

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
«___» _____ 2011 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:
ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ РАЗЛИЧНЫХ БИОАКТИВНЫХ ПРОДУКТОВ НА ГЕНЕРАЦИЮ
ДК *IN VITRO* И *IN VIVO*
(промежуточный, 4 этап)

Руководитель работ
проф., д.м.н.

_____ Е.Р. Черных
подпись

Новосибирск 2011

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель работ проф., д.м.н.	_____ подпись	Е.Р. Черных (все разделы отчета)
Исполнители		
гл.н.с., проф., д.м.н.	_____ подпись	А.А. Останин (все разделы отчета)
вед.н.с., д.м.н.	_____ подпись	Н.А. Хонина (раздел 3.1, 3.2)
с.н.с., к.м.н.	_____ подпись	О.Ю. Леплина (разделы 1, 2, 3.1, 3.2)
с.н.с., к.м.н.	_____ подпись	Е.Я. Шевела (раздел 3.2)
с.н.с., к.м.н.	_____ подпись	М.А. Тихонова (разделы 3.1, 3.2)
с.н.с., к.м.н.	_____ подпись	Л.В. Сахно (разделы 3.1, 3.2)
зав. отделением Клиники иммунопатологии, к.м.н.	_____ подпись	Н.М. Старостина (разделы 3.1, 3.2)
врач-ординатор Клиники иммунопатологии	_____ подпись	О.И. Желтова (разделы 3.1, 3.2)
врач-ординатор Клиники иммунопатологии	_____ подпись	М.В. Шипунов (разделы 3.1, 3.2)
м.н.с.	_____ подпись	Т.В. Тыринова (разделы 3.1, 3.2)
аспирант	_____ подпись	Е.В. Баторов (раздел 3.2)
студент НГМУ	_____ подпись	А.Е. Горбачева (раздел 3.1)
студент НГМУ	_____ подпись	О.М. Павлова (раздел 3.1)
студент НГМУ	_____ подпись	С.Э. Сланова (раздел 3.2)
студент НГМУ	_____ подпись	С.И. Ворошилов (раздел 3.2)
нормоконтролер	_____ подпись	Н.В. Сычева
Соисполнители		
Руководитель темы в Институте цитологии и генетики СО РАН, зав. лабораторией, д.б.н.	_____ подпись	С.С. Богачев (разделы 3.3, 3.4, 3.5)
н.с., к.б.н.	_____ подпись	А.С. Проскурина (разделы 3.3, 3.4, 3.5)

н.с., к.б.н.	_____	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	
аспирант	_____	А.В. Прокопенко (разделы 3.3, 3.4, 3.5)
	подпись	
студент НГМУ	_____	Т.С. Гвоздева (разделы 3.4, 3.5)
	подпись	
студент НГУ	_____	Т.Б. Маланханова (раздел 3.4)
	подпись	
студент КарГУ	_____	Е.А. Лебедева (раздел 3.5)
	подпись	
студент ДВГУ	_____	Е.С. Петрова (раздел 3.5)
	подпись	

Реферат

Отчет 60 с., 17 таблиц, 6 рисунков, 44 источника.

Ключевые слова – дендритные клетки, интерферон- α , двуцепочечная ДНК человека, рИЛ-2, ДГЭАС, полиоксидоний, суперлимф, цитокины, CD11+CD123– миелоидные дендритные клетки, CD11–CD123+ плазмацитоидные дендритные клетки, рак молочной железы, злокачественные глиомы, лимфомы, туберкулез.

Объектом исследования являются дендритные клетки человека.

Целью настоящего этапа являлось исследование влияния различных биоактивных медиаторов на созревание и функциональную активность дендритных клеток, генерируемых в присутствии ИФН- α . В рамках тематики этапа предполагалось решить следующие задачи: 1) изучить влияние различных биоактивных продуктов на созревание ИФН-ДК *in vitro*; 2) изучить влияние различных биоактивных продуктов на функциональную активность ИФН-ДК *in vitro*; 3) исследовать влияние препарата двуцепочечной ДНК человека (Панаген) на созревание и функции ИФН-ДК *in vitro*; 4) исследовать влияние препарата двуцепочечной ДНК человека на количество и соотношение различных типов ДК у больных с онкопатологией, участвующих в исследованиях препарата Панаген на II фазе клинических испытаний.

Панель исследуемых биоактивных продуктов включала: гормон дегидроэпиандростерон сульфат (ДГЭАС); иммуномодулирующие препараты – сополимер N-окси-1,4-этиленпиперазина и (N-карбоксиэтил)-1,4-этиленпиперазиний бромида («Полиоксидоний») и комплекс нативных провоспалительных цитокинов («Суперлимф»), препарат рекомбинантного интерлейкина-2 человека («Ронколейкин»); препарата двуцепочечной ДНК человека («Панаген»). Оценивали корректирующие эффекты исследуемых биоактивных медиаторов на фенотипические и функциональные характеристики ИФН-ДК здоровых доноров и больных с онкопатологией (злокачественные глиомы и лимфомы) и туберкулезом легких.

Было показано, что иммуномодулирующие препараты («Полиоксидоний», «Суперлимф»), препарат двуцепочечной ДНК человека («Панаген»), а также гормон ДГЭАС характеризуются выраженным стимулирующим эффектом на процесс дифференцировки/созревания ИФН-ДК. Так, например, Панаген по своему стимулирующему действию на ДК был сопоставим с «классическим» дозревающим стимулом – липополисахаридом стенки бактерий (ЛПС). В свою очередь, стимулирующий эффект ДГЭАС проявлялся не только в отношении ДК здоровых доноров, но и в модели «толерогенных» ДК, полученных от женщин с физиологической беременностью.

Показано, что стимулирующий эффект ДГЭАС на созревание ИФН-ДК во многом обусловлен усилением эндогенной продукции ФНО α – цитокина, который является одним из мощных «созревающих» стимулов для ДК.

При исследовании влияния биоактивных препаратов на функциональные свойства ДК, полученных от больных с онкопатологией (злокачественные опухоли головного мозга и лимфомы) и туберкулезом легких, была показана принципиальная возможность восстановления сниженной функциональной активности ДК у больных с тяжелыми онкологическими и инфекционными заболеваниями с помощью различных биоактивных препаратов («Полиоксидоний», «Суперлимф», «Ронколейкин», «Панаген»), добавление которых на этапе конечного созревания ДК позволяет значимо повысить аллостимуляторную и цитотоксическую активность генерируемых *in vitro* ИФН-ДК.

В целом, проведенные исследования обосновывают новые подходы к коррекции возможных дисфункций ДК при патологии и пути повышения эффективности клеточных технологий лечения инфекционных и онкологических заболеваний с использованием аутологичных дендритноклеточных вакцин.

При исследовании фенотипа и функциональной активности ИФН-ДК использовали разработанный ранее стандарт лабораторного тестирования дендритных клеток *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.

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.

Результаты, полученные в ходе реализации проекта, использованы при чтении курса лекций для клинических ординаторов НИИ клинической иммунологии СО РАМН, а также для студентов 1, 3 и 4 курсов факультета естественных наук Новосибирского государственного университета.

Предусмотренные календарным планом задания выполнены полностью.

Содержание

Определения, обозначения и сокращения	8
Введение	9
Основная часть	14
1 Литературный обзор	14
2 Материалы и методы	18
3 Результаты и обсуждение	20
3.1 Исследование влияния различных биоактивных продуктов (цитокины, ингибиторы ПГЕ2, и др.) на созревание ИФН-ДК <i>in vitro</i>	20
3.2 Исследование влияния различных биоактивных продуктов (цитокины, ингибиторы ПГЕ2, и др.) на функциональную активность ИФН-ДК <i>in vitro</i>	26
3.3 Исследование влияния препарата двуцепочечной геномной ДНК человека на созревание и функции ИФН-ДК <i>in vitro</i>	33
3.4 Исследование влияния препарата двуцепочечной геномной ДНК человека на количество различных типов ДК у больных с онкопатологией, участвующих в исследованиях препарата Панаген на II фазе Клинических испытаний	38
3.5 Определение соотношения различных типов ДК у больных с онкопатологией после воздействия препарата Панаген	44
Заключение	49
Список использованных источников	55

Определения, обозначения и сокращения

ГМ-КСФ – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

ДК – дендритные клетки

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИВ – индекс влияния

ИЛ-2, ИЛ-4 и др. – интерлейкин-2, интерлейкин-4 и др.

ИФН- α – интерферон- α

ИФН- γ – интерферон- γ

ИФН-ДК – дендритные клетки, полученные в присутствии интерферона- α

ЛПС – липополисахарид стенки бактерий

МНК – моноклеарные клетки

ППД – туберкулиновый очищенный белковый дериват

СКЛ – смешанная культура лимфоцитов

ФНО α – фактор некроза опухоли- α

CD – кластер дифференцировки

HLA-DR – антигены главного комплекса гистосовместимости

НК-клетки – натуральные киллерные клетки

Th0, Th1, Th2 – субпопуляции Т-хелперных клеток

Введение

Дендритные клетки (ДК) являются высокоспециализированными антигенпрезентирующими клетками, способными индуцировать иммунный ответ против различных антигенов, включая опухолевые и вирусные антигены. Соответственно технологии генерации ДК и использования их в качестве индивидуальных вакцин рассматриваются в качестве перспективных клеточных технологий, направленных на усиление противоопухолевого и противовирусного иммунитета.

Тем не менее, ДК представляют собой гетерогенную популяцию клеток, различающихся по степени зрелости (незрелые, частично-зрелые или зрелые ДК) и соответственно, по уровню функциональной активности. Кроме того, ДК в культуре *in vitro* могут быть получены с использованием различных протоколов, например, либо в присутствии ГМ-КСФ и ИЛ-4 (ИЛ4-ДК) или в присутствии ГМ-КСФ и ИФН- α (ИФН-ДК). Важнейшим отличием применения ИФН- α для активации и получения ДК *in vitro* от классического индуктора ИЛ-4, 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, полученным в ходе выполнения 1-го и 2-го этапов работы, ИФН-ДК имеют ряд преимуществ:

- 1) генерируются быстрее по времени;
- 2) характеризуются высокой способностью к захвату антигена (поскольку 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 гемопозитические факторы (Г-КСФ) и хемокины (MCP-1);

5) ИФН-ДК обладают схожей с ИЛ-4-ДК способностью активировать Т-клетки к продукции Th1/провоспалительных (ИЛ-2, ИЛ-1 β , ФНО- α , ИЛ-12p70, ИЛ-17) и Th2/противовоспалительных цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-13), ростовых факторов гемоиммунопоза (ИЛ-7, Г-КСФ, ГМ-КСФ), а также СХС и СС хемокинов (ИЛ-8, MCP-1);

6) ИФН-ДК оказывают более выраженный стимулирующий эффект на Th1 и Th2-клетки, что проявляется достоверно более высоким уровнем продукции ИФН- γ и ИЛ-5, а также СС хемокина – MIP-1 β ;

7) ИФН-ДК обладают более выраженной способностью активировать Th1-клетки и индуцируют 10-кратный прирост количества CD3+ИФН- γ + Т-клеток в смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ);

8) ИФН-ДК характеризуются наличием умеренной Th2-стимуляторной активности (индуцируют увеличение количества CD3+ИЛ-4+ Т-клеток в СКЛ), которая практически отсутствует у ИЛ4-ДК;

9) ИФН-ДК характеризуются способностью к активации цитотоксических CD8+ Т-лимфоцитов, экспрессирующих внутриклеточно перфорин, при этом данная функциональная активность ИФН-ДК может быть дополнительно усилена при использовании в качестве дозревающего стимула ДНК человека.

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 противоифекционного иммунного ответа.

При этом исследования, выполненные на 3 этапе работы, показали принципиальную возможность генерации *ex vivo* из моноцитов крови больных с онкопатологией (злокачественными глиомами, гемобластозами) и инфекционными заболеваниями (гепатиты В и С, туберкулез легких) популяции ИФН-ДК в количествах, достаточных для проведения иммунотерапии с использованием индивидуальных лечебных вакцин.

Было установлено также, что ИФН-ДК, генерируемые у пациентов с онкопатологией и инфекционными заболеваниями, характеризуются некоторой задержкой дифференцировки/созревания, что проявляется увеличением клеток с фенотипом моноцитов (CD14+) и ДК промежуточной степени зрелости (CD1a, CD83+CD1a+, CD11+CD123+), а с другой стороны – снижением доли клеток, экспрессирующих молекулы зрелых и активированных ДК (CD83+, CD83+CD1a–, CD25+). Среди больных с онкопатологией эти признаки были наиболее выражены в группе больных со злокачественными лимфомами, в меньшей степени – в группе пациентов со злокачественными глиомами и минимальны – у больных с множественной миеломой. Среди больных с инфекционными заболеваниями наиболее выраженные нарушения дифференцировки/созревания ДК регистрировались у пациентов с хроническими вирусными гепатитами с исходом в цирроз печени, а также у больных туберкулезом легких с туберкулиновой анергией (сниженным пролиферативным ответом Т-клеток на ППД).

Изменения фенотипа ИФН-ДК, как правило, ассоциируются с нарушениями функциональной (цитокин-секреторной и Th1/Th2-стимуляторной) активности ИФН-ДК, которые в зависимости от вида патологии имеют различную степень выраженности – от выраженных дисфункций до их минимальных проявлений или отсутствия таковых.

В целом, полученные данные четко свидетельствуют, что у отдельных групп больных (например, у пациентов с хроническими вирусными гепатитами с исходом в цирроз; туберкулезом легких с туберкулиновой анергией; злокачественными лимфомами) проведение клеточной

иммунотерапии с использованием ДК-вакцин должно предусматривать поиск путей коррекции возможных дисфункций генерируемых ДК, а также возможность комбинации с адьювантной цитокинотерапией (например, с использованием препаратов рекомбинантного ИЛ-2 и/или ИФН- α), которая позволит активировать *in vivo* дополнительное количество ДК и цитотоксических Т-лимфоцитов. В то же время, у больных злокачественными глиомами, множественной миеломой, хроническими вирусными гепатитами (не осложненными развитием цирроза печени), туберкулезом легких (с сохраненным антиген-специфическим ответом на ППД) генерируемые *in vitro* ИФН-ДК в целом сохраняют свою функциональную активность (в частности, способность активировать эффективный Th1 ответ), что обосновывает принципиальную возможность их клинической апробации в качестве индивидуальных лечебных вакцин.

Изменение свойств генерируемых *in vitro* ДК при патологии обуславливают необходимость разработки новых подходов для целенаправленной коррекции нарушенных функций ДК с целью их последующего более эффективного использования в качестве аутологичных лечебных вакцин.

Поэтому целью четвертого этапа работы явилось исследование влияния различных биоактивных медиаторов на созревание и функциональную активность ДК, генерируемых в присутствии ИФН- α . Предполагалось решить следующие задачи: 1) изучить влияние различных биоактивных продуктов на созревание ИФН-ДК *in vitro*; 2) изучить влияние различных биоактивных продуктов на функциональную активность ИФН-ДК *in vitro*; 3) исследовать влияние препарата двуцепочечной геномной ДНК человека (Панаген) на созревание и функции ИФН-ДК *in vitro*; 4) исследовать влияние препарата двухцепочечной геномной ДНК человека на количество и соотношение различных типов ДК у больных с онкопатологией, участвующих в исследованиях препарата Панаген на II фазе клинических испытаний.

Проведенные исследования продемонстрировали, что иммуномодулирующие препараты («Полиоксидоний», «Суперлимф»), препарат двуцепочечной ДНК человека («Панаген»), а также гормон ДГЭАС характеризуются выраженным стимулирующим эффектом на процесс дифференцировки/созревания ИФН-ДК. Так, например, Панаген по своему стимулирующему действию на ДК был сопоставим с «классическим» дозревающим стимулом – липополисахаридом стенки бактерий (ЛПС). В свою очередь, стимулирующий эффект ДГЭАС проявлялся не только в отношении ДК здоровых доноров, но и в модели «толерогенных» ДК, полученных от женщин с физиологической беременностью.

Показано, что стимулирующий эффект ДГЭАС на созревание ИФН-ДК во многом обусловлен усилением эндогенной продукции ФНО α – цитокина, который является одним из мощных «созревающих» стимулов для ДК.

При исследовании влияния биоактивных препаратов на функциональные свойства ДК, полученных от больных с онкопатологией (злокачественные опухоли головного мозга и лимфомы) и туберкулезом легких, была показана принципиальная возможность восстановления сниженной функциональной активности ДК у больных с тяжелыми онкологическими и инфекционными заболеваниями с помощью различных биоактивных препаратов («Полиоксидоний», «Суперлимф», «Ронколейкин», «Панаген»), добавление которых на этапе конечного созревания ДК позволяет значительно повысить аллостимуляторную и цитотоксическую активность генерируемых *in vitro* ИФН-ДК.

Получены также новые данные, которые могут являться доказательством противоопухолевого действия препарата Панаген при его использовании в сочетании с цитостатиками (циклофосфан и доксорубицин) в клиническом применении при лечении рака молочной железы II-IV стадии.

Основная часть

1 Литературный обзор

Дендритные клетки (ДК) являются высокоспециализированными антиген-презентирующими клетками, способными индуцировать иммунный ответ против различных антигенов, включая опухолевые и вирусные антигены [1]. ДК играют центральную роль в поддержании врожденного иммунитета и обеспечивают взаимосвязь между врожденным и приобретенным иммунитетом благодаря способности инициировать антигенспецифический иммунный ответ и детерминировать его направленность. ДК обладают уникальной способностью активировать как CD4, так и CD8-клетки. При этом стимулирующий эффект ДК в 10-100 превышает стимулирующее действие макрофагов и других антиген-презентирующих клеток в силу более высокого уровня экспрессии костимуляторных молекул, медленной внутриклеточной деградации антигена и длительной презентации антигена на поверхности клеток. Кроме того, ДК являются единственными антигенпрезентирующими клетками, которые способны активировать наивные Т-клетки [2, 3].

Наряду со способностью к индукции иммунного ответа, ДК могут также ингибировать иммунные реакции, вызывая развитие состояние иммунологической толерантности. Толерогенные свойства ДК обусловлены различными механизмами – снижением экспрессии HLA-DR и костимуляторных молекул, необходимых для эффективной активации Т-клеток и усилением экспрессии поверхностных коингибиторных молекул и рецепторов (B7-H1, ILT-2, ILT-3, ILT-4, CD209, CD200R и HLA-G), индуцирующих апоптоз или анергию Т-клеток; усилением продукции супрессивных цитокинов (ИЛ-10, TGF- β), ингибирующих функции эффекторных Т-клеток и селективно активирующих Th2-ответ [4, 5], а также способностью ДК к генерации регуляторных CD4+CD25+ Т-клеток [6]. Наличие толерогенной активности ДК в большей степени свойственно незрелым ДК и может индуцироваться рядом факторов –

иммуносупрессивными цитокинами, простагландином E2, гистамином, витамином D3, молекулой HLA-G, а также глюкокортикоидами [7-10].

Недавние исследования также показали, что ДК могут подавлять пролиферацию и оказывать непосредственный цитотоксический эффект на клетки опухолевых линий [11, 12]. Противоопухолевая активность ДК опосредуется с участием различных молекул семейства фактора некроза опухоли-альфа (ФНО α , lymphotoxin- α 1 β 2, FasL, TRAIL), а также перфорина и/или гранзима [12, 13] и имеет, по-видимому, большое значение, поскольку высвобождающиеся опухолевые антигены могут сразу же презентироваться дендритными клетками Т-лимфоцитам, обеспечивая более ранний запуск специфического иммунного ответа. При этом, вовлечение различных молекулярных механизмов позволяет ДК преодолеть «резистентность» опухолевых клеток к лизису.

Таким образом, степень зрелости (незрелые, частично-зрелые, зрелые ДК) и особенности микроокружения/генерации ДК во многом детерминируют их функциональную гетерогенность в широком диапазоне эффектов: от преобладающей иммуностимулирующей активности до выраженной иммуносупрессорной, толерогенной активности.

Согласно данным литературы дифференцировка и созревание ДК, а также их функциональная активность подвержена регуляции со стороны различных цитокинов. Известно также, что созревание и функционирование ДК может регулироваться различными гормонами. Свойства ДК через toll-подобные рецепторы могут существенно регулироваться антигенами, входящими в состав инфекционных патогенов (бактерий, вирусов, грибов). Наконец, многие иммуносупрессивные препараты способны индуцировать толерогенную активность ДК. Поэтому при патологии в силу изменения цитокинового баланса, гормональных нарушений, терапевтических воздействий и влияния патогенов свойства ДК могут быть существенно изменены.

Действительно, различные нарушения в количественном содержании и/или функциональной активности ДК были выявлены при хронических вирусных и бактериальных инфекциях, онкопатологии, патологии беременности [14-17]. Так, рядом исследований было показано, что опухолевый процесс и хронические инфекционные заболевания сопровождаются снижением количества миелоидных ДК и угнетением их стимуляторной активности, что рассматривается в качестве одного из возможных механизмов персистенции инфекции и ускользания опухоли от иммунного надзора [18-22].

С другой стороны имеются данные, что при физиологической беременности ДК приобретают толерогенные свойства, а снижение этой активности ассоциируется с угрозой преждевременного прерывания беременности [23-26].

Нарушение функциональной активности генерируемых *in vitro* ДК может быть также обусловлено изменением функциональной активности моноцитов периферической крови, которые являются источником получения ДК [27, 28].

Так, результаты исследований, выполненных на 3 этапе работы, показали, что ИФН-ДК, генерируемые у пациентов с онкопатологией и инфекционными заболеваниями, характеризуются задержкой дифференцировки/созревания, что проявляется увеличением клеток с фенотипом моноцитов (CD14+) и ДК промежуточной степени зрелости (CD1a, CD83+CD1a+, CD11+CD123+), а с другой стороны – снижением доли клеток, экспрессирующих молекулы зрелых и активированных ДК (CD83+, CD83+CD1a–, CD25+). Среди больных с онкопатологией эти признаки были наиболее выражены в группе больных со злокачественными лимфомами, в меньшей степени – в группе пациентов со злокачественными глиомами и минимальны – у больных с множественной миеломой. Среди больных с инфекционными заболеваниями наиболее выраженные нарушения дифференцировки/созревания ДК регистрировались у пациентов с

хроническими вирусными гепатитами с исходом в цирроз печени, а также у больных туберкулезом легких с туберкулиновой анергией (сниженным пролиферативным ответом Т-клеток на ППД) [29-34].

Изменения фенотипа ИФН-ДК, как правило, ассоциируются с нарушениями функциональной (цитокин-секреторной и Th1/Th2-стимуляторной) активности ИФН-ДК, которые в зависимости от вида патологии имеют различную степень выраженности – от выраженных дисфункций до их минимальных проявлений или отсутствия таковых. Кроме того, у больных с онкопатологией нами была выявлена дефектность эффекторной (цитотоксической) функции ДК против опухолевых клеток [35, 36].

В целом, полученные нами ранее данные четко свидетельствуют, что у отдельных групп больных (например, у пациентов с хроническими вирусными гепатитами с исходом в цирроз; туберкулезом легких с туберкулиновой анергией; злокачественными лимфомами) проведение клеточной иммунотерапии с использованием ДК-вакцин должно предусматривать предварительную оценку их функциональных свойств, поиск путей коррекции возможных дисфункций генерируемых ДК, а также возможность комбинации с адьювантной цитокинотерапией (например, с использованием препаратов рекомбинантного ИЛ-2 и/или ИФН- α), которая позволит активировать *in vivo* дополнительное количество ДК и цитотоксических Т-лимфоцитов.

Недавние исследования также продемонстрировали, что ДК экспрессируют рецепторы к гормонам и подвержены гормональной регуляции [37, 38]. Так Canning с соавт. проанализировали эффект гормона коры надпочечников дегидроэпиандростерона сульфата (ДГЭАС) на генерацию миелоидных ДК, генерируемых при культивировании моноцитов периферической крови в присутствии ГМ-КСФ и ИЛ-4. Добавление ДГЭАС приводило к образованию ДК, характеризующихся более зрелым фенотипом, что проявлялось в увеличении экспрессии костимуляторных молекул CD80 и

снижении экспрессии молекул адгезии CD43 по сравнению с культурами ДК, генерируемых в отсутствие гормона [39]. Таким образом, ДГЭАС обладает способностью стимулировать созревание ДК, что опосредует стимулирующий эффект гормона на дифференцировку наивных Th0 клеток в сторону Th1 и активацию NK-клеток. Данный эффект ДГЭАС, по-видимому, лежит в основе ослабления толерогенных свойств ДК у беременных с гиперандрогенией надпочечникового генеза, являясь неблагоприятным для нормального протекания беременности [40, 26], однако может представлять интерес в качестве стратегии преодоления толерогенных свойств ДК при другой патологии.

Изменение свойств генерируемых ДК при патологии, а с другой стороны данные об участии ряда биоактивных медиаторов в регуляции дифференцировки/созревания ДК обуславливают необходимость разработки стратегий для целенаправленной коррекции функций ДК при использовании их в качестве вакцин. Поэтому настоящий раздел работы был посвящен исследованию влияния различных биоактивных продуктов на созревание и функциональную активность дендритных клеток, генерируемых в присутствии ИФН- α .

2 Материалы и методы

В исследование были включены 14 больных злокачественными лимфомами (6 мужчин и 8 женщин) в возрасте от 20 до 58 лет (средний возраст 37 ± 2 лет), 28 больных туберкулезом легких (средний возраст $48,3 \pm 3,6$ лет), 8 пациентов со злокачественными глиомами головного мозга Grade IV (средний возраст $39,4 \pm 2,8$ лет) и 24 сопоставимых по возрасту и полу здоровых донора крови.

Мононуклеарные клетки (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, 1000 Ед/мл) и INF- α (Роферон-А, Roche, Швейцария, 1000 Ед/мл) с последующим созреванием с липополисахаридом (ЛПС E.colli 0114:B4, Sigma-Aldrich, 10 мкг/мл) в течение 24 ч.

Фенотипический анализ ДК проводили методом проточной цитофлюориметрии (FACSCalibur, Becton Dickinson, США) с использованием FITS- или PE-меченных моноклональных антител (CD83, CD14, CD25; PharMingen, США).

Аллостимуляторную активность ДК оценивали в реакции СКЛ. В качестве отвечающих клеток использовали МНК доноров, истощенных от фракции адгезивных ($0,1 \times 10^6$ /лунку), которые культивировали (37°C , 5% CO_2) в 96-луночных круглодонных планшетах в среде RPMI-1640 с 10% инактивированной сыворотки доноров АВ (IV) группы. Стимуляторами служили дендритные клетки в соотношении МНК:ДК = 10:1. Пролиферативный ответ оценивали на 5 сутки радиометрически по включению ^3H -тимидина (1 мкКю/лунку), вносимого за 18 ч до окончания культивирования.

Для оценки цитотоксической активности ДК проводили МТТ-тест, заключающийся в способности живых клеток превращать растворимый желтый бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-или-2,5-тетразолия) (МТТ) в нерастворимые пурпурно-синие внутриклеточные кристаллы МТТ-формаза. Опухолевые клетки (5×10^4 /лунку) культивировали с ЛПС-активированными ИФН-ДК в 96-луночных плоскодонных планшетах в течение 24 ч в соотношении эффекторы/мишени 1:1. После окончания совместной инкубации в лунки вносили по 20 мкл раствора МТТ (5 мг/мл, Диа М, Германия), а затем через 3 ч планшеты центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 мин, удаляли супернатант и добавляли по 100 мкл ДМСО (диметилсульфоксид, MP Voimedicals, LLC, Франция). Через 30 мин после

полного растворения кристаллов формазана измеряли оптическую плотность содержимого лунок на многоканальном спектрофотометре Мультискан при длине волны 492 нм. Расчет цитотоксической активности проводили по стандартной формуле: $(\%) = [1 - (\text{ОП}_{\text{э+м}} - \text{ОП}_{\text{э}}) / \text{ОП}_{\text{м}}] \times 100\%$, где $\text{ОП}_{\text{э+м}}$ – значение оптической плотности в опытных сериях; $\text{ОП}_{\text{э}}$ – значение оптической плотности в лунках с эффекторами; $\text{ОП}_{\text{м}}$ – значение оптической плотности в лунках с мишенями.

Оценку количественного содержания циркулирующих ДК в периферической крови проводили с использованием 4-цветной проточной цитофлуориметрии (FACS Calibur, Becton Dickinson) из 0,5 мл клеток лейкоцезвеси. 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.

Статистическую обработку полученных результатов проводили на персональном компьютере с использованием программы «STATISTICA 6.0».

3 Результаты и обсуждение

3.1 Исследование влияния различных биоактивных продуктов (цитокины, ингибиторы ПГЕ₂, и др.) на созревание ИФН-ДК *in vitro*

Согласно данным литературы дегидроэпиандростерон и его сульфатированная форма (ДГЭАС) по своим биологическим свойствам является естественным антагонистом глюкокортикоидов. Концентрация ДГЭАС в периферической крови существенно превышает уровень других стероидных гормонов, что предполагает активное участие гормона в регуляции иммунной системы и, в частности в регуляции ДК, которые экспрессируют рецепторы к стероидным гормонам [41].

Для изучения эффекта ДГЭАС на дифференцировку ДК гормон (Sigma-Aldrich, кат. № D5297) в конечной концентрации 10^{-6} М добавляли с первых

суток культивирования прилипающей фракции МНК. Для оценки влияния гормона на созревание ДК, ДГЭАС вносили на стадии конечного дозревания совместно с ЛПС за 24 ч до окончания культивирования.

Добавление ДГЭАС с первых суток культивирования (таблица 1) сопровождалось достоверным снижением относительного количества CD14+ моноцитов и увеличением доли клеток, экспрессирующих костимуляторные молекулы CD80 и CD86, что свидетельствует о стимулирующем действии ДГЭАС на дифференцировку ИНФ-ДК.

Добавление ДГЭАС на стадии дозревания также приводило к уменьшению доли CD14+ клеток и достоверному увеличению CD86+ клеток. Кроме того, наблюдалось значимый прирост числа клеток с маркером зрелых ДК (CD83+) и тенденция к увеличению доли активированных CD25+ клеток.

Как на этапе дифференцировки, так и на этапе созревания ДК снижение относительного содержания CD14+ клеток в присутствии ДГЭАС ассоциировалось с тенденцией к увеличению CD1a⁺ клеток, что свидетельствовало о дифференцировке дополнительного количества моноцитов в незрелые CD1a+ ДК. При этом ДГЭАС не оказывал какого-либо влияния на экспрессию молекулы CD123, характерной для плазмацитоидных дендритных клеток. Выявленные изменения в экспрессии стадио-специфических и костимуляторных молекул на ДК под влиянием ДГЭАС свидетельствует о стимулирующем влиянии гормона на дифференцировку и созревание ИНФ-ДК, причем не только на этапе дифференцировки, но и созревания ДК.

Таблица 1 – Влияние ДГЭАС на дифференцировку и созревание ИНФ-ДК здоровых доноров.

	В отсутствии ЛПС		В присутствии ЛПС	
	ДГЭАС (-)	ДГЭАС (+)	ДГЭАС (-)	ДГЭАС (+)
CD14	14,1±4,6	10,3±2,9*	14,1±2,1	10,4±2,7
CD1a	39,9±6,3	42,7±6,5	39,1±5,4	44,1±5,5
CD83	14,3±3,3	19,2±5,2	17,0±3,0	25,6±6,4*
CD123	40,4±9,1	43,1±9,3	60,6±6,0	61,9±6,4

CD86	42,1±5,94	49,1±6,8*	72,8±3,0	84,1±1,42*
CD80	59,4±10	75,6±7,2*	64,4±6,6	73,2±9,4
CD25	13,2±2,1	18,7±3,8	33,9±5,1	39,5±6,0
CD11c	18,9±3,1	19,9±3,0	18,6±2,8	19,9±3,0

Примечание: данные (n=13) представлены в виде процентного содержания клеток (M±S.E.), экспрессирующих соответствующий маркер. * $P_U < 0,05$ – достоверность различий по сравнению с ДК, полученными в отсутствие ДГЭАС (U – критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Важно отметить, что стимулирующий эффект ДГЭАС проявлялся не только в культурах ДК здоровых доноров, но и культурах ДК, характеризующихся признаками задержки созревания, в частности, полученных от женщин с физиологической беременностью (модель толерогенных ДК). В этом случае добавление ДГЭАС с первых суток культивирования достоверно не влияло на количество ДК, экспрессирующих исследуемые маркеры (таблица 2). В то же время, при добавлении ДГЭАС совместно с ЛПС (за 24 ч до окончания культивирования) регистрировалось статистически достоверное возрастание доли CD1a+, CD83+ и CD25+ ДК.

Таблица 2 – Влияние дегидроэпиандростерона сульфата на дифференцировку и созревание ИФН-ДК у женщин с физиологической беременностью.

	В отсутствие ДГЭАС (n=10)	В присутствии ДГЭАС (10^{-6} М)	
		В течение всего периода генерации ДК (n=10)	На стадии дозревания ДК (n=10)
CD83	17,0±2,4	17,5±2,8	21,5±3,1**
CD1a	4,1±0,3	4,9±0,7	6,3±0,8*
CD11c	18,4±2,8	19,6±3,0	19,3±3,0
CD123	21,6±3,4	23,0±3,8	21,5±4,1
CD14	14,3±2,2	12,8±1,9	14,4±2,2
CD25	8,8±2,2	9,4±1,6	12,0±2,1*

Примечание: данные представлены в виде процентного содержания клеток (M±S.E.), экспрессирующих соответствующий маркер. * $P_U < 0,05$, ** $P_U < 0,01$ – достоверность различий по сравнению с ДК, полученными в стандартных условиях (U – критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Увеличение количества CD83+ и CD25+ ДК при добавлении гормона совместно с ЛПС свидетельствовало о стимулирующем действии ДГЭАС на

созревание ДК. Кроме того, прирост количества незрелых ДК (CD1a+) в ДГЭАС-модифицированных культурах указывал на стимулирующий эффект гормона на дифференцировку ДК. В то же время ДГЭАС не оказывал какого-либо влияния на экспрессию молекулы CD123, характерную для плазматоидных дендритных клеток. Таким образом, ДГЭАС оказывал стимулирующий эффект не только на созревание/активацию ДК здоровых доноров, но и ДК женщин с физиологической беременностью, характеризующиеся признаками задержки дифференцировки/созревания.

Сравнение концентрации цитокинов в культуральных супернатантах интактных и ЛПС активированных ДК показало (таблица 3), что интактные (т.е. не стимулированные ЛПС) ИНФ-ДК характеризуются достаточно высоким уровнем продукции ИФН- γ и ФНО α , умеренной секрецией ИЛ-2 и практически не продуцируют ИЛ-12(p70). Созревание ДК в присутствии ЛПС сопровождается 5-, 4- и 2-кратным усилением продукции ИФН- γ , ФНО α и ИЛ-2, соответственно, а также появлением в супернатантах ИЛ-12(p70).

Таблица 3 – Влияние ДГЭАС на продукцию Th1/про- и Th2/противовоспалительных цитокинов на этапе дифференцировки и созревания ИНФ-ДК.

Цитокины (пг/мл)		В отсутствии ЛПС		В присутствии ЛПС	
		ДГЭАС (-)	ДГЭАС (+)	ДГЭАС (-)	ДГЭАС (+)
Th1/про- воспалительные	ИФН- γ	164 \pm 105 (38,8)	316 \pm 177 * (84,5)	830 \pm 197 (836)	910 \pm 137 (828)
	ИЛ-2	19,7 \pm 3,9 (15,2)	18,9 \pm 4,9 (14,0)	38,3 \pm 4,1 (36,8)	40 \pm 3,9 (39,7)
	ИЛ-12p70	0,5 \pm 0,3 (0,2)	3,3 \pm 2,2 (0,8)	10,2 \pm 3,8 (6,5)	37 \pm 22,7 (8,0)
	ФНО α	123 \pm 87 (43,7)	143 \pm 80 (49,3)	627 \pm 218 (282)	2311 \pm 657 * (1669)
Th2/противо- воспалительные	ИЛ-4	53,3 \pm 14,8 (41,5)	65,1 \pm 14,6 (45,1)	204 \pm 40,3 (210)	214 \pm 29 (187)
	ИЛ-5	1,2 \pm 0,4 (0,7)	1,2 \pm 0,3 (0,9)	1,6 \pm 0,2 (1,4)	1,8 \pm 0,5 (1,7)
	ИЛ-13	22,4 \pm 7,2 (41,5)	20,0 \pm 5,5 (18,5)	37,0 \pm 5,1 (39,6)	34,5 \pm 4,7 (30,0)
	ИЛ-10	11,9 \pm 3,0 (11,5)	13,5 \pm 4,0 (10,4)	94,0 \pm 46,6 (57,3)	113 \pm 55 (68)

Примечание: данные (n=10) представлены в виде M±SE (медиана); ДГЭАС в концентрации 10⁻⁶ М добавляли в культуру ДК на начальной стадии (влияние на дифференцировку) и совместно с ЛПС (влияние на созревание). * PU<0,05 – достоверность различий по сравнению с ДК, полученными в отсутствие ДГЭАС (U – критерий Вилкоксона-Манна-Уитни в сопряженных парах).

Анализ продукции Th2/противовоспалительных цитокинов показал, что ИНФ-ДК секретировали в умеренных количествах ИЛ-4, ИЛ-13 и ИЛ-10 (но не ИЛ-5), уровень которых (особенно ИЛ-4 и ИЛ-10) значительно возрастал по мере созревания ДК в присутствии ЛПС. Добавление ДГЭАС на этапе дифференцировки приводило к достоверному приросту продукции ИФН-γ, уровень которого, тем не менее, был ниже, чем при стимуляции ЛПС.

В свою очередь, эффект ДГЭАС на этапе созревания ДК (добавление гормона совместно с ЛПС за 24 ч до окончания культивирования) проявлялся 4-кратным усилением продукции ФНОα. При этом ДГЭАС не оказывал заметного влияния на продукцию Th2/противовоспалительных цитокинов ни на этапе дифференцировки, ни на этапе созревания ИФН-ДК.

Поскольку ФНОα является фактором дифференцировки дендритных клеток, можно полагать, что эффект ДГЭАС на созревание ДК связан с усилением продукции ФНОα, который через аутокринные механизмы стимулирует конечную дифференцировку/созревание ИФН-ДК.

В свою очередь, усиление продукции ИФН-γ может детерминировать преимущественную стимуляцию Th1 при взаимодействии ДК с Т-лимфоцитами и активацию НК-клеток. Проведенные исследования также свидетельствуют о том, что наряду с изменением цитокинпродуцирующей функции ДК стимулирующий эффект ДГЭАС может быть обусловлен усилением экспрессии ко-стимуляторных молекул (CD80 и CD86) на ДК, во многом определяющих эффективность взаимодействия с Т-клетками.

Таким образом, обработка ДК в культуре *in vitro* ДГЭАС стимулирует дифференцировку и созревание ДК доноров и может быть использована для ослабления толерогенной активности ДК при патологии.

В отдельной серии экспериментов также исследовали влияния иммуноактивных медиаторов на созревание ИФН-ДК *in vitro*. В качестве иммуноактивных медиаторов использовали отечественные фармакопейные иммуномодулирующие препараты: «Полиоксидоний» – сополимер N-окси-1,4-этиленпиперазина и (N-карбоксиитил)-1,4-этиленпиперазиний бромида, и «Суперлимф», который представляет собой комплекс нативных провоспалительных цитокинов.

Исследуемые иммуноактивные препараты добавляли в культуру ДК на стадии дозревания за 24 ч до окончания культивирования. В таблице 4 приведены данные о стимулирующем влиянии данных препаратов на созревание ДК.

Таблица 4 – Влияние иммуноактивных факторов на созревание ИФН-ДК.

	ДК (0)	ДК + Полиоксидоний (5мкг/мл)	ДК + Суперлимф (20нг/мл)
CD14	26,6±2,4	18,3±1,8*	24,0±3,6
CD83	19,0±4,7	32,7±4,7*	28,5±6,2*
CD86	53,1±4,6	59,7±5,4	49,3±6,8
HLA-DR	70,5±4,4	90,7±3,7*	87,9±3,4*

Примечание: данные (n=9) представлены в виде процентного содержания клеток (M±S.E.), экспрессирующих соответствующий маркер. * $P_U < 0,05$ – достоверность различий по сравнению с ДК (0) (U – критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Добавление препарата Полиоксидоний на стадии дозревания приводило к уменьшению доли CD14+ клеток, достоверному увеличению числа зрелых CD83+ клеток и увеличению относительного содержания HLA-DR-позитивных клеток, что в целом свидетельствовало о стимулирующем влиянии препарата на созревание ИФН-ДК.

Комплекс нативных цитокинов, содержащихся в препарате Суперлимф, в целом обладал схожим действием за исключением отсутствия влияния на экспрессию CD14, что свидетельствовало о менее выраженном стимулирующем действии этого препарата на дифференцировку ДК.

3.2 Исследование влияния различных биоактивных продуктов (цитокины, ингибиторы ПГЕ2, и др.) на функциональную активность ИФН-ДК *in vitro*

Обнаруженные нами ранее изменения фенотипа и функций ИФН-ДК при онкологических и инфекционных заболеваниях [29-34] свидетельствуют, что эффективность применения таких ДК в качестве вакцин может быть существенно снижена.

В этой связи возникает необходимость коррекции *in vitro* функциональной активности ДК больных с патологией. Поскольку фенотипические характеристики ИФН-ДК, отражающие эффективность и/или завершенность этапов дифференцировки/созревания ДК, корректировались с помощью добавления в культуры биоактивных препаратов, мы также исследовали эффект исследуемых медиаторов на функциональную активность ИФН-ДК.

Одним из интегральных показателей функциональной активности ДК является их способность к стимуляции пролиферативного ответа аллогенных Т-лимфоцитов в СКЛ, поскольку аллостимуляторная активность ДК ассоциирована со степенью зрелости ДК, спектром и уровнем продуцируемых ими цитокинов, а также способностью ДК активировать Th1/Th2 ответ и индуцировать генерацию Т-регуляторных лимфоцитов. Соответственно, оценка аллостимуляторной активности может представлять удобный скрининговый метод для выявления дисфункций ДК и оценки иммунокорректирующего эффекта различных факторов.

С целью изучения возможности коррекции функциональной активности ДК было проанализировано влияние ряда иммуноактивных факторов на аллостимуляторную активность ДК, полученных от больных злокачественными лимфомами и туберкулезом легких. В качестве потенциальных модуляторов были выбраны препарат рекомбинантного интерлейкина-2 человека («Ронколейкин»), сополимер N-окси-1,4-этиленпиперазина и (N-карбоксиэтил)-1,4-этиленпиперазиний бромида

(«Полиоксидоний»), и комплекс провоспалительных цитокинов («Суперлимф»).

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 ЛПС) анализируемыми иммуноактивными факторами сопровождалась статистически значимым усилением исходно сниженной аллостимуляторной активности в СКЛ (таблица 5).

Таблица 5 – Влияние биоактивных продуктов на аллостимуляторную активность ИФН-ДК больных злокачественными лимфомами в СКЛ.

		Пролиферативная активность в СКЛ (имп/мин)	Индекс влияния
ДК (0)	M±SE Mediana LQ-UQ	3178±325 2726 2115-2820	-
ДК + рИЛ-2 (100 Ед/мл)	M±SE Mediana LQ-UQ	12211±977* 11879 10200-15889	4,6±0,52 4,37 3,78-5,05
ДК + Полиоксидоний (5 мкг/мл)	M±SE Mediana LQ-UQ	5771±472* 5485 3800-6093	2,0±0,2 2,07 1,15-2,57
ДК + Суперлимф (20 нг/мл)	M±SE Mediana LQ-UQ	5014±361* 4800 4200-5100	1,9±0,2 1,85 1,08-2,27

Примечание: представлены средние значения (M±SE), медианы и диапазоны 25-75% квартильных значений (LQ–UQ) пролиферативной активности в СКЛ. Респондеры – аллогенные МНК, стимуляторы – интактные ДК(0) и предобработанные стимулирующими факторами ДК, на этапе созревания с ЛПС в соотношении 10:1, Индекс влияния – отношение культур ДК в присутствии стимулов к ДК (0), * $P_U < 0,05$ – достоверность различий показателей по отношению к культурам ДК (0).

При этом наиболее выраженным стимулирующим эффектом характеризовался рИЛ-2 (в дозе 100 Ед/мл). Другие факторы (Полиоксидоний, комплекс провоспалительных цитокинов) проявляли менее выраженный, но статистически достоверный стимулирующий эффект на восстановление аллостимуляторной активности.

Исследование влияния анализируемых иммуноактивных факторов на

аллостимуляторную активность ДК больных туберкулезом легких показало (таблица 6), что рИЛ-2 (в дозе 100 Ед/мл) и Полиоксидоний (в дозе 5 мкг/мл) также достоверно усиливали аллостимуляторную активность ДК больных туберкулезом при добавлении их в культуру совместно с созревающим стимулом.

Таблица 6 – Влияние биоактивных продуктов на аллостимуляторную активность ИФН-ДК больных туберкулезом в СКЛ.

		Пролиферативная активность в СКЛ (имп/мин)	Индекс влияния
ДК (0)	M±SE Mediana LQ-UQ	5331±638 3964 2937-7165	-
ДК + рИЛ-2 (100ЕД/мл)	M±SE Mediana LQ-UQ	10562± 2491 * 9234 4633-15488	2,8±0,5 2,54 2,2-3,14
ДК + Полиоксидоний (5 мкг/мл)	M±SE Mediana LQ-UQ	6281±798* 5390 3579-8933	1,9±0,2 2,1 1,5-2,12

Примечание: представлены средние значения (M±SE), медианы и диапазоны 25-75% квартильных значений (LQ–UQ) пролиферативной активности в СКЛ. Респондеры – аллогенные МНК, стимуляторы – интактные ДК (0) и предобработанные стимулирующими факторами ДК, на этапе созревания с ЛПС в соотношении 10:1, n=28. Индекс влияния – отношение культур ДК в присутствии стимулов к ДК (0), * $P_U < 0,05$ – достоверность различий показателей по отношению к культурам ДК (0) без добавления корригирующих факторов (U – критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Таким образом, полученные результаты демонстрируют, что у больных со сниженной аллостимуляторной активностью ДК (больные злокачественными лимфомами и туберкулезом) добавление рИЛ-2, полиоксидония, комплекса цитокинов с провоспалительной активностью обладает стимулирующим эффектом и усиливает аллостимуляторную активность ДК в СКЛ. При этом ДК больных злокачественными лимфомами и туберкулезом различались по чувствительности к стимулирующему влиянию анализируемых иммуноактивных препаратов. Так, ДК больных туберкулезом отличались меньшей чувствительностью к корригирующему действию рИЛ-2. Индекс влияния рИЛ-2 у больных туберкулезом был в 2

раза меньше соответствующего показателя у больных злокачественными лимфомами ($2,8 \pm 0,5$ против $4,6 \pm 0,5$).

Наряду с аллостимуляторной активностью важным свойством ДК, особенно в аспекте их использовании в качестве противоопухолевых вакцин является прямая противоопухолевая цитотоксическая активность. Выявленный нами дефект указанной функции у больных с глиомами головного мозга высокой степени злокачественности [42] и пациентов злокачественными лимфомами побудило исследовать возможность стимуляции цитотоксической активности ДК *in vitro* с помощью иммуноактивных медиаторов.

Для этого был проведен анализ влияния рекомбинантного ИЛ-2, полиоксидония и двуцепочечной ДНК человека (препарата «Панаген») на цитотоксическую активность ИФН-ДК больных злокачественными опухолями головного мозга и злокачественными лимфомами.

Цитотоксическую активность ДК оценивали против клеток опухолевых линий Нер-2 и Jurkat в МТТ-тесте. Для этого клетки опухолевых линий Нер-2 и Jurkat культивировали с интактными ДК или ДК, предобработанными иммуноактивными факторами на этапе их созревания. Обработка ДК больных злокачественными опухолями головного мозга ИЛ-2, двуцепочечной экзогенной ДНК человека и полиоксидонием усиливала исходно низкий уровень цитотоксической активности ДК против клеток Нер-2 практически у всех больных.

Сравнение средних показателей цитотоксичности интактных и модифицированных ДК и индексов влияния анализируемых биоактивных продуктов на цитотоксическую активность ДК больных злокачественными опухолями головного мозга в культурах TRAIL-резистентных опухолевых клеток Нер2 показало (таблица 7), что наиболее выраженным стимулирующим эффектом обладали интерлейкин-2 и полиоксидоний. Усиление цитотоксической активности ИФН-ДК у больных злокачественными опухолями головного мозга при добавлении

двучепочечной ДНК (препарата «Панаген») было достоверным, но менее выраженным.

Таблица 7 – Влияние биоактивных продуктов на цитотоксическую активность ИФН-ДК больных злокачественными опухолями головного мозга (Grade IV).

	Линия Нер-2		Линия Jurkat	
	Цитотоксичность (%)	ИВ	Цитотоксичность (%)	ИВ
ДК (0)	8 ± 2,5	-	50 ± 6,5	-
ДК + рИЛ-2 (100 Ед/мл)	27 ± 4,7*	7,5±2,6	61± 4,1*	1,3±0,1
ДК + Панаген (5 мкг/мл)	16 ± 2,9 *	6,1±3,7	56 ± 4,5	1,2±0,1
ДК + Полиоксидоний (5 мкг/мл)	20 ± 4,3*	7,4±4,1	50 ± 9,2	0,9±0,2

Примечание: представлены средние значения (M±SE) цитотоксической активности ДК (%) больных злокачественными опухолями головного мозга (Grade IV) в присутствии различных иммуностимулирующих факторов в МТТ-тесте (соотношение эффекторы:мишени=1:1), n=8. ИВ – индекс влияния – отношение цитотоксичности в присутствии стимулов к ДК (0). * $P_U < 0,05$ – достоверность различий по сравнению с ДК (0) (U – критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

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

Аналогичные эффекты регистрировались при анализе влияния интерлейкина-2, двучепочечной ДНК человека и полиоксидония на цитотоксическую активность ДК больных злокачественными лимфомами (таблица 8).

Таблица 8 – Влияние биоактивных продуктов на цитотоксическую активность ИФН-ДК больных злокачественными лимфомами (n=7).

	Линия Нер-2		Линия Jurkat	
	Цитотоксичность (%)	ИВ	Цитотоксичность (%)	ИВ
ДК (0)	10 ± 4,4	-	29 ± 8,4	-
ДК + рИЛ-2 (100 Ед/мл)	36 ± 5,3*	7,5±4,8	30 ± 4,8	2,1±1,2
ДК + Панаген (5 мкг/мл)	34 ± 4,9*	6,8±4,7	31 ± 3,9	2,3±1,3
ДК + Полиоксидоний (5мкг/мл)	21 ± 2,8*	6,9±5,4	30 ± 3,3	1,8±0,8

Примечание: представлены средние значения (M±SE) цитотоксической активности ДК (%) больных злокачественными лимфомами в присутствии различных иммуностимулирующих факторов в МТТ-тесте (соотношение эффекторы:мишени=1:1). ИВ – индекс влияния – отношение цитотоксичности в присутствии стимулов к ДК (0). * $P_U < 0,05$ – достоверность различий по сравнению с ДК (0) (U – критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Все анализируемые иммуноактивные медиаторы достоверно усиливали исходно низкую цитотоксическую активность ИФН-ДК больных злокачественными лимфомами против клеток Нер-2. При этом двуцепочечная ДНК (Панаген) обладала схожей стимулирующей активностью в сравнении с ИЛ-2 и полиоксидонием. В то же время исследуемые препараты не влияли на исходно сохранную цитотоксическую активность ДК против TRAIL-чувствительных клеток линии Jurkat.

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

патологии и пути повышения эффективности клеточных технологий лечения инфекционных и онкологических заболеваний с использованием аутологичных дендритноклеточных вакцин.

Кроме того, нами была проведена оценка влияния гормонов на функциональную активность ИНФ-ДК. Для этого исследовали эффект гормона ДГЭАС на способность ДК стимулировать пролиферативный ответ в СКЛ. Добавление гормона, как на этапе дифференцировки, так и на этапе созревания ДК характеризовалось умеренным статистически недостоверным усилением аллостимуляторной активности ДК (16930 ± 1190 против 14290 ± 1110 и 19910 ± 1870 против 18780 ± 1190 имп/мин, соответственно, $n=10$).

Влияние ДГЭАС на функциональную активность ИНФ-ДК дополнительно исследовали по эффекту гормона на Th1- и Th2-стимуляторную активность ДК, оценивая относительное содержание ИФН- γ и ИЛ-4-продуцирующих клеток в СКЛ.

Таблица 9 – Влияние интактных и ДГЭАС-модифицированных ДК на содержание CD3+ ИФН- γ + и CD3+ ИЛ-4+ Т-клеток в СКЛ.

% CD3+Т-клеток	0	+ДК _{инт}	ИВ	0	+ДК _{ДГЭАС}	ИВ
ИФН- γ +	3,1 \pm 0,3	17,6 \pm 1,8*	6,2 \pm 0,8	3,1 \pm 0,3	27,9 \pm 3,6* #	10,1 \pm 1,7
ИЛ-4 +	2,0 \pm 0,4	6,7 \pm 1,6 *	3,4 \pm 0,8	2,0 \pm 0,4	6,8 \pm 1,1 *	3,9 \pm 0,4

Примечание: представлено относительное число CD3+ Т-клеток с внутриклеточной экспрессией ИФН- γ и ИЛ-4 в СКЛ в присутствии интактных и ДГЭАС-модифицированных ДК (гормон добавляли на стадии созревания ИФН-ДК). ИВ – индекс влияния ДК на количество Т-клеток, экспрессирующих ИФН- γ и ИЛ-4. * $P_U < 0,05$ – достоверность различий показателей по сравнению с культурами без добавления ДК, # - $P_U < 0,05$ – достоверность различий по сравнению с интактными ДК (U – критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Из данных таблицы 9 видно, что интактные ДК стимулировали увеличение количества CD3+ ИФН- γ + Т-клеток (ИВ=6,2 \pm 0,8) и в меньшей степени влияли на CD3+ ИЛ-4+ Т-клетки (ИВ=3,4 \pm 0,8). Еще больший прирост количества CD3+ ИФН- γ + Т-клеток (до 27,9 \pm 3,6%; ИВ=10,1 \pm 1,7) регистрировался в присутствии ДГЭАС-модифицированных ДК. В то же

время увеличение числа CD3+ ИЛ-4+ Т-клеток в СКЛ, индуцированной как интактными, так и ДГЭАС-модифицированными ДК, было сходным. Таким образом, ДГЭАС достоверно усиливал способность ДК стимулировать Т-клетки к продукции Th1 цитокинов (ИФН- γ), при этом гормон не оказывал значимого влияния на способность ИФН-ДК активировать Т-клетки к продукции Th2-цитокинов (ИЛ-4).

Полученные в целом данные свидетельствуют, что ДГЭАС в физиологических концентрациях оказывает стимулирующее влияние на дифференцировку и созревание ИФН-ДК. Можно полагать, что эффект ДГЭАС на созревание ДК во многом обусловлен усилением эндогенной продукции ФНО α – цитокина, который является одним из мощных «созревающих» стимулов для ДК.

В свою очередь, способность ДГЭАС усиливать экспрессию костимуляторных молекул и продукцию ИФН- γ , объясняет стимулирующий эффект гормона на способность ДК активировать Т-хелперные клетки первого типа (Th1-клетки). Усиление продукции дендритными клетками ИФН- γ может также опосредовать стимулирующий эффект ДГЭАС на НК-клетки. В то же время, неспособность ДГЭАС-модифицированных ДК активировать Т-клетки второго типа (Th2), по-видимому, связано с отсутствием влияния гормона на продукцию дендритными клетками Th2/противовоспалительных цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-13, ИЛ-10).

3.3 Исследование влияния препарата двуцепочечной геномной ДНК человека на созревание и функции ИФН-ДК *in vitro*

Ранее нами было показано, что ИФН-ДК, генерированные из моноцитов крови здоровых доноров, отличаются гетерогенностью, что, очевидно, связано с относительным содержанием в общей популяции незрелых, частично зрелых и зрелых клеток. Эти различия проявляются не только фенотипически, но и проявляются на уровне функциональной/аллостимуляторной активности ДК.

Поскольку дифференцировка моноцитов в ДК связана с потерей CD14 молекул, а созревание незрелых ДК в зрелые клетки – с приобретением маркера терминальной дифференцировки CD83 и маркера активированных клеток CD25, уменьшение доли CD14⁺ в сочетании с увеличением CD83⁺ клеток расценивали как признак созревания ДК. Эффект двуцепочечной геномной ДНК человека (препарата «Панаген» оценивали в сравнении с действием стандартного дозревающего стимула ЛПС (10 мкг/мл; позитивный контроль), а также относительно ДК, культивирование которых осуществлялось в отсутствие стимулирующего фактора (негативный контроль).

В первой серии экспериментов исследовалось влияние различных доз препарата фрагментированной аллогенной двуцепочечной ДНК на созревание ИФН-ДК, генерированных из моноцитов крови здорового донора (рисунок 1).

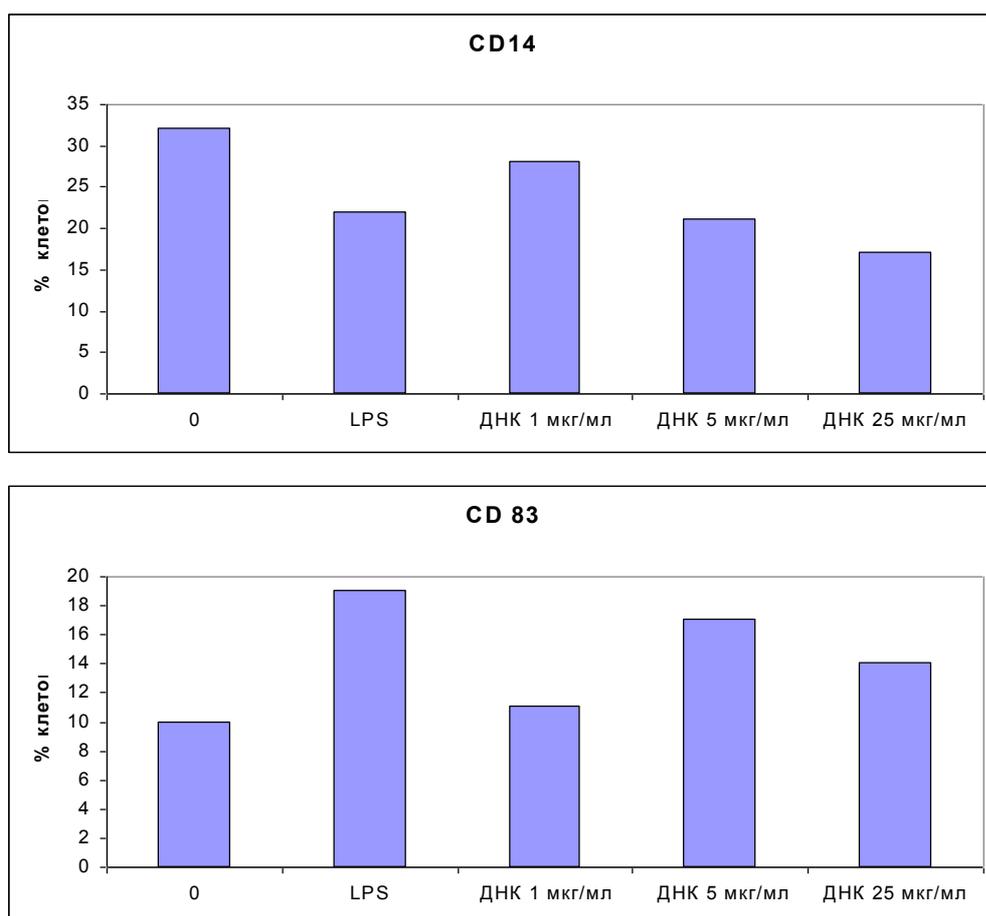


Рисунок 1 – Процентное содержание CD14+ и CD83+ клеток в популяции ИФН-ДК здорового донора, генерированных без дозревающего стимула (0), а также в присутствии ЛПС или препарата ДНК человека в дозе 1, 5 и 25 мкг/мл.

Как показывают результаты исследования, использование в качестве дозревающего стимула двуцепочечной ДНК в дозе 5 мкг/мл сопровождалось снижением доли CD14+ клеток и увеличением относительного содержания CD83+ клеток (рисунок 1). При этом эффект ДНК был сопоставим с эффектом ЛПС.

Во второй серии экспериментов была проведена сравнительная оценка влияния ЛПС и препарата двуцепочечной ДНК человека (5 мкг/мл) на репрезентативной выборке здоровых доноров (n=13) (рисунок 2). Как следует из анализа полученных данных, созревание ДК здоровых доноров эффективно индуцировалось как ЛПС, так и препаратом экзогенной ДНК. Данный эффект проявлялся снижением относительного количества незрелых CD14+ клеток в сочетании с увеличением доли зрелых CD83+ ДК, в том числе экспрессирующих активационный маркер CD25. Большой разброс в процентном содержании клеток объясняется индивидуальными различиями в созревании ДК доноров.

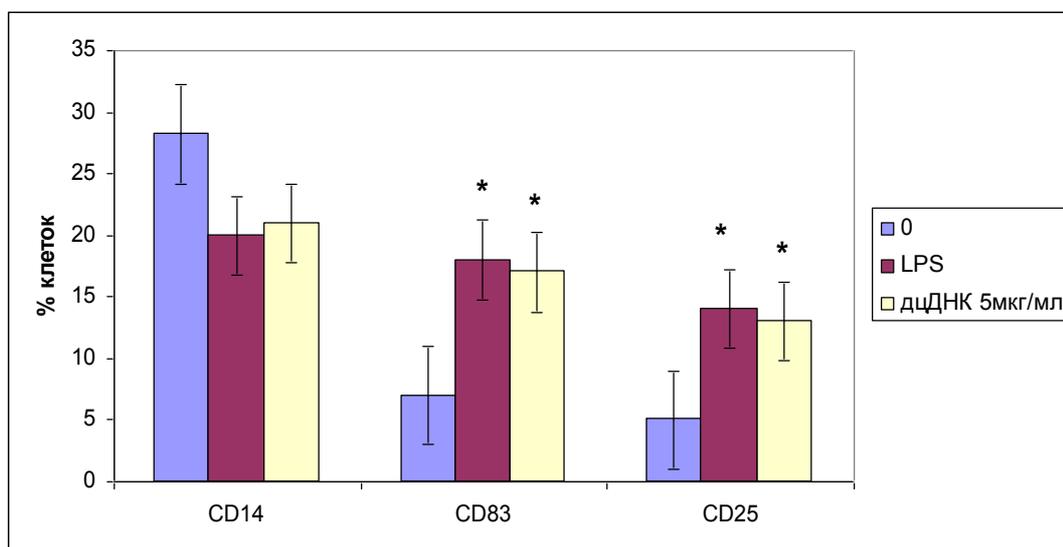


Рисунок 2 – Процентное содержание CD14+, CD83+ и CD25+ клеток среди ИФН-ДК здоровых доноров (n=13), генерированных без дозревающего стимула (0), а также в присутствии ЛПС или препарата двуцепочечной ДНК человека в дозе 5 мкг/мл. * P_U – достоверность различий культур по сравнению с (0), U – критерий Вилкоксона-Манна-Уитни.

Исследование уровня аллостимуляторной активности ДК в СКЛ, является одним из методов оценки антигенпрезентирующей функции ДК. Высокая аллостимуляторная активность ДК свидетельствует о функциональной зрелости и потенциальной способности ДК индуцировать специфический иммунный ответ. Поэтому было исследовано влияние препарата двуцепочечной ДНК на функциональную активность ИФН-ДК в группе больных туберкулезом легких (n=10), где наблюдалась изначально сниженная аллостимуляторная активность.

Таблица 10 – Влияние препарата двуцепочечной ДНК (5мкг/мл) на аллостимуляторную активность ДК больных туберкулезом, культивируемых в различных условиях (n=10).

	0	ЛПС	ДНК
Спонтанная пролиферация МНК доноров (имп/мин)	185 ± 45		
Пролиферативный ответ в СКЛ (имп/мин)	1492 ± 281	4814 ± 96*	5100 ± 1686*
Индекс стимуляции в СКЛ	11,3 ± 2,3	41,0 ± 10,9*	41,6 ± 15,3*

Примечание: данные представлены в виде $M \pm S.E.$; * $P_U < 0,05$ – достоверность различий показателей по сравнению с экспериментами, в которых ДК были культивированы в отсутствие дозревающего стимула (0).

Для этого вместо дозревающего стимула в процессе генерации ДК добавляли препарат двуцепочечной ДНК (5 мкг/мл). Эффект добавления препарата Панаген сравнивали с эффектом добавления ЛПС по способности усиливать аллостимуляторную активность ДК. В этой серии экспериментов было установлено, что препарат двуцепочечной ДНК может быть использован в качестве дозревающего стимула в процессе генерации ДК и

его влияние на усиление аллостимуляторной способности ДК больных туберкулезом сравнимо с влиянием липополисахарида (таблица 10).

Таким образом, приведенные выше данные демонстрируют, что добавление иммуномодулирующих препаратов (например, препарата двуцепочечной ДНК человека) в процессе генерации дендритных клеток больных туберкулезом может влиять на их функциональную активность, а именно усиливать аллостимуляторную активность в СКЛ. Данные эксперименты являются необходимым этапом исследования для последующего использования дендритных клеток в качестве вакцин при лечении пациентов с иммунопатологическими состояниями.

В отдельной серии экспериментов исследовалось влияние препарата ДНК на функциональную активность ИФН-ДК при добавлении препарата в период генерации ДК совместно с созревающим стимулом за 24 ч до окончания культивирования культуры ДК.

В результате исследования, которое было проведено в группе 14 пациентов, больных туберкулезом легких, и 12 больных злокачественными лимфомами было показано, что препарат двуцепочечной ДНК достоверно усиливал аллостимуляторную активность ДК больных злокачественной лимфомой и не оказывал стимулирующего действия на ДК больных туберкулезом (таблица 11).

Таблица 11 – Влияние двуцепочечной ДНК на аллостимуляторную активность ИФН-ДК больных туберкулезом и злокачественными лимфомами.

		Туберкулез легких (14)		Злокачественные лимфомы (12)	
		Пролиф.ответ в СКЛ (имп/мин)	ИВ	Пролиф.ответ в СКЛ (имп/мин)	ИВ
ДК (0)	M±SE	5331 ± 638	-	3178 ± 325	-
	Mediana	3964	-	2726	-
	LQ-UQ	2937-7165	-	2115-2820	-
ДК + ДНК (5 мкг/мл)	M±SE	5861 ± 948	1,6±0,2	7433 ± 357*	2,5±0,2
	Mediana	4141	2,2	4767,0	2,2
	LQ-UQ	3110-6890	1,8-2,8	5430-8200	1,8-2,8

Примечание: представлены средние значения (M±SE), медианы и диапазоны 25-75%

квартильных значений (LQ–UQ) пролиферативной активности в СКЛ. Респондеры – аллогенные МНК, стимуляторы – интактные ДК (0) и предобработанные препаратом ДНК (5 мкг/мл) ДК, на этапе созревания с ЛПС в соотношении 10:1. Индекс вилияния – отношение культур ДК в присутствии стимулов к ДК (0), * $P_U < 0,05$ – достоверность различий показателей по отношению к культурам ДК (0) без добавления корректирующих факторов (U – критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Согласно полученным нами ранее данным экзогенная ДНК в форме фрагментов геномной ДНК поглощается ДК и интернализуется во внехромосомном пространстве клеточного ядра [43, 44]. Взаимодействие с клеткой, продвижение в ядерное пространство и депонирование в нем фрагментов экзогенной ДНК приводит к созреванию и активации ДК, что сопровождается увеличением доли клеток, экспрессирующих, соответственно CD83 и CD25 маркеры, а также усилением их стимуляторной активности на пролиферацию Т-лимфоцитов в аллогенной СКЛ.

3.4 Исследование влияния препарата двуцепочечной геномной ДНК человека на количество различных типов ДК у больных с онкопатологией, участвующих в исследованиях препарата Панаген на II фазе Клинических испытаний

Поскольку антигенпрезентирующие клетки, такие как макрофаги и ДК, происходят из моноцитов, стимуляция препаратом Панаген моноцитарного роста кроветворения может служить в качестве позитивного показателя проводимой терапии. В этой связи оценка субпопуляций и соотношения миелоидных (CD11+CD123–) и плазмацитоидных (CD11–CD123+) ДК в периферической крови пациентов, находящихся в исследовании, может характеризовать возможные пути активации иммунного ответа.

В исследовании были включены больные раком молочной железы II–IV стадии, получающих препарат Панаген, и пациентки, получающие плацебо. После оперативного удаления опухоли проводилось 3 курса полихимиотерапии (циклофосфан 500 мг/м² в/в 1 день, доксорубин 50 мг/м² в/в 1 день, фторурацил 500 мг/м² в/в 1 день).

Полихимиотерапия включает обязательное использование сочетания доксорубина и циклофосфана (доксорубин приводит к перемещению калретикулина на цитоплазматическую мембрану, что делает опухолевую клетку видимой для атаки фагоцитирующими клетками; циклофосфан приводит к деструкции опухолевой клетки и формированию иммуногенного клеточного дебриса). Циклофосфан дифференцированно угнетает различные популяции Т-лимфоцитов. Так угнетение Т-регуляторных лимфоцитов происходит практически полностью, при этом нарушается их супрессорная функция. В свою очередь, цитотоксические Т-лимфоциты гибнут только частично и восстанавливаются под действием препарата ДНК и активности ДК. Это создает промежуток времени, когда опухолевая ткань становится незащищенной цитокиновым градиентом, предохраняющим ее от воздействия иммунной системы.

В этот же момент проводится активация созревания и индукция аллостимуляторной активности ДК организма *in vivo* с использованием экзогенной фрагментированной аллогенной ДНК человека (препарата «Панаген»). ДК созревают и нагружаются опухолевыми антигенами, которые теперь становятся доступными для распознавания. В результате ДК активируют развитие Т-цитотоксического специфического противоопухолевого ответа. Цитотоксические Т-лимфоциты лизируют оставшиеся опухолевые клетки. Кроме того, формируется долгосрочная Т-клеточная память против опухолевых антигенов.

В ходе исследования было установлено, что только часть пациентов отвечает изменением субпопуляционного состава ДК на действие препарата. В связи с этим был выбран следующий принцип анализа: сравнивались абсолютные показатели по отношению к нулевой точке при первой и третьей ХТ отдельно. Сравнение показателей производилось по отношению к контрольной точке – 21 день после 1 ХТ, взятой за 100%.

При анализе количества плазмацитоидных ДК (CD11–CD123+) в образцах периферической крови (таблица 12) установлено, что из группы в

14 человек на действие препарата отвечали 9 человек по совокупности после 1 и 3 ХТ, что составляет 64% (рисунок 3, таблица 13). 36% пациентов не отвечали на действие препарата Панаген в выбранных контрольных точках.

Таблица 12 – Процентное содержание CD11–CD123+ плазмацитоидных ДК в периферической крови пациентов, находящихся в исследовании.

	0 – исходный уровень	21 день после 1 ХТ	21 день после 3 ХТ
Панаген			
А-ва	0,42	0,57	0,16
Б-ко	0,78	0,21	0,18
Б-рь	0,68	0,36	1,40
В-ва	0,34	0,12	0,75
Г-ко	0,88	0,54	0,52
Г-на	1,56	0,85	0,74
Г-ва	0,13	0,12	0,80
Е-ва	0,96	0,61	0,49
И-ва	0,34	0,30	0,64
Ков-ва	2,00	5,26	0,84
М-ва	0,29	0,90	0,10
М-д	0,16	0,87	0,06
М-на	0,39	0,60	0,48
П-на	0,95	0,87	0,31
Плацебо			
Д-н	0,23	0,41	0,42
Кач-ва	0,30	0,24	0,53
К-ва	0,22	0,97	0,26

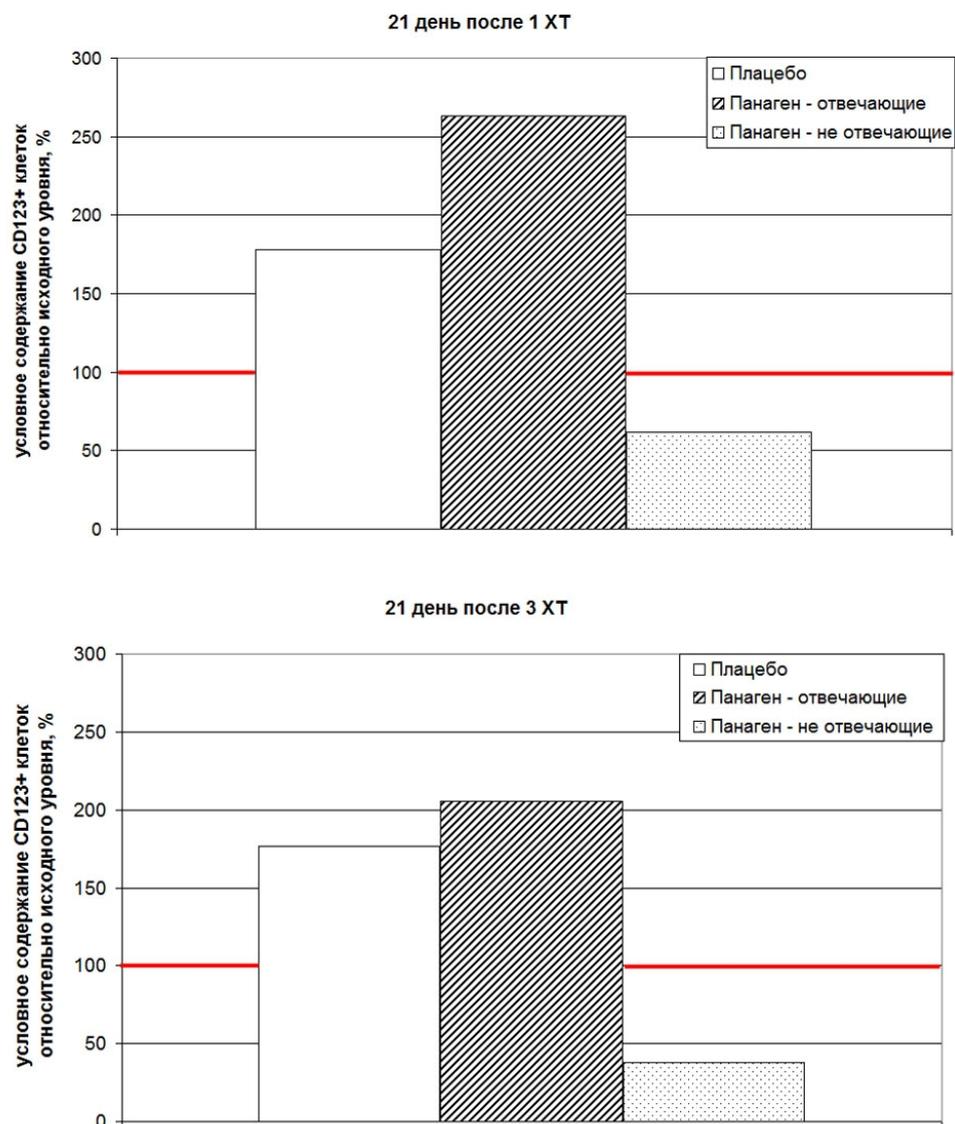


Рисунок 3 – Условное содержание (%) CD11–CD123+ плазмацитоидных ДК в периферической крови пациентов, находящихся в исследовании, на 21 день после 1 и 3 ХТ относительно исходного уровня (горизонтальная линия).

Таблица 13. Условное содержание (%) CD11–CD123+ плазмацитоидных ДК в периферической крови пациентов, находящихся в исследовании, на 21 день после 1 и 3 ХТ относительно исходного уровня.

21 день после 1 ХТ		21 день после 3 ХТ	
Панаген – отвечающие			
А-ва	135,7	М-на	123,1
М-на	153,8	Б-рь	205,9
Ков-ва	263,0	В-ва	220,6
М-ва	310,3	Г-ва	615,4
М-д	543,8	И-ва	188,2
медиана	263,0	медиана	205,9

Панаген – не отвечающие			
Б-ко	26,9	А-ва	38,1
Г-ко	61,4	Б-ко	23,1
Г-на	54,5	Г-ко	59,1
Е-ва	63,5	Г-на	47,4
П-на	91,6	Е-ва	51,0
Б-рь	52,9	П-на	32,6
В-ва	35,3	Ков-ва	42,0
Г-ва	92,3	М-ва	34,5
И-ва	88,2	М-д	37,5
медиана	61,4	медиана	38,1
Плацебо			
Д-н	178,3	Д-н	182,6
Кач-ва	80,0	Кач-ва	176,7
К-ва	440,9	К-ва	118,2
медиана	178,3	медиана	176,7

Полученные данные предполагают, что в ходе терапии происходит увеличение популяции циркулирующих плазмацитоидных ДК. При этом всплеск появления ДК связан с состоянием индивидуального больного. С индивидуальными особенностями связаны, на наш взгляд, эффект различия в количестве плазмацитоидных ДК к 1 ХТ у одних пациентов и к 3 ХТ у других. 63% больных, получавших Панаген, демонстрируют ответ на действие препарата по совокупности показателей контрольных точек 21 сутки после 1 и 3 ХТ.

Анализ изменения популяции миелоидных ДК (CD11+CD123–) в периферической крови не выявил закономерностей, которые позволили бы оценить возможность активации адаптивного иммунитета через эту популяцию антигенпрезентирующих клеток (рисунок 4, таблицы 14, 15).

Таблица 14 – Процентное содержание CD11+CD123– миелоидных ДК в периферической крови пациентов, находящихся в исследовании.

	0 – исходный уровень	21 день после 1 ХТ	21 день после 3 ХТ
Панаген			
А-ва	0,90	1,43	0,47
Б-ко	0,93	0,51	0,18
Б-рь	0,68	0,87	0,99
В-ва	0,59	0,37	1,05

Г-ко	1,90	0,78	0,78
Г-на	1,56	1,11	2,00
Г-ва	0,42	0,39	1,40
Е-ва	2,40	0,80	0,81
И-ва	0,42	0,86	0,85
Ков-ва	2,00	3,00	0,84
М-ва	1,71	1,13	0,24
М-д	0,18	1,20	0,15
М-на	0,88	0,86	0,75
П-на	1,05	1,32	0,38
Плацебо			
Д-н	0,32	0,32	1,02
Кач-ва	0,80	0,35	1,60
К-ва	0,97	1,46	0,30

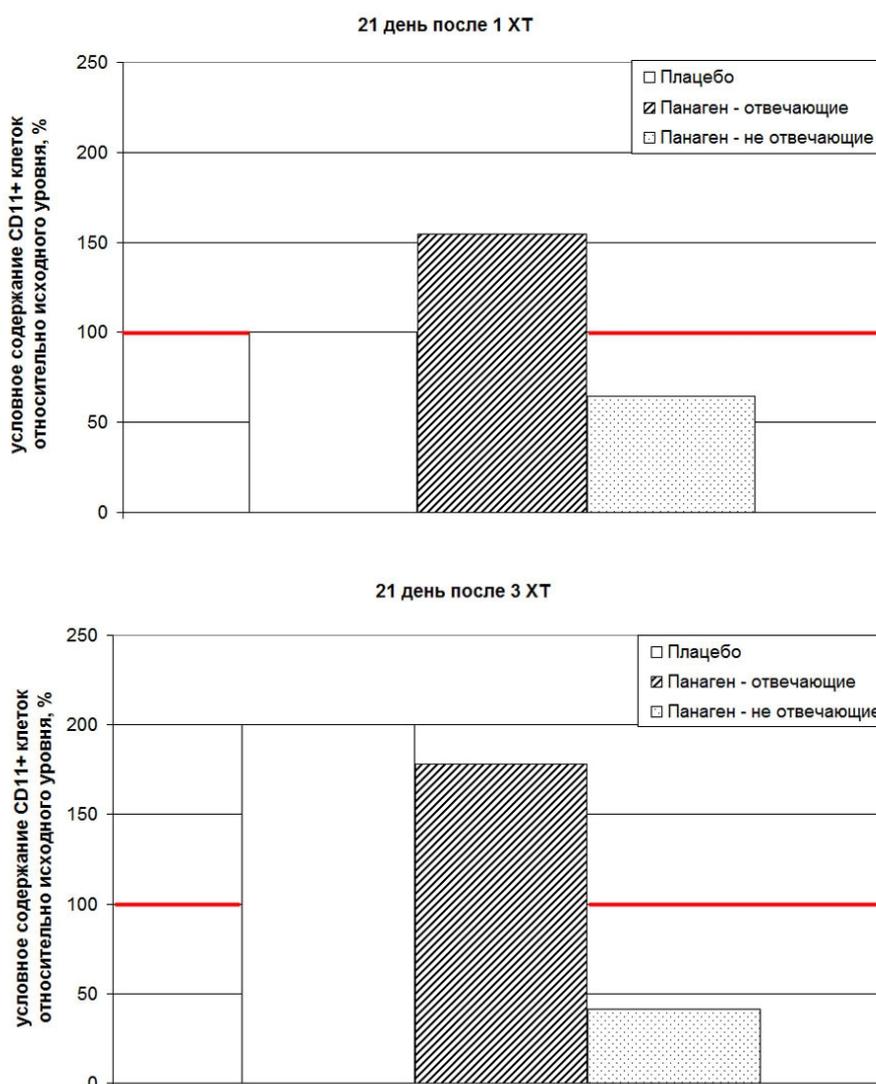


Рисунок 4 – Условное содержание (%) CD11+CD123– миелоидных ДК в периферической крови пациентов, находящихся в исследовании, на 21 день после 1 и 3 ХТ относительно исходного уровня (горизонтальная линия).

Таблица 15 – Условное содержание (%) CD11+CD123– миелоидных ДК в периферической крови пациентов, находящихся в исследовании, на 21 день после 1 и 3 ХТ относительно исходного уровня.

21 день после 1 ХТ		21 день после 3 ХТ	
Панаген – отвечающие			
А-ва	158,9	В-ва	178,0
Б-ррь	127,9	Б-ррь	145,6
И-ва	204,8	И-ва	202,4
Ков-ва	150,0	Г-на	128,2
М-д	666,7	Г-ва	333,3
П-на	125,7		
медиана	154,4	медиана	178,0
Панаген – не отвечающие			
В-ва	62,7	А-ва	52,2
Б-ко	54,8	Ков-ва	42,0
Г-ко	41,1	М-д	83,3
Е-ва	33,3	П-на	36,2
М-ва	66,1	Б-ко	19,4
М-на	97,7	Г-ко	41,1
Г-на	71,2	Е-ва	33,8
Г-ва	92,9	М-ва	14,0
		М-на	85,2
медиана	64,4	медиана	41,1
Плацебо			
Д-н	100,0	Д-н	318,8
Кач-ва	43,8	Кач-ва	200,0
К-ва	150,5	К-ва	30,9
медиана	100,0	медиана	200,0

3.5 Определение соотношения различных типов ДК у больных с онкопатологией после воздействия препарата Панаген

В ходе ХТ у 30% больных наблюдалось значительное повышение количества плазмацитоидных ДК в периферической крови к последней контрольной точке 21 день после 3 ХТ (рисунок 5, таблица 16). Остальные пациенты демонстрировали снижение или стабилизацию этой популяции ДК в образцах крови по отношению к показателю после 1 ХТ.

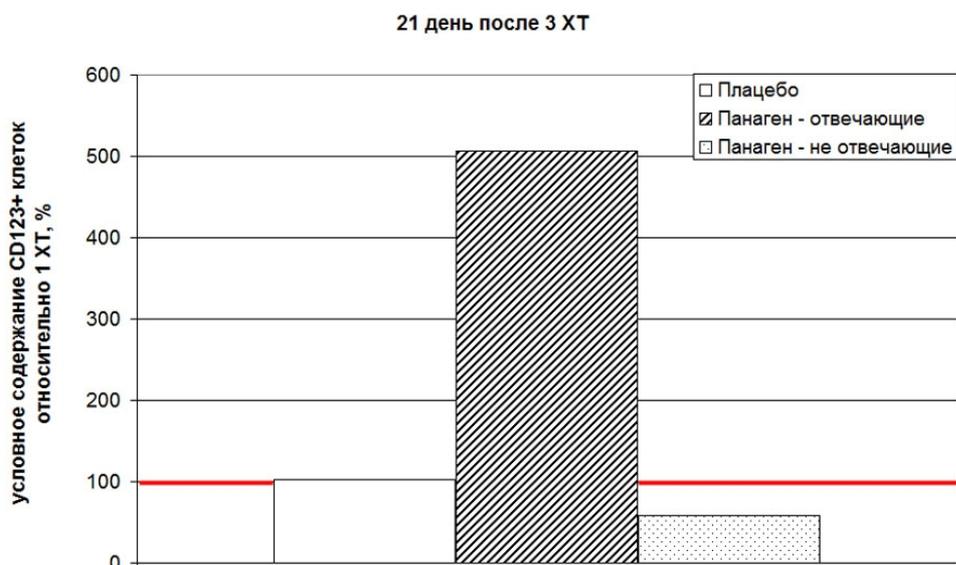


Рисунок 5 – Условное содержание (%) CD11–CD123+ плазмацитоидных ДК в периферической крови пациентов, находящихся в исследовании, на 21 день после 3 ХТ относительно уровня после 1 ХТ.

Таблица 16 – Условное содержание (%) CD11–CD123+ плазмацитоидных ДК в периферической крови пациентов, находящихся в исследовании, на 21 день после 3 ХТ относительно уровня после 1 ХТ.

Панаген – отвечающие		Панаген – не отвечающие		Плацебо	
Б-рь	388,9	А-ва	28,1	Д-н	102,4
В-ва	625,0	П-на	35,6	Кач-ва	220,8
Г-ва	666,7	Б-ко	85,7	К-ва	26,8
И-ва	213,3	Г-ко	96,3		
		Г-на	87,1		
		Е-ва	80,3		
		М-на	80,0		
		Ков-ва	16,0		
		М-ва	11,1		
		М-д	6,9		
медиана	506,9	медиана	57,8	медиана	102,4

На рисунке 6 и в таблице 17 приведен анализ изменения популяции миелоидных ДК (CD11+CD123–) в периферической крови на 21 сутки после 3 ХТ относительно уровня после 1 ХТ.

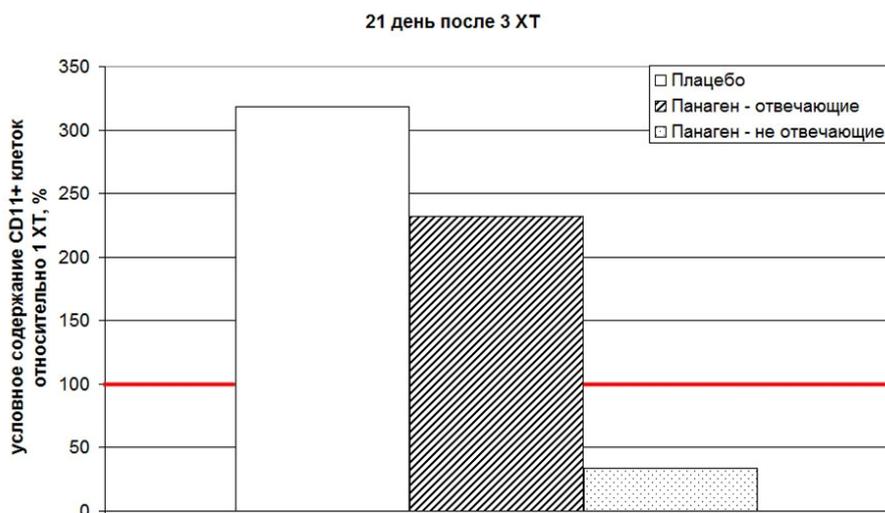


Рисунок 6 – Условное содержание (%) CD11+CD123– миелоидных ДК в периферической крови пациентов, находящихся в исследовании, на 21 день после 3 ХТ относительно уровня после 1 ХТ.

Таблица 17 – Условное содержание (%) CD11+CD123– миелоидных ДК в периферической крови пациентов, находящихся в исследовании, на 21 день после 3 ХТ относительно уровня после 1 ХТ.

Панаген – отвечающие		Панаген – не отвечающие		Плацебо	
Б-рь	113,8	А-ва	32,9	Д-н	318,8
В-ва	283,8	Б-ко	35,3	Кач-ва	457,1
Г-на	180,2	Г-ко	100,0	К-ва	20,5
Г-ва	359,0	Е-ва	101,3		
		И-ва	98,8		
		Ков-ва	28,0		
		М-ва	21,2		
		М-на	87,2		
		М-д	12,5		
		П-на	28,8		
медиана	232,0	медиана	34,1	медиана	318,8

В целом проведенные исследования показали, что среди больных раком молочной железы можно выделить две подгруппы пациентов, одни из которых отвечают на действие препарата Панаген, а другие – нет. Соотношение числа пациентов «отвечающих» и «не отвечающих» составляет в среднем 50/50%. Анализ изменения популяции миелоидных ДК (CD11+CD123–) в периферической крови не выявил закономерностей, которые позволили бы оценить возможность активации адаптивного

иммунитета через эту популяцию антигенпрезентирующих клеток. Тем не менее, нами показано, что в ходе терапии происходит увеличение популяции циркулирующих плазмацитоидных CD11–CD123+ДК. При этом пик увеличения данной субпопуляции ДК зависит, по-видимому, от индивидуальных особенностей больного. Так, 63% больных, получавших Панаген, демонстрируют ответ на действие препарата по совокупности показателей контрольных точек на 21 сутки после 1 и 3 ХТ. У 30% больных, принимавших Панаген, наблюдается значительное увеличение количества плазмацитоидных клеток к 3 ХТ.

Исследования, выполненные на 3 этапе работы, показали, у значительной (70%) части больных, принимавших препарат Панаген, количество регуляторных супрессорных CD4+CD25+CD127– Т-лимфоцитов в первой и второй контрольных точках сохраняется на исходном уровне аналогично с группой «Плацебо». При этом у 30% пациентов количество Т-регуляторных лимфоцитов в первой контрольной точке (21 сутки после 1 ХТ) снижается в 5-100 раз. Ко времени анализа во второй контрольной точке (21 сутки после 3 ХТ) количество Т-супрессоров восстанавливается до исходного уровня, но важно отметить, что ни у одной пациентки не было выявлено количественной экспансии регуляторных Т-лимфоцитов, что является хорошим прогностическим признаком.

Кроме того, в ходе выполнения 2 этапа работы нами было показано, что 10 из 12 (83%) пациентов, принимавших Панаген, количество цитотоксических CD8+перфорин+ Т-лимфоцитов в первой контрольной точке (21 день после 1 ХТ) достоверно больше, чем в группе «Плацебо» ($p_u < 0,05$). Если рассматривать анализируемый признак по совокупности обеих контрольных точек (через 21 день после 1-ого и 3-го курса ХТ), то у всех пациенток, принимавших Панаген, в периферической крови содержание цитотоксических Т-клеток было значительно выше исходных значений.

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют, что у пациентов, принимавших препарат Панаген в ходе трех непрерывных ХТ,

произошла индукция адаптивного иммунитета (генерация цитотоксических CD8+перфорин+ Т-лимфоцитов). Данный эффект двуцепочечной ДНК реализуется, очевидно, через эндогенную активацию антиген-презентирующих клеток, которая не сопровождается количественным приростом миелоидных CD11+CD123– ДК (и проявляется только у части больных увеличением числа плазмацитоидных CD11–CD123+ ДК), но индуцирует *in vivo* (как это было показано в витральных условиях) более эффективное конечное созревание ДК и усиливает их функциональную, иммуностимуляторную активность. Важно при этом отметить, что позитивный эффект препарата Панаген на параметры адаптивного иммунитета не приводит к развитию побочных иммуотропных эффектов, связанных с количественной экспансией регуляторных супрессорных CD4+CD25+CD127– Т-клеток, которые могли бы потенцировать общий иммуносупрессорный фон у больных раком молочной железы в процессе проведения курсов полихимиотерапии.

Полученные данные могут являться доказательством противоопухолевого действия препарата Панаген при его использовании в сочетании с цитостатиками (циклофосфан и доксорубицин) в клиническом применении при лечении рака молочной железы II-IV стадии.

Заключение

Развитие опухолевого процесса, а также активация и хронизация инфекционных заболеваний бактериальной и вирусной природы, как правило, ассоциированы с нарушениями врожденного и приобретенного иммунитета. Исследования последних лет также показали, что ДК при онкопатологии и инфекционных заболеваниях также могут подвергаться количественным и функциональным изменениям. В частности, нами показано, что даже в стандартных витральных условиях с использованием ГМ-КСФ и ИФН- α , которые позволяют стабильно получать из моноцитов крови здоровых доноров достаточно большое количество функциональной активных ДК, у пациентов с онкопатологией и инфекционными заболеваниями генерируемые *in vitro* ИФН-ДК отличаются признаками задержки дифференцировки и созревания.

Среди больных с онкопатологией признаки задержки созревания ДК были наиболее выражены в группе больных со злокачественными лимфомами, в меньшей степени – в группе пациентов со злокачественными глиомами и минимальны – у больных с множественной миеломой. Среди больных с хроническими вирусными гепатитами С и В наиболее выраженные нарушения были характерны для больных с вирусным гепатитом С, а также пациентов с хроническими вирусными гепатитами с исходом в цирроз печени. Аналогичным образом, признаки задержки дифференцировки/созревания ДК регистрировались у больных с туберкулезом легких, причем в наибольшей степени проявлялись у больных с нарушением специфического ответа на антигены *M. Tuberculosis* (ППД).

Кроме того, генерируемые *in vitro* ИФН-ДК у больных с онкопатологией и инфекционными заболеваниями, отличались также от ДК доноров по характеру продукции цитокинов, что проявлялось в виде снижения уровня продукции Th1/провоспалительных цитокинов и/или усиления секреции Th2/противовоспалительных цитокинов. Задержка созревания и нарушение цитокин-продуцирующей функции ИФН-ДК у

больных с онкопатологией и инфекционными заболеваниями ассоциировалось с изменением Th1- и Th2-стимуляторной активности Т-клеток.

Полученные нами ранее данные убедительно свидетельствуют, что ИФН-ДК у больных с онкопатологией и инфекционными заболеваниями отличаются от клеток здоровых доноров по ряду фенотипических маркеров и функций, однако данные изменения в зависимости от вида патологии могут иметь различную степень выраженности: от явных дисфункций до их минимальных проявлений или отсутствия таковых. При этом наиболее выраженные фенотипические изменения, как правило, сопряжены с изменением функциональной активности ДК и в целом свидетельствуют о снижении стимулирующей активности ДК при онкопатологии и инфекционных заболеваниях и приобретении ими толерогенных свойств, ассоциированных с повышенной продукцией ИЛ-10, снижением Th1- и усилением Th2-стимуляторной активности.

Следовательно, у отдельных категорий больных (например, у пациентов с хроническими вирусными гепатитами с исходом в цирроз; туберкулезом легких с туберкулиновой анергией; злокачественными лимфомами) для получения ИФН-ДК, пригодных для последующего использования в качестве аутологичных дендритноклеточных вакцин, необходимо на этапе генерации использовать какие-то дополнительные биоактивные медиаторы/препараты, которые позволили бы повысить эффективность дифференцировки/созревания ДК и усилить их иммуностимулирующую, функциональную активность.

Поиску таких биоактивных препаратов и был посвящен 4 этап работы. Было исследовано влияние различных биоактивных продуктов (гормона – дегидроэпиандростерон сульфата [ДГЭАС]; иммуномодулирующих препаратов – сополимера N-окси-1,4-этиленпиперазина и (N-карбоксиэтил)-1,4-этиленпиперазиний бромида [«Полиоксидоний»] и комплекса нативных провоспалительных цитокинов [«Суперлимф»], препарата рекомбинантного

интерлейкина-2 человека [«Ронколейкин»]; препарата двуцепочечной ДНК человека [«Панаген»]) на фенотипические и функциональные характеристики ИФН-ДК здоровых доноров и больных с онкопатологией (злокачественные глиомы, лимфомы) и туберкулезом легких. В частности, изучались корригирующие эффекты исследуемых биоактивных медиаторов на процесс дифференцировки и созревания ИФН-ДК, а также их влияние на аллостимуляторную, цитокин-секреторную и цитотоксическую активность ДК, генерируемых в культуре *in vitro*.

Было показано, что иммуномодулирующие препараты («Полиоксидоний», «Суперлимф»), препарат двуцепочечной ДНК человека («Панаген»), а также гормон ДГЭАС характеризуются выраженным стимулирующим эффектом на процесс дифференцировки/созревания ИФН-ДК. Важно отметить, что, например, Панаген по своему стимулирующему действию на ДК был сопоставим с «классическим» дозревающим стимулом – ЛПС, который обычно используется в различных протоколах генерации ДК. В свою очередь, стимулирующий эффект ДГЭАС проявлялся не только в отношении ДК здоровых доноров, но и в модели «толерогенных» ДК, полученных от женщин с физиологической беременностью.

Одним из механизмов стимулирующего действия ДГЭАС является его способность усиливать продукцию ФНО α в культуре ИФН-ДК на этапе их конечного созревания. Поскольку хорошо известно, что ФНО α является мощным фактором дифференцировки дендритных клеток, можно заключить, что в основе ДГЭАС-опосредованных эффектов на созревание ДК лежат аутокринные механизмы цитокиновой регуляции. В целом полученные нами результаты показывают, что ДГЭАС является перспективным биоактивным гормональным препаратом, который может эффективно использоваться в процессе генерации ИФН-ДК с целью ослабления их возможной толерогенной, супрессорной активности и усиления иммуностимуляторного потенциала.

При исследовании влияния биоактивных препаратов на функциональные свойства ДК, полученных от больных с онкопатологией (злокачественные опухоли головного мозга, злокачественные лимфомы) и туберкулезом легких, было показано, что использование рIL-2 (Ронколейкина), Полиоксидония, Суперлимфа или Панагена (дцДНК) в процессе генерации ДК позволяет статистически достоверно усилить аллостимуляторную активность получаемых ИФН-ДК. Кроме того, обработка ДК больных злокачественными глиомами и лимфомами Ронколейкином, Пангеном и Полиоксидонием достоверно усиливала (в 6-7,5 раз) исходно низкий уровень цитотоксической активности ДК против НК- и TRAIL-резистентных опухолевых клеток линии Нер-2.

Таким образом, полученные данные демонстрируют принципиальную возможность восстановления сниженной функциональной активности ДК у больных с тяжелыми онкологическими и инфекционными заболеваниями с помощью различных биоактивных препаратов («Полиоксидоний», «Суперлимф», «Ронколейкин», «Панаген»), добавление которых на этапе конечного созревания ДК позволяет значимо повысить их аллостимуляторную и цитотоксическую активность.

В целом, проведенные исследования обосновывают новые подходы к коррекции возможных дисфункций ДК при патологии и пути повышения эффективности клеточных технологий лечения инфекционных и онкологических заболеваний с использованием аутологичных дендритноклеточных вакцин.

Дополнительно было оценено влияние препарата Панаген на количество и соотношение миелоидных CD11+CD123- и плазмацитоидных CD11-CD123+ ДК в периферической крови больных раком молочной железы в динамике проведения курсов ПХТ. Проведенные исследования в совокупности с результатами, полученными на 2-3 этапах работы, свидетельствуют, что у пациентов, принимавших препарат Панаген в ходе трех непрерывных ХТ, происходит индукция адаптивного иммунитета

(генерация цитотоксических CD8+перфорин+ Т-лимфоцитов). Данный эффект двуцепочечной ДНК реализуется, очевидно, через эндогенную активацию антигенпрезентирующих клеток, которая, однако, не сопровождается количественным приростом миелоидных CD11+CD123– ДК (и проявляется только у части больных увеличением числа плазмацитоидных CD11–CD123+ ДК), но индуцирует *in vivo* (как это было показано в витральных условиях) более эффективное конечное созревание ДК и усиливает их функциональную, иммуностимуляторную активность. Важно отметить, что позитивный эффект препарата Панаген на параметры адаптивного иммунитета не приводит к развитию побочных иммуотропных эффектов, связанных с количественной экспансией регуляторных супрессорных CD4+CD25+CD127– Т-клеток, которые могли бы потенцировать общий иммуносупрессорный фон у больных раком молочной железы в процессе проведения курсов химиотерапии.

При исследовании ИФН-ДК у больных с онкопатологией и инфекционными заболеваниями использован разработанный ранее (на 1-2 этапе) стандарт лабораторного тестирования ДК *in vitro*, на основе использования основных критериев оценки фенотипических и функциональных свойств ДК.

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

Результаты, полученные в ходе реализации проекта, внедрены в образовательный процесс на кафедре цитологии и генетики Новосибирского государственного университета (НГУ) и на кафедре иммунологии Новосибирского государственного медицинского университета (НГМУ). Результаты, полученные в ходе выполнения НИР используются: в программе

курса лекций «Введение в биологию» для студентов 1 курса факультета естественных наук НГУ (лекция «Биологические эффекты экзогенных нуклеиновых кислот»); курса лекций по иммунологии для студентов 3 курса факультета естественных наук НГУ (в разделах «Врожденный иммунитет», «Презентация антигенов», «ДНК-вакцины и вакцины на основе дендритных клеток»); на семинарных занятиях студентов 4 курса факультета естественных наук НГУ, специализирующихся по цитологии и генетике; лекционного материала в обучении клинических ординаторов и аспирантов НИИ клинической иммунологии СО РАМН.

Подготовлена рабочая учебная программа тематического усовершенствования врачей (72 ч) по курсу «Применение клеточных технологий в медицине», в которую также включены лекции с использованием научных данных, полученные в ходе выполнения НИР.

Предусмотренные календарным планом задания выполнены полностью.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Banchereau J., Steinman R.M. Dendritic cells and control of immunity // Nature. – 1998. – V. 392. – P. 245-252.
- 2 Massard G., Tongia M-M., Wihin J-M., Morand G. The dendritic cell lineage: a ubiquitous antigen-presenting organization // Ann.Thorac.Surg. – 1996. – V. 61. – P. 252-258.
- 3 Peters J.H., Gleseler R., Thiele B., Steinbach F. Dendritic cells from ontogenetic orhans to myelomonocytic descendants // Immunol. Today. – 1996. – V. 17. – P. 273-278.
- 4 Reichardt W., Dürr K., Elverfeldt D., Jüttner E., Gerlach U, Yamada M., Smith B., Negrin R., Zeiser R. Impact of mammalian target of rapamycin inhibition on lymphoid homing and tolerogenic function of nanoparticle-labeled dendritic cells following allogeneic hematopoietic cell transplantation // J. Immunol. – 2008. – V. 181. – P. 4770-4779.
- 5 Fedoric B, Krishnan R. Rapamycin downregulates the inhibitory receptors ILT2, ILT3, ILT4 on human dendritic cells and yet induces T cell hyporesponsiveness independent of FoxP3 induction // Immunol. Lett. – 2008. – V. 120. – P. 49-59.
- 6 Suciú-Foca N., Manavalan J.S., Scotto L., Kim-Schulze S., Galluzzo S., Naiyer Afzal J., Fan J., George V., Cortesini R. Molecular characterization of allospecific T suppressor and tolerogenic dendritic cells // Intern. Immunopharmacol. – 2005. – V. 5. – P. 7-11.
- 7 Tschoep K.E., Noessner E. Understand tolerogenic dendritic cells // Blood. – 2007. – V. 109. – P. 3616-3025.
- 8 Michael H., Ludivine H., Pascale H., Frederic M., Mohammad A., Patrick R., Yves H., Jacques B., Philippe D. High expression of PGE2 enzymatic pathways in cervical (pre)neoplastic lesions and functional consequences for antigen-presenting cells // Cancer Immunol. Immunother. – 2009. – V. 58. – P. 603-614.

9 Gauzzi M.C., Purificato C., Donato K., Jin Y., Wang L., Daniel K.C., Maghazachi A.A., Bellardelli F., Adorini L., Gessani S. Suppressive effect of $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃ on type I IFN-mediated monocytes differentiation into dendritic cells: impairment of functional activities and chemotaxis // *J. Immunol.* – 2005. – V. 174. – P. 270-276.

10 Butts C.L., Shukair S.A., Duncan K.M., Harris C.W., Belyakaya E., Sternberg E.M. Effects of dexamethasone on rat dendritic cell function // *Horm. Metab. Res.* – 2007. – V. 39. – P. 404–412.

11 Chauvin C., Josien R. Dendritic cells as killers: mechanistic aspects and potential roles // *J. Immunol.* – 2008. – V. 181. – P. 11-16.

12 Wesa A.K., Storkus W.J. Killer dendritic cells: mechanisms of action and therapeutic implications for cancer // *Cell Death & Differentiation.* – 2008. – V. 15. – P. 51-57.

13 Korthals M, Safaian N, Kronenwett R, Maihofer D, Schott M, Papewalis C, Diaz Blanco E, 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. Transl. Med.* – 2007. – V. 25. – P. 46-48.

14 Duan X.Z., Wang M., Li H.W., Liu J.C., Wang F.S. Decreased numbers and impaired function of circulating dendritic cell subsets in patients with chronic hepatitis B infection // *J. Gastroenterol. Hepatol.* – 2005. – V. 20. – P. 234-242.

15 Pinzon-Charry A., Maxwell T., Lopez J.A. Dendritic cell dysfunction in cancer: a mechanism for immunosuppression // *Immunol. Cell Biol.* – 2005. – V. 83. – P. 451-461.

16 Yang L., Carbone D.P. Tumor-host immune interactions and dendritic cell dysfunction // *Adv. Cancer Res.* – 2004. – V. 92. – P. 13-27.

17 Yoko U., Masao H., Okamoto A., Higuchi A., Tanabe A, Hirabayashi K., Izumi S., Makino T., Kato S., Hotta T. Frequencies of dendritic cells (myeloid DC and plasmacytoid DC) and their ratio reduced in pregnant women: comparison

with umbilical cord blood and normal healthy adults // *Human Immunol.* – 2003. – V. 64. – P. 1144-1151.

18 Almand B, Resser J.R, Lindman B., Nadaf S., Clark J.I., Kwon E.D., Carbone D.P., Gabrilovich D.I. Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer // *Clin. Cancer Res.* – 2000. – V. 6. – P. 1755-1766.

19 Della Bella S., Nicola S., Brambilla L., Riva A., Ferrucci S., Presicce P., Boneschi V., Berti E., Villa M.L. Quantitative and functional defects of dendritic cells in classic Kaposi's sarcoma // *Clinical Immunol.* – 2006. – V. 119. – P. 317-329.

20 Zhang Z., Fu J., Zhao Q., He Y., Jin L., Zhang H., Yao J., Zhang L., Wang F.S. Differential restoration of myeloid and plasmacytoid dendritic cells in HIV-1-infected children after treatment with highly active antiretroviral therapy // *J. Immunol.* – 2006. – V. 76. – P. 5944-5951.

21 Ulsenheimer A., Gerlach J.T., Jung M.C., Gruener N., Wachtler M., Backmund M., Santantonio T., Schraut W., Heeg M.H., Schirren C.A., Zachoval R., Pape G.R., Diepolder H.M. Plasmacytoid dendritic cells in acute and chronic hepatitis C virus infection // *Hepatology.* – 2005. – V. 41 – N 3. – P. 643-651.

22 Van der Molen R.G, Sprengers D., Binda R.S, de Jong E.C., Niesters H.G., Kusters J.G., Kwekkeboom J, Janssen H.L. Functional impairment of myeloid and plasmacytoid dendritic cells of patients with chronic hepatitis B // *Hepatology.* – 2004. – V. 40. – P. 738-746.

23 Scholz C., Toth B., Santoso L., Kuhn C., Franz M., Mayr D., Jeschke U., Friese K., Schiessl B. Distribution and maturity of dendritic cells in diseases of insufficient placentation // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2008. – V. 60. – N 3. – P. 238-244.

24 Darmochwal-Kolarz D., Rolinski J., Tabarkiewicz J., Leszczynska-Gorzela B., Buczkowski J., Wojas K., Oleszczuk J. Myeloid and lymphoid dendritic cells in normal pregnancy and pre-eclampsia // *Clin. Exp. Immunol.* – 2003. – V. 132. – N 2. – P. 339-344.

25 Черных Е.Р., Селедцова Н.В., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Тыринова Т.В., Курганова Е.В., Хонина Н.А., Останин А.А., Пасман Н.М. Дендритные клетки как возможные регуляторы иммунной перестройки при беременности // Мед. иммунология. – 2009. – Т. 11. – № 6. – С. 541-548.

26 Селедцова Н.В., Хонина Н.А., Тихонова М.А., Останин А.А., Пасман Н.М., Черных Е.Р. Возможная роль дендритных клеток в нарушении гестационной иммуносупрессии у беременных с надпочечниковой гиперандрогенией // Вестник НГУ, серия: биология, клиническая медицина. – 2007. – Т. 5. – № 3. – С. 91-93

27 Сахно Л.В., Распай Ж.М., Тихонова М.А., Никонов С.Д., Жданов О.А., Останин А.А., Черных Е.Р. Дефект антигенпрезентирующих клеток у больных туберкулезом легких // Мед. иммунология. – 2009. – Т. 11. – № 2-3. – С. 245-254.

28 Шевела Е.Я, Сизикова С.А., Тихонова М.А., Крючкова И.В., Кулагин А.Д., Лисуков И.А., Останин А.А., Черных Е.Р. Механизмы и клиническое значение моноцитарно-опосредованной супрессии у больных лимфомами // Гематология и трансфузиология. – 2006. – № 3. – С. 18-23.

29 Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Козлов Ю.П., Ступак В.В., Останин А.А., Черных Е.Р. Характеристика IFN α -индуцированных дендритных клеток у больных злокачественными глиомами головного мозга // Бюллетень СО РАМН. – 2007. – Т. 124. – № 2. – С. 27-33.

30 Сахно Л.В., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Распай Ж.М., Гилева И.П., Никонов С.Д., Жданов О.А., Останин А.А., Черных Е.Р. Характеристика дендритных клеток, генерируемых в присутствии интерферона- α , у больных туберкулезом легких // Проблемы туберкулеза. – 2007. – № 3. – С. 42-46.

31 Леплина О.Ю., Насонова Г.В., Тихонова М.А., Крючкова И.В., Лисуков И.А., Останин А.А., Черных Е.Р. Характеристика IFN α -индуцированных дендритных клеток у больных злокачественными лимфомами // Гематология и трансфузиология. – 2008. – № 3. – С. 24-29.

32 Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Борисова А.Е., Старостина Н.М., Останин А.А., Черных Е.Р., Козлов В.А. Фенотип и функции дендритных клеток у больных хроническими вирусными гепатитами // Мед. иммунология. – 2009. – Т. 11. – № 2-3. – С. 191-196.

33 Леплина О.Ю., Насонова Г.В., Тихонова М.А., Крючкова И.В., Лисуков И.А., Останин А.А., Черных Е.Р. IFN α -индуцированные дендритные клетки у больных множественной миеломой // Сибирский онкологический журнал. – 2009. – Т. 36. – № 6. – С. 37-43.

34 Сахно Л.В., Леплина О.Ю., Распай Ж.М., Тихонова М.А., Курганова Е.В., Гилева И.П., Никонов С.Д., Жданов О.А., Останин А.А., Черных Е.Р. Функциональные свойства IFN- α -индуцированных дендритных клеток у больных туберкулезом легких// Медицинская иммунология. – 2008. – Т. 10. – № 2-3. – С. 151-158.

35 Черных Е.Р., Леплина О.Ю., Тыринова Т.В., Тихонова М.А., Ступак В.В., Мишинов С.В., Пендюрин И.В., Останин А.А. Противоопухолевая активность дендритных клеток здоровых доноров и больных с опухолями головного мозга // Мед. иммунология. – 2010. – Т. 12. – № 3. – С. 199-206.

36 Леплина О.Ю., Тыринова Т.В., Ступак В.В., Мишинов С.В., Пендюрин И.В., Останин А.А., Черных Е.Р. Эффекторные функции интерферон- α -индуцированных дендритных клеток у здоровых доноров и больных опухолями головного мозга // Российский иммунологический журнал. – 2011. – Т. 5(14). – № 3-4. – С. 322-332.

37 Черных Е.Р., Леплина О.Ю., Тыринова Т.В., Тихонова М.А., Сахно Л.В., Останин А.А. Участие дегидроэпиандростерона сульфата и прогестерона в регуляции толерогенной активности ИФН- α -индуцированных дендритных клеток *in vitro* // БЭБиМ. – 2011. – Т. 151. – № 2. – С. 168-173.

38 Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Сахно Л.В., Тыринова Т.В., Останин А.А., Черных Е.Р. Эффект дегидроэпиандростерона сульфата на созревание и функциональные свойства ИФН- α -индуцированных дендритных клеток // БЭБиМ. – 2009. – Т. 147. – № 7. – С. 80-85.

39 Canning M.O., Grotenhuis K., de Wit H.J., Drexhage H.A. Opposing effects of dehydroepiandrosterone and dexamethasone on the generation of monocyte-derived dendritic cells // *Eur. J. Endocrinol.* – 2000. – V. 143. – № 5. – P. 687-695.

40 Селедцова Н.В., Хонина Н.А., Дударева А.В., Тихонова М.А., Останин А.А. Пасман Н.М., Черных Е.Р. Нарушение иммунорегуляторных механизмов у беременных с гиперандрогенией // *Бюллетень СО РАМН.* – 2006. – Т. 119. – № 1. – С. 35-40.

41 Okabe T., Haji M., Takayanagi R., Adachi M., Imasaki K., Kurimoto F., Watanabe T., Nawata H. Up-regulation of high-affinity dehydroepiandrosterone binding activity by dehydroepiandrosterone in activated human T lymphocytes// *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 1995. – V. 80. – P. 2993-2996.

42 Leplina O.Yu., Tyrinova T.V., Tikhonova M.A., Shevela E.Ya., Stupak V.V., Mishinov S.V., Pendyurin I., Sadovoy M., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Direct antitumor activity of interferon-induced dendritic cells of healthy donors and patients with primary brain tumors / In book: “Glioma – exploring it’s biology and practical relevance” edited by Anirban Ghosh, 2011. – P. 325-342. (<http://www.intechopen.com/books/show/title/glioma-exploring-its-biology-and-practical-relevance>)

43 Alyamkina E.A., Dolgova E.V., Likhacheva A.S., Rogachev V.A., Sebeleva T.E., Nikolin V.P., Popova N.A., Kiseleva E.V., Orishchenko K.E., Sakhno L.V., Gelfgat E.L., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Zagrebelniy S.N., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Exogenous allogenic fragmented double-stranded DNA is internalized into human dendritic cells and enhances their allostimulatory activity // *Cellular Immunology.* – 2010. – V. 262. – N 2. – P. 120-126.

44 Alyamkina E.A., Leplina O.Yu., Sakhno L.V., Chernykh E.R., Ostanin A.A., Efremov Ya.R., Shilov A.G., Orishchenko K.E., Likhacheva A.S., Dolgova E.V., Nikolin V.P., Popova N.A., Zagrebelniy S.N., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Effect of double-stranded DNA on maturation of dendritic cells in vitro // *Cellular Immunology.* – 2010. – V. 266. – N 1. – P. 46-51.