

Министерство образования и науки Российской Федерации
УЧРЕЖДЕНИЕ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ МЕДИЦИНСКИХ НАУК
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РАМН

УДК
№ госрегистрации
Инв.№

УТВЕРЖДАЮ
Директор НИИКИ СО РАМН,
академик РАМН
_____ В.А. Козлов
«___» _____ 2010 г.

ОТЧЕТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ
по Государственному контракту от 01 сентября 2010 г. № 14.740.11.0007

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ СОЗДАНИЯ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ВАКЦИН НА БАЗЕ
ИННОВАЦИОННЫХ ПОДХОДОВ ГЕНЕРАЦИИ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИНТЕРФЕРОНА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ И
ИНФЕКЦИОННЫХ (ВИРУСНЫХ) ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА

по теме:
ХАРАКТЕРИСТИКА ФЕНОТИПИЧЕСКИХ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ
ИНФ-ДК В СРАВНЕНИИ С ИЛ4-ИНДУЦИРОВАННЫМИ ДК
(промежуточный, 1 этап)

Руководитель работ
проф., д.м.н.

_____ Е.Р. Черных
подпись

Новосибирск 2010

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель работ проф., д.м.н.	_____	Е.Р. Черных (все разделы отчета)
	подпись	
Исполнители		
гл.н.с., проф., д.м.н.	_____	А.А. Останин (все разделы отчета)
	подпись	
вед.н.с., д.м.н.	_____	Н.А. Хонина (разделы 1, 2, 3.1, 3.2)
	подпись	
с.н.с., к.м.н.	_____	О.Ю. Леплина (разделы 1, 2, 3.1, 3.2)
	подпись	
с.н.с., к.м.н.	_____	Е.Я. Шевела (разделы 3.1, 3.2)
	подпись	
с.н.с., к.м.н.	_____	М.А. Тихонова (разделы 3.1, 3.2)
	подпись	
с.н.с., к.м.н.	_____	Л.В. Сахно (разделы 3.1, 3.2)
	подпись	
зав. отделением Клиники иммунопатологии, к.м.н.	_____	Н.М. Старостина (разделы 3.1, 3.2)
	подпись	
н.с., к.м.н.	_____	Н.В. Селедцова (разделы 3.1, 3.2)
	подпись	
н.с., к.м.н.	_____	В.В. Сергеевичева (разделы 3.1, 3.2)
	подпись	
аспирант	_____	Т.В. Тыринова (разделы 3.1, 3.2)
	подпись	
аспирант	_____	Е.В. Баторов (разделы 3.1, 3.2)
	подпись	
нормоконтролер	_____	Н.В. Сычева
	подпись	
Соисполнители		
Руководитель темы в Институте цитологии и генетики СО РАН, зав. лабораторией, д.б.н.	_____	С.С. Богачев (разделы 3.3, 3.4, 3.5)
	подпись	
н.с., к.б.н.	_____	А.С. Проскурина (разделы 3.3, 3.4, 3.5)
	подпись	
н.с.	_____	К.Е. Орищенко (разделы 3.3, 3.4, 3.5)
	подпись	
аспирант	_____	Е.А. Алямкина (разделы 3.3, 3.4, 3.5)
	подпись	
аспирант	_____	Е.В. Долгова (разделы 3.3, 3.4, 3.5)
	подпись	

Реферат

Отчет 24 с., 5 таблиц, 33 источника

Ключевые слова – дендритные клетки, интерферон-альфа, интерлейкин-4, фенотип, цитокины, рак молочной железы, ДНК человека.

Объектом исследования являются дендритные клетки человека

Целью настоящего этапа исследования являлась сравнительная характеристика фенотипических и функциональных свойств интерферон-альфа-индуцированных (ИФН-ДК) и ИЛ-4-индуцированных дендритных клеток (ИЛ4-ДК). В рамках тематики этапа предполагалось оценить экспрессию молекул, характеризующих стадию зрелости и активацию ДК (CD14, CD1a, CD83, CD25), а также опосредующих цитотоксический потенциал ДК (TRAIL, B7-H1). Планировалось провести сравнительный анализ цитокин-секреторной активности ИФН-ДК и ИЛ4-ДК по уровню продукции Th1/провоспалительных и Th2/противовоспалительных цитокинов. Предполагалось также оценить количественное содержание миелоидных CD11c+/HLA-DR+ и плазмацитоидных CD123+/HLA-DR+ ДК в крови здоровых доноров и больных раком молочной железы, прошедших курсы программной химиотерапии в ходе проведения II фазы Клинических испытаний препарата фрагментированной ДНК человека (Панаген).

Проведенные исследования продемонстрировали, что по своим фенотипическим характеристикам популяция ИФН-ДК является «частично зрелыми» (semi-mature) клетками, и отличается от ИЛ4-ДК повышенным содержанием CD123+ ДК, а также клеток, экспрессирующих B7-H1 и TRAIL, что свидетельствует об их более высоком цитотоксическом потенциале. Кроме того, ИФН-ДК отличаются повышенной продукцией Th1/провоспалительных (ИФН- γ , ИЛ-2, ИЛ-17, ИЛ-1 β) и Th2/противовоспалительных цитокинов (ИЛ-10, ИЛ-5), а также Г-КСФ и M-CSF-1. Таким образом, ИФН-ДК по сравнению с ИЛ4-ДК могут более активно индуцировать реакции клеточного и гуморального иммунитета. При обследовании больных раком молочной железы показано, что на фоне химиотерапии, сочетающейся с приемом препарата фрагментированной ДНК человека (Панаген), регистрируется достоверное увеличение относительного содержания плазмацитоидных CD123+/HLA-DR+ ДК, и абсолютного количества миелоидных CD11c+/HLA-DR+ ДК, что свидетельствует о позитивных изменениях параметров иммунитета, благоприятствующих подавлению опухолевого роста.

Отработаны стандарты операционных процедур по выделению, культивированию, генерации, криоконсервации и размораживанию ИФН-ДК человека *in vitro*.

Степень внедрения – написан и утвержден лабораторно-технологический регламент получения ИФН-ДК человека с целью последующего создания индивидуальных дендритноклеточных вакцин.

Рекомендации по внедрению результатов НИР – требуется подготовить нормативную документацию, необходимую для работы с клеточными вакцинами.

Область применения – онкологические диспансеры и клиники, а также специализированные медицинские центры по борьбе с хроническими вирусными инфекциями (герпесвирусная инфекция, хронические вирусные гепатиты, и др.).

Результаты проведенной работы научно обосновывают целесообразность использования ИФН-ДК в качестве клеточной основы при создании индивидуальных лечебных вакцин, которые могут быть использованы в комплексной терапии больных с онкопатологией или хроническими вирусными заболеваниями для индукции/усиления противоопухолевого или противоинфекционного иммунного ответа.

Экономическая эффективность или значимость работы заключается в том, что результаты работы могут быть использованы для создания новой медицинской технологии применения индивидуальных дендритноклеточных вакцин для лечения онкологических и инфекционных (вирусных) заболеваний человека, которая после регистрации в Росздравнадзоре может быть внедрена в практическое здравоохранение.

В итоге исследований, проведенных на первом этапе, отработан технологический регламент (стандарты операционных процедур) по выделению, культивированию, генерации, криоконсервации и размораживанию ИФН-ДК человека *in vitro*, а также показано, что ИФН-ДК в сравнении с ИЛ4-ДК имеют ряд принципиальных фенотипических и функциональных отличий, свидетельствующих об их более высокой способности к активации реакций врожденного и адаптивного (клеточного и гуморального) иммунитета.

Полученные на первом этапе результаты планируется использовать в образовательном процессе, начиная с 2011 г, на кафедре иммунологии Новосибирского государственного медицинского университета и Медицинском факультете Новосибирского государственного университета.

Предусмотренные календарным планом задания выполнены полностью.

Содержание

Определения, обозначения и сокращения	6
Введение	7
Основная часть	9
1 Литературный обзор	9
2 Материалы и методы	11
3 Результаты и обсуждение	12
3.1 Определение экспрессии молекул, характеризующих зрелость и активацию ДК (фенотипическая характеристика ИЛ4-ДК и ИФН-ДК)	12
3.2 Определение экспрессии молекул, опосредующих цитотоксическую и супрессорную активности ДК	13
3.3 Определение продукции Th1/провоспалительных и Th2/противовоспалительных цитокинов ДК	16
3.4 Оценка количественного содержания миелоидных и плазмоцитоидных ДК в крови здоровых доноров и пациентов, больных раком молочной железы на программной химиотерапии	18
3.5 Оценка количественного содержания миелоидных и плазмоцитоидных ДК в крови пациентов, прошедших курсы программной химиотерапии в ходе проведения 2 фазы клинических испытаний препарата Панаген	19
Заключение	20
Список использованных источников	22

Определения, обозначения и сокращения

ГМ-КСФ	гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
ДК	дендритные клетки
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ИЛ	интерлейкины
ИФН- α	интерферон альфа
ЛПС	липополисахарид из стенки бактерий
МНК	мононуклеарные клетки
ФНО- α	фактор некроза опухоли альфа
CD	кластер дифференцировки
MCP-1	хемокин – моноцитарный хемоаттрактантный белок-1
TRAIL	апоптоз-индуцирующий лиганд, связанный с семейством ФНО- α

Введение

Дендритные клетки (ДК) являются уникальными антиген-презентирующими клетками, способными индуцировать иммунный ответ против различных антигенов, включая опухолевые и вирусные антигены. Наряду с запуском адаптивного иммунного ответа эти клетки обладают непосредственной эффекторной функцией и способны лизировать опухолевые и вирус-инфицированные клетки. При опухолевом росте и хронических рецидивирующих вирусных заболеваниях количественные и функциональные параметры ДК претерпевают существенные изменения, что приводит к снижению эффективности иммунного ответа. Соответственно технологии генерации ДК и использования их в качестве индивидуальных вакцин рассматриваются в качестве перспективных инновационных клеточных технологий, направленных на усиление противоопухолевого и противовирусного иммунитета. Развитие подобных технологий стало возможным благодаря разработке методов генерации ДК из периферической крови человека. Согласно стандартным методам ДК получают путем культивирования прилипающей фракции мононуклеарных клеток в присутствии гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) и интерлейкина-4 (ИЛ-4), однако данный путь представляется мало физиологичным, а генерируемые ДК в условиях дефицита ростовых факторов быстро теряют свои функции. Относительно недавно был описан новый способ генерации ДК при замене ИЛ-4 на интерферон-альфа (ИФН- α). Данный тип ДК получил название «интерфероновых». ИФН-индуцированные ДК отличаются от ИЛ4-индуцированных более высокой миграционной активностью и являются более стабильными в условиях дефицита ростовых факторов, что делает их привлекательными кандидатами на роль клеточных вакцин.

Тем не менее, многие важные свойства ИФН-индуцированных ДК (ИФН-ДК), их фенотипические и функциональные характеристики, остаются не исследованными.

Поэтому целью первого этапа исследований являлась сравнительная характеристика фенотипических и функциональных свойств ИФН-ДК и ИЛ-4-индуцированных ДК (ИЛ4-ДК). Предполагалось решить следующие задачи: 1) оценить экспрессию молекул, характеризующих стадию зрелости и активацию ДК (CD14, CD1a, CD83, CD25), а также опосредующих цитотоксический потенциал ДК (TRAIL, B7-H1); 2) провести сравнительный анализ цитокин-секреторной активности ИФН-ДК и ИЛ4-ДК по уровню продукции Th1/провоспалительных и Th2/противовоспалительных цитокинов; 3) оценить количественное содержание миелоидных CD11c+/HLA-DR+ и плазмоцитоидных CD123+/HLA-DR+ ДК в крови здоровых доноров и больных раком молочной железы,

прошедших курсы программной химиотерапии в ходе проведения II фазы Клинических испытаний препарата фрагментированной ДНК человека (Панаген).

Проведенные исследования продемонстрировали, что по своим фенотипическим характеристикам популяция ИФН-ДК является «частично зрелыми» (semi-mature) клетками, и отличается от ИЛ4-ДК повышенным содержанием CD123+ ДК, а также клеток, экспрессирующих В7-Н1 и TRAIL, что свидетельствует об их более высоком цитотоксическом потенциале. Кроме того, ИФН-ДК отличаются повышенной продукцией Th1/провоспалительных (ИФН- γ , ИЛ-2, ИЛ-17, ИЛ-1 β) и Th2/противовоспалительных цитокинов (ИЛ-10, ИЛ-5), а также Г-КСФ и МСР-1. Таким образом, ИФН-ДК по сравнению с ИЛ4-ДК могут более активно индуцировать реакции клеточного и гуморального иммунитета. При обследовании больных раком молочной железы показано, что на фоне химиотерапии, сочетающейся с приемом препарата фрагментированной ДНК человека (Панаген), регистрируется достоверное увеличение относительного содержания плазмацитоидных CD123+/HLA-DR+ ДК, и абсолютного количества миелоидных CD11c+/HLA-DR+ ДК, что свидетельствует о позитивных изменениях параметров иммунитета, благоприятствующих подавлению опухолевого роста.

Таким образом, результаты проведенной работы научно обосновывают целесообразность использования ИФН-ДК в качестве клеточной основы при создании высокоэффективных, индивидуальных лечебных вакцин, которые могут быть использованы для индукции/усиления реакций клеточного и гуморального иммунитета.

Основная часть

1 Литературный обзор

ДК являются профессиональными антигенпрезентирующими клетками, способными представлять различные антигены (антигенные детерминанты патогенных возбудителей, опухолевые антигены, аллоантигены) Т-клеткам и индуцировать адаптивный антигенспецифический иммунный ответ. Наряду с антигенпрезентирующей функцией эти клетки способны выполнять регуляторные функции, контролируя силу и направленность иммунного ответа, а также обладать эффекторными функциями, свойственными клеткам врожденного иммунитета, например, цитотоксической активностью. Многочисленные экспериментальные исследования *in vivo* и *in vitro* показали, что ДК, нагруженные опухолевыми антигенами или антигенами инфекционных возбудителей, индуцируют эффективный противоопухолевый и противоинфекционный иммунный ответ. Эти данные обосновывают целесообразность применения ДК в качестве адъювантной терапии в клинической практике. Кроме того, в последние годы был достигнут значительный прогресс в методах наработки и генерации большого количества ДК *in vitro*, что существенно ускорило активное проведение клинических испытаний вакцин на основе ДК в клинической практике в лечении различных форм онкопатологий и инфекционных заболеваний.

Важно отметить, что ДК представляют достаточно гетерогенную популяцию клеток в зависимости от гистогенетической принадлежности (миелоидные или лимфоидные), зрелости, и активирующих сигналов. Соответственно функциональная активность этих клеток может также существенно различаться вплоть до противоположных эффектов. Так, например, известно, что ДК могут обладать не только стимулирующей, но и толерогенной активностью и подавлять иммунный ответ на определенные антигены [1]. Сферой приложения таких ДК могут стать аутоиммунные заболевания, патология беременности и трансплантация органов и тканей. Исследования последних лет также показали, что важную роль в детерминировании свойств ДК играют условия их генерации.

У мышей ДК обычно генерируют *in vitro* из CD34+ костномозговых предшественников в присутствии набора определенных цитокинов [23]. У человека ДК получают обычно из циркулирующих моноцитов периферической крови. Традиционно ДК генерируют путем культивирования прилипающей фракции мононуклеарных клеток (МНК) в присутствии двух ключевых цитокинов – ГМ-КСФ и ИЛ-4 – так называемые ИЛ4-ДК [31]. При этом ГМ-КСФ стимулирует дифференцировку моноцитов в сторону миеломоноцитарной линии, а ИЛ-4 ингибирует развитие макрофагов [30]. Генерируемые таким образом клетки (ИЛ4-ДК) обладают высокой способностью к захвату антигена, но

слабой стимуляторной активностью в отношении Т-клеток, т.е. являются незрелыми. Дальнейшая инкубация их с последующим добавлением коктейля дозревающих цитокинов (ФНО- α , ИЛ-1, ЛПС, CD40-лиганд) ведет к дозреванию ДК и повышению их способности активировать иммунный ответ. Однако, является ли такой путь генерации физиологичным – остается большим вопросом, поскольку продукция ИЛ-4 в высоких дозах *in vivo* представляется маловероятной. Кроме того, данный тип ДК характеризуется нарушенной миграционной активностью и в условиях дефицита ростовых факторов может трансформироваться в клетки с фенотипом моноцитов.

Другим путем получения ДК является культивирование моноцитов с ГМ-КСФ и ИФН- α [25]. Такой путь генерации представляется более физиологичным, поскольку ИФН- α является ранним медиатором врожденного иммунного ответа, продуцируется в больших количествах в ответ на стимуляцию инфекционными антигенами и провоспалительными цитокинами и обладает выраженным стимулирующим эффектом на клеточный и гуморальный иммунитет. Кроме того, ИФН-ДК, имеют ряд преимуществ – генерируются быстрее по времени, характеризуются высокой способностью к захвату антигена, сохраняют стабильность в отсутствие цитокинов, имеют более высокую миграционную активность и способны эффективно стимулировать Th1 ответ, обладая при этом умеренной Th2-стимулирующей активностью [23, 26].

Сравнение свойств ИЛ4-ДК и ИФН-ДК представляет большой интерес в плане обоснования выбора наиболее оптимального типа ДК для клинической практики. Тем не менее, данные по сравнительной характеристике указанных типов ДК немногочисленны и порой имеют противоречивый характер. Особенно это касается цитотоксического потенциала ДК. Недавние исследования показали, что миелоидные ДК, генерируемые *in vitro* в присутствии ИЛ-4 из моноцитов периферической крови, индуцируют апоптоз гемопозитических опухолевых линий без повреждения нормальных клеток [28]. Кроме того, было показано, что добавление к коктейлю дозревающих цитокинов ИФН- α при генерации ИЛ4-ДК ведет к индукции их цитотоксической активности, опосредованной молекулой TRAIL [18]. Установлено, что ИФН-ДК также обладают цитотоксичностью за счет экспрессии на своей поверхности молекулы TRAIL и гранзима В и лизируют *in vitro* клетки линии К-562 [4, 15]. Кроме того, ИФН-ДК экспрессируют на своей поверхности CD56-молекулы – маркер, специфичный для натуральных киллерных клеток, и именно эти CD56+ ИФН-ДК проявляют цитотоксическую активность (до 24%) опухолевой линии К-562 [21]. Клетки, получаемые в присутствии ИФН- α , несут значительное число CD123 – маркера плазмацитоидных клеток, которые, как показано Matsui и соавт., лизируют опухолевые клетки контакт-зависимым образом [19].

Учитывая вышеизложенное, целью настоящего фрагмента работы стало сравнительное исследование фенотипических особенностей, спектра продуцируемых цитокинов и экспрессии молекул, опосредующих цитотоксическую/супрессорную активность ИЛ4-ДК и ИФН-ДК.

2 Материалы и методы

МНК из гепаринизированной венозной крови получали центрифугированием в градиенте плотности фиколла-верографина. ИФН-ДК генерировали путем культивирования прилипающей фракции МНК во флаконах для культивирования (BD Biosciences Falcon, UK) в течение 3 суток в среде RPMI-1640 (Sigma, США), дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 5мМ HEPES-буфера, 100 мкг/мл гентамицина и 5% сыворотки плодов коровы (БиолоТ, С-Пб), в присутствии ГМ-КСФ (Sigma-Aldrich, 40 нг/мл) и ИФН- α (Роферон-А, Roche, Швейцария, 1000 Ед/мл) с последующим дозреванием с липополисахаридом (ЛПС *E.colli* 0114:B4, Sigma-Aldrich, 10 мкг/мл) в течение 24 ч. Для генерации ИЛ4-ДК прилипающую фракцию МНК (полученную как в предыдущем протоколе) инкубировали в полной культуральной среде в присутствии ГМ-КСФ (Sigma-Aldrich, 40 нг/мл), ИЛ-4 (Sigma-Aldrich 40 нг/мл) и 5% сыворотки плодов коровы (БиолоТ, Санкт-Петербург) в течение 5 сут при 37°C в CO₂-инкубаторе при 5% CO₂. В последующие 48 ч в качестве дозревающего стимула вносился ЛПС (*E.colli* 0114:B4, Sigma-Aldrich, 10 мкг/мл), после чего проводился подсчет ДК, а также собирали и замораживали цельные супернатанты культивируемых ДК.

Фенотипирование ДК проводили методом одноцветной или двуцветной проточной цитофлюориметрии (FACS Calibur, Becton Dickinson) с использованием FITC-, APC- или PE-меченных антител (CD1a, CD14, CD25, CD83, анти-B7-H1, TRAIL – PharMingen, США).

Продукцию цитокинов (ФНО- α , ИФН- γ , ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-10, ИЛ-12(p70), ИЛ-13, ИЛ-17, Г-КСФ, ИЛ-8, MCP-1, MIP-1 β) в цельных культурах ДК оценивали методом проточной флюориметрии на 2-х лучевом лазерном автоматизированном анализаторе (Bio-Plex Protein Assay System, Bio-Rad, США) с использованием коммерческих тест-систем 17Plex (определяемый динамический диапазон 2 – 32000 пкг/мл) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. При статистической обработке значения цитокинов, выходящие за нижнюю границу чувствительности метода (<2 пкг/мл), принимались за 1 пкг/мл.

Оценку количественного содержания циркулирующих ДК в периферической крови проводили с использованием 4-цветной проточной цитофлюориметрии (FACS Calibur,

Becton Dickinson) из 0,5 мл лейкоцитами. Для этого использовали набор антител HLA-DR-PercP, CD123-Per, CD11c-APC, линейные маркеры (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56)-Lin1-FITC. В Lin1-негативном регионе определяли количество HLA-DR+/CD123-/CD11c+ миелоидных и HLA-DR+/CD123+/CD11c- плазмоцитоидных ДК.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась методами описательной, параметрической и непараметрической статистики на персональном компьютере с использованием программы «STATISTICA 6.0».

3 Результаты и обсуждение

3.1 Определение экспрессии молекул, характеризующих зрелость и активацию ДК (фенотипическая характеристика ИЛ4-ДК и ИФН-ДК)

Для сравнения ИЛ4-ДК и ИФН-ДК были отобраны 14 условно здоровых доноров, у каждого из которых из прилипающей фракции МНК одновременно генерировали оба типа ДК. В результате культивирования моноцитов периферической крови в присутствии ГМ-КСФ и ИФН- α в течение 3-4 суток клетки теряли способность прилипать к пластику и приобретали типичные морфологические черты дендритных клеток, в то время как ИЛ4-ДК приобретали подобные свойства к 5 суткам культивирования. Жизнеспособность клеток во всех экспериментах была не менее 85-90%. Выход клеток в обоих протоколах значительно не отличался и составлял $(0,1 \pm 0,09$ и $0,13 \pm 0,1$ ДК на 10^6 МНК, соответственно).

Таблица 1 – Фенотипическая характеристика ЛПС-активированных ИФН-ДК и ИЛ4-ДК.

Маркер (%)	ИФН-ДК (n=14)	ИЛ-4-ДК (n=14)
CD14	$22,2 \pm 3,6$	$11,1 \pm 2,4$ *
CD83	$34,6 \pm 3,7$	$52,8 \pm 6,2$ *
CD86	$65,2 \pm 4,2$	$58,3 \pm 3,6$
CD25	$25,1 \pm 3,5$	$29,4 \pm 2,6$
CD1a	$10,4 \pm 2,0$	$48,8 \pm 2,3$ *
CD123	$40,1 \pm 3,4$ (n=28)	$6,7 \pm 1,8$ *
HLA-DR	$86,4 \pm 9,2$	$91,8 \pm 7,4$

Примечание: представлены средние значения относительного содержания (%) различных субпопуляций ДК, n – число наблюдений, * – достоверность различий $P_t < 0,01$, t – критерий Стьюдента.

Анализ поверхностных маркеров двух типов ДК (Таблица 1) показал, что ИФН-ДК отличаются от ИЛ4-ДК более высоким относительным содержанием клеток с маркером моноцитов CD14 было, что характеризует эти клетки как «частично зрелые» и согласуется с данными других авторов [5]. Количество клеток, экспрессирующих молекулу CD83+ (маркер зрелых ДК) в культурах ИФН-ДК, было напротив ниже, чем в культурах ИЛ4-ДК, что также свидетельствовало о менее зрелом фенотипе ИФН-ДК по сравнению с ИЛ4-ДК. Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют, что в отсутствие ЛПС стимуляции ИФН-ДК содержат большее количество CD83+ клеток, т.е. являются более дифференцированными по сравнению с незрелыми ИЛ4-ДК [5, 22]. В то же время после активации ЛПС эта популяция клеток имеет менее зрелый фенотип по сравнению со зрелыми, ЛПС-активированными ИЛ4-ДК.

Содержание клеток с активационным маркером зрелых ДК (CD25) и антигенами гистосовместимости II класса (HLA-DR) было одинаковым в культурах ИФН-ДК и ИЛ4-ДК. Экспрессия костимуляторных молекул CD86 на ИФН-ДК и ИЛ4-ДК была также сходной, свидетельствуя косвенно о сравнимой антигенпрезентирующей активности исследуемых ДК. Обращает на себя внимание, что среди ИФН-ДК содержатся клетки (в среднем $24,9 \pm 2,64\%$), экспрессирующие рецептор к ИЛ-3 α (CD123), характерный маркер ДК плазмацитоидной природы. Присутствие этого маркера может быть связано с различной способностью ИЛ-4 и ИФН- α к «down»-регуляции CD123, который широко представлен на дифференцирующихся моноцитах. Кроме того, ИФН-ДК клетки отличаются более низким уровнем экспрессии молекулы CD1a, функциональная роль которой состоит в презентации небелковых антигенов.

3.2 Определение экспрессии молекул, опосредующих цитотоксическую и супрессорную активности ДК

Выделенные из периферической крови человека ДК, а также генерируемые *in vitro* ДК способны избирательно проявлять свою цитотоксическую активность, вызывая апоптоз в клетках различных опухолевых линий [13, 32], при этом не повреждая нормальные клетки [12]. Гибель опухолевых клеток может индуцироваться с вовлечением различных молекулярных механизмов апоптоза как на уровне клеточно-контактного взаимодействия, так и на уровне продукции растворимых медиаторов. Цитотоксический потенциал ДК связывают с экспрессией молекул, способных индуцировать апоптоз клеток-мишеней, к которым, прежде всего, относятся молекулы B7-H1 и TRAIL.

Семейство B7-молекул и распознающие их рецепторы являются важными костимуляторными молекулами, осуществляющими запуск иммунного ответа и его

контроль. Классический В7-CD28 путь включает 2 лиганда – CD80 и CD86, и два рецептора – CD28 and CTLA-4. Костимуляция через CD28 обеспечивает рост и выживаемость Т-клеток. Связывание же с CTLA-4 ингибирует Т-клеточный ответ за счет негативного сигнала. [24]. В последние годы идентифицированы новые члены семейства В7, обеспечивающие негативный контроль иммунного ответа. Так, запуск программы апоптоза Т-лимфоцитов происходит через рецептор программированной клеточной смерти (PD-1), который относится к семейству CD28/CTLA-4 молекул и появляется на мембране Т-лимфоцитов после их активации через Т-клеточный рецептор. Показано, что PD-1 экспрессируется на CD4+ и CD8+ Т-клетках, а также на натуральных киллерных Т-клетках, В-лимфоцитах и активированных моноцитах. Идентифицированы два типа лигандов для PD-1, один из которых, обозначенный как PD-L2 (В7-DC или CD273), является индуцибельным и обнаруживается на ДК, макрофагах и культивированных тучных клетках костномозгового происхождения [27]. Другой лиганд – PD-L1 (В7-Н1 или CD274) конститутивно экспрессируется на Т- и В-клетках, ДК и макрофагах, тем не менее уровень экспрессии В7-Н1 может повышаться на активированных клетках [6]. Установлено, что В7-Н1 участвует в регуляции апоптоза активированных Т-клеток и конститутивно экспрессируется на большинстве опухолевых клеток человека при опухолевой прогрессии [7].

В качестве потенциального индуктора апоптотической гибели опухолевых клеток (клеток-мишеней) согласно данным литературы может выступать молекула семейства фактора некроза опухоли-альфа TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand). Действительно, поверхностная экспрессия TRAIL регистрируется на CD11c+ ДК здоровых доноров в ответ на стимуляцию ИФН I класса и ИФН γ [9]. Кроме того, генерируемые из моноцитов ДК в стандартном протоколе (ИЛ-4 и ГМ-КСФ) обладают киллерной активностью против TRAIL-чувствительных опухолевых линий за счет продукции мембранно-связанной формы TRAIL [3]. В то же время есть немногочисленные данные, свидетельствующие о том, что незрелые ИФН-ДК отличаются от ИЛ4-ДК более высоким уровнем внутриклеточной экспрессии TRAIL, что находит отражение в цитотоксической активности ДК против TRAIL-чувствительных опухолевых линий *in vitro* [14].

Таким образом, можно полагать, что более высокая экспрессия данных молекул на ДК детерминирует апоптоз-индуцирующую активность ДК при их взаимодействии с Т-лимфоцитами или опухолевыми клетками-мишенями, и таким образом опосредует цитотоксическую/ингибирующую активность ДК.

Еще одной молекулой, экспрессия которой на ДК может опосредовать супрессорную активность ДК, является HLA-G – человеческий лейкоцитарный антиген первого класса (Ib) главного комплекса гистосовместимости. Изначально HLA-G был обнаружен на клетках трофобласта, обеспечивая толерантность матери к плоду [16]. Кроме того, эта молекула экспрессируется на некоторых злокачественных клетках, а также на макрофагах и ДК у онкологических пациентов (опухоли легких, молочной железы и кожной лимфомы) [17, 31], а также при воспалительных заболеваниях легких [20]. Экспрессия HLA-G может меняться в процессе дифференцировки и созревания ДК. Так показана потенциальная способность ДК экспрессировать и секретировать HLA-G, особенно это касается миелоидных ДК, генерируемых из CD34+ предшественников [10].

Анализ экспрессии TRAIL, B7-H1 и HLA-G был проведен как в популяциях незрелых, так и ЛПС-активированных ИФН- α и ИЛ-4-индуцированных ДК (Таблица 2). Видно, что как незрелые, так и ЛПС-активированные ИФН-ДК содержали большее количество клеток, экспрессирующих на мембране молекулу TRAIL, чем ИЛ4-ДК. При этом как в культурах ИФН-ДК, так и ИЛ4-ДК ЛПС не влиял достоверно на мембранную экспрессию данной молекулы.

Что касается коингибиторных молекул B7-H1, незрелые ИФН-ДК содержали большее количество B7-H1-позитивных клеток, чем незрелые ИЛ4-ДК. При стимуляции ЛПС относительное содержание клеток, экспрессирующих B7-H1, в культурах ИЛ4-ДК достоверно возрастало и становилось сравнимым с таковым в культурах ИФН-ДК. В культурах ИФН-ДК активация ЛПС не приводила к достоверному изменению количества этих клеток.

Исследование экспрессии HLA-G молекулы показало, что незрелые ИЛ4-ДК характеризовались более высоким уровнем экспрессии HLA-G молекулы, а ЛПС-индуцированное созревание этих клеток сопровождалось значимым снижением количества клеток, экспрессирующих HLA-G. В то же время активация ИФН-ДК ЛПС не сопровождалась изменением экспрессии молекулы HLA-G.

Таблица 2 – Экспрессия молекул, опосредующих цитотоксическую / супрессорную активность ДК.

Маркер (% клеток)	ИФН-ДК		ИЛ4-ДК	
	0	ЛПС	0	ЛПС
TRAIL (n=12)	18,3±2,0	16,1±1,6	10,6±1,1*	8,8±1,9*
B7-H1 (n=12)	39,1±5,3	32,6±3,9	27,6±6,2*	38,0±6,9 #
HLA-G (n=8)	8,5±1,4	10,0±1,9	16,3±4,9*	7,1±2,0 #

Примечание: представлены средние значения экспрессии (%) различных молекул на ДК, n – число наблюдений, 0 – ДК без дозревающего стимула, ЛПС – ДК после дозревающего стимула, # – достоверность различий незрелых (0) и зрелых ДК (ЛПС), * – достоверность различий ИФН-ДК и ИЛ4-ДК, $P_u < 0,05$, u – критерий Вилкоксона-Манна-Уитни.

Таким образом, по сравнению с незрелыми ИЛ4-ДК, ДК, индуцированные в присутствии ИФН- α характеризуются более высоким уровнем экспрессии B7-H1 и TRAIL, что может свидетельствовать об их более высоком цитотоксическом потенциале. Вместе с тем эти клетки содержат меньшее количество клеток, экспрессирующих HLA-G, что может указывать на их меньшую супрессорную активность. ЛПС-активированные ИФН-ДК сохраняют более высокий уровень экспрессии TRAIL, но при этом не отличаются от зрелых ИЛ4-ДК по экспрессии B7-H1 и HLA-G, т.е. сохраняют более высокий цитотоксический потенциал и, по-видимому, имеют сходный иммуносупрессорный потенциал, опосредуемый молекулой HLA-G.

3.3 Определение продукции Th1/провоспалительных и Th2/противовоспалительных цитокинов ДК

Оценка цитокин-секреторной активности ДК показала (Таблица 3), что ИФН-ДК достоверно отличались от ИЛ4-ДК более высоким уровнем продукции Th1/провоспалительных цитокинов (ИФН- γ , ИЛ-2, ИЛ-17, ИЛ-1 β) и повышенной секрецией ФНО- α . В то же время продукция ИЛ-12p70 в культурах ИФН-ДК была практически в 2 раза ниже ($435,4 \pm 60,9$ против $796,4 \pm 195,7$ пг/мл в культурах ИЛ4-ДК), что согласуется с известными литературными данными [5]. Возможно, недостаточная секреция ИЛ-12p70 связана с низким уровнем экспрессии CD1a – молекулы, ответственной за презентацию липидных антигенов [8].

Таблица 3 – Продукция цитокинов ЛПС-активированными ИФН-ДК и ИЛ4-ДК.

Цитокины	ИФН-ДК (n=17)	ИЛ4-ДК (n=17)
Th1/провоспалительные цитокины		
ИФН- γ	$4915,7 \pm 1706,9$ (2277) *	$3325,9 \pm 1270$ (1406)
ИЛ-2	$1177,6 \pm 78,5$ (1121) *	$827,8 \pm 102,2$ (830)
ИЛ-1 β	$502,8 \pm 46,9$ (456) *	$273,9 \pm 55,4$ (197)
ФНО- α	$18910,1 \pm 2799,4$ (19485)	$12408,4 \pm 3031,6$ (2799)
ИЛ-12(p70)	$435,4 \pm 60,9$ (300) **	$796,4 \pm 195,7$ (504)
ИЛ-17	$488,8 \pm 18,9$ (480) *	$401,8 \pm 48,1$ (433)

Th2/противовоспалительные цитокины		
ИЛ-5	41,4 ± 14,2 (22) **	13,1 ± 2,0 (10)
ИЛ-6	35580,0 ± 1411,7 (38135)	28081,7 ± 3249,1 (34561)
ИЛ-10	658,2 ± 138,2 (422) *	495,7 ± 210,1 (181)
ИЛ-13	133,5 ± 15,8 (109)	177,9 ± 40,1 (145)
Факторы иммуногемопоза		
ИЛ-7	38,4 ± 1,6 (38) *	44,2 ± 2,3 (48)
Г-КСФ	4290,8 ± 511,9 (4045) *	3884,1 ± 1500,8 (1378)
Хемокины		
ИЛ-8	35378 ± 8739,6 (27697)	26514 ± 759,6 (27962)
МСР-1	29166,8 ± 1598,6 (28948) **	11253,9 ± 1760,1 (11453)
МІР-1β	16274,0 ± 7,61 (16285)	15539,5 ± 518,8 (16285)

Примечание: представлены средние значения уровня продукции цитокинов (пкг/мл) в супернатантах цельных культур ДК. В скобках приведены медианы значений. *, ** – достоверность различий между продукцией цитокинов в протоколе ИФН-ДК и ИЛ4-ДК. * – $p_u < 0,05$, ** – $p_u < 0,01$, u – критерий Вилкоксона-Манна-Уитни.

ИФН-ДК отличались от ИЛ4-ДК также более высоким уровнем продукции Th2/противовоспалительных цитокинов (ИЛ-10, ИЛ-5). Секреция ИЛ-6 регистрировалась на достаточно высоком уровне в культурах обоих типов ДК. Не было выявлено также различий в уровне продукции ИЛ-13.

ИФН-ДК в отличие от ИЛ4-ДК характеризовались также более высокой секрецией Г-КСФ и хемокина МСР-1, что может свидетельствовать об их повышенной потенциальной способности рекрутировать и активировать клетки врожденного иммунитета (гранулоциты, моноциты/макрофаги).

Полученные данные о более высокой продукции Th1/провоспалительных цитокинов и хемокинов, а также ИЛ-10 и ИЛ-5 в культурах ИФН-ДК позволяют полагать, что эти клетки могут более активно индуцировать реакции клеточного и гуморального иммунитета по сравнению с ИЛ4-ДК.

3.4 Оценка количественного содержания миелоидных и плазматоидных ДК в крови здоровых доноров и пациентов, больных раком молочной железы на программной химиотерапии

Известно, что в циркулирующей крови существует две популяции ДК – миелоидные ДК, которые идентифицируются по поверхностной экспрессии CD11c и HLA-DR, и плазматоидных ДК, имеющих фенотип CD123+/HLA-DR+. Эти клетки имеют различные функции. Так, миелоидные ДК активируют наивные Т-клетки, продвигают их дифференцировку в сторону Th1 и генерируют противоопухолевый иммунный ответ [2], тогда как плазматоидные ДК преимущественно активируют Th2-ответ и могут индуцировать состояние толерантности. Количество и соотношение этих субпопуляций ДК может меняться при различных иммунопатологических состояниях. Так показано, что при раке молочной железы и множественной миеломе снижается количество обеих субпопуляций ДК [15, 33].

Таблица 4 – Содержание миелоидных и плазматоидных ДК в периферической крови здоровых доноров и пациентов, больных раком молочной железы на программной химиотерапии.

Маркер ДК		Относительное содержание (%)		Абсолютное содержание ($\times 10^3$ /мл)	
		Доноры (n=12)	Больные (n=10)	Доноры (n=12)	Больные (n=10)
CD11c+ / HLA-DR+	M \pm m	0,76 \pm 0,11	1,2 \pm 0,2 *	35,2 \pm 0,55	48,8 \pm 18,1 *
	Mediana	0,79	0,99	36,6	24,8
	Min-max	0,13-1,3	0,42-2,4	4,03-70,2	12,1-177,6
CD123+ / HLA-DR+	M \pm m	0,31 \pm 0,06	0,76 \pm 0,19 *	14,7 \pm 36,1	24,8 \pm 7,2 *
	Mediana	0,25	0,56	15,6	13,7
	Min-max	0,08-0,62	0,13-2,0	2,96-27,6	6,7-71,0

Примечание: * – достоверность различий в группе больных и доноров, $p_u < 0,01$, u – критерий Вилкоксона-Манна-Уитни.

Оценка различных субпопуляций ДК (Таблица 4) показала, что в периферической крови здоровых доноров относительное содержание миелоидных ДК (CD11c+/HLA-DR+) варьирует от 0,13 до 1,3 %, составляя в среднем 0,76%, тогда как количество плазматоидных ДК (CD123+/HLA-DR+) составляет в среднем 0,31% с диапазоном от 0,08 до 0,62%. Индекс соотношения миелоидных и плазматоидных ДК составляет в

среднем $2,1 \pm 0,53$. Таким образом, относительное и абсолютное количество миелоидных клеток в среднем в 2 раза превышает количество плазмацитоидных ДК, что согласуется с данными литературы [11].

У больных с метастатическими формами рака молочной железы (Таблица 4) по предварительным данным относительное и абсолютное содержание миелоидных и плазмацитоидных ДК перед началом курса химиотерапии было повышенным, и статистически достоверно отличалось от нормативных значений. При этом соотношение миелоидных и плазмацитоидных ДК было несколько снижено за счет нарастания численности плазмацитоидных ДК (индекс соотношения $1,8 \pm 0,3$).

3.5 Оценка количественного содержания миелоидных и плазмацитоидных ДК в крови пациентов, прошедших курсы программной химиотерапии в ходе проведения 2 фазы клинических испытаний препарата Панаген

На фоне химиотерапии, сочетающейся с приемом препарата ДНК человека (Панаген), у больных раком молочной железы отмечалось статистически достоверное увеличение относительного содержания плазмацитоидных CD123+/HLA-DR+ ДК и абсолютного количества миелоидных CD11c+/HLA-DR+ ДК (Таблица 5).

Таблица 5 – Содержание миелоидных и плазмацитоидных ДК в периферической крови пациентов, больных раком молочной железы на программной химиотерапии до и после приема препарата Панаген.

Маркер ДК		Относительное содержание (%)		Абсолютное содержание ($\times 10^3/\text{мл}$)	
		До лечения (n=10)	После лечения (n=6)	До лечения (n=10)	После лечения (n=6)
CD11c+ / HLA-DR+	M±m	1,2±0,2	1,25±0,38	48,8±18,1	121,1±78,6 *
	Mediana	0,99	0,96	24,8	42,7
	Min-max	0,42-2,4	0,39-3,0	12,1-177,6	8,1-505,4
CD123+ / HLA-DR+	M±m	0,76±0,19	1,32±0,79 *	24,8±7,2	38,4±25,1
	Mediana	0,56	0,59+	13,7	14,2
	Min-max	0,13-2,0	0,12-5,2	6,7-71,0	4,3-163

Примечание:* – достоверность различий в группе до и после лечения, $p_u < 0,01$, u – критерий Вилкоксона-Манна-Уитни.

В литературе имеются данные, что накопление плазмацитоидных ДК в зоне опухолевого роста на фоне применения препарата имиквимод (агонист Toll-like рецептора TLR7/8) сопровождается снижением роста опухоли [29]. С этой точки зрения возрастание доли плазмацитоидных ДК на фоне приема препарата Панаген может рассматриваться в качестве позитивных изменений параметров иммунитета, благоприятствующих подавлению опухолевого роста.

Заключение

Особенностью разрабатываемой технологии является использование ИФН- α для активации созревания ДК *in vitro*.

Важнейшим отличием применения ИФН- α для активации и получения ДК *in vitro* от классического индуктора ИЛ-4, традиционно используемого в зарубежных протоколах, является более физиологичный путь генерации ДК, поскольку ИФН- α является ранним медиатором врожденного иммунитета, тогда как продукция ИЛ-4 в высоких дозах *in vivo* представляется маловероятной. По нашим данным ИФН-ДК имеют ряд преимуществ: 1) генерируются быстрее по времени; 2) характеризуются высокой способностью к захвату антигена (т.к. имеют фенотип «частично зрелых» клеток), сохраняя при этом антиген-презентирующую активность (т.к. экспрессируют костимуляторные молекулы [CD86] и молекулы главного комплекса гистосовместимости [HLA-DR]); 3) обладают цитотоксическим потенциалом, поскольку экспрессируют молекулы B7-H1 и TRAIL, и отличаются повышенным содержанием плазмацитоидных CD123+ ДК; 4) сохраняют функциональную стабильность и способны эффективно индуцировать реакции клеточного и гуморального иммунитета, поскольку активно секретируют Th1/провоспалительные (ИФН- γ , ИЛ-2, ИЛ-17, ИЛ-1 β) и Th2/противовоспалительные цитокины (ИЛ-10, ИЛ-5), а также ростовые гемопоэтические факторы (Г-КСФ) и хемокины (MCP-1).

Таким образом, результаты проведенной работы научно обосновывают целесообразность использования ИФН-ДК в качестве клеточной основы при создании индивидуальных лечебных вакцин, которые могут быть использованы в комплексной терапии больных с онкопатологией или хроническими вирусными заболеваниями для индукции/усиления противоопухолевого или противоинфекционного иммунного ответа.

Проведенные на первом этапе исследования позволили отработать стандарты операционных процедур и подготовить лабораторно-технологический регламент по выделению, культивированию, генерации и криоконсервации/размораживанию ИФН-ДК человека *in vitro*.

Экономическая эффективность работы заключается в том, что результаты работы могут быть использованы для создания новой медицинской технологии применения индивидуальных дендритноклеточных вакцин для лечения онкологических и инфекционных (вирусных) заболеваний человека, которая после регистрации в Росздравнадзоре может быть внедрена в практическое здравоохранение.

Начиная с 2011 г, полученные на первом этапе результаты, планируется использовать в образовательном процессе на кафедре иммунологии Новосибирского государственного медицинского университета и Медицинском факультете Новосибирского государственного университета.

Предусмотренные календарным планом задания выполнены полностью.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Anderson A. E., Swan D. J., Sayers B. L., Harry R. A., Patterson A. M., von Delwig A., Robinson J. H., Isaacs J. D., Hilkens C. M. LPS activation is required for migratory activity and antigen presentation by tolerogenic dendritic cells // *J. Leukoc. Biol.* – 2009. – V. 85. – P. 243-250.
2. Brossart P., Wirths S., Brugger W., Kanz L. Dendritic cells in cancer vaccines // *Exp. Hematol.* – 2001. – V. 29. – P. 1247-1255.
3. 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. – V. 176. – P. 248-255.
4. Chauvin C., Josien R. Dendritic cells as killers: mechanistic aspects and potential roles // *J. Immunol.* – 2008. – V. 181. – P. 11-16.
5. Della-Bella S. D., Nicola S., Riva A. Functional repertoire of dendritic cells generated in granulocyte macrophage-colony stimulating factor and interferon – α // *J. Leukoc. Biol.* – 2004. – V. 75. – P. 106-116.
6. Dong H., Chen X. Immunoregulatory role of B7-H1 in chronicity of inflammatory responses // *Cell. Mol. Immunology.* – 2006. – V. 3. – P. 179-187.
7. Dong H., Chen L. B7-H1 pathway and its role in the evasion of tumor immunity // *Mol. Med.* – 2005. – V. 81. – P. 281-287.
8. Ebner S., Neyer S., Hofer S., Nussbaumer W., Romani N., Heufler C. Generation of large numbers of human dendritic cells from whole blood passaged through leukocyte removal filters: an alternative to standard buffy coats // *J. Immunol. Methods.* – 2001. – V. 252. – P. 93-104.
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. – V. 190. – P. 1155-1164.
10. Fric G. L., Gros F, Sebti Y., Guilloux V, Pangault C, Fauchet R, Amiot L. Capacity of myeloid and plasmacytoid dendritic cells especially at mature stage to express and secrete HLA-G molecules // *J. Leukoc. Biol.* – 2004. – V. 76. – P. 1125-1133.
11. Hasskamp J. H, Zapas J. L., Elias G. Dendritic Cell Counts in the Peripheral Blood of Healthy Adults // *Am. J. Hematol.* – 2005. – V. 78. – P. 314-315.
12. Hubert P., Giannini S. L., Vanderplassen A., Franzen-Detrooz E., Jacobs N., Boniver J., Delvenne P. Dendritic cells induce the death of human papillomavirus- transformed keratinocytes // *FASEB J.* – 2001. – V.15. – P. 2521-2523.
13. Janjic B. M., Pimenov A., Whiteside T. L. Storkus W. J., Vujanovic N. L. Innate direct anticancer effector function of human immature dendritic cells. I. Involvement of an apoptosis-inducing pathway // *J. Immunol.* – 2002. – V. 168. – P. 1832-1840.
14. Korthals M., Safaian N., Kronenwett R., Maihofer D., Schott M., Papewalis C., Diaz Blanco E., Winter M., Czibere A., Haas R. Monocyte derived dendritic cells generated by

- IFN- α acquire mature dendritic and natural killer cell properties as shown by gene expression analysis // *J. Transl. Med.* – 2007. – V. 5. – P. 46-48.
15. Kovarova L., Buchler T., Pour L. Dendritic cell counts and their subsets during treatment of multiple myeloma // *Neoplasma.* – 2007. – V. 54. – P. 297-303.
 16. Kovats S., Main E. K., Librach C., Stubblebine M., Fisher S. J., DeMars, R. A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts // *Science.* – 1990. – V. 248. – P. 220-223.
 17. Lefebvre S., Antoine M., Uzan S., McMaster M., Dausset J., Carosella E. D., Paul P. Specific activation of the non-classical class I histocompatibility HLA-G antigen and expression of the ILT-2 inhibitory receptor in human breast cancer // *J. Pathol.* – 2002. – V. 196. – P. 266-274.
 18. Lu G., Janjic B. M., Janjic J., Whiteside T. L., Storkus W. J., Vujanovic N. L. Innate direct anticancer effector function of human immature dendritic cells. II. Role of TNF, lymphotoxin, Fas- ligand, and TNF-related apoptosis-inducing ligand // *J. Immunol.* – 2002. – V. 168. – P. 1831-1839.
 19. Matsui T., Connolly J. E., Michnevitz M., Chaussabel D., Yu C-I., Glaser C, Tindle S., Pypaert M., Freitas H., Piqueras B., Banchereau J., Palucka A. K. CD2 Distinguishes Two Subsets of Human Plasmacytoid Dendritic Cells with Distinct Phenotype and Functions // *J. Immunol.* – 2009. – V. 182. – P. 6815-6823.
 20. Pangault C., Le Fric G., Caulet-Maugendre S., Lena, H., Amiot L., Guilloux V., Onno M., Fauchet R. Lung macrophages and dendritic cells express HLA-G molecules in pulmonary diseases // *Hum. Immunol.* – 2002. – V. 63. – P. 83-90.
 21. Papewalis C., Jacobs B., Wuttke M., Ullrich E., Baehring T., Fenk R., Willenberg H. S. Schinner S., Cohnen M., Seissler J., Zacharowski K., Scherbaum W. A., Matthias Schott M. IFN- α Skews Monocytes into CD56+-Expressing Dendritic Cells with Potent Functional Activities In Vitro and In Vivo // *J. Immunol.* – 2008. – V. 180. – P. 1462-1470.
 22. Paquette R., Hsu N., Kiertscher S., Park A., Tran L., Roth M., Glaspy J. Interferon-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor differentiate peripheral blood monocytes into potent antigen-presenting cells // *J. Leukoc. Biol.* – 1998. – V. 64. – P. 358-367.
 23. Parlato S., Santini S., Lapenta C., Di Pucchio T., Logozzi M., Spada M., Giammarioly A., Malorni W., Fais S., Bellardelli F. Expression of CCR-7, MIP-3b, and Th1 chemokines in type I IFN-induced monocyte-derived dendritic cells – importance for the rapid acquisition of potent migratory and functional activities // *Blood.* – 2001. – V. 98. – P. 3022-3029.
 24. Salomon B. Bluestone J. A. Complexities of CD28/B7:CTLA-4 costimulatory pathway in autoimmunity and transplantation // *Annu. Rev. Immunol.* – 2001. – V. 9. – P. 225-253.
 25. Santini S., Lapenta C., Logozzi M., Parlato S., Spada M., Di Pucchio T., Bellardelli F. Type I Interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cells

- development and activity in vitro and in HU-PBL-SCID mice // *J. Exp. Med.* – 2000. – V. 191. – P. 1777-1788.
26. Santini S., Pucchini 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. – V. 21. – P. 357-362.
 27. Sharpe A. H., Wherry E. J., Ahmed R., Freeman G. J. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection // *Nat. Immunol.* – 2007. – V. 8. – P. 239-245.
 28. Shi J., Ikeda K., Fujii N., Kondo E., Shinagawa K., Ishimaru F., Kaneda K., Tanimoto M., Li X., Pu Q. Activated human umbilical cord blood dendritic cells kill tumor cells without damaging normal hematological progenitor cells // *Cancer Sci.* – 2005. – V. 96. – P. 127-133.
 29. Strydom G., Bangert C., Tauber M., Strohal R., Kopp T., Stingl G. Tumoricidal activity of TLR7/8-activated inflammatory dendritic cells // *J. Exp. Med.* – 2007. – V. 204. – P. 1441-1451.
 30. Szabolcs P., Avigan D., Gezelter S., Ciocon D. H., Moore M. A., Steinman R. M., Jung J. W. Dendritic cells and macrophages can mature independently from a human bone marrow-derived, post colony forming unit intermediate // *Blood.* – 1996. – V. 87. – P. 4520-4530.
 31. Urosevic M., Kurrer M. O., Kamarashev J., Mueller B., Weder W., Burg G., Stahel R. A., Dummer R., Trojan A. Human leukocyte antigen G up-regulation in lung cancer associates with high-grade histology, human leukocyte antigen class I loss and interleukin-10 production // *Am. J. Pathol.* – 2001. – V. 159. – P. 817-824.
 32. Vanderheyde N., Aksoy E., Amraoui Z., Vandenabeele P., Goldman M., Willems F. Tumoricidal activity of monocyte-derived dendritic cells: evidence for a caspase-8-dependent, Fas-associated death domain-independent mechanism // *J. Immunol.* – 2001. – V. 167. – P. 3565-3569.
 33. Vukovic S., Gardiner D., Field K. Monitoring dendritic cells in clinical practice using a new whole blood single-platform TruCOUNT assay // *J. Immunol. Methods.* – 2004. – V. 284. – P. 73-87.