радиотерапии до оперативного вмешательства. Всеми пациентами было подписано информированное согласие на проведение исследования.

Получение ДК

Мононуклеарные клетки (МНК) периферической крови выделяли стандартным методом на градиенте плотности фиколл-урографина. Прилипшую фракцию МНК получали методом адгезии на пластике (Nunc, Дания) в среде RPMI-1640 (БиоЛот, Россия), содержащей 10% ЭТС (Nuclope, США), 2 мМ L-глутамин (БиоЛот, Россия), 5×10^{-5} мМ меркаптоэтанол (Sigma, США), NEPES (Sigma, США), 80 мкг/мл гентамицина (KRKA, Словения), 100 мкг/мл ампициллина (ЗАО «Синтез», Россия), в атмосфере 5% CO₂ при 37 °С. Неприлипшие клетки выделяли и сохраняли в культуральной среде в условиях CO₂-инкубатора для дальнейшего использования. Для получения незрелых дендритных клеток (нДК) выделенную фракцию прилипших МНК культивировали в полной среде с добавлением GM-CSF (50 нг/мл) и IL-4 (100 нг/мл) (Peprotech, США). Через 48 часов культивирования к нДК были добавлены аутологичные антигены в составе лизата опухолевых клеток в дозе белка 100 мкг/мл, а еще через 18 часов для получения зрелых ДК (зДК) – TNFα (ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор», Россия) в дозе 25 нг/мл. В качестве контрольной группы использовали ДК, к которым не добавляли опухолевый лизат (ДК [0]).

Получение аутологичных опухолевых клеток и приготовление лизата

Аутологичные клетки опухоли выделяли путем механического измельчения (гомогенизатор Поттера) и последующей фильтрации через металлический фильтр. Далее отмывали 3 раза в бессывороточной среде, содержащей двойную концентрацию антибиотиков. Полученные клетки делили на две части. Одну часть замораживали в ЭТС (Nuclope, США), содержащей 10% ДМСО (Panreac, Испания), из другой получали смесь опухолевых антигенов путем трехкратного цикла замораживания-оттаивания с последующим

фильтрованием через фильтр-насадку (0,45 мкм) (Millipore, Ирландия). Концентрацию белка в лизате определяли спектрофотометрическим методом на приборе NanoDrop 2000C (Thermo Scientific).

Фенотипическая и функциональная характеристика ДК

Для анализа фенотипических характеристик полученных дендритных клеток использовали меченные флюорохромом моноклональные антитела анти-CD83-PE (BD Pharmingen, США), анти-CD86-FITC (BD Pharmingen, США), анти-HLA-DR-FITC (Сорбент, Россия) с последующим анализом при помощи проточного цитофлуориметра FACSCalibur (BD, США), FACS Aria (BD, США). Клетки инкубировали с антителами в течение 20 мин, затем отмывали и фиксировали в 1% растворе параформальдегида. Для оценки способности полученных дендритных клеток к захвату антигена определяли их эффективность рецептор-опосредованного эндоцитоза с помощью FITC-декстрана (Sigma, США). Для этого проводилась инкубация клеток с FITC-декстраном (1 мкг/мл) в полной среде в течение 1 часа при +4 °С и при +37 °С. При +4 °С происходит связывание декстрана с поверхностными рецепторами, а при +37 °С связанный декстран проникает в клетку (непосредственно эндоцитоз). Результаты представлялись в виде отношения интенсивностей флюоресценции меченых клеток, захватывающих декстран при +37 °С и при +4 °С, и выраженного в % (индекс эндоцитозной активности).

Стимуляция цитотоксической и секреторной активности эффекторных клеток против аутологичных клеток опухоли

Для оценки иммуномодулирующего влияния дендритных клеток, нагруженных антигеном, их культивировали с неприлипшей фракцией МНК, в соотношении 1:10. В качестве дополнительного стимулятора в отдельные лунки с МНК и ДК добавляли 10 нг/мл rhIL-12 и rhIL-18 100 нг/мл (Peprotech, США). Далее полученные группы культур клеток разделили на две подгруппы (спонтанная и антиген-стимулированная), ко второй подгруппе через 48 часов инкубации (5% CO₂ и 37 °С) добавляли лизат аутологичных опухолевых клеток в количестве 100 мкг/мл.

Цитотоксическая активность

Через 48 часов после добавления лизата в совместную культуру ДК и МНК оценивали содержание перфорин- и гранзим В-позитивных клеток с помощью анти-Perforin-FITC, и анти-гранзим В-PE моноклональных антител (BD, США) согласно протоколу производителя на проточном

цитофлуориметре FACS[®] (BD, США) в общем лимфоцитарном регионе. Параллельно с проводимыми тестами, в спонтанной подгруппе при совместном культивировании МНК и ДК через 5 суток от момента ссаживания вышеперечисленных клеток оценивали влияние индуцированных зрелых дендритных клеток на цитотоксическую активность мононуклеарных клеток периферической крови против аутологичных опухолевых клеток, используя коммерческий набор «CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay» (Promega, США) согласно инструкции производителя.

Продукция $IFN\gamma$ и $IL-4$, $IL-2$

Содержание иммунорегуляторных цитокинов $IFN\gamma$ и $IL-4$, $IL-2$ в кондиционных средах совместных культур МНК и ДК оценивали через 48 часов после добавления лизата с помощью ком-

мерческих наборов для ИФА (Вектор-Бест, Россия) согласно протоколу производителя.

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью программы «Statistica 6.0». Данные представлялись в виде медианы и диапазона значений квартилей (25% и 75%), а для проверки гипотез о достоверности различий использовали непараметрический критерий Вилкоксона. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

При фенотипической характеристике генерированных в течение 4-х дневного протокола, дендритных клеток установлено повышение процента позитивных клеток, экспрессирующих молекулы CD83, HLA-DR, CD86 в зависимости

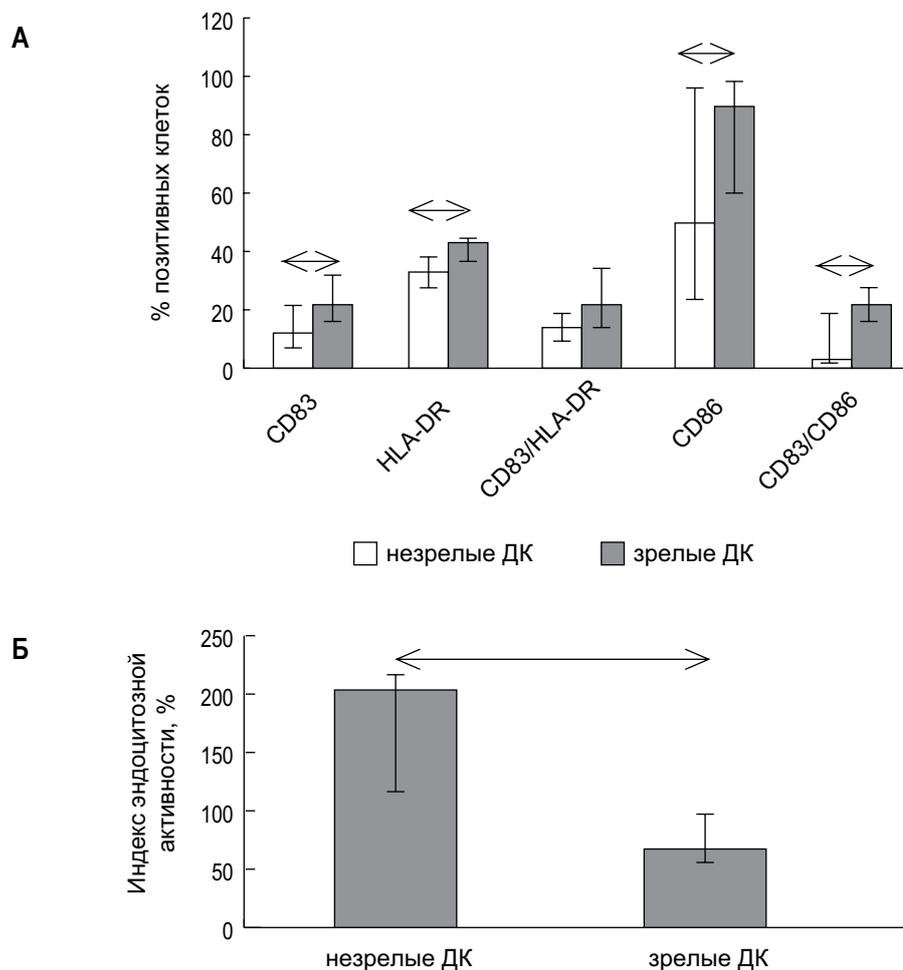


Рисунок 1. А. Уровень экспрессии молекул CD83 CD86 HLA-DR на поверхности незрелых и зрелых дендритных клеток (ДК), полученных из прилипшей фракции мононуклеарных клеток периферической крови больных колоректальным раком ($n = 11$). **Б.** Эндоцитозная активность в зависимости от степени зрелости дендритных клеток (ДК) ($n = 10$)

Примечание. Здесь и далее данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала. Стрелкой на рисунке обозначены статистически значимые различия при $p \leq 0,05$ (критерий Вилкоксона).

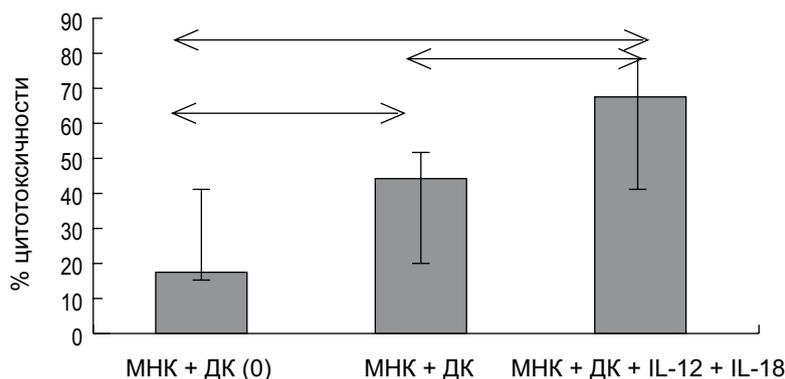


Рисунок 2. Влияние антиген-нагруженных дендритных клеток и rhIL-12 с rhIL-18 на цитотоксическую активность мононуклеарных клеток неприлипающей фракции против аутологических клеток колоректального рака (n = 16) *in vitro*

Примечание. Совместное культивирование мононуклеарных клеток неприлипающей фракции периферической крови пациентов, больных колоректальным раком (МНК) с дендритными клетками (ДК), предварительно обработанными лизатом опухолевой ткани либо не обработанными (ДК [0]), проводилось в течение 5-ти суток. Стрелкой на рисунке обозначены статистически значимые различия при $p \leq 0,05$ (критерий Вилкоксона).

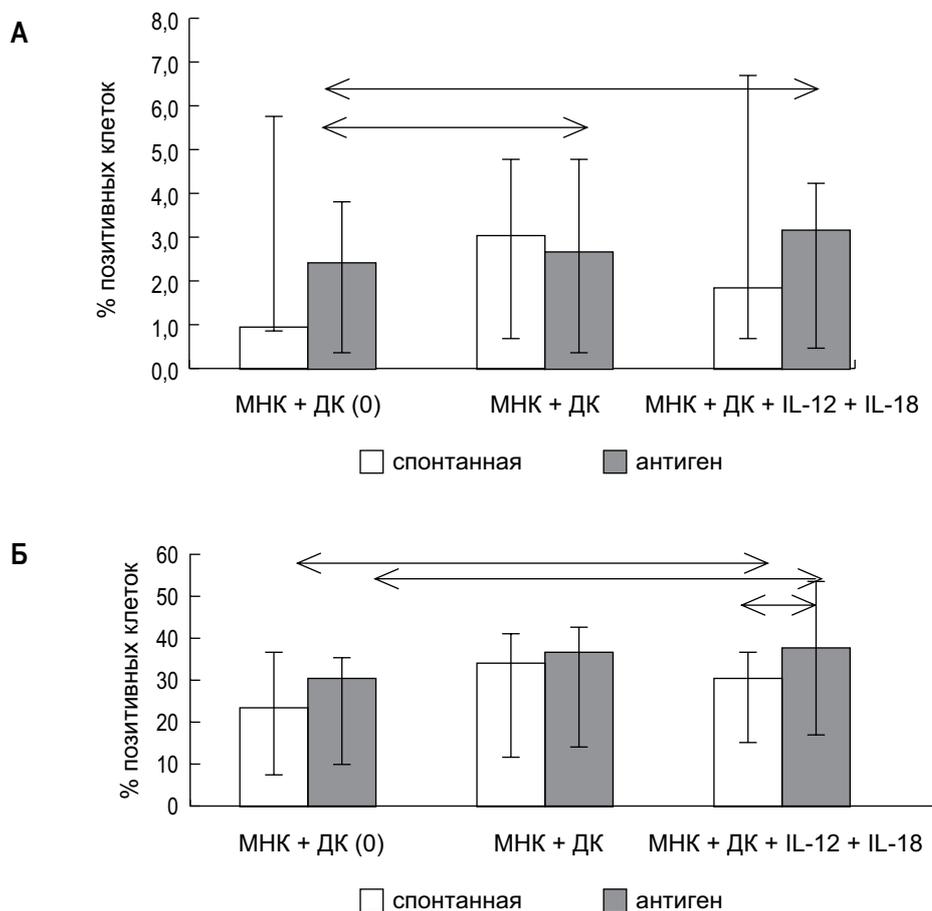


Рисунок 3. Влияние антиген-нагруженных дендритных клеток и rhIL-12 с rhIL-18 на количество перфорин-позитивных лимфоцитов пациентов, больных колоректальным раком (n = 13) *in vitro* (А), на количество гранзим В-позитивных лимфоцитов пациентов, больных колоректальным раком (n = 7) *in vitro* (Б)

Примечание. Совместное культивирование мононуклеарных клеток неприлипающей фракции периферической крови больных колоректальным раком (МНК) с дендритными клетками (ДК), предварительно обработанными лизатом опухолевой ткани либо не обработанными (ДК [0]), проводилось в течение 48 часов до добавления антигенов лизата опухолевой ткани с последующим культивированием, еще в течение 72 часов после добавления. Стрелкой на рисунке обозначены статистически значимые различия при $p \leq 0,05$ (критерий Вилкоксона).

от степени зрелости дендритных клеток (рис. 1А). Для исследования способности генерированных дендритных клеток захватывать антиген проводилась оценка активности в отношении рецептор-опосредованного эндоцитоза (с помощью захвата FITC-декстрана) при +4 °С и при +37 °С. В результате обнаружено понижение интенсивности захвата антигена зрелыми дендритными клетками по сравнению с аналогичным показателем у незрелых дендритных клеток, свидетельствующее об эффективном захвате антигена незрелыми ДК по механизму рецептор-опосредованного эндоцитоза и о сохранении способности зрелых ДК к неспецифическому связыванию декстрана без проникновения его в клетку (рис. 1Б).

Для определения воздействия зрелых, праймированных антигенами опухолевого лизата ДК на цитотоксическую активность мононуклеарных клеток против аутологических клеток опухоли кишечника, проводили цитотоксический тест, основанный на определении в кондиционной среде уровня лактатдегидрогеназы, высвободившейся из лизированных клеток *in vitro*. В целях

модуляции клеточного иммунного ответа *in vitro* при сокультивировании МНК и ДК применяли рекомбинантные цитокины rhIL-18 и rhIL-12. В результате установлено, что ДК, нагруженные опухолевыми антигенами, обладают способностью повышать в 2,5 раза цитотоксическую активность МНК против аутологических клеток опухоли толстой или прямой кишки (рис. 2) по сравнению с ДК (0), которые не были праймированы опухолевым лизатом. Применение rhIL-12 совместно с rhIL-18 при культивировании ДК, нагруженных антигенами опухолевого лизата, с МНК оказало стимулирующее влияние на цитотоксическую активность иммунокомпетентных клеток при данной патологии, подтвержденное повышением процента цитотоксичности МНК против опухолевых клеток кишечника в 1,5 раза по сравнению с аналогичной группой, но без стимуляции цитокинами (рис. 2). Таким образом, следует отметить, что наиболее эффективная стимуляция цитотоксической активности МНК наблюдается при сочетанном использовании ДК и цитокинов.

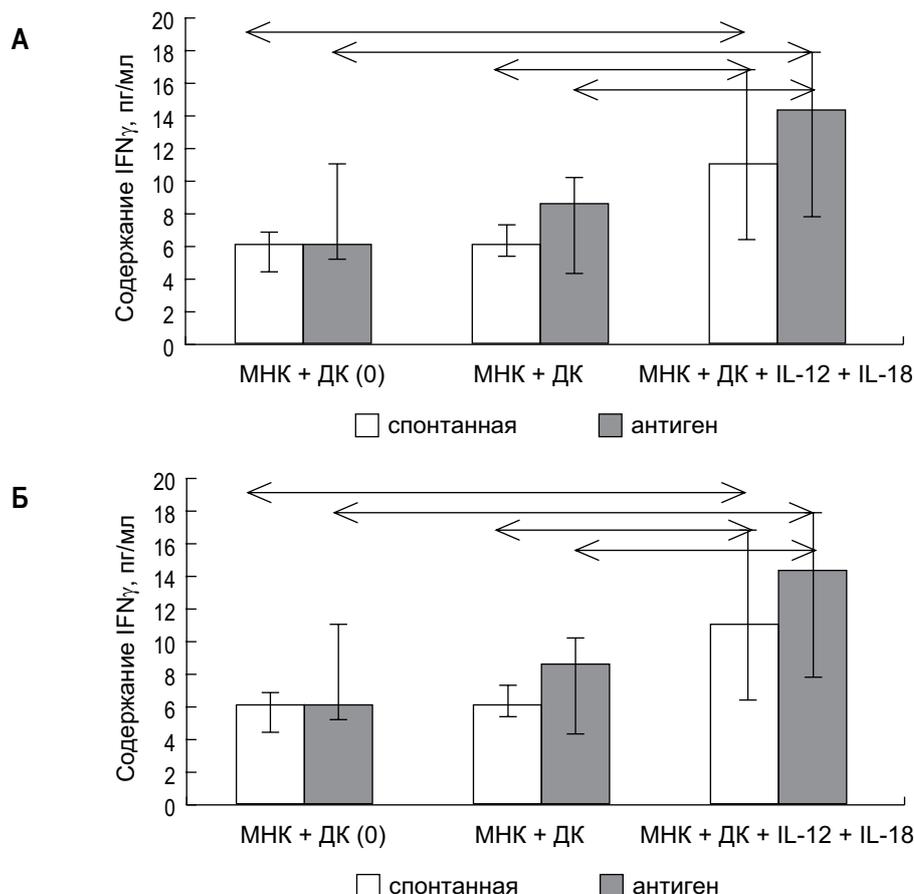


Рисунок 4. Влияние антиген-нагруженных ДК и rhIL-12 с rhIL-18 на уровень продукции IFN γ (А) и IL-2 (Б) мононуклеарными клетками периферической крови пациентов, больных колоректальным раком (n = 17) *in vitro*
Примечание. Стрелкой на рисунке обозначены статистически значимые различия при $p \leq 0,05$ (критерий Вилкоксона).

Для оценки потенциальной цитотоксической активности иммунокомпетентных клеток, больных колоректальным раком, определяли содержание перфорин- и гранзим В-позитивных лимфоцитов после совместного культивирования МНК с ДК. Установлено, что ДК, нагруженные антигенами опухолевого лизата, как самостоятельно, так и в сочетании с цитокинами rhIL-12 и rhIL-18 оказывали стимулирующее влияние на накопление перфориновых гранул лимфоцитами, в антиген-активированной группе, по сравнению со случаем, где в совместную культуру МНК, больных колоректальным раком, добавлялись только ДК (0), которые не были праймированы антигенами опухолевого лизата (рис. 3А).

При определении количества гранзим В-позитивных лимфоцитов в культуре МНК периферической крови, больных колоректальным раком, обнаружено стимулирующее влияние на исследуемый показатель совместного культивирования с ДК, праймированных опухолевым лизатом, в присутствии цитокинов rhIL-12 и rhIL-18, как в спонтанной, так и в антиген-стимулированной подгруппах, по сравнению с группой МНК + ДК (0), а также зарегистрировано повышения процента гранзим В-позитивных клеток в ответ на антиген в условиях добавления ДК и интерлейкинов (рис. 3Б).

Для определения поляризации иммунного ответа под влиянием ДК, нагруженных антигенами опухоли, определяли уровень продукции IFN γ , IL-2, IL-4 в кондиционных средах МНК, как в спонтанной, так и в антиген-активированной подгруппах. В результате исследования свое индуцирующее влияние на продукцию IFN γ в культуре МНК, показали ДК, нагруженные антигенами лизата, в присутствии rhIL-12 и rhIL-18 в спонтанной и антиген-активированной подгруппах по сравнению с контрольными группами (рис. 4А). При определении уровня продукции IL-2 в культуре МНК под воздействием ДК и rhIL-12 с rhIL-18 обнаружено стимулирующее влияние ДК в присутствии rhIL-12 и rhIL-18 на содержание IL-2 в кондиционной среде по сравнению с контролем (МНК + ДК [0]) (рис. 4Б).

Полученные данные по содержанию IL-4 не имели достоверных различий между группами и подгруппами (данные не представлены), что указывает на отсутствие значимого влияния на стимуляцию цитокинов Th2-типа, участвующих в регуляции преимущественного гуморального иммунного ответа.

Обсуждение

На первом этапе исследования необходимо было получить зрелые антиген-нагруженные дендритные клетки из мононуклеарных клеток периферической крови пациентов, больных колоректальным раком. Для этого использовали клеточный протокол, заключающийся в 48-часовом культивировании клеток, до предоставления антигенов опухолевого лизата на 18 часов и терминальной дифференциации полученных незрелых антиген-нагруженных дендритных клеток в течение последующих 24 часов с применением TNF α . По мнению ряда авторов, такой короткий протокол получения зрелых ДК позволяет генерировать ДК, по своим функциональным и фенотипическим характеристикам не отличающиеся от ДК, полученных в результате культивирования по стандартному 5-7-дневному протоколу. В ряде работ доказана способность ДК, полученных с использованием короткого протокола (4 дня), индуцировать антиген-специфический Т-клеточный иммунный ответ [5, 11]. В нашей работе обнаружено достоверное повышение по мере созревания ДК, экспрессирующих соответствующие маркеры дифференцировки и костимуляции CD83, CD86 и HLA-DR, свидетельствует о возможности генерации зрелых ДК, применяя клеточный протокол при данной патологии. Известно, что незрелые дендритные клетки обладают высокой способностью к захвату антигена, учитывая это, для характеристики функциональных свойств полученных в работе дендритных клеток исследовали их способность к захвату FITC-меченного декстрана. Известно, что в процессе созревания ДК теряют свою способность к эндоцитозу из-за снижения экспрессии большинства рецепторов, распознающих антигены, и снижения процессов фаго- и пиноцитоза [1]. Согласно литературным данным, ДК, фагоцитирующие некротические или апоптотические клетки меланомы, эффективнее иницируют иммунный ответ на опухоль, чем ДК, нагруженные опухолеспецифичными пептидами. В нашей работе исследование эффективности захвата антигена, определяемое по отношению интенсивностей флуоресценции при +37 °C и +4 °C, показало, что незрелые ДК, полученные у пациентов, больных колоректальным раком, обладают способностью к захвату антигена, которая снижается по мере созревания ДК, что свидетельствует о возможности захвата антигенов и эффективной их кросс-презентации ден-

дритными клетками с последующим снижением этой функции по мере их дифференцировки.

Для определения эффективности стимуляции противоопухолевой цитотоксической и секреторной активности эффекторных клеток *in vitro* с помощью полученных ДК в нашей работе изучали цитотоксическую активность, продукцию $IFN\gamma$, IL-4, IL-2 и экспрессию перфорина, гранзима В мононуклеарными клетками неприлипшей фракции, предварительно культивированными с ДК-нагруженными антигенами опухолевого лизата. Дополнительно определяли продукцию $IFN\gamma$, IL-4, IL-2 и экспрессию перфорина, гранзима В мононуклеарными клетками в ответ на добавление антигенов лизата через 72 часа. Осуществляя доставку антигенов лизата опухолевых клеток незрелым дендритным клеткам *in vitro* предполагается, что процессы захвата антигена и его кросс-презентации будут протекать без отклонений, а совместное культивирование клеток неприлипшей фракции МНК и ДК будет способствовать формированию клонов антиген-специфических иммунокомпетентных клеток. Для стимуляции и поддержания направленной дифференцировки наивных Т-клеток в Th-1 типа в нашей работе применялся rhIL-18 при совместном культивировании зрелых антиген-нагруженных ДК и мононуклеарных клеток неприлипшей фракции. IL-18 способен воздействовать на основные типы иммунокомпетентных клеток (Т-, В-, NK-клетки), повышая пролиферацию Т-клеток, продукцию $IFN\gamma$ Т- и NK-клетками, а также цитолитическую активность NK-клеток, и цитотоксических Т-лимфоцитов [9, 17]. Известен синергетический эффект IL-18 и IL-12, опосредуемый индукцией рецептора IL-18R α на наивных Т-клетках в ответ на IL-12 и последующая реципрокная стимуляция экспрессии рецептора IL-12R β 2 интерлейкином-18 [16]. Исходя из вышесказанного, целесообразным стало в дальнейшем применять наряду с rhIL-18 rhIL-12, который является одним из основных регуляторов клеточного иммунного ответа. IL-12 известен в качестве активатора NK-клеток и цитотоксических лимфоцитов. Источники его синтеза – моноциты, макрофаги, дендритные клетки, нейтрофилы, В-лимфоциты. Этот цитокин стимулирует дифференцировку Т-лимфоцитов в Th1, усиливает синтез $IFN\gamma$ и IgG и тем самым индуцирует противоопухолевый иммунитет [12]. В целях изучения стимуляторного эффекта и ДК и rhIL-12 и rhIL-18 на цитотоксическую способность МНК периферической крови пациентов,

больных колоректальным раком, проводили цитотоксический тест, основанный на определении уровня в кондиционной среде лактатдегидрогеназы, высвободившейся из лизированных, аутологичных, опухолевых клеток *in vitro*. В результате установлено, что индуцирующее влияние ДК, нагруженных опухолевым лизатом, на цитотоксическую активность МНК, больных колоректальным раком (в 2,5 раза), против аутологичных опухолевых клеток увеличивается при добавлении в культуру иммуномодулирующих цитокинов rhIL-12 с rhIL-18 (в 1,5 раза). Когда же эти цитокины применялись по отдельности, то ожидаемого эффекта не было получено (данные не представлены). Действуя паракринно, rhIL-12 с rhIL-18 способствуют дифференциации наивных Т-клеток в CD8⁺ цитотоксические клетки, а также способны оказывать влияние на противоопухолевую активность NK- и NKT-клеток. Таким образом, ДК, нагруженные лизатом, повышают процент гибели опухолевых клеток в совместной культуре с МНК как самостоятельно, так и в присутствии цитокинов при исследуемой патологии.

Т-лимфоциты, NK- и NKT-клетки ответственны преимущественно за клеточно-опосредованную гибель опухолевых клеток, экспрессируя ряд белков, ответственных за апоптоз опухолевых клеток. Поэтому показателем потенциала цитотоксической активности может выступать накопление перфорина, гранзима В в цитотоксических гранулах лимфоцитов. Перфорины – растворимые, порообразующие белки, секретируемые цитолитическими лимфоцитами, и принимают непосредственное участие в процессах апоптоза. Исследования показали, что человеческий перфорин синтезируется в форме предшественника с молекулярной массой ~67 кДа (555 аминокислотных остатков), который имеет N-концевой сигнальный пептид из 21 аминокислоты. Белок становится активным только после удаления сигнального пептида и дополнительного отщепления гликозилированного C-концевого пептида цистеиновой протеазой. В предыдущих работах установлено, что содержание перфорина в CD8⁺ опухоль-инфильтрующих лимфоцитах значительно снижается по сравнению с CD8⁺ лимфоцитами периферической крови при колоректальном раке. Еще одним компонентом цитотоксических гранул является гранзим В, который, благодаря своей способности активировать прокаспазы, может запускать каспазно-опосредованный путь апоптоза, а также апоптоз с участием митохондриальных белков [3, 20]. Для определения

влияния ДК и rhIL-18 с rhIL-12 на цитотоксический статус эффекторных клеток в совместной культуре МНК определяли количество перфорин-позитивных, гранзим В-позитивных лимфоцитов через 72 часа. Согласно нашим данным, ДК, нагруженные опухолевым лизатом, обладают стимулирующим влиянием на накопление перфорина лимфоцитами при добавлении в совместную культуру рекомбинантных цитокинов и без добавления в антиген-активированной подгруппе, а количество гранзим В-позитивных лимфоцитов повышалось в ответ на совместное культивирование с ДК в присутствии цитокинов и в спонтанной и в антиген-активированной подгруппах, и в ответ на добавление антигенов лизата опухолевых клеток. Объяснением полученных результатов, по-видимому, является инициация перфорин-гранзим В-опосредуемого механизма цитотоксичности эффекторных клеток в совместной культуре МНК, больных колоректальным раком, в ответ на добавление ДК и rhIL-18 с rhIL-12. В литературе описаны механизмы проникновения гранзима В путем эндоцитоза, но эффективнее он проникает в атакуемую клетку с помощью поробразующего белка перфорина [13]. Сам перфорин в высоких концентрациях при наличии свободных ионов Ca^{2+} способен вызывать осмотический лизис за счет образования пор диаметром 5-20 нм в мембране клетки-мишени [21]. Недавно появились данные об еще одной роли гранзима, заключающейся в участии и индуцировании эффективной кросс-презентации антигенов дендритными клетками [10], и подтверждающие преимущество применения предварительно праймированных мононуклеарных клеток, антиген-нагруженными дендритными клетками, впоследствии при иммунотерапии онкологических заболеваний.

В нашей работе при определении уровня продукции МНК $IFN\gamma$, IL-4, IL-2 в ответ на совместное культивирование с ДК и rhIL-18 с rhIL-12,

установлено, что в данных условиях наблюдаются максимальные значения в кондиционных средах $IFN\gamma$, IL-2, доказывающие влияние ДК, нагруженных лизатом, в присутствии цитокинов на формирование иммунных реакций по Th1-типу. Полученные данные по содержанию в кондиционных средах IL-4 не имели достоверных различий между группами и подгруппами, что указывает на отсутствие значимого влияния на стимуляцию цитокинов Th2-типа, участвующих в регуляции преимущественного гуморального иммунного ответа.

Таким образом, при совместном культивировании зрелых аутологичных, нагруженных лизатом дендритных клеток и мононуклеарных клеток пациентов, больных колоректальным раком, происходит активация мононуклеарных клеток, что проявляется в стимуляции цитотоксической активности против аутологичных опухолевых клеток. Использование рекомбинантных цитокинов rhIL-18 совместно с rhIL-12 приводит к усилению оказываемого стимулирующего влияния ДК на МНК, а именно: повышение цитотоксической активности против аутологичных опухолевых клеток, экспрессии перфорина мононуклеарными клетками, уровня продукции $IFN\gamma$ и увеличение экспрессии гранзима В мононуклеарными клетками, уровня продукции IL-2. Таким образом, аутологичные ДК, нагруженные антигенами лизата опухолевых клеток стимулируют проявления Th1-иммунного ответа и не способствуют индукции Th2-цитокина IL-4 в совместной культуре.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009-2013 гг.» (Соглашение № 8265).

Список литературы

1. Каралкин П.А., Лупатов А.Ю., Ярыгин К.Н. Эндоцитоз микро- и наноразмерных частиц дендритными клетками человека в культуре // Биологические мембраны. — 2009. — № 5. — С. 394-400.
2. Злокачественные новообразования в России в 2010 году (заболеваемость и смертность) / Под редакцией В.И. Чиссова, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. — М.: ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздравсоцразвития России, 2012. — 260 с.

Ссылки 3-22 см. в References (стр. 245-246). See References for numbers 3-22 at pp. 245-246.

References

1. Karalkin P.A., Lupatov A.Yu., Yarygin K.N. Endotsitoz mikro- i nanorazmernykh chastits dendritnymi kletkami cheloveka v kul'ture [Endocytosis of micro- and nanosized particles *in vitro* by human dendritic cells]. *Biologicheskie membrany – Membrane and Cell Biology. Biochemistry (Moscow) suppl. Series A*, 2009, no. 5, pp. 394-400.
2. Zlokachestvennyye novoobrazovaniya v Rossii v 2010 godu (zabolevaemost' i smertnost'). Pod redaktsiey Chissova V.I., Starinskogo V.V., Petrovoy G.V. [Malignancies in Russia in 2010 (morbidity and mortality). Eds.: Chissov V.I., Starinsky V.V., Petrova G.V.]. Moscow, FGBU «MNIOI after P.A. Hertzen» Minzdravsocrazvitiya Rossii – FGBU «MNIOI after P.A. Hertzen» Minzdravsocrazvitiya Russia, 2012. 260 p.
3. Andrade F., Roy S., Nicholson D., Thornberry N., Rosen A., Casciola-Rosen L. Granzyme B directly and efficiently cleaves several downstream caspase substrates: implications for CTLre-induced apoptosis. *Immunity*, 1998, vol. 8, no. 4, pp. 451-460.
4. Cammarota R., Bertolini V., Pennesi G., Bucci E.O', Gottardi O., Garlanda C., Laghi L., Barberis M.C., Sessa F., Noonan D.M., Albini A. The tumor microenvironment of colorectal cancer: stromal TLR-4 expression as a potential prognostic marker. *Journal of Translational Medicine*, 2010, vol. 8, pp. 112-128.
5. Chiang C.L.-L., Benencia F., Coukos G. Whole Tumor Antigen Vaccines. *Semin. Immunol.*, 2010, vol. 22, no. 3, pp. 132-143.
6. Colotta F., Allavena P., Sica A., Garlanda C., Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*, 2009, vol. 7, pp. 1073-1081.
7. De Jong E.C., Smits H.H., Kapsenberg M.L. Dendritic cell-mediated T cell polarization. *Springer Semin. Immunol.*, 2004, vol. 26, pp. 289-307.
8. Deschoolmeester V., Baay M., Marck E.V., Weyler J., Vermeulen P., Lardon F., Vermorken J.B. Tumor infiltrating lymphocytes: an intriguing player in the survival of colorectal cancer patients. *BMC Immunology*, 2010, vol. 11, pp. 1471-2172.
9. Gracie J.A., Robertson S.E., McInnes I.B. Interleukin-18. *J. Leukoc. Biol.*, 2003, vol. 73, pp. 213-224.
10. Hoves S., Sutton V.R., Haynes N.M., Hawkins E.D., Fernández Ruiz D., Baschuk N., Sedelies K.A., Schnurr M., Stagg J., Andrews D.M., Villadangos J.A., Trapani J.A. A critical role for granzymes in antigen cross-presentation through regulating phagocytosis of killed tumor cells. *J. Immunol.*, 2011, vol. 187, no. 3, pp. 1166-1175.
11. Jarnjak-Jankovic S., Hammerstad H., Sæbøe-Larssen S., Kvalheim G., Gaudernack G. A full scale comparative study of methods for generation of functional dendritic cells for use as cancer vaccines. *BMC Cancer*, 2007, vol. 7, no. 119, pp. 2407-7-119.
12. Johanna E.A. Portielje, Jan Willem Gratama, Heidi H. van Ojik, Gerrit Stoter, Wim H.J. Kruit IL-12: a promising adjuvant for cancer vaccination. *Cancer Immunol. Immunother*, 2003, vol. 52, pp. 133-144.
13. Keefe D., Shi L., Feske S., Massol R., Navarro F., Kirchhausen T., Lieberman J. Perforin triggers a plasma membrane-repair response that facilitates CTL induction of apoptosis. *Immunity*, 2005, vol. 23, no. 3, pp. 249-262.
14. Liu K., Caldwell S.A., Greenelch K.M., Yang D., Abrams S.I. CTL Adoptive Immunotherapy Concurrently Mediates Tumor Regression and Tumor Escape. *J. Immunol.*, 2006, vol. 176, pp. 3374-3382.
15. Malmberg K.-J., Levitsky V., Norell H., de Matos C.T., Carlsten M., Schedvins K., Rabbani H., Moretta A., S derstr m K., Levitskaya J., Kiessling R. IFN- γ protects short-term ovarian carcinoma cell lines from CTL lysis via a CD94/NKG2A-dependent mechanism. *J. Clin. Invest.*, 2002, vol. 110, pp. 1515-1523.
16. Munk R.B., Sugiyama K., Ghosh P., Sasaki C.Y., Rezanka L., Banerjee K., Takahashi H., Sen R., Longo D.L. Antigen-independent IFN- γ production by human naive CD4+ T cells activated by IL-12 plus IL-18. *Plos One*, 2011, vol. 6, no. 5, p. 18553.
17. Nakanishi K., Yoshimoto T., Tsutsui H., Okamura H. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annu. Rev. Immunol.*, 2001, vol. 19, pp. 423-474.
18. Nersting J., Svenson M., Andersen V., Bendtzen K. Maturation of human dendritic cells by monocyte-conditioned medium is dependent upon trace amounts of lipopolysaccharide inducing tumour necrosis factor α . *Immunology Letters*, 2003, vol. 89, pp. 59-65.
19. Rousalova I., Krepela E. Granzyme B-induced apoptosis in cancer cells and its regulation (Review). *International Journal of Oncology*, 2010, vol. 37, pp. 1361-1378.

20. Thomas D.A., Scorrano L., Putcha G.V., Korsmeyer S.J., Ley T.J. Granzyme B can cause mitochondrial depolarization and cell death in the absence of BID, BAX, and BAK. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, vol. 98, no. 26, pp. 14985-14990.
21. Trambas C.M., Griffiths G.M. Delivering the kiss of death. *Review. Nat. Immunol.*, 2003, vol. 4, no. 5, pp. 399-403.
22. Zhou L., Chong M.M.W., Littman D.R. Plasticity of CD4+ T Cell Lineage Differentiation. *Immunity*, 2009, vol. 30, pp. 646-655.