

О.Ю. Леплина<sup>1</sup>, Л.В. Сахно<sup>1</sup>, А.А. Останин<sup>1</sup>, С.С. Богачев<sup>2</sup>, Е.Р. Черных<sup>1</sup>КОРРЕКЦИЯ IN VITRO ДИСФУНКЦИЙ ИНТЕРФЕРОН- $\alpha$ -ИНДУЦИРОВАННЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК У БОЛЬНЫХ ИММУНОПАТОЛОГИЧЕСКИМИ СОСТОЯНИЯМИ<sup>1</sup> НИИ клинической иммунологии СО РАМН (Новосибирск)<sup>2</sup> Институт цитологии и генетики СО РАМН (Новосибирск)

В работе проведен анализ коррекции нарушенных функций дендритных клеток (ДК) у больных злокачественными опухолями головного мозга ( $n = 8$ ), злокачественными лимфомами ( $n = 14$ ), и туберкулезом легких ( $n = 26$ ), генерируемых *in vitro* в присутствии интерферона-альфа. Показана принципиальная возможность восстановления сниженной функциональной активности ДК интерлейкином-2, комплексом провоспалительных цитокинов, двуцепочечной ДНК человека и полиоксидонием, добавление которых на этапе конечного созревания ДК позволяет значительно повысить аллостимуляторную активность ДК у больных со злокачественными лимфомами и туберкулезом легких, а также усилить цитотоксическую активность ДК против NK- и TRAIL-резистентной линии HEP-2 у больных онкологическими заболеваниями, что открывают новые подходы к коррекции нарушений ДК при патологии и обосновывают пути повышения эффективности лечения инфекционных и онкологических заболеваний с использованием вакцин на основе дендритных клеток.

**Ключевые слова:** дендритные клетки, интерферон-альфа, коррекция, цитотоксичность, аллостимуляторная активность

CORRECTION OF INTERFERON- $\alpha$ -INDUCED DENDRITIC CELL DYSFUNCTIONS IN IMMUNOCOMPROMISED PATIENTSO.Yu. Lepkina<sup>1</sup>, L.V. Sakhno<sup>1</sup>, A.A. Ostanin<sup>1</sup>, S.S. Bogachev<sup>2</sup>, E.R. Chernykh<sup>1</sup><sup>1</sup> Institute of Clinical Immunology SB RAMS, Novosibirsk<sup>2</sup> Institute of cytology and genetics SB RAMS, Novosibirsk

The correction of impaired functions of *in vitro* generated interferon-alpha-induced dendritic cells (IFN-DCs) in patients with malignant brain tumors ( $n = 8$ ), malignant lymphomas ( $n = 14$ ) and pulmonary tuberculosis ( $n = 26$ ) was analyzed in the present study. The principal possibility of restoring reduced functional activity of patient DCs was shown. The addition of recombinant human IL-2, complex of pro-inflammatory cytokines, double-stranded human DNA or polyoxidonium to IFN-DC cultures at the stage of maturation could significantly increase the allostimulatory activity of DCs in patients with malignant lymphomas and pulmonary tuberculosis, as well as enhance the cytotoxic activity of cancer patient DCs against NK- and TRAIL-resistant tumor cell line HEP-2. These findings offer new approaches to the correction of DC dysfunctions in the pathology and justify ways of improving the treatment of infectious diseases and cancer using dendritic cell vaccines.

**Key words:** dendritic cells, interferon-alpha, correction, cytotoxicity, allostimulatory activity

Дендритные клетки (ДК) являются наиболее эффективными антигенпрезентирующими клетками и играют важную роль в инициации и поддержании специфического иммунного ответа. Опухолевый процесс и хронические инфекционные заболевания сопровождаются существенными количественными и функциональными изменениями ДК, что рассматривается одним из основных механизмов персистенции инфекции и ускользания опухоли от иммунного надзора [6, 10, 11]. Традиционно, ДК генерируют из моноцитов периферической крови в присутствии гранулоцит-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) и интерлейкина-4 (IL-4) [9]. Однако данный тип ДК характеризуется относительно низкой миграционной активностью и в условиях дефицита ростовых факторов может трансформироваться в клетки с фенотипом моноцитов [6]. Генерация ДК при замене IL-4 интерфероном- $\alpha$  представляется более физиологичной, поскольку IFN- $\alpha$  является ранним медиатором врожденного иммунитета [8]. Генерируемые в присутствии

IFN- $\alpha$  ДК обладают более высокой миграционной активностью, способностью стимулировать как Th1-, так и Th2-ответ и эффективно стимулировать CD8<sup>+</sup>T-клетки [5, 8]. Ранее нами было показано, что у онкологических больных генерируемые таким образом дендритные клетки характеризуются увеличением доли незрелых и снижением числа зрелых форм ДК, снижением аллостимуляторной активности, ослаблением Th1 и возрастанием Th2-стимуляторной активности; а также уменьшением их цитотоксического потенциала [1, 2]. А ДК больных хроническими инфекционными заболеваниями (хронические вирусные гепатиты, туберкулез легких) характеризуются признаками задержки дифференцировки/созревания, смещением баланса в сторону продукции Th2-цитокинов и усилением Th2-стимуляторной активности, что указывает на снижение способности ДК активировать реакции клеточного иммунитета при данных патологиях [3, 4]. Таким образом, обнаруженные нами изменения свойств ДК при онкопатологии и инфекционных заболеваниях ставят вопрос о

полноценности генерируемых дендритных клеток и разработке подходов к коррекции нарушений функций ДК у данной категории больных с целью возможности дальнейшего использования вакцин на основе аутологичных дендритных клеток для лечения указанных патологий. Поэтому целью данной работы явилось изучение возможности коррекции нарушенных функций ДК у больных онкологическими и инфекционными заболеваниями с помощью различных иммуноактивных факторов.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Мононуклеарные клетки (МНК) периферической крови выделяли центрифугированием цельной, гепаринизированной венозной крови в градиенте плотности фикола-верографина ( $p = 1,078$ , фикола-Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Швеция; верографин-Spofa, ЧССР). Дендритные клетки генерировали путем культивирования прилипающей фракции МНК. Для этого МНК в концентрации  $3 \times 10^6$ /мл помещали в 6-луночные планшеты для культивирования (ТТР, Швейцария) на 2 ч в 3 мл среды RPMI-1640 (Sigma, США), дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 5мМ HEPES-буфера, 100 мкг/мл гентамицина и 10% сыворотки АВ (IV) группы. Затем неприлипшую фракцию удаляли, а оставшиеся клетки инкубировали в полной культуральной среде в присутствии GM-CSF (Sigma-Aldrich, 40 нг/мл), INF- $\alpha$  (Роферон-А, Roche, Швейцария, 1000 Ед/мл) и 5% сыворотки плодов коровы (Биолот, Санкт-Петербург) в течение 3 сут. при 37° в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 5% CO<sub>2</sub>. На последующие 24 ч в качестве дозревающего стимула вносился LPS (*E. coli* 0114:B4, Sigma-Aldrich, 10 мкг/мл). В отдельных экспериментах проводилась 24-часовая обработка ДК (на этапе конечного созревания в присутствии LPS) иммуноактивными препаратами: рекомбинантным интерлейкином-2 человека («Ронколейкин») — 100 ЕД/мл, сополимером N-окси-1,4-этиленпиперазина и (N-карбоксиэтил)-1,4-этиленпиперазина бромид («Полиоксидоний») — 5 мкг/мл, комплексом провоспалительных цитокинов («Суперлимф») — 20 нг/мл и двуцепочечной ДНК человека («Панаген») — 5 мкг/мл. После чего проводилось харвестирование и подсчет ДК.

Алlostимуляторную активность ДК оценивали в реакции смешанной культуры лимфоцитов (СКЛ). В качестве отвечающих клеток использовались МНК доноров ( $0,1 \times 10^6$ /лунку), которые культивировали в 96-луночных круглодонных планшетах для иммунологических исследований (Медполимер, Санкт-Петербург) в среде RPMI-1640 с 10% инактивированной сыворотки доноров АВ (IV) группы при 37 °С в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Стимуляторами служили дендритные клетки в соотношении МНК : ДК = 10 : 1. Пролиферативный ответ оценивался на 5 сут радиометрически по включению <sup>3</sup>H-тимидина (1 мкКю/лунку), вносимого за 18 ч до окончания культивирования.

Для оценки цитотоксической активности ДК проводился МТТ-тест, заключающийся в способности живых клеток превращать растворимый

желтый бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-тетразолия (МТТ) в нерастворимые пурпурно-синие внутриклеточные кристаллы МТТ-формаза. Опухолевые клетки линии НЕР-2 ( $5 \times 10^4$  /лунку) культивировали с LPS-активированными ИФН-ДК в 96-луночных плоскодонных планшетах в течение 24 часов в соотношении эффекторов/мишеней 1:1. После окончания совместной инкубации в лунки вносили по 20 мкл 5 мг/мл раствора МТТ (Диа М, Германия), а затем через 3 часа планшеты центрифугировали при 1500 об./мин в течение 5 минут, удаляли супернатант и добавляли по 100 мкл ДМСО (диметилсульфоксид, МР Boimedicals, LLC, Франция). Через 30 минут после полного растворения кристаллов формазана измерялась оптическая плотность содержимого лунок на мультискане при длине волны 492 нм. Расчет цитотоксической активности проводился по стандартной формуле: (%) =  $[1 - (ОП_э + м - ОП_м) / ОП_м] \times 100$  %, где ОП<sub>э</sub> + м — значение оптической плотности в опытных сериях; ОП<sub>э</sub> — значение оптической плотности в лунках с эффекторами; ОП<sub>м</sub> — значение оптической плотности в лунках с мишенями.

Математическая обработка полученных результатов проводилась методами описательной, параметрической и непараметрической статистики на персональном компьютере с использованием программы «STATISTICA 6.0». Таблицы и рисунки содержат информацию в виде средних арифметических величин (М) и стандартных ошибок средних (SE). Сравнение вариационных рядов осуществлялось с помощью непараметрического U-критерия Вилкоксона — Манна — Уитни.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Одним из интегральных показателей функциональной активности ДК является их способность к стимуляции пролиферативного ответа аллогенных Т-лимфоцитов в смешанной культуре лимфоцитов, поскольку алlostимуляторная активность ДК ассоциирована со степенью зрелости ДК, спектром и уровнем продуцируемых ими цитокинов, а также способностью ДК активировать Th1/Th2 ответ и индуцировать генерацию Трег. Действительно наиболее выраженное снижение алlostимуляторной активности ДК, выявляемое у больных туберкулезом легких (ТБ) и пациентов злокачественной лимфомой (ЗЛ), ассоциировалось с признаками задержки созревания/активации ДК, повышенной продукцией IL-10 в культурах ДК и смещением стимуляторной активности ДК сторону активации Th-2 ответа [4]. Соответственно, оценка алlostимуляторной активности может представлять удобный скрининговый маркер для выявления дисфункций ДК и оценки иммунокорригирующего эффекта различных факторов. Поэтому для изучения возможности коррекции функциональной активности ДК было проанализировано влияние различных иммуноактивных факторов на алlostимуляторную активность ДК, полученных от больных злокачественными лимфомами и туберкулезом

легких. В качестве потенциальных модуляторов были выбраны рекомбинантный интерлейкин-2 человека («Ронколейкин»), сополимер N-окси-1,4-этиленпиперазина и (N-карбоксиэтил)-1,4-этиленпиперазиний бромид («Полиоксидоний»), комплекс провоспалительных цитокинов («Суперлимф») и двуцепочечная ДНК человека («Панаген»).

Исследования в группе 14 пациентов со злокачественными лимфомами (8 мужчин и 6 женщин в возрасте от 14 до 67 лет) показали, что 24-часовая обработка ДК (на этапе конечного созревания в присутствии LPS) анализируемыми иммуноактивными факторами сопровождалась статистически значимым усилением их аллостимуляторной активности в СКЛ (табл. 1). При этом наиболее выраженным стимулирующим эффектом характеризовался рИЛ-2 (в дозе 100 Ед/мл). Другие факторы (полиоксидоний, комплекс провоспалительных цитокинов, ДНК человека проявляли менее выраженный, но статистически достоверный стимулирующий эффект на восстановление аллостимуляторной активности.

Исследование влияния анализируемых иммуноактивных факторов на аллостимуляторную активность ДК больных туберкулезом показало (табл. 1), что рИЛ-2 (в дозе 100 Ед/мл) и Полиоксидоний (в дозе 5 мкг/мл) достоверно усиливали аллостимуляторную активность ДК больных туберкулезом легких при добавлении их в культуру совместно с дозревающим стимулом. В то же время ДНК человека не обладала стимулирующим эффектом на аллостимуляторную активность. В отдельной серии экспериментов было также проведено сравнительное исследования аллостимуляторной активности интактных, LPS-предобработанных и ДНК-активированных ДК, полученных от 14 больных ТБ. Добавление двуцепочечной геномной ДНК человека в качестве дозревающего стимула в культуры ДК на этапе созревания вместо LPS приводило к достоверному возрастанию аллостимуляторной активности ДК с  $1492 \pm 281$  до  $5100 \pm 1686$  имп./мин. При этом  $ИВ_{ДНК}$  был сравним с  $ИВ_{LPS}$  ( $41,6 \pm 15,3$  и  $41,0 \pm 10,9$  соответственно).

Таким образом, полученные результаты демонстрируют, что у больных со сниженной аллостимуляторной активностью дендритных клеток (пациенты злокачественной лимфомой, ТБ) добавление интерлейкина-2, полиоксидония, комплекса цитокинов с провоспалительной активностью или нативной ДНК человека обладает стимулирующим эффектом и усиливает аллостимуляторную активность ДК в СКЛ. При этом ДК больных злокачественными лимфомами и ТБ различались по чувствительности к стимулирующему влиянию анализируемых иммуноактивных препаратов. Так, ДК больных ТБ отличались меньшей чувствительностью к ДНК человека и рИЛ-2. Индекс влияния рИЛ-2 у больных ТБ был достоверно двукратно ниже такового показателя у больных ЗЛ ( $2,8 \pm 0,5$  против  $4,6 \pm 0,5$ ).

Наряду с аллостимуляторной активностью важным свойством ДК, особенно в аспекте их использования в качестве противоопухолевых вакцин является прямая противоопухолевая цитотоксическая активность. Выявление дефектности указанной функции у больных с глиомами головного мозга высокой степени злокачественности и пациентов злокачественными лимфомами [7] побудило исследовать возможность стимуляции цитотоксической активности ДК *in vitro* с помощью иммуноактивных факторов. Для этого был проведен анализ влияния рекомбинантного интерлейкина-2, полиоксидония и двуцепочечной ДНК человека на цитотоксическую активность ДК больных злокачественными опухолями головного мозга (ЗОГМ) и ЗЛ. Цитотоксическую активность ДК оценивали против клеток опухолевых линий Нер-2 и Jurkat в МТТ-тесте. Для этого клетки опухолевых линий Нер-2 (клетки эпителиальной карциномы гортани человека) и Jurkat (Т-клеточная лимфома), культивировали с интактными ДК или ДК, предобработанными иммуноактивными факторами на этапе их созревания. Обработка ДК больных ЗОГМ интерлейкином-2, двуцепочечной геномной ДНК человека и полиоксидонием усиливала исходно низкий уровень цитотоксической активности ДК против клеток Нер-2 практически у всех больных. Сравнение средних показателей

**Таблица 1**  
**Влияние иммуноактивных факторов на аллостимуляторную активность пациентов злокачественной лимфомой и туберкулезом легких**

|                                      | Пролиферативная активность в СКЛ (имп/мин) |                            |
|--------------------------------------|--------------------------------------------|----------------------------|
|                                      | ЗЛ (n = 14)                                | Туберкулез легких (n = 26) |
| МНК + ДК(0)                          | 3178 ± 325                                 | 5331 ± 638                 |
| МНК + ДК (+) рИЛ-2, 100 ЕД/мл        | 12211 ± 977*                               | 10562 ± 2491*              |
| МНК + ДК (+) полиоксидоний, 5 мкг/мл | 5771 ± 472                                 | 6281 ± 798*                |
| МНК + ДК (+) суперлимф., 20 нг/мл    | 5014 ± 361*                                | —                          |
| МНК + ДК (+) панаген, 5 мкг/мл       | 7433,3 ± 357,4*                            | 5861,5 ± 948,4             |

**Примечание:** представлены  $M \pm SE$  значения пролиферативной активности в алло-СКЛ; стимуляторы-интактные ДК(0) и предобработанные ДК(+) в соотношении 10 : 1, \* –  $p_0 < 0,05$  – достоверность различий показателей по отношению к культурам ДК (0), U – критерий Вилкоксона – Манна – Уитни.

Таблица 2

## Влияние иммуноактивных факторов на цитотоксическую активность ДК больных ЗОГМ (Grade IV) и злокачественной лимфомой

|                               | Цитотоксичность (%)  |                    |                      |                    |
|-------------------------------|----------------------|--------------------|----------------------|--------------------|
|                               | Линия Нер-2          |                    | Линия Jurkat         |                    |
|                               | Больные ЗОГМ (n = 8) | Больные ЗЛ (n = 7) | Больные ЗОГМ (n = 8) | Больные ЗЛ (n = 7) |
| ДК (0)                        | 8 ± 2,5              | 10 ± 4,4           | 50 ± 6,5             | 29 ± 8,4           |
| ДК (+р-ИЛ-2, 100 Ед/мл)       | 27 ± 4,7*            | 36 ± 5,3*          | 61 ± 4,1*            | 30 ± 4,8           |
| ДК (+ панаген, 5 мкг/мл)      | 16 ± 2,9*            | 34 ± 4,9*          | 56 ± 4,5             | 31 ± 3,9           |
| ДК (+ полиоксидоний, 2 нг/мл) | 20 ± 4,3*            | 21 ± 2,8*          | 50 ± 9,2             | 30 ± 3,3           |

**Примечание:** представлены  $M \pm SE$  цитотоксической активности ДК (%) больных в присутствии иммуноактивных факторов в МТТ-тесте. \* –  $p_U < 0,05$  – достоверность различий по сравнению с ДК (0), U – критерий Вилкоксона – Манна – Уитни.

цитотоксичности интактных и модифицированных ДК и индексы влияния анализируемых иммуноактивных факторов на цитотоксическую активность ДК больных ЗОГМ показало (табл. 2), что наиболее выраженным стимулирующим эффектом обладали интерлейкин-2 и полиоксидоний, тогда как панаген достоверно, но в меньшей степени восстанавливал цитотоксическую активность ДК ЗОГМ.

Наряду с выраженным стимулирующим эффектом интерлейкина-2, ДНК и полиоксидония на низкую цитотоксическую активность ДК больных ЗОГМ против клеток Нер-2, сохранная цитотоксическая активность ДК против линии Jurkat умеренно возрастала только после обработки ДК интерлейкином-2 и не менялась при обработке ДК двуцепочечной ДНК и полиоксидонием.

Аналогичные эффекты регистрировались при анализе влияния интерлейкина-2, двуцепочечной ДНК человека и полиоксидония на цитотоксическую активность ДК больных ЗЛ (табл. 2) Все анализируемые иммуноактивные факторы достоверно усиливали исходно низкую цитотоксическую активность ДК больных ЗЛ против клеток Нер-2 и не влияли на исходно сохранную цитотоксическую активность ДК против клеток линии Jurkat.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные данные демонстрируют принципиальную возможность восстановления сниженной функциональной активности ДК с помощью стимуляции ДК на этапе созревания интерлейкином-2 или комплексом провоспалительных цитокинов, двуцепочечной ДНК человека или полиоксидонием, добавление которых на этапе конечного созревания ДК позволяет значительно повысить аллостимуляторную активность ДК у больных со злокачественными лимфомами и туберкулезом легких, а также усилить цитотоксическую активность ДК против NK- и TRAIL-резистентной линии Нер-2 у больных онкологическими заболеваниями (злокачественными опухолями головного мозга и злокачественными лимфомами). Проведенные исследования откры-

вают новые подходы к коррекции нарушений ДК при патологии и обосновывают пути повышения эффективности клеточных технологий лечения инфекционных и онкологических заболеваний с использованием аутологичных дендритноклеточных вакцин.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Леплина О.Ю., Насонова Г.В., Тихонова М.А., Крючкова И.В. и др. Характеристика IFN $\alpha$ -индуцированных дендритных клеток у больных злокачественными лимфомами // Гематология и трансфузиология. – 2008. – № 3. – С. 24 – 29.
2. Леплина О.Ю., Насонова Г.В., Тихонова М.А., Крючкова И.В. и др. «IFN $\alpha$ -индуцированные дендритные клетки у больных множественной миеломой» // Сибир. онколог. журн. – 2009. – № 6. – С. 37 – 43.
3. Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Борисова А.Е., Старостина Н.М. и др. Фенотип и функции дендритных клеток у больных хроническими вирусными гепатитами // Мед. иммунология. – 2009. – Т. 2/3. – С. 191 – 196.
4. Сахно Л.В., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Распай Ж.М. и др. Характеристика дендритных клеток, генерируемых в присутствии интерферона- $\alpha$  у больных туберкулезом легких // Проблемы туберкулеза. – 2007. – № 3. – С. 42 – 46.
5. Carbonneil C., Aouba A., Burgard M. Dendritic cells generated in the presence of GM-CSF and Interferon-alpha are potent inducers of HIV-specific CD8 + T-cells // AIDS. – 2003. – Vol. 17. – P. 1731 – 1740.
6. Della Bella S., Nicola S., Brambilla L. Quantitative and functional defects of dendritic cells in classic Kaposi's sarcoma // Clin. Immunol. – 2006. – Vol. 119. – P. 317 – 329.
7. Lepina O.Yu., Tyrinova T.V., Tikhonova M.A., Shevela E.Ya. et al. Direct antitumor activity of interferon-induced dendritic cells of healthy donors and patients with primary brain tumors / In: Glioma – exploring it's biology and practical relevance; ed. by. A. Ghosh. – 2011. – P. 325 – 342.
8. Santini S., Lapenta C., Belardelli F. Type I interferons as regulators of the differentiation/activation

of human dendritic cells: methods for the evaluation of IFN-induced effects // Meth. Mol Med. — 2005. — Vol. 116. — P. 167—181.

9. Thurner B., Roder C., Dieckmann D. Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical applications // J. Immunol. Meth. — 1999. — Vol. 223. — P. 1—15.

10. Van der Molen R.G., Sprengers D., Binda R.S. Functional impairment of myeloid and plasmacytoid dendritic cells of patients with chronic hepatitis B // Hepatology. — 2004. — Vol. 40. — P. 738—746.

11. Zhang Z.J., Fu Q., Zhao Y. Differential restoration of myeloid and plasmacytoid dendritic cells in HIV-1-infected children after treatment with highly active antiretroviral therapy // J. Immunol. — 2006. — Vol. 176. — P. 5644—5651.

#### Сведения об авторах

**Леплина Ольга Юрьевна** — старший научный сотрудник ФГБУ НИКИ СО РАМН, доктор медицинских наук (630005, г. Новосибирск, ул. Некрасова, д. 55, кв. 61; тел.: 383 228-21-01; e-mail: oleplina@mail.ru)

**Сахно Людмила Васильевна** — старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБУ НИКИ СО РАМН, кандидат медицинских наук

**Останин Александр Анатольевич** — ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБУ НИКИ СО РАМН, доктор медицинских наук, профессор

**Черных Елена Рэмовна** — заведующая лабораторией клеточной иммунотерапии, Заместитель директора НИИКИ СО РАМН, чл.-корр. РАМН, доктор медицинских наук, профессор (630110, г. Новосибирск, ул. Б. Хмельницкого, 62, кв. 4; тел.: 8-(383)-228-57-49; e-mail: bmt-novosibirsk@mail.ru)