

# ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ С ОПУХОЛЯМИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Черных Е.Р.<sup>1</sup>, Леплина О.Ю.<sup>1</sup>, Тыринова Т.В.<sup>1</sup>,  
Тихонова М.А.<sup>1</sup>, Ступак В.В.<sup>2</sup>, Мишинов С.В.<sup>2</sup>,  
Пендюрин И.В.<sup>2</sup>, Останин А.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> НИИ клинической иммунологии СО РАМН, г. Новосибирск

<sup>2</sup> ФГУ НИИ травматологии и ортопедии Росмедтехнологий, г. Новосибирск

**Резюме.** В работе проведен сравнительный анализ цитостатической и цитотоксической активности IL-4- и IFN-индуцированных дендритных клеток (IL-4- и IFN-ДК) здоровых доноров и больных с опухолями головного мозга. Цитостатическую активность оценивали по способности ДК ингибировать пролиферацию опухолевых клеток НК-резистентных линий HEp-2 и A-549, цитостатическую активность — по лизису клеток HEp-2. По сравнению с IL-4-ДК, IFN-ДК доноров обладали более выраженным цитостатическим эффектом в отношении клеток линии HEp-2 и сходной цитостатической активностью. У больных с опухолями головного мозга IFN-ДК характеризовались сниженной цитотоксической активностью. Причем ДК больных со злокачественными опухолями головного мозга практически не обладали цитотоксическим потенциалом, тогда как у пациентов с доброкачественными опухолями способность ДК к лизису опухолевых клеток сохранялась. Сравнительное исследование цитостатической активности ДК показало, что в отличие от здоровых доноров IFN-ДК больных со злокачественными и доброкачественными опухолями не ингибировали пролиферацию опухолевых клеток HEp-2. Потеря цитостатической активности ДК не сопровождалась уменьшением доли CD123<sup>+</sup>ДК (обладающих, по данным литературы, наибольшим опухолеостатическим потенциалом) и была, скорее всего, обусловлена функциональными изменениями IFN-ДК.

**Ключевые слова:** дендритные клетки, цитотоксическая/статическая активность, опухолевые клеточные линии, опухоли головного мозга.

Chernykh E.R., Leplina O.Yu., Tyrinova T.V., Tikhonova M.A., Stupak V.V., Mishinov S.V., Pendyurin I.V., Ostanin A.A.

## ANTI-TUMOR ACTIVITY OF DENDRITIC CELLS IN HEALTHY DONORS AND PATIENTS WITH BRAIN TUMORS

**Abstract.** In present work, a comparative analysis of cytostatic and cytotoxic activity of IL-4 and IFN $\alpha$ -induced dendritic cells (IL-4- and IFN-DCs) has been performed in healthy donors and patients with brain tumors. Cytostatic activity was evaluated, as a capacity of DCs to inhibit growth of NK-resistant HEp-2 and A-549 tumor cell lines, whereas cytotoxic activity was measured by assessment of HEp-2 lysis. As compared with IL4-DC, IFN-DCs from healthy donors displayed a more pronounced cytostatic effect and similar cytotoxic activity against HEp-2 cells. In the patients with brain tumors, IFN-DCs were characterized by decreased cytotoxic activity. Meanwhile, DCs from the patients with malignant gliomas virtually did not exhibit a cytotoxic potential, whereas IFN-DCs from the patients with benign brain tumors retained their cytotoxic properties. A comparative study has shown that, in contrast to healthy donors, IFN-DCs from the patients with either malignant or benign brain tumors did not inhibit HEp-2 proliferation.

### Адрес для переписки:

Черных Елена Рэмовна,  
НИИ клинической иммунологии СО РАМН  
630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.  
Тел.: (383) 236-03-29.  
Факс: (383) 222-70-28.  
E-mail: ct\_lab@mail.ru

The loss of DC-mediated cytostatic activity was not associated with decrease of CD123<sup>+</sup> DCs (known as cells with maximal tumor-inhibitory potential), and, most likely, it resulted from functional changes in IFN-DC populations. (*Med. Immunol.*, vol. 12, N 3, pp 199-206)

**Keywords:** dendritic cells, cytotoxic/cytostatic activity, tumor cell lines, brain tumors.

## Введение

Дендритные клетки (ДК) играют ведущую роль в запуске специфического противоопухолевого иммунного ответа, поскольку наделены уникальной способностью захватывать, процессировать и презентировать опухолевые антигены наивным CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитам, а также эффекторным CD8<sup>+</sup>Т-клеткам. Кроме того, продуцируемые дендритными клетками цитокины способны регулировать направленность и силу иммунного ответа, активировать естественные цитотоксические клетки (NK<sup>+</sup>, NKT-клетки) и участвовать в координации гуморального иммунного ответа [15, 2].

Недавние исследования также показали, что помимо важной роли в запуске адаптивного противоопухолевого иммунного ответа, ДК могут непосредственно подавлять рост опухолевых клеток за счет цитостатического и цитотоксического эффектов. Причем молекулярные механизмы противоопухолевой активности ДК существенно варьируют в зависимости от типа дендритных и опухолевых клеток. В частности, гибель опухолевых клеток может опосредоваться через механизмы апоптоза и некроза с вовлечением мембранно-связанных и продуцируемых молекул семейства фактора некроза опухоли-альфа (TNF $\alpha$ , lymphotoxin- $\alpha_1\beta_2$ , FasL, TRAIL), а также перфорина и/или гранзима [6, 22].

Двойственная функция ДК как непосредственных эффекторов (клеток-киллеров) врожденного иммунитета и индукторов/регуляторов адаптивного иммунного ответа придает особую значимость ДК в противоопухолевой защите и привлекает к этим клеткам особый интерес в плане их терапевтического использования. Действительно, ДК могут непосредственно участвовать в элиминации опухолевых клеток. При этом множество механизмов, задействованных в реализации цитотоксической активности ДК, по-видимому, позволяет преодолеть «резистентность» опухолевых клеток к лизису. Разрушение опухолевых клеток дендритными клетками сопровождается высвобождением опухолевых антигенов, которые могут сразу же презентироваться дендритными клетками Т-лимфоцитам. Кроме того, важно отметить, что благодаря специфическому распознаванию через рецепторы NKG2D или иные пока неидентифицируемые молекулы цитотоксическая активность ДК направлена именно против опухолевых, но не нормальных клеток. Поэтому иммунотерапия с использованием ДК предполагает наличие минимальных побочных эффектов [12].

Значение цитотоксической активности ДК *in vivo* подтверждается рядом фактов. Во-первых, ДК присутствуют в зоне опухолевого роста, причем более высокое их содержание коррелирует с более благоприятным прогнозом [3]. Во-вторых, интактные ДК (не нагруженные опу-

холевым антигеном) при локальном введении в опухоль ингибируют опухолевый рост и в ряде случаев вызывают ремиссию [8, 17]. Кроме того, показано, что внутриопухолевое введение ДК повышает эффективность химиотерапии, что может быть обусловлено суммацией противоопухолевого эффекта цитостатиков и ДК [18].

Большинство исследований противоопухолевой активности ДК у человека проведено с миелоидными ДК, выделенными из периферической крови или генерированными *in vitro* из моноцитов крови в присутствии гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) и интерлейкина-4 (IL-4). Показано, что цитотоксическая активность этих ДК усиливается после их обработки интерферонами I типа или интерфероном- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) [13, 9]. Однако противоопухолевый потенциал ДК, генерируемых в присутствии интерферона- $\alpha$  (IFN $\alpha$ ), остается практически неизученным. Тем более отсутствуют данные об эффекторной функции ДК при онкопатологии.

Целью настоящего исследования явилось изучение противоопухолевой активности ДК, генерируемых в условиях замены IL-4 интерфероном- $\alpha$  (IFN $\alpha$ ), и сравнительный анализ цитостатической/токсической активности IFN $\alpha$ -индуцированных ДК у здоровых доноров и больных с опухолями головного мозга.

## Материалы и методы

В исследование были включены 28 здоровых доноров крови и 22 пациента с опухолями головного мозга, в том числе 12 больных с гистологически верифицированной глиобластомой (ГБ), 6 — с анапластической астроцитомой (АА), и по одному пациенту с олигодендроглиомой, ангиоретикулемой, фибриллярно-протоплазматической астроцитомой и менингиомой. Обследование всех пациентов проводилось при получении письменного информированного согласия. Мононуклеарные клетки (МНК) получали центрифугированием гепаринизированной венозной крови в градиенте плотности фикола-верографина. ДК в стандартном «интерлейкиновом» протоколе получали путем культивирования прилипающей фракции МНК в 6-луночных планшетах («Nunclon», Дания) в течение 5 суток в среде RPMI-1640 («Sigma-Aldrich», США), дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 5мМ HEPES-буфера, 100 мкг/мл гентамицина и 5% сыворотки плодов коровы («БиолоТ», Санкт-Петербург), в присутствии GM-CSF (40 нг/мл, «Sigma-Aldrich») и IL-4 (40 нг/мл; «Sigma-Aldrich») с последующим созреванием в течение 48 ч с липополисахаридом (10 мкг/мл, LPS *E. coli* 0114:B4, «Sigma-Aldrich»). IFN $\alpha$ -индуцированные ДК генерировали пу-

тем культивирования прилипающей фракции МНК в течение 3 суток в присутствии GM-CSF (40 нг/мл) и IFN $\alpha$  (1000 Ед/мл, Роферон-А, Roche, Швейцария) с последующим созреванием в течение 24 ч с LPS (10 мкг/мл).

Фенотипический анализ ДК проводили методом проточной цитофлюориметрии (FACSCalibur, Becton Dickinson, США) с использованием FITC- или PE-меченных моноклональных антител анти-CD14, HLA-DR, («Сорбент», Москва) и CD86, CD83, CD123 (BD PharMingen, США).

Цитостатическую активность ДК в отношении опухолевых клеток оценивали по способности ДК ингибировать пролиферацию клеток опухолевых линий Нер-2 (клетки эпителиальной карциномы гортани человека) и А-549 (клетки карциномы рака легкого человека). Для этого клетки-мишени опухолевых линий ( $1 \times 10^3$ /лунку) инкубировали в течение 48 ч в круглодонных 96-луночных планшетах в отсутствие (контроль) и в присутствии клеток-эффекторов (+ДК, опыт) в соотношении эффекторы/мишени 10:1, 20:1 и 40:1. Интенсивность пролиферации оценивали по включению  $^3\text{H}$ -тимидина (1 мКю/лунку), вносимого за 18 ч до окончания культивирования. Индекс влияния ДК (ИВ $_{\text{ДК}}$ ) рассчитывали как отношение пролиферативного ответа в опыте к контролю, а цитостатическую активность ДК определяли по формуле  $(1 - \text{ИВ}_{\text{ДК}}) \times 100\%$ .

Для оценки цитотоксической активности клетки линии Нер-2 предварительно метили  $^3\text{H}$ -тимидином (1 мКю/лунку) в течение 18 ч, отмывали и культивировали в 96-луночных план-

шетах ( $1 \times 10^3$ /лунку). Эффекторные клетки (ДК) добавляли в соотношении 40:1, 20:1 и 10:1. Через 18 ч клетки переносили на фильтры и оценивали радиоактивность на  $\beta$ -счетчике (Packard Instrument, Meriden, CT). Жизнеспособные Нер-2 клетки с высокомолекулярной ДНК задерживались на фильтре, тогда как лизированные опухолевые клетки с фрагментированной ДНК удалялись с фильтра в процессе харвестирования. Процент цитотоксичности рассчитывали по формуле  $[1 - (\text{имп/мин в культурах с эффекторными клетками} / \text{имп/мин в контрольных культурах в отсутствие эффекторных клеток})] \times 100\%$ .

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета прикладных программ Statistica 6.0 для Windows. Для выявления значимых различий сравниваемых показателей использовали непараметрический U-критерий Вилкоксона–Манна–Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ . Данные приведены в виде среднего арифметического значения (М) и стандартной ошибки среднего (S.E.), а также в виде медианных значений (Median) и интерквартильного диапазона (IQR).

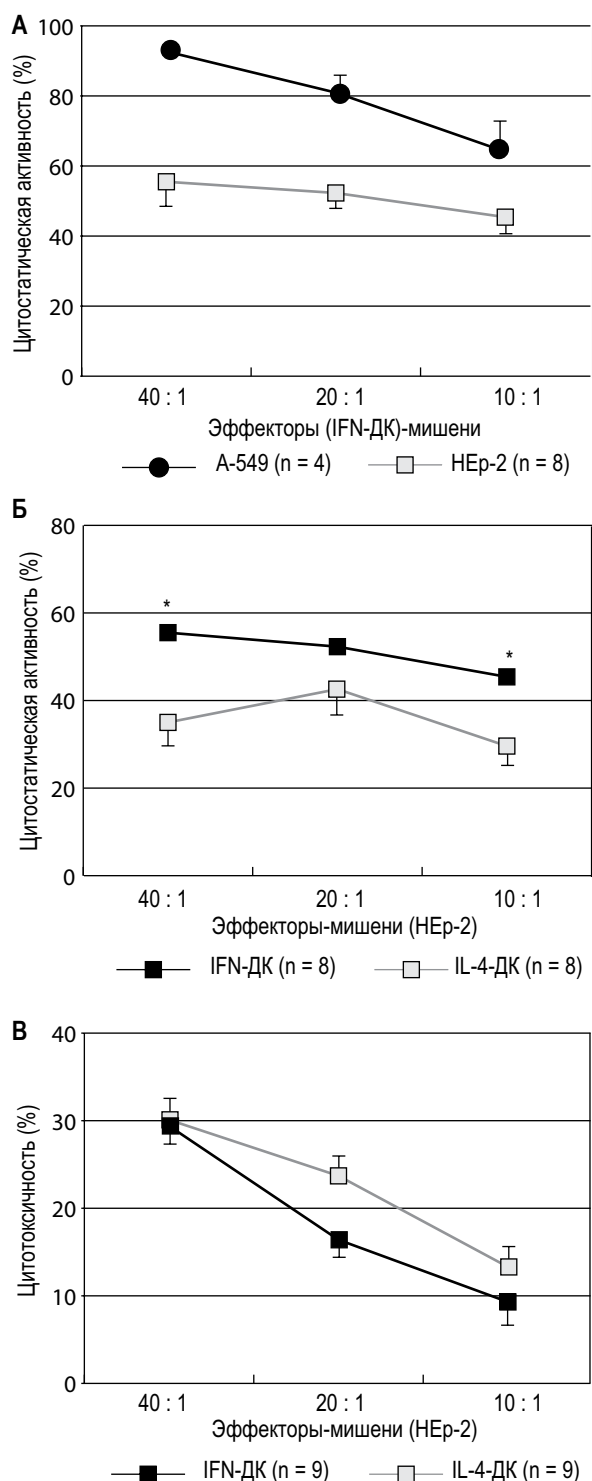
## Результаты

Исследование поверхностных маркеров ДК здоровых доноров, генерированных в стандартном протоколе (IL-4-ДК) и индуцированных в присутствии IFN $\alpha$  (IFN-ДК) показало (табл. 1), что большинство клеток в обоих протоколах не экспрессировали CD14 и несли на своей поверхности HLA-DR и CD86 молекулы, то есть соответствовали по фенотипу дендритным клеткам.

**ТАБЛИЦА 1. ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА IL-4- И IFN $\alpha$ -ИНДУЦИРОВАННЫХ ДК ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ**

Маркеры		IL-4-ДК (n = 14)	IFN-ДК (n = 14)
CD14	M $\pm$ S.E.	11,1 $\pm$ 2,4	22,2 $\pm$ 3,7*
	Median	8,0	23,0
	IQR	3-19	10-27
CD83	M $\pm$ S.E.	52,8 $\pm$ 6,2	34,6 $\pm$ 3,7*
	Median	46,5	36,0
	IQR	30-51	22-46
CD86	M $\pm$ S.E.	58,3 $\pm$ 3,6	65,2 $\pm$ 4,2
	Median	45,6	52,4
	IQR	38-64	32-67
CD123	M $\pm$ S.E.	10,7 $\pm$ 1,8	40,1 $\pm$ 3,4*
	Median	9,6	41,6
	IQR	4-16	24-49
HLA-DR	M $\pm$ S.E.	91,8 $\pm$ 7,4	86,4 $\pm$ 9,2
	Median	90,4	88,9
	IQR	84-98	76-92

**Примечание.** Представлено относительное (%) содержание ДК, экспрессирующих данный маркер. \* –  $P < 0,01$  – достоверность различий между популяциями IL-4- и IFN $\alpha$ -индуцированными ДК (U-критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).



**Рисунок 1. Цитостатическая и цитотоксическая активность ДК здоровых доноров против клеток опухолевых линий**

**Примечание.** По оси ординат представлены средние значения ( $M \pm S.E.$ ) цитостатической активности IFN-ДК против опухолевых клеток линий А-549 и HEP-2 (рис. 1А), а также цитостатической (рис. 1Б) и цитотоксической (рис. 1В) активности IFN-ДК и IL-4-ДК против клеток линии HEP-2. По оси абсцисс – соотношение эффекторов-мишеней (40:1, 20:1 и 10:1). \* –  $pU < 0,05$  – достоверность различий IFN-ДК и IL-4-ДК (U-критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

При этом популяция IL-4-ДК отличалась большим содержанием зрелых CD83<sup>+</sup> клеток, а популяция IFN-ДК – содержанием клеток с рецептором к IL-3 (CD123<sup>+</sup>), что согласуется с данными литературы [7, 16].

Влияние ДК на рост опухолевых клеток оценивали в культурах NK-резистентных опухолевых линий HEP-2 и А-549. Это позволяло исключить цитотоксический эффект натуральных киллерных клеток, которые в виде небольшой примеси могли присутствовать в культурах ДК. Как видно из данных рис. 1А, IFN-ДК обладали четким дозозависимым ингибирующим эффектом на пролиферацию клеток линий HEP-2 и А-549. При этом сравнительный анализ эффектов IFN-ДК и IL-4-ДК в культурах клеток HEP-2 (рис. 1Б) показал, что антипролиферативная активность IFN-ДК при соотношении эффекторов-мишеней равном 40:1 была достоверно выше, чем у IL-4-ДК. Характерно, что уменьшение количества IFN-ДК при со-культивировании с опухолевыми клетками не сказывалось критично на уровне их цитостатического эффекта. В результате при соотношении эффекторов-мишеней 10:1 ингибирующая активность IFN-ДК сохранялась на уровне  $45,4 \pm 6,2\%$ , тогда как у IL-4-ДК была в 1,5 раза ниже ( $29,6 \pm 7,4\%$ ;  $Pu < 0,05$ ). Таким образом, IFN-ДК обладали более выраженным статическим эффектом в отношении опухолевых клеток линии HEP-2.

Поскольку подавление пролиферации опухолевых клеток могло быть обусловлено не только цитостатическим, но и непосредственным цитотоксическим эффектом, на следующем этапе исследовали способность ДК лизировать опухолевые клетки HEP-2 (рис. 1В). IFN-ДК обладали дозозависимой цитотоксической активностью в культурах клеток линии HEP-2, которая при максимальном соотношении эффекторов и мишеней (40:1) составляла в среднем  $29,4 \pm 4,6\%$  и снижалась до  $9,3 \pm 3,1\%$  по мере уменьшения содержания ДК. Сравнение IFN-ДК и IL-4-ДК, полученных от одних и тех же доноров, показало, что оба типа ДК обладали схожей цитотоксической активностью. Однако если цитотоксическая и цитостатическая активности IL-4-ДК находились в прямой взаимосвязи, которая проявлялась в виде сильной тенденции ( $r_s = 0,65$ ;  $p = 0,08$ ), то антипролиферативный эффект IFN-ДК не коррелировал с их цитотоксической активностью ( $r_s = 0,08$ ;  $p = 0,87$ ). Принимая также во внимание, что при одинаковой цитотоксической активности способность к угнетению пролиферации опухолевых клеток у IFN-ДК была выше, чем у IL-4-ДК, можно полагать, что цитостатическая и цитотоксическая активности

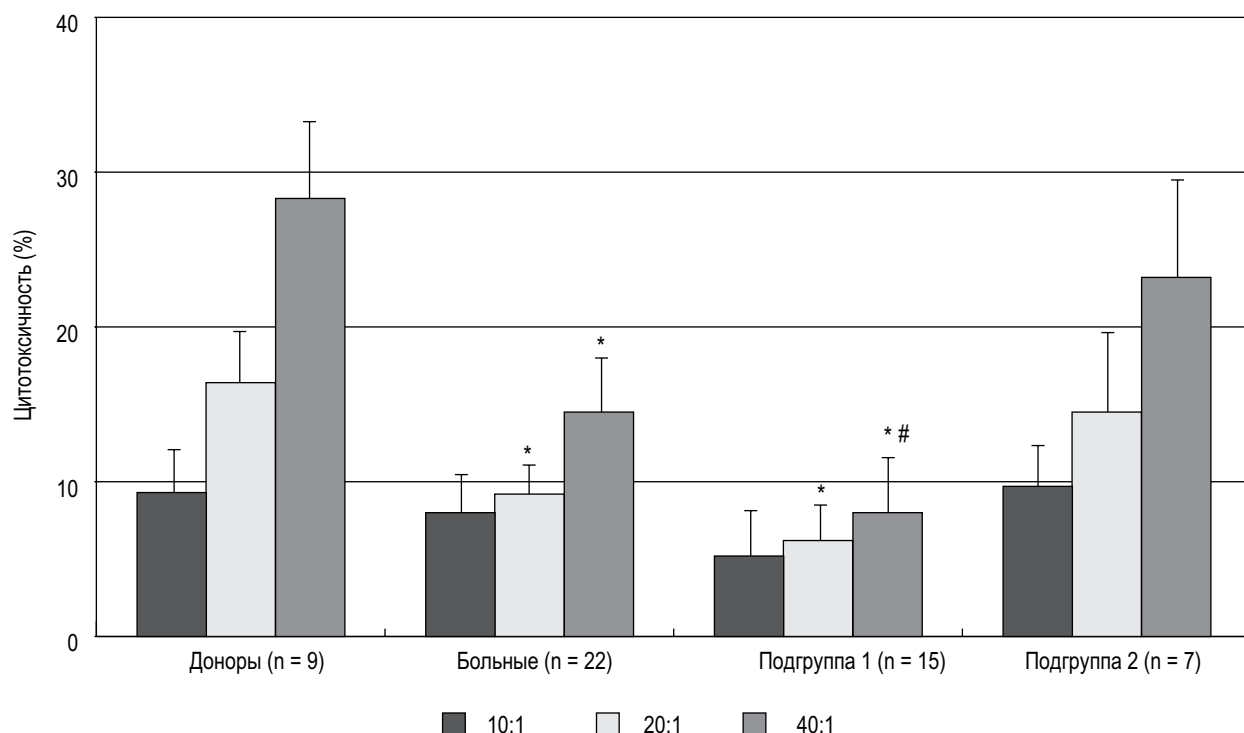
IFN-ДК, скорее всего, опосредуются через различные механизмы.

При сравнении IFN-ДК здоровых доноров и больных с опухолями головного мозга (рис. 2) оказалось, что в целом по группе ДК больных ( $n = 22$ ) отличались сниженной цитотоксической активностью ( $p < 0,05$ ). Поскольку обследованные пациенты различались по гистологическому типу опухолей, анализ эффекторных функций ДК был также проведен отдельно в подгруппах больных со злокачественными и доброкачественными опухолями. В первую подгруппу вошли 15 пациентов, включая 12 больных с ГБ и 3 пациентов с АА III степени злокачественности. Вторая подгруппа включала 7 больных, в том числе 3 пациентов с АА II степени злокачественности, а также больных с олигодендроглиомой (1), ангиоретикулемой (1), фибриллярно-протоплазматической астроцитомой (1) и менингиомой (1). ДК больных со злокачественными опухолями головного мозга практически не обладали цитотоксической активностью ни в одном из исследуемых соотношений эффекторов и мишеней (рис. 2). В то же время IFN-ДК пациентов с доброкачествен-

ными опухолями сохраняли способность к дозозависимому лизису опухолевых клеток Нер-2.

Сравнительное исследование цитостатической активности ДК показало (табл. 2), что в отличие от здоровых доноров IFN-ДК больных не ингибировали пролиферацию опухолевых клеток Нер-2 ( $ИВ_{ДК} > 1,0$ ). Отсутствие цитостатической активности было характерно как для ДК больных со злокачественными, так и с доброкачественными опухолями. Только у 4 из 15 (26,7%) больных со злокачественными и у 3 из 7 (43%) пациентов с доброкачественными опухолями IFN-ДК при максимальном соотношении эффекторы-мишени (40:1) проявляли относительно слабый цитостатический эффект (на уровне 10-15%). Но и в этом случае при уменьшении количества IFN-ДК до 20:1 и/или 10:1 антипролиферативный эффект ДК нивелировался, и они оказывали стимулирующее влияние на пролиферацию опухолевых клеток линии Нер-2.

Одной из особенностей IFN-ДК является более высокое по сравнению с «интерлейкиновыми» ДК содержание  $CD123^+$  клеток. Молекула



**Рисунок 2. Цитотоксическая активность IFN-ДК здоровых доноров и больных с опухолями головного мозга**

**Примечание.** По оси ординат представлены средние значения ( $M \pm S.E.$ ) цитотоксической активности IFN-ДК здоровых доноров ( $n = 9$ ) и больных с опухолями головного мозга ( $n = 22$ ). Подгруппа 1 ( $n = 15$ ) – больные со злокачественными и подгруппа 2 ( $n = 7$ ) – с доброкачественными опухолями. Клетки-эффекторы (IFN-ДК) и клетки-мишени (линии Нер-2), меченые  $^3H$ -тимидином, культивировали в соотношениях 10:1, 20:1 и 40:1 в течение 18 ч. Процент цитотоксичности рассчитывали по формуле  $[1 - (\text{имп/мин в культурах с эффекторными клетками} / \text{имп/мин в контрольных культурах в отсутствие эффекторных клеток})] \times 100\%$ .

\* –  $pU < 0,05$  – достоверность различий по сравнению с IFN-ДК здоровых доноров.

# –  $pU < 0,05$  – достоверность различий между подгруппами больных с доброкачественными и злокачественными опухолями (U-критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

ТАБЛИЦА 2. ЦИТОСТАТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ IFN-ДК ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ С ОПУХОЛЯМИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Группы		Соотношение клеток-эффекторов/мишеней		
		40:1	20:1	10:1
Доноры (n = 17)	M±S.E.	0,27±0,05	0,4±0,05	0,6±0,2
	Median	0,26	0,38	0,47
	IQR	0,17 - 0,38	0,28-0,53	0,32-0,73
Больные (общая группа, n = 22)	M±S.E.	2,6±0,4	3,5±0,5	3,2±0,4
	Median	1,9	3,16	2,7
	IQR	1,1 - 4,1	2,3-5,2	1,9-4,1
Подгруппа 1 (n = 15)	M±S.E.	2,3±0,5	3,3±0,7	2,9±0,6
	Median	1,8	2,4	2,5
	IQR	1,1-3,9	1,4-6,5	1,7-4,3
Подгруппа 2 (n = 7)	M±S.E.	2,9±0,9	2,8±0,6	2,9±0,5
	Median	2,9	2,8	2,9
	IQR	0,97-4,4	2,3-3,5	1,9-4,1

**Примечание.** Представлены индексы влияния IFN-ДК (ИВДК, расч. ед.) на пролиферацию опухолевых клеток линии HEp-2 при различных соотношениях клеток-эффекторов/мишеней (40:1, 20:1 и 10:1). ИВДК рассчитывали как отношение пролиферативного ответа в опыте (в присутствии IFN-ДК) к контролю (клетки HEp-2 в отсутствие ДК). Подгруппа 1 – больные со злокачественными и подгруппа 2 – с доброкачественными опухолями головного мозга.

CD123 служит маркером плазматоидных ДК, и именно эти клетки в популяции IFN-ДК по данным ряда авторов характеризуются более высокой цитостатической активностью [10, 21]. Анализ относительного содержания CD123<sup>+</sup> ДК в популяции IFN-ДК не выявил их значимого снижения у больных с опухолями головного мозга (34,0±5,0 против 40,1±3,4 у доноров;  $p > 0,05$ ). Таким образом, потеря цитостатической активности обусловлена, скорее всего, не количественными, а функциональными изменениями общей популяции IFN-ДК, генерируемых у больных с опухолями головного мозга.

## Обсуждение

Недавние исследования продемонстрировали, что миелоидные ДК, генерируемые в присутствии GM-CSF и IL-4, обладают способностью подавлять рост клеток различных опухолевых линий в культуре *in vitro*, причем опухоль-ингибирующая активность IL-4-ДК усиливается после их созревания в присутствии LPS или активации интерферонами [5, 11, 12]. Однако механизмы цитотоксической/цитостатической активности LPS-стимулированных ДК и ДК, активированных интерферонами, могут существенно различаться. Так, важная роль в реализации противоопухолевой активности LPS-активированных ДК отводится TNF $\alpha$  [14, 19]. В то же время, учитывая снижение поверхностной экспрессии TRAIL [20] по мере созревания ДК, предполагается, что данная молекула не является ключевой в реализации про-

тивоопухолевого эффекта зрелых миелоидных ДК. Напротив, цитотоксическую/статическую активность ДК, активированных интерферонами, связывают с молекулой TRAIL, экспрессия которой существенно усиливается в присутствии интерферонов I типа и IFN $\gamma$  [9, 13], а также с внутриклеточной экспрессией граназа B [11].

В проведенных нами исследованиях впервые охарактеризована эффекторная функция IFN $\alpha$ -индуцированных ДК против опухолевых клеток NK-резистентных линий. Полученные данные свидетельствуют, что IFN-ДК после созревания в присутствии LPS проявляют такую же цитотоксическую активность, как и зрелые ДК, генерируемые в стандартном протоколе в присутствии IL-4, однако при этом обладают большей способностью подавлять пролиферацию опухолевых клеток. Учитывая снижение поверхностной экспрессии TRAIL по мере созревания ДК [20], а также использование в качестве мишеней клеток TRAIL-резистентной линии HEp-2, позволяет предполагать, что цитотоксическая активность LPS-активированных IFN-ДК может реализовываться через TRAIL – независимый путь. Тем не менее более высокая цитостатическая активность IFN-ДК в культурах клеток линии A-549 (в отличие от клеток линии HEp-2, чувствительной к TRAIL [4]) свидетельствует о возможном вовлечении молекулы TRAIL в реализацию эффекторной функции IFN-ДК.

Отсутствие корреляции между цитотоксическим и цитостатическим эффектом IFN-ДК позволяет полагать, что указанные активности могут опосредоваться различными механизмами.

Аналогичные данные были получены в отношении IL-4-ДК [19]. Авторы показали, что LPS-стимулированные IL-4-ДК обладают цитостатической активностью, ассоциированной с TNF $\alpha$ . Причем эта активность не была связана с цитотоксической активностью ДК. Так, IL-4-ДК ингибировали рост модифицированных клеток линии Jurkat с дефицитом каспазы-8 или гиперэкспрессией Bcl-2. С другой стороны, супернатанты IL-4-ДК ингибировали пролиферацию немодифицированных клеток Jurkat, но не проявляли цитотоксической активности. Цитостатическая и цитотоксическая активности IFN-ДК, очевидно, также реализуются через независимые механизмы. Дополнительными аргументами в пользу данного предположения, на наш взгляд, могут быть данные о сходной цитотоксической активности, но более высоком уровне цитостатической активности IFN-ДК по сравнению с IL-4-ДК, а также относительно сохранная цитотоксическая активность IFN-ДК больных с доброкачественными опухолями головного мозга при отсутствии цитостатической активности.

Еще одним важным фактом, выявленным в настоящем исследовании, является дефектность IFN-ДК как эффекторных клеток противоопухолевой резистентности у больных с внутримозговыми опухолями и особенно злокачественными глиомами. Злокачественные опухоли головного мозга индуцируют слабый антигенспецифический ответ, что обусловлено опухоль-индуцированной иммуносупрессией, а также локализацией опухоли в иммунологически привилегированных тканях мозга. Ранее нами было показано, что IFN-ДК больных характеризуются сохранной антиген-презентирующей функцией, способны активировать Т-клетки к продукции Th1 цитокинов и индуцировать пролиферацию Т-лимфоцитов в ответ на антигены, содержащиеся в лизате опухолевых клеток [1]. Однако выявленный дефект эффекторной функции ДК может ослаблять противоопухолевый ответ и являться еще одной причиной несостоятельности противоопухолевой защиты у больных со злокачественными опухолями головного мозга. Действительно, по сравнению с больными злокачественными глиомами пациенты с доброкачественными опухолями головного мозга, которые характеризуются медленной прогрессией и существенно более высокими показателями выживаемости, отличались относительно сохранной цитотоксической активностью дендритных клеток. Кроме того, можно полагать, что в условиях нарушенной эффекторной функции ДК проведение циторедуктивной терапии (радио-химиотерапия) у больных злокачественными глиомами приобретает особую важность

как в плане непосредственной элиминации опухолевых клеток, так и высвобождения опухолевых антигенов, необходимых для запуска специфического иммунного ответа. Дальнейшие исследования, направленные на изучение взаимосвязи между противоопухолевой активностью IFN-ДК и клиническими исходами, а также выяснение механизмов дефекта цитотоксической/статической активности ДК, возможно, позволят в будущем объяснить различную чувствительность больных к комплексной терапии и обосновать новые иммунотерапевтические подходы к лечению злокачественных глиом головного мозга.

## Список литературы

1. Черных Е.Р., Леплина О.Ю., Ступак В.В., Пендюрин И.В., Никонов С.Д., Тихонова М.А., Останин А.А. Клеточные технологии в лечении злокачественных глиом головного мозга // Клеточные технологии. Теоретические и прикладные аспекты. — Новосибирск: Наука, 2009. — С. 240-276.
2. Banchereau J., Briere F., Caux C., Davoust J., Lebecque S., Liu Y., Pulendran B., Palucka K. Immunobiology of dendritic cells // Annu Rev Immunol. — 2000. — Vol. 18. — P. 767-811.
3. Becker Y. Dendritic cell activity against primary tumors: an overview // In Vivo. — 1993. — Vol. 7. — P. 187-191.
4. Chaperot L., Blum A., Manches O., Lui G., Angel J., Molens J.-P., Plumas J. Virus or TLR agonists induce TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells // J. Immunol. — 2006. — Vol. 176. — P. 248-255.
5. Chapoval A.I., Tamada K., Chen L. In vitro growth inhibition of a broad spectrum of tumor cell lines by activated human dendritic cells // Blood. — 2000. — Vol. 95. — P. 2346-2351.
6. Chauvin C., Josien R. Dendritic cells as killers: mechanistic aspects and potential roles // J. Immunol. — 2008. — Vol. 18. — P. 11-16.
7. Della Bella S., Nicola S., Riva A., Biasin M., Clerici M., Villa M.L. Functional repertoire of dendritic cells generated in granulocyte macrophage-colony stimulating factor and interferon- $\alpha$  // J. Leuk Biol. — 2004. — Vol. 75. — P. 106-116.
8. Ehteshami M.P., Kabos M.A., Gutierrez K., Samoto K.L., Black J., Yu S. Intratumoral dendritic cell vaccination elicits potent tumoricidal immunity against malignant glioma in rats // J. Immunother. — 2003. — Vol. 26. — P. 107-116.
9. 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) // J. Exp. Med. — 1999. — Vol. 190. — P. 1155-1164.

10. Jun S., Ikeda K., Maeda Y., Shinagawa K., Ohtsuka A., Yamamura H., Tanimoto M. Identification of CD123<sup>+</sup> myeloid dendritic cells as an early-stage immature subset with strong tumorigenic potential // *Cancer Letters*. — 2008. — Vol. 270. — P. 19-29.
11. Korthals M., Safaian N., Kronenwett R., Maihöfer D., Schott M., Papewalis C., Blanco E.D., Winter M., Czibere A., Haas R., Kobbe G., Fenk R. Monocyte derived dendritic cells generated by IFN $\alpha$  acquire mature dendritic and natural killer cell properties as shown by gene expression analysis // *J. Translational Med.* — 2007. — Vol. 5. — P. 46-57.
12. Larmonier K., Fraszczak J., Lakomy D., Bonnotte B., Katsanis E. Killer dendritic cells and their potential for cancer immunotherapy // *Cancer Immunol & Immunother.* — 2009. — Vol. 59. — P. 1-11.
13. Liu S., Yu Y., Zhang M., Wang W., Cao X. The involvement of TNF- $\alpha$ -related apoptosis inducing ligand in the enhanced cytotoxicity of IFN- $\beta$ -stimulated human dendritic cells to tumor cells // *J. Immunol.* — 2001. — Vol. 166. — P. 5407-5415.
14. Manna P.P., Mohanakumar T. Human dendritic cell mediated cytotoxicity against breast carcinoma cells in vitro // *J. Leuk Biol.* — 2002. — Vol. 72. — P. 312-320.
15. Melief C.J. Cancer immunotherapy by dendritic cells // *Immunity*. — 2008. — Vol. 29. — P. 372-383.
16. Santini S., Puccini T., Lapenta C., Parlato S., Logozzi M., Belardelli F. A new type 1 IFN-mediated pathway for the rapid differentiation of monocytes into highly active dendritic cells // *Stem cells*. — 2003. — Vol. 21. — P. 357-362.
17. Shin J.Y., Lee C.D., Kang J.S., Chung E., Lee Y., Seo S.Y., Lee S.Y., Baek S.Y., Kim B.S., Kim J.B., Yoon S. Anti-tumor effect of intratumoral administration of dendritic cell combination with vincristine chemotherapy in a murine fibrosarcoma model // *Histol. Histopathol.* — 2003. — Vol. 18. — P. 435-447.
18. Tong Y., Song W., Crystal R.G. Combined intratumoral injection of bone marrow-derived dendritic cells and systemic chemotherapy to treat pre-existing murine tumors // *Cancer Res.* — 2001. — Vol. 61. — P. 7530-7535.
19. Vanderheyde N., Vandenabeele P., Goldman M., Willems F. Distinct mechanisms are involved in tumorigenic and tumoricidal activities of monocyte-derived dendritic cells // *Immunol Lett.* — 2004. — Vol. 91. — P. 99-101.
20. Vidalain P.O., Azocar O., Yagita H., Rabourdin-Combe C., Servet-Delprat C. Cytotoxic activity of human dendritic cells is differentially regulated by double-stranded RNA and CD40 ligand // *J. Immunol.* — 2001. — Vol. 167, N 7. — P. 3765-3772.
21. Wang M., Shi J., Wan Y., Li J., Yuan Y. A subset of myeloid dendritic cells derived from peripheral blood monocytes represented a predominant subset characterized by their potential tumor-inhibiting activity // *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal.* — 2009. — Vol. 45. — P. 398-404.
22. Wesa A.K., Storkus W.J. Killer dendritic cells: mechanisms of action and therapeutic implications for cancer // *Cell Death Differ.* — 2008. — Vol. 15. — P. 51-57.

поступила в редакцию 14.12.2009

принята к печати 11.01.2010