

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК, НАГРУЖЕННЫХ АУТОЛОГИЧНЫМ ЛИЗАТОМ ОПУХОЛИ БОЛЬНЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ ГЛИОМАМИ, НА АКТИВАЦИЮ АНТИГЕН-СПЕЦИФИЧЕСКОГО Т-КЛЕТОЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА *IN VITRO*

© 2019 г. Е. Д. Соловьева¹, Т. В. Тыринова^{2*}, А. В. Калиновский, С. В. Мишинов⁴, С. В. Чернов³, В. В. Ступак⁴

*E-mail: ct_lab@mail.ru

¹Новосибирский государственный университет Новосибирск, Россия;

²ФГБНУ «НИИ фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия;

³ФГБУ «Федеральный центр нейрохирургии» МЗ РФ, Новосибирск, Россия;

⁴ФГБУ «НИИ Травматологии и ортопедии им. Я. Л. Цивьяна» МЗ РФ, Новосибирск, Россия

Поступила: 20.03.2019. Принята: 05.04.2019

В настоящей работе было показано, что IFN α -индуцированные ДК (ИФН-ДК), нагруженные лизатом аутологичных опухолевых клеток пациентов с злокачественными глиомами головного мозга (ДК_{лиз}) более эффективно стимулируют пролиферативный ответ аутологичных Т-клеток по сравнению с ненагруженными ИФН-ДК (ДК_{лпс}), не вызывая при этом значимую индукцию апоптоза CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток. Установлено, что ДК_{лиз} индуцируют активацию цитотоксических CD8⁺ Т-клеток (в тесте дегрануляции) в культурах аутологичных мононуклеарных клеток анализируемых больных.

Ключевые слова: дендритные клетки, интерферон альфа, глиобластома

DOI: 10.31857/S102872210006537-5

Адрес: 630099 Новосибирск, ул. Ядринцевская, д. 14, ФГБНУ «НИИ фундаментальной и клинической иммунологии».

Тыринова Тамара Викторовна, Тел./факс: +7(383)2282101

E-mail: ct_lab@mail.ru

Авторы:

Соловьева Е.Д., студентка 6-го курса Института медицины и психологии В. Зельмана, Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия;

Тыринова Т.В., к.б.н., научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «НИИ фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия;

Калиновский А.В., к.м.н., зав. операционным блоком ФГБУ «Федеральный центр нейрохирургии» МЗ РФ, Новосибирск, Россия;

Мишинов С.В., к.м.н., врач-нейрохирург отделения нейрохирургии, ФГБУ «Новосибирский НИИ травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна» МЗ РФ, Новосибирск, Россия;

Чернов С.В., к.м.н., зав. отделением нейроонкологии ФГБУ «Федеральный центр нейрохирургии» МЗ РФ, Новосибирск, Россия;

Ступак В.В., д.м.н., профессор, зав. отделением нейрохирургии ФГБУ «Новосибирского НИИ травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна» МЗ РФ Новосибирск, Россия.

АКТУАЛЬНОСТЬ

ДК являются главными «профессиональными» антиген-презентирующими клетками, способными индуцировать генерацию Th1/провоспалительных и цитотоксических CD8⁺ Т-лимфоцитов, что успешно используется для создания вакцин на основе ДК в иммунотерапии злокачественных опухолей [1]. При этом важным аспектом является выбор опухолевого антигена для нагрузки незрелых ДК *ex vivo*, что позволило бы индуцировать эффективный АГ-специфический иммунный ответ.

Целью настоящей работы явилось изучение *in vitro* способности IFN α -индуцированных ДК (ИФН-ДК), нагруженных лизатом злокачественных глиом головного мозга, активировать специфический Т-клеточный ответ против опухолевых антигенов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 5 пациентов с глиомами головного мозга высокой степени злокачественности (Grade IV) в возрасте от 48 до 67 лет. ДК получали путем культивирования прилипающей фракции моноклеарных клеток (МНК) в присутствии GM-CSF и IFN α в течение 3–4 сут, последующей нагрузкой аутологичным лизатом опухоли (0,1 мг/мл по белку) в течение 1 часа в качестве антигенного материала и добавлением ЛПС на 24 ч для индукции созревания ДК (ДК_{лиз}). Контрольными культурами служили ненагруженные лизатом ЛПС-стимулированные ИФН-ДК (ДК_{лпс}). Пролиферативный ответ Т-клеток оценивали радиометрически по включению ³H-тимидина в смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ) при культивировании аутологичных МНК больных с ИФН-ДК в соотношении 10:1. Апоптоз Т-клеток оценивали в 72-часовой ауто-СКЛ методом проточной цитометрии по экспрессии Annexin V и Propidium Iodide (PI) в гейте CD3⁺CD4⁺ и CD3⁺CD8⁺ клеток. Генерацию АГ-специфических цитотоксических клеток оценивали с помощью метода дегрануляции проточной цитометрией по уровню экспрессии CD107a в гейте CD3⁺CD8⁺ клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Пролиферативный ответ аутологичных МНК, стимулированных ДК_{лиз}, почти в два раза превышал аналогичный показатель в культурах МНК, стимулированных контрольными ДК_{лпс} (Me 705,9 имп/мин vs 375,3 имп/мин; $p < 0,05$). Исследование апоптоз-индуцирующей активности ДК показало, что со-культивирование аутологичных МНК с ДК_{лиз} больных злокаче-

ственными глиомами не сопровождалось значимыми изменениями относительного количества Annexin V⁺PI⁻ (ранний апоптоз) среди CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток в сравнении с контрольными нестимулированными МНК больных ($p = 0,34$ и $p = 0,89$, соответственно). В случае активации МНК интактными ДК_{лпс} отмечался тренд к увеличению количества CD4⁺ Т-клеток в стадии раннего апоптоза ($p = 0,08$). Относительное количество Annexin V⁺PI⁺ (поздний апоптоз) и Annexin V⁻PI⁺ (некроз) клеток было сопоставимо в нестимулированных МНК и МНК, активированных ДК_{лиз}, и не превышало 1–2%. Наибольшее количество CD3⁺CD8⁺CD107a⁺ клеток в ответ на 5-часовое представление ауто-АГ наблюдался в культурах МНК предварительно инкубированных с аутологичными ДК_{лиз} больных глиомами. Индекс стимуляции дегрануляции CD8⁺ Т-клеток, праймированных ДК_{лпс}, составлял $(1,0 \pm 0,06)$ расч. ед, тогда как для ДК_{лиз} аналогичный показатель был в среднем $(3,5 \pm 1,3)$ расч. ед ($p < 0,05$).

Таким образом, ДК больных глиобластомами, нагруженные лизатом аутологичных опухолевых клеток, способны индуцировать антиген-специфический Т-клеточный ответ *in vitro*, проявляющийся усилением пролиферации Т-клеток, активацией цитотоксических Т-клеток, не стимулируя при этом процесс апоптоза Т-клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Назаркина Ж. К., Лактионов П. П. Получение дендритных клеток для иммунотерапии раковых заболеваний. Биомедицинская химия, Новосибирск 2015, 30–40. [Nazarkina Zh. K., Laktionov P. P. Preparation of dendritic cells for cancer immunotherapy. Biomedical chemistry, Novosibirsk 2015, P. 30–40].

THE STUDY OF ABILITY OF DENDRITIC CELLS LOADED WITH AUTOLOGICAL TUMOR LYSATE OF PATIENT WITH HIGH-GRADE GLIOMA TO ACTIVATE ANTIGEN-SPECIFIC T-CELL RESPONSE *IN VITRO*

© 2019 E. D. Soloveva¹, T. V. Tyrinova^{2*}, A. V. Kalinovsky³, S. V. Mishinov⁴, S. V. Chernov³, V. V. Stupak⁴

*E-mail: ct_lab@mail.ru

¹Novosibirsk state university, Novosibirsk, Russia;

²Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia;

³Federal Neurosurgical Center, Ministry of Health of the Russian Federation, Novosibirsk, Russia;

⁴«Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics them. Y. L. Tsivyana», Ministry of Health of the Russian Federation, Novosibirsk, Russia

Received: 20.03.2019. Accepted: 05.04.2019

In the present work we demonstrated that IFN α -induced dendritic cells (IFN-DCs) loaded with a lysate of autologous tumor cells of high-grade glioma patients (DC_{LYS}) more effectively stimulated the proliferative response of autologous T-cells compared with unloaded IFN-DCs (DC_{LPS}) and did not induce apoptosis of CD4⁺ and CD8⁺ T cells. Moreover, DC_{LYS} activated cytotoxic CD8⁺ T cells (in the degranulation test) in cultures of autologous mononuclear cells of studied patients.

Key words: dendritic cells, interferon alpha, glioblastoma

Authors:

Soloveva E. D., 6th year student of the Institute of Medicine and Psychology V. Zelman, Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia;

Tyrinova T. V., ✉ PhD, researcher, laboratory of cellular immunotherapy, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia. E-mail: ct_lab@mail.ru;

Kalinovsky A. V., PhD, head of surgical unit, Federal Neurosurgical Center, Ministry of Health of the Russian Federation, Novosibirsk, Russia;

Mishinov S. V., PhD, neurosurgeon, neurosurgery department, «Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics them. Y. L. Tsivyana», Ministry of Health of the Russian Federation, Novosibirsk, Russia;

Chernov S. V., PhD, head of neurooncology department, Federal Neurosurgical Center, Ministry of Health of the Russian Federation, Novosibirsk, Russia;

Stupak V. V., MD, professor, head of neurosurgery department, «Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics them. Y. L. Tsivyana», Ministry of Health of the Russian Federation, Novosibirsk, Russia.