

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

УДК
№ госрегистрации
Инв.№

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

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

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

по теме:
СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ СПОСОБНОСТИ
ИНФ-ДК И ИЛ4-ДК ИНДУЦИРОВАТЬ Т-КЛЕТКИ
(промежуточный, 2 этап)

Руководитель работ
проф., д.м.н.

_____ Е.Р. Черных
подпись

Новосибирск 2010

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

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

Реферат

Отчет 26 с., 1 рисунок, 5 таблиц, 29 источников.

Ключевые слова – дендритные клетки, ИФН- α , ИЛ-4, Th1 Т-клетки, Th2 Т-клетки, CD8+перфорин+ цитотоксические Т-лимфоциты, рак молочной железы, ДНК человека.

Объектом исследования являются дендритные клетки человека

Целью настоящего этапа исследования являлась сравнительная оценка функциональной способности интерферон-альфа-индуцированных (ИФН-ДК) и ИЛ-4-индуцированных дендритных клеток (ИЛ4-ДК) активировать Т-клетки. В рамках тематики этапа предполагалось оценить способность различных типов дендритных клеток к активации Th1 и Th2 Т-клеток, а также цитотоксических CD8+ Т-лимфоцитов с внутриклеточным содержанием перфорина. Планировалось также оценить количественное содержание цитотоксических CD8+перфорин+ Т-лимфоцитов в периферической крови здоровых доноров и больных раком молочной железы, прошедших курсы программной химиотерапии в ходе проведения II фазы Клинических испытаний препарата фрагментированной ДНК человека (Панаген).

Проведенные исследования продемонстрировали, что ИФН-ДК обладают схожей с ИЛ4-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 гемоимунопозеза (ИЛ-7, Г-КСФ, ГМ-КСФ), а также СХС и СС хемокинов (ИЛ-8, MCP-1). При этом 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 . По сравнению с ИЛ4-ДК «интерфероновые» дендритные клетки обладают более выраженной способностью активировать Th1-клетки, что проявляется 10-кратным увеличением количества CD3+ИФН- γ + Т-клеток в смешанной культуре лимфоцитов. Кроме того, ИФН-ДК характеризуются также наличием умеренной Th2-стимуляторной активности, которая проявляется в смешанной культуре лимфоцитов статистически значимым увеличением количества CD3+ИЛ-4+Т-клеток, и практически отсутствует у ИЛ4-ДК. Показано, что ИФН-ДК характеризуются способностью к активации цитотоксических Т-лимфоцитов, экспрессирующих внутриклеточно перфорин. При этом, данная функциональная активность ИФН-ДК может быть дополнительно усилена при использовании в качестве дозревающего стимула нативной ДНК человека (препарат Панаген).

Отработан стандарт лабораторного тестирования функциональной активности дендритных клеток *in vitro*.

Степень внедрения – написан и утвержден лабораторно-технологический регламент получения ИФН-ДК человека с целью последующего создания индивидуальных дендритноклеточных вакцин. Определены основные критерии оценки фенотипических и функциональных свойств дендритных клеток.

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

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

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

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

В итоге исследований, проведенных на втором этапе, показано, что ИФН-ДК оказывают более выраженный стимулирующий эффект на активацию Th1- и Th2-клеток, а также способны индуцировать генерацию цитотоксических CD8+перфорин+ Т-лимфоцитов. Полученные результаты свидетельствуют, что ИФН-ДК обладают высоким функциональным потенциалом для запуска/регуляции реакций врожденного и адаптивного (клеточного и гуморального) иммунитета.

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

Предусмотренные календарным планом задания выполнены полностью.

Содержание

Определения, обозначения и сокращения	6
Введение	7
Основная часть	9
1 Литературный обзор	9
2 Материалы и методы	10
3 Результаты и обсуждение	12
3.1, 3.2 Определение способности ДК к активации Th1- и Th2-клеток	12
3.3 Определение способности ДК, полученных от здоровых доноров, к активации цитотоксических Т-лимфоцитов с внутриклеточным содержанием перфорины	15
3.4 Оценка количественного содержания цитотоксических CD8+ Т-лимфоцитов с внутриклеточным содержанием перфорины в периферической крови пациентов, прошедших курсы программной химиотерапии в ходе проведения II фазы клинических испытаний препарата Панаген.	17
3.5 Сопоставление результатов по количественному содержанию цитотоксических CD8+ Т-лимфоцитов с внутриклеточным содержанием перфорины, полученных от здоровых доноров и онкологических больных	20
Заключение	22
Список использованных источников	24

Определения, обозначения и сокращения

ГМ-КСФ	гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
ДК	дендритные клетки
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ИЛ	интерлейкины
ИФН- α	интерферон альфа
ЛПС	липополисахарид из стенки бактерий
МНК	моноклеарные клетки
РМЖ	рак молочной железы
СКЛ	смешанная культура лимфоцитов
ФНО- α	фактор некроза опухоли альфа
ХТ	химиотерапия
CD	кластер дифференцировки

Введение

Дендритные клетки (ДК) являются высокоспециализированными антиген-презентирующими 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 весьма гетерогенную популяцию в зависимости от степени их зрелости (незрелые, частично-зрелые или зрелые ДК), либо происхождения (миелоидные или лимфоидные ДК). Соответственно функциональная активность этих клеток может также существенно различаться, вплоть до оппозитных эффектов.

Получение ДК в культуре *in vitro* также предполагает использование различных протоколов, например, генерацию ДК в присутствии ГМ-КСФ и ИЛ-4 (ИЛ4-ДК) или в присутствии ГМ-КСФ и ИФН- α (ИФН-ДК). Указанные типы ДК различаются по времени генерации, фенотипу и продукции различных цитокинов. Так, например, нами на первом этапе исследований было показано, что по своим фенотипическим характеристикам популяция ИФН-ДК является «частично зрелыми» (semi-mature) клетками, и отличается от ИЛ4-ДК повышенным содержанием CD123+ ДК, а также клеток, экспрессирующих B7-N1 и TRAIL, что свидетельствует об их более высоком цитотоксическом потенциале. Кроме того, ИФН-ДК отличаются повышенной продукцией Th1/провоспалительных (ИФН- γ , ИЛ-2, ИЛ-17, ИЛ-1 β) и Th2/противовоспалительных цитокинов (ИЛ-10, ИЛ-5), а также Г-КСФ и MCP-1. Полученные нами результаты согласуются с данными других авторов, которые также показали, что по сравнению с ИЛ4-ДК, ИФН-ДК характеризуются низким уровнем продукции ИЛ-12, но высоким уровнем секреции ИФН- α , ИЛ-6, ИЛ-1 β , ИЛ-18, ИЛ-4 и ИЛ-10 [1-3].

Соответственно, указанные типы ДК могут различаться и по способности активировать Th1/Th2 ответ. Участие ДК в поляризации иммунного ответа является важной регуляторной функцией ДК. ДК могут индуцировать Т-клеточный ответ как по Th1-, так и Th2-типу [4]. Поскольку важную роль в эффективном противоопухолевом и противовирусном иммунном ответе играют Th1-клетки, то оценка способности ДК активировать Th1-ответ представляет особый интерес и рассматривается в качестве потенциального критерия эффективности дендритноклеточных вакцин при их клинической апробации у больных с онкопатологией и вирусной инфекцией.

Поэтому целью второго этапа исследований явилась сравнительная оценка функциональной способности ИФН-ДК и ИЛ4-ДК индуцировать Т-клетки. Предполагалось решить следующие задачи: 1) оценить способность ДК к активации Th1- и Th2-клеток; 2) определить способность ДК, полученных от здоровых доноров, к активации цитотоксических Т-лимфоцитов с внутриклеточным содержанием перфорина; 3) оценить количественное содержание цитотоксических CD8+перфорин+ Т-лимфоцитов в периферической крови пациентов раком молочной железы (РМЖ), прошедших курсы программной химиотерапии (ХТ) в ходе проведения II фазы клинических испытаний препарата Панаген; 4) провести сравнительный анализ количества циркулирующих цитотоксических CD8+ Т-лимфоцитов с внутриклеточным содержанием перфорина в группах здоровых доноров и онкологических больных РМЖ и злокачественными опухолями головного мозга.

Проведенные исследования продемонстрировали, ИФН-ДК обладают схожей с ИЛ4-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 гемоиммунопоеза (ИЛ-7, Г-КСФ, ГМ-КСФ), а также СХС и СС хемокинов (ИЛ-8, MCP-1). При этом 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 . По сравнению с ИЛ4-ДК «интерфероновые» ДК обладают более выраженной способностью активировать Th1-клетки, что проявляется 10-кратным увеличением количества CD3+ИФН- γ + Т-клеток в смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ). Кроме того, ИФН-ДК характеризуются также наличием умеренной Th2-стимуляторной активности, которая проявляется в СКЛ статистически значимым увеличением количества CD3+ИЛ-4+ Т-клеток, и практически отсутствует у ИЛ4-ДК. Показано, что ИФН-ДК характеризуются способностью к активации цитотоксических Т-лимфоцитов, экспрессирующих внутриклеточно перфорин (CD8+Pr+ Т-клеток). При этом, данная функциональная активность ИФН-ДК может быть дополнительно усилена при использовании в качестве дозревающего стимула нативной ДНК человека (препарат Панаген). Таким образом, ИФН-ДК по сравнению с ИЛ4-ДК могут более активно индуцировать реакции клеточного и гуморального иммунитета.

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

Основная часть

1 Литературный обзор

ДК относятся к классу антигенпрезентирующих клеток, обладающих высокой способностью представлять различные антигены (антигенные детерминанты патогенных возбудителей, опухолевые антигены, аллоантигены) Т-клеткам и индуцировать адаптивный антигенспецифический иммунный ответ. Наряду с этим ДК способны выполнять регуляторные функции, контролируя силу и направленность иммунного ответа, а также обладают эффекторными функциями (например, цитотоксической активностью), свойственными клеткам врожденного иммунитета. Многочисленные экспериментальные исследования *in vivo* и *in vitro* показали, что ДК, нагруженные опухолевыми антигенами или антигенами инфекционных возбудителей, индуцируют эффективный противоопухолевый и противоинфекционный иммунный ответ. Эти данные обосновывают целесообразность применения ДК в качестве адъювантной иммунотерапии. Кроме того, в последние годы был достигнут значительный прогресс в методах выделения/генерации большого количества ДК *in vitro*, что существенно ускорило активное проведение клинических испытаний дендритноклеточных вакцин при лечении различных онкологических и инфекционных заболеваний.

Согласно данным литературы, зрелые ИЛ4-ДК способны к эффективной активации Th1-ответа, однако характеризуются относительно низкой миграционной активностью. Поэтому индукция Th1-ответа *in vivo* при использовании таких ДК-вакцин может быть недостаточно эффективной.

ДК, генерируемые в присутствии ИФН- α , обладают более высокой миграционной активностью [2], и, по мнению некоторых авторов, также способны активировать Th1, но при этом сохраняют способность и к активации Th2-ответа, т.е. могут обладать более широким функциональным репертуаром [1, 3]. Считается что генерация ДК в присутствии ИФН- α в большей степени отражает физиологические условия в организме *in situ*, поскольку ИФН- α является ранним медиатором врожденного иммунного ответа, продуцируется в больших количествах в ответ на стимуляцию инфекционными антигенами и провоспалительными цитокинами и обладает выраженным стимулирующим эффектом на клеточный и гуморальный иммунитет. Очевидно, что активация интерфероновой системы является наиболее ранним механизмом, запускающим индукцию и созревание ДК. Соответственно, использование ИФН- α для генерации ДК представляется более предпочтительным подходом по сравнению с применением ИЛ-4 [5, 6].

Функциональная характеристика ИЛ4-ДК и ИФН-ДК представляет большой интерес в плане обоснования выбора наиболее оптимального типа ДК для клинической практики. Однако сравнительная оценка ИЛ4-ДК и ИФН-ДК в отношении активации Th1- и Th2-клеток, а также исследование их способности индуцировать цитотоксические CD8+ Т-лимфоциты ранее не проводились.

Вышеизложенное определило цель второго этапа работы – провести сравнительную оценку функциональной способности ИФН-ДК и ИЛ4-ДК активировать Т-клетки.

2 Материалы и методы

В исследование были включены 52 практически здоровых доноров крови, представленных лицами обоего пола (25 мужчин и 27 женщин) в возрасте от 20 до 58 лет (средний возраст 37 ± 2 лет). 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, 40 нг/мл) и ИФН- α (Роферон-А, Roche, Швейцария, 1000 Ед/мл) с последующим дозреванием с липополисахаридом (ЛПС) *E.coli* (0114:B4, Sigma-Aldrich, 10 мкг/мл) в течение 24 ч.

Для генерации ИЛ4-ДК прилипающую фракцию МНК (полученную как в предыдущем протоколе) инкубировали в полной культуральной среде в присутствии ГМ-КСФ (Sigma-Aldrich, 40 нг/мл), ИЛ-4 (Sigma-Aldrich 40 нг/мл) и 5% сыворотки плодов коровы (БиолоТ, Санкт-Петербург) в течение 5 сут при 37°C в CO₂-инкубаторе при 5% CO₂. В последующие 48 ч в качестве дозревающего стимула также использовали ЛПС (*E.colli* 0114:B4, Sigma-Aldrich, 10 мкг/мл).

Способность ИФН-ДК и ИЛ4-ДК активировать Th1- и Th2-ответ оценивали в аллогенной СКЛ. В качестве отвечающих клеток использовали МНК доноров, истощенных от фракции адгезивных клеток, которые культивировали ($0,1 \times 10^6$ МНК/лунку, 37°C, 5% CO₂) в 96-луночных круглодонных планшетах в среде RPMI-1640, дополненной 10% инактивированной сыворотки АВ (IV) группы. Стимуляторами служили ДК в соотношении МНК:ДК=10:1. Культуральные супернатанты СКЛ собирали на 5 сут, и оценивали содержание Th1/Th2-цитокинов (ИФН- γ , ИЛ-2, ИЛ-1 β , ФНО- α , ИЛ-12(p70), ИЛ-17, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-13, ИЛ-7, Г-КСФ, ГМ-КСФ, ИЛ-8, МСР-1, МIP-1 β) методом проточной флюориметрии на 2-х лучевом лазерном автоматизированном

анализаторе (Bio-Plex Protein Assay System, Bio-Rad, США) с использованием коммерческих тест-систем 17Plex (определяемый динамический диапазон 2 – 32000 пкг/мл) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. При статистической обработке значения цитокинов, выходящие за нижнюю границу чувствительности метода (<2 пкг/мл), принимались за 1 пкг/мл, методом протеомного мультиплексного анализа.

Кроме того, способность ИФН-ДК и ИЛ4-ДК активировать Th1- и Th2-ответ оценивали также по количеству Т-клеток, содержащих внутриклеточно ИФН- γ и ИЛ-4, соответственно. Анализ экспрессии внутриклеточных цитокинов в популяции CD3+ Т-лимфоцитов, активированных ДК в СКЛ, проводили методом трехцветной проточной цитометрии (FACSCalibur, “Becton Dickinson”, США). Для этого МНК, истощенные от моноцитов, культивировали в 96-луночных планшетах в полной культуральной среде с 10% сыворотки плодов коровы в отсутствие (контроль) и в присутствии (опыт) ДК в соотношении 10:1 в течение 72 ч. За 18 ч до конца инкубации в культуру добавляли брефелдин (10 мкг/мл, “ICN”, США), затем клетки отмывали и инкубировали 15 мин при комнатной температуре с APC-мечеными моноклональными анти-CD3-антителами (Becton Dickinson, США). Далее проводили пермеабиллизацию клеток с помощью 0,2% раствора Твин-20 и инкубировали их с моноклональными FITC-конъюгированными анти-ИФН- γ и PE-мечеными анти-ИЛ-4 антителами (Becton Dickinson, США). При этом рассчитывали соответствующие индексы влияния ДК (ИВ_{ДК}) на количество Т-клеток, экспрессирующих ИФН- γ и ИЛ-4, по формуле $ИВ_{ДК} = \text{опыт}/\text{контроль}$.

Цитотоксические лимфоциты оценивали по количеству CD8+ Т-клеток с внутриклеточным содержанием перфорина (Pr+) методом проточной цитофлюориметрии. Для оценки внутриклеточной экспрессии перфорина в CD8+ Т-клетках, МНК обрабатывали FITC-мечеными анти-CD8 антителами («Сорбент», Москва). Пермеабиллизацию клеток проводили с использованием 0,2% раствора Твин-20, после чего клетки культивировали 30 мин с PE-мечеными анти-perforin антителами (Becton Dickinson, США). Образцы анализировали на проточном цитофлюориметре FACSCalibur с использованием программы Cellquest.

Для оценки способности ДК индуцировать цитотоксические Т-лимфоциты оценивали содержание CD8+Pr+ Т-клеток, генерируемых в СКЛ. Для этого аллогенные МНК стимулировали ДК в соотношении 1:10 в течение 48 ч в полной культуральной среде в присутствии 10% АВ(ІУ) сыворотки.

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

3 Результаты и обсуждение

3.1, 3.2 Определение способности ДК к активации Th1- и Th2-клеток

Способность ИФН-ДК и ИЛ-4-ДК к активации Th1- и Th2-клеток оценивали по уровню продукции Th1/провоспалительных и Th2/противовоспалительных цитокинов в 5-суточных супернатантах СКЛ, где стимуляторами служили ИФН-ДК или ИЛ4-ДК (таблица 1). ИФН-ДК и ИЛ4-ДК получали от одних и тех же доноров для исключения возможных различий, обусловленных различной экспрессией HLA-DR антигенов.

Таблица 1 – Влияние ИФН-ДК и ИЛ-4-ДК на продукцию Т-клетками Th1/провоспалительных и Th2/противовоспалительных цитокинов в СКЛ.

Цитокины (пг/мл)	Контроль ДК (-)	ИЛ-4-ДК (n=18)		ИФН-ДК (n=18)	
		Опыт ДК (+)	ИВ _{ДК}	Опыт ДК (+)	ИВ _{ДК}
Th1/провоспалительные цитокины					
ИФН- γ	513,0 \pm 94,5 (513)	3700,0 \pm 1005,0 * (2865)	6,9 \pm 0,9 (6,4)	4680,6 \pm 1018,0 *,# (3888)	8,7 \pm 0,7 # (8,4)
ИЛ-2	36,0 \pm 4,9 (36)	167,4 \pm 15,4 * (154)	5,2 \pm 0,7 (5,1)	168,0 \pm 9,8 * (154)	5,3 \pm 0,7 (5,7)
ИЛ-1 β	147,0 \pm 13,2 (147)	1460,3 \pm 180,8 * (1308)	7,4 \pm 1,8 (7,6)	1311,8 \pm 137,3 * (1204)	9,1 \pm 0,7 (9,3)
ФНО- α	49,5 \pm 7,4 (49)	374,6 \pm 15,0 * (370)	8,7 \pm 1,1 (8,3)	356,3 \pm 92,8 * (263)	7,6 \pm 1,3 (7,5)
ИЛ-12(p70)	16,5 \pm 1,7 (16,5)	45,6 \pm 3,7 * (44,5)	2,9 \pm 0,2 (3,1)	41,6 \pm 1,8 * (40,5)	2,8 \pm 0,4 (2,6)
ИЛ-17	338,0 \pm 78,3 (338)	1160,6 \pm 173,8 * (981)	4,8 \pm 0,7 (4,8)	1161,0 \pm 90,3 * (1061)	4,9 \pm 0,9 (5,2)
Th2/противовоспалительные цитокины					
ИЛ-4	51,5 \pm 10,4 (51,5)	271,1 \pm 18,4 * (256)	7,2 \pm 1,4 (6,8)	255,1 \pm 8,5 * (250)	6,9 \pm 1,4 (6,5)
ИЛ-5	29,0 \pm 4,9 (29)	35,8 \pm 9,3 (25,5)	1,2 \pm 0,15 (1,1)	50,5 \pm 16,8 *,# (24)	3,7 \pm 0,7 (3,0)
ИЛ-6	4602,5 \pm 573,6 (4602)	22462,3 \pm 3156,0 * (22390)	5,7 \pm 1,1 (5,5)	23911,1 \pm 1186,5 * (23367)	5,7 \pm 0,7 (5,6)
ИЛ-10	69,5 \pm 3,2 (69,5)	702,3 \pm 49,3 * (734)	10,6 \pm 1,2 (12,0)	649,9 \pm 84,1 * (620,0)	9,9 \pm 1,7 (9,3)
ИЛ-13	53,0 \pm 6,0 (53,0)	331,8 \pm 83,0 * (215)	6,0 \pm 1,0 (5,8)	351,8 \pm 64,6 * (298,5)	6,3 \pm 0,6 (5,8)
Факторы иммуногемопозеза					
ИЛ-7	2,0 \pm 0,01 (2,0)	7,9 \pm 2,0 * (8,0)	3,9 \pm 1,0 (4,0)	18,0 \pm 10,7 * (8,0)	9,0 \pm 5,3 (5,9)
Г-КСФ	519,0 \pm 13,6 (519)	10255,4 \pm 953,0 * (10190)	19,7 \pm 1,7 (19,6)	8114,4 \pm 1012,4 * (8267)	15,6 \pm 2,0 (14,9)
ГМ-КСФ	495,0 \pm 44,9 (495)	1548,2 \pm 187,1 * (1559)	3,4 \pm 0,5 (3,5)	1470,0 \pm 104,7 * (1381)	3,1 \pm 0,3 (3,2)
Хемокины					

ИЛ-8	27193,0±2715,7 (271193)	46954,0±6665,1 * (47444)	1,8±0,3 (1,5)	53278,1±2075,0 * (53774)	2,11±0,23 (2,1)
МСР-1	4887,0±328,8 (4887)	6581,3±527,2 (6076)	1,4±0,1 (1,4)	5868,1±398,5 (5682)	1,2±0,03 (1,2)
МІР-1β	3994,5±483,6 (3994)	20448,5±2462,2 * (21173)	5,5±0,5 (5,1)	28525,4±1373,1 *,# (27081)	8,0±1,1 # (7,5)

Примечание: представлены средние значения уровня продукции (пкг/мл) цитокинов Т-клетками. Контроль ДК(-) – спонтанная продукция цитокинов Т-клетками в отсутствие ДК. Опыт ДК(+) – продукция цитокинов Т-клетками, стимулированными ДК (в соотношении МНК/ДК=10/1). ИВ_{ДК} – индекс влияния ДК, рассчитанный по формуле ИВ_{ДК} = опыт/контроль. В скобках представлены медианы значений. * – достоверность различий между спонтанной и ДК-индуцированной продукцией, # – достоверность различий между продукцией цитокинов присутствии ИФН-ДК по сравнению с ИЛ-4-ДК; #- достоверность различий ИВ ИФН-ДК и ИЛ-4-ДК ($p_u < 0,05$, u – критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Было установлено, что оба типа ДК обладают сопоставимой способностью активировать Т-клетки к продукции Th1/провоспалительных цитокинов (ИЛ-2, ИЛ-1β, ФНО-α, ИЛ-12p70, ИЛ-17). В то же время ИФН-ДК по сравнению с ИЛ4-ДК индуцировали более высокий уровень продукции ИФН-γ ($p_u < 0,05$).

Анализ содержания Th2/противовоспалительных цитокинов в культурах СКЛ показал, что ИФН-ДК и ИЛ4-ДК примерно в равной степени активировали Т-клетки к продукции ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10 и ИЛ-13, тем не менее, ИФН-ДК оказывали более выраженный стимулирующий эффект на Th2-клетки, секретирующие ИЛ-5 ($p_u < 0,05$).

ИФН-ДК и ИЛ-4-ДК обладали сходной способностью активировать Т-клетки к продукции ростовых факторов иммуногемопоеза (ИЛ-7, Г-КСФ и ГМ-КСФ) и хемокины (ИЛ-8 и МСР-1). В то же время, ИФН-ДК индуцировали более выраженную продукцию МІР-1β ($p_u < 0,05$), обеспечивающего рекрутирование Т-клеток.

В литературе имеются сведения о том, что миелоидные ИФН-ДК экспрессируют мРНК МСР-1, секретируют сам белок [7], а также способны экспрессировать другие хемокины – ИЛ-8, RANTES и соответствующие рецепторы к ним [8]. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что ДК способны индуцировать продукцию указанных хемокинов Т-клетками, и, следовательно, могут контролировать миграцию различных типов клеток опосредованно через регуляцию функций Т-лимфоцитов.

Таким образом, ИФН-ДК обладают схожей с ИЛ4-ДК способностью активировать Т-клетки к продукции Th1/провоспалительных (ИЛ-2, ИЛ-1β, ФНО-α, ИЛ-12p70, ИЛ-17) и Th2/противовоспалительных цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10 и ИЛ-13), ростовых факторов гемоиммунопоэза (ИЛ-7, Г-КСФ, ГМ-КСФ), а также СХС и СС хемокинов (ИЛ-8, МСР-1). При этом 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 – МIP-1 β .

Таблица 2 – Влияние ИФН-ДК и ИЛ4-ДК на активацию Th1- и Th2- клеток в СКЛ.

% CD3+ Т-клеток	ИЛ4-ДК (n=21)			ИФН-ДК (n=24)		
	Контроль ДК(-)	Опыт ДК(+)	ИВ _{ДК}	Контроль ДК(-)	Опыт ДК (+)	ИВ _{ДК}
ИФН- γ +	2,1 \pm 0,19 (0,1-2,7)	7,5 \pm 0,6* (2,3-11,2)	5,2 \pm 1,8 (1,9-14,5)	1,8 \pm 0,17 (0,3-2,7)	10, 5 \pm 0,5 * # (6,0-14,0)	11,1 \pm 2,2 # (3,2-36,0)
ИЛ-4+	2,1 \pm 0,31 (0,1-4,2)	2,96 \pm 0,42 (1,2-8,0)	3,2 \pm 0,9 (0,8-9,4)	1,45 \pm 0,22 (0,15-3,7)	5,1 \pm 0,61 * # (1,2-10,0)	5,8 \pm 1,7 (1,5-12,3)

Примечание: данные представлены в виде $M \pm SE$ (в скобках диапазон минимальных и максимальных значений). Определяли процентное содержание CD3+ Т-клеток с внутриклеточным содержанием ИФН- γ и ИЛ-4 в СКЛ в присутствии ИФН-ДК и ИЛ4-ДК. ИВ_{ДК} – индекс влияния ДК, рассчитанный по формуле $ИВ_{ДК} = \text{опыт}/\text{контроль}$. * – достоверность различий показателей по сравнению с контролем, # – достоверность различий между ИФН-ДК и ИЛ4-ДК ($p_u < 0,05$, u – критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Чтобы оценить влияние ИФН-ДК и ИЛ4-ДК на поляризацию Th1- и Th2- лимфоцитов в СКЛ дополнительно исследовали также относительное количество CD3+ Т-клеток с внутриклеточным содержанием ИФН- γ и ИЛ-4, соответственно. Было установлено (таблица 2), что в присутствии ИФН-ДК содержание CD3+ИФН- γ + Т-лимфоцитов (Th1-клеток) увеличивается в среднем в 10 раз (ИВ_{ДК}=11,1 \pm 2,2). ИЛ4-ДК также обладали Th1-стимулирующей активностью, однако проявляли ее в меньшей степени, поскольку индуцировали лишь 5-кратное возрастание CD3+ИФН- γ + Т-клеток в СКЛ (ИВ_{ДК}=5,2 \pm 1,8; $p_u < 0,05$). При этом следует отметить, что активация Т-клеток в аллогенной СКЛ «интерфероновыми» ДК сопровождалась также статистически достоверным увеличением количества CD3+ИЛ-4+ Т-клеток, в то время как ИЛ4-ДК практически не обладали Th2-стимулирующей активностью.

Полученные данные позволяют полагать, что по сравнению с ИЛ4-ДК «интерфероновые» ДК обладают более выраженной способностью активировать Th1 клетки, а также характеризуются наличием умеренной Th2-стимуляторной активности, которая практически отсутствует у ИЛ4-ДК.

Как известно, иммунный ответ, который регулируется и контролируется Th1- цитокинами, является ключевым в противоопухолевой защите. При этом известно, что при дефиците Th2-цитокинов эффективность противоопухолевой защиты может снижаться [4, 9], тогда как сбалансированный иммунный ответ, который развивается с

участием как Th1-, так и Th2-цитокинов, стимулирует рекрутирование дополнительных противоопухолевых эффекторных клеток и индуцирует образование антител, специфичных к опухолиассоциированным антигенам. Таким образом, индукция клеточного, Th1-контролируемого иммунного ответа, а также гуморальных, Th2-контролируемых иммунных реакций может значительно усилить эффективность противоопухолевой защиты. В этом аспекте использование ИФН-ДК представляется более перспективным.

3.3 Определение способности ДК, полученных от здоровых доноров, к активации цитотоксических Т-лимфоцитов с внутриклеточным содержанием перфорины

Эффективность генерации цитотоксических Т-клеток в процессе противоопухолевого ответа во многом определяется функциональной активностью ДК, презентующих опухолевые антигены. Развитие опухоли, как правило, ассоциировано с уменьшением количества ДК и нарушением их функций, в том числе вследствие задержки их созревания, что может обуславливать низкую эффективность антигенспецифического противоопухолевого иммунного ответа. В этой связи можно полагать, что воздействия, направленные на индукцию созревания ДК, например, путем стимуляции ДК двуцепочечной, нативной ДНК человека (препарат Панаген) могут повысить их способность к активации цитотоксических Т-клеток.

Чтобы проверить это предположение, было проведено сравнительное исследование способности интактных и ДНК-обработанных ДК стимулировать генерацию цитотоксических Т-клеток. Для этого у 7 доноров генерировали ИФН-ДК в отсутствие (ДК_{ИНТ}) и присутствии нативной ДНК (ДК_{ПАНАГЕН}). В качестве позитивного контроля для стимуляции созревания ДК использовали стандартный стимул – ЛПС (ДК_{ЛПС}). Затем полученные ДК использовали в качестве стимуляторов в СКЛ. Через 48 ч в культуре СКЛ оценивали количество цитотоксических CD8⁺ Т-лимфоцитов с внутриклеточным содержанием перфорины (CD8⁺Pr⁺ Т-клетки). Количество CD8⁺Pr⁺ Т-клеток среди свежесыведенных отвечающих МНК служило контролем.

Таблица 3 – Влияние интактных и Панаген-обработанных ДК здоровых доноров на индукцию CD8⁺Pr⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов в СКЛ.

ДК доноров	Контроль	Относительное содержание CD8 ⁺ Pr ⁺ Т-клеток (%) в СКЛ, индуцированной в присутствии					
		ДК _{ИНТ}	ИВ (ДК _{ИНТ})	ДК _{ЛПС}	ИВ ДК _{ЛПС}	ДК _{ПАНАГЕН}	ИВ ДК _{ПАНАГЕН}

1	3,8	13	3,4	13	3,4	15	3,9
2	3,8	10	2,6	12	3,2	14	3,7
3	3,8	14	3,7	14	3,7	12	3,15
4	3,8	12	3,45	10	2,6	18	4,7
5	2,5	7,5	3	7,5	3	10	4
6	2,5	5	2	7,5	3	7,5	3
7	2,5	15	6	12,5	5	22,5	5
M±m	3,2±0,26	10,9±1,4 *	3,4±0,5	10,9±1,0 *	3,4±0,3	14,1±1,9 *	4,5±0,8 *

Примечание: данные представлены в виде индивидуальных и средних значений в серии из двух экспериментов. В первом эксперименте ДК от 4 доноров (доноры 1-4) использовались в качестве стимуляторов в СКЛ против МНК донора 8, во втором – ДК от трех доноров (доноры 6-7) для стимуляции СКЛ против МНК донора 9. В качестве контроля использованы свежeweделенные МНК. ИВ (индекс влияния) рассчитывали как соотношение количества CD8+Pr+ Т-клеток в СКЛ, индуцированной соответственно ДК_{ИНТ}, ДК_{ЛПС}, ДК_{ПАНАГЕН} к количеству этих клеток в культурах свежeweделенных МНК.

* – достоверность различий показателей по сравнению с контролем ($p_u < 0,05$, u – критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Как следует из данных таблицы 3, свежeweделенные МНК доноров характеризовались низким содержанием CD8+Pr+ Т-клеток (3,2±0,26%). Незрелые ИФН-ДК (ДК_{ИНТ}) индуцировали в СКЛ достоверное 3-кратное увеличение относительного количества цитотоксических Т-лимфоцитов. Обработка ДК стандартным дозревающим стимулом – ЛПС (ДК_{ЛПС}) – только в 2 из 7 случаев (доноры №2 и №6) приводила к незначительному усилению их способности активировать цитотоксические Т-клетки. В то же время использование в качестве дозревающего стимула нативной ДНК человека (ДК_{ПАНАГЕН}) оказывало более выраженный эффект, в результате которого ДК 6 из 7 обследованных доноров (кроме донора №3) повысили свою способность к активации CD8+Pr+ Т-клеток. Таким образом, ИФН-ДК характеризуются способностью к активации цитотоксических Т-лимфоцитов, экспрессирующих внутриклеточно перфорин. При этом, данная функциональная активность ИФН-ДК может быть дополнительно усилена при использовании в качестве дозревающего стимула нативной ДНК человека (Панагена), тогда как ЛПС оказывает менее значимый стимулирующий эффект.

3.4 Оценка количественного содержания цитотоксических CD8+ Т-лимфоцитов с внутриклеточным содержанием перфорина в периферической крови пациентов, прошедших курсы программной химиотерапии в ходе проведения II фазы клинических испытаний препарата Панаген.

Известно, что цитотоксические Т-лимфоциты осуществляют защиту против многих вирус-инфицированных, а также опухолевых клеток. Цитотоксический эффект осуществляется за счет взаимодействия Fas/FasL, ФНО-опосредованным путем, а также посредством перфорина/гранзима В [10, 11]. Перфорин продуцируется гранулами цитотоксических эффекторных клеток, формирует поры в мембранах клеток-мишеней, облегчая проникновение гранзима В в клетку-мишень [12], что приводит к фрагментации ДНК и клеточной гибели за счет активации каспазы 3 [13].

Одной из задач 2 этапа исследований являлась оценка количественного содержания цитотоксических CD8+ Т-лимфоцитов с внутриклеточным содержанием перфорина в периферической крови пациентов в ходе проведения II фазы клинических испытаний по протоколу «Двойное-слепое, многоцентровое, плацебо-контролируемое исследование безопасности, и лейкостимулирующей активности препарата «Панаген» у пациентов с раком молочной железы».

В исследование включались пациенты женского пола любого этнического происхождения с диагнозом РМЖ, отвечающие следующим критериям:

- Подписанное и датированное письменное информированное согласие.
- Женщины в возрасте ≥ 18 лет.
- РМЖ на стадии II, III или IV (с отдаленными метастазами).
- Пациентам планируется проводить ХТ циклофосфаном/ доксорубицином/ фторурацилом в качестве стандартной ХТ для лечения РМЖ.
- Пациенты раньше не получали ХТ.
- Функциональный статус по шкале Восточной кооперативной онкологической группы (ECOG) ≤ 2 .
- Количество лейкоцитов $\geq 3 \times 10^9$ /л до начала лечения.
- Количество нейтрофилов $\geq 1,5 \times 10^9$ /л до начала лечения.
- Число тромбоцитов $\geq 100 \times 10^9$ /л до начала лечения.
- Адекватная функция сердца.
- Адекватная функция печени, т.е. активность АЛТ/АСТ $< 2,5 \times$ верхний предел нормы (ВПН), активность щелочной фосфатазы $< 5 \times$ ВПН, содержание билирубина $< 1,5 \times$ ВПН.

- Адекватная функция почек, т.е. содержание креатинина в сыворотке крови $< 1,5 \times \text{ВПН}$, содержание мочевины $< \text{ВПН}$. Клиренс по эндогенному креатинину.

Все пациентки получали ХТ по схеме: Циклофосфан 500 мг/м^2 в/в 1 день, доксорубин 50 мг/м^2 в/в 1 день, фторурацил 500 мг/м^2 в/в 1 день. На фоне ХТ пациенты основной группы принимали препарат Панаген (нативной ДНК человека) в дозе 30 мг/сутки при дробном равномерном приеме в течение активного периода суток (одна таблетка шесть раз в день, каждые два часа). Пациенты начинали прием препарата сразу непосредственно после проведенной ХТ и принимали 3 таблетки в течение 6 часов, то есть по одной таблетке каждые два часа. После этого пациенты прекращали прием препарата, и возобновляли его через 42 часа, то есть через 48 часов после проведенной ХТ (день 3) и продолжали в течение 17 дней до 20 дня после ХТ (включительно). Если следующий курс ХТ откладывался (приемлема задержка на 1 неделю), то пациенты продолжали прием препарата и заканчивали прием препарата за 1 день до следующего цикла ХТ. Аналогичная схема приема препарата применялась и на 2 курсе ХТ (Рис. 1).

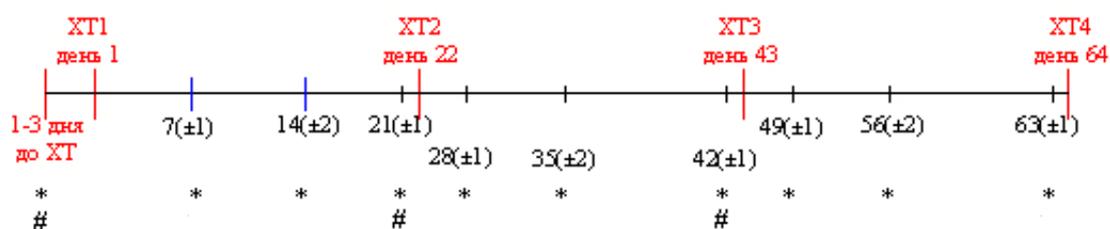


Рисунок 1. Схема приема препарата. * – Анализ крови на абсолютное количество лейкоцитов и нейтрофилов, общий анализ крови. # – Определение количества цитотоксических CD8+Pr+ Т-клеток.

В цикле ХТ-1 образцы крови для определения относительного и абсолютного числа лейкоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов и цитотоксических CD8+Pr+ Т-клеток собирали за 1-3 дня до ХТ и на 21 (± 1) день после ХТ. В цикле ХТ-2 образцы крови собирали 42 (± 1) день после ХТ.

Поскольку исследование является плацебо-контролируемым, то часть пациентов контрольной группы будет принимать таблетки, не содержащие активного ингредиента, и проходить лабораторное обследование по аналогичной схеме.

Таблица 4 – Содержание CD8+Pr+ Т-лимфоцитов у больных РМЖ на ХТ на фоне приема препарата Панаген.

	M \pm SE	Содержание CD8+Pr+ Т-клеток в крови	
		(%)	(абс. количество, $\times 10^3/\text{мл}$)
Больные до начала	M \pm SE	10,37 \pm 1,66	0,18 \pm 0,04

ХТ n=12	Med Min-Max	9,5 2,0-18,0	0,20 0,03-0,44
Больные после ХТ-1 + Панаген (день 21) n=10	M±SE	10,0±1,36	0,21±0,04
	Med	9,0	0,20
	Min-Max	4,0-17,0	0,04-0,47
Больные после ХТ-2 + Панаген (день 42) n=6	M±SE	7,8±1,5	0,12±0,028
	Med	7,7	0,11
	Min-Max	2,1-12,6	0,03-0,22

Оценка исходного (до начала ХТ) количества CD8+Pr+ Т-клеток в периферической крови пациенток РМЖ (n=12) показала (таблица 4), что относительное содержание цитотоксических Т-лимфоцитов варьирует от 2 до 18%, составляя в среднем 9,5%, соответственно, абсолютное количество CD8+Pr+ Т-клеток составляет в среднем $0,20 \times 10^3$ /мл с диапазоном от 0,03 до $0,44 \times 10^3$ /мл. Таким образом, по нашим предварительным данным (обследовано только 12 пациенток), у больных РМЖ относительное и абсолютное содержание цитотоксических CD8+Pr+ Т-клеток перед началом курса ХТ сохранялось на уровне нормативных значений здоровых доноров (см. раздел 3.5).

Хорошо известно, что проведение ХТ у больных РМЖ сопровождается выраженным цитотоксическим действием, что приводит к панцитопении различной степени тяжести (снижению числа гранулоцитов, лимфоцитов, тромбоцитов, эритроцитов). Поэтому РМЖ представляет собой один из главных типов рака, при котором ХТ, как правило, сочетается с приемом лейкостимулирующих препаратов (лейкомакс, нейпоген, нейпомакс, лейкостим).

В проводимом нами исследовании традиционные лейкостимулирующие препараты не использовались, поскольку с этой целью оценивалась безопасность и эффективность препарата нативной ДНК человека (препарата Панаген). Из данных таблицы 4 видно, что на фоне курсового лечения препаратом Панаген относительное и абсолютное количество CD8+Pr+ Т-клеток у больных РМЖ после проведения ХТ-1 не снижалось и сохранялось на исходном уровне. И только после повторного курса ХТ отмечалось незначительное и статистически недостоверное снижение количества циркулирующих цитотоксических CD8+ Т-клеток.

После завершения запланированных клинических испытаний и сравнительного анализа количества цитотоксических Т-клеток у больных РМЖ в динамике проводимой ХТ в основной и контрольной группах (на фоне приема препарата-плацебо) можно будет более точно ответить на вопрос – насколько прием препарата нативной ДНК человека

(Панаген) позволяет профилактировать снижение численности цитотоксических клеток CD8+ Т-клеток с внутриклеточным содержанием перфорина.

3.5 Сопоставление результатов по количественному содержанию цитотоксических CD8+ Т-лимфоцитов с внутриклеточным содержанием перфорина, полученных от здоровых доноров и онкологических больных

Сравнительный анализ относительного и абсолютного количества цитотоксических CD8+Pr+ Т-клеток в группах здоровых доноров и больных с онкопатологией показал (таблица 5), что пациенты РМЖ и больные злокачественными опухолями головного мозга, обследованные до начала лечения (химио/радиотерапии, оперативного лечения), характеризуются сохранным уровнем циркулирующих цитотоксических Т-клеток, который значимо не отличается от уровня здоровых доноров.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что у обследованных нами онкологических больных сохраняется резерв эффекторных цитотоксических Т-клеток, которые могут быть индуцированы к реализации антиген-специфического противоопухолевого иммунного ответа с помощью дендритноклеточных вакцин, или на фоне приема препарата нативной ДНК человека, которая активирует ДК *in situ*.

В экспериментальных исследованиях и клинической практике активно разрабатывают стратегии лечения злокачественных новообразований, в которых помимо деструктивного действия на опухолевые клетки цитостатиков используются подходы, направленные на усиление иммунных механизмов противоопухолевой защиты [14, 15].

Одним из индукторов противоопухолевого иммунитета может выступать двуцепочечная ДНК. Было показано, что двуцепочечная ДНК, введенная извне или присутствующая в организме в результате гибели клеток, приводит к созреванию ДК, и индуцирует гуморальный и клеточный иммунитет [16, 17].

Таблица 5 – Содержание CD8+Pr+ Т-лимфоцитов в периферической крови здоровых доноров и онкологических больных.

		Содержание CD8+Pr+Т-клеток в крови	
		(%)	(абс. количество, $\times 10^3$ /мл)
Здоровые доноры (n=27)	M±S.E	10,8±0,89	0,17±0,02
	Med	9,0	0,17
	Min-Max	4,0-21,0	0,14-0,4
РМЖ (n=12)	M±S.E	10,37±1,66	0,18±0,04
	Med	9,5	0,20

	Min-Max	2,0-18,0	0,03-0,44
Злокачественные опухоли головного мозга (n=26)	M±S.E	9,9±0,85	0,2±0,03
	Med	9,0	0,17
	Min-Max	2,0-20,0	0,03-0,63

Иммуностимулирующий эффект ДНК может быть особенно выраженным на фоне проводимой ХТ. Одним из широко используемых в клинической практике химиопрепаратов при лечении онкозаболеваний является циклофосфан. Его действие основано в первую очередь на прямом цитотоксическом действии на опухолевую клетку, приводящем к ее лизису. Также установлено, что циклофосфан оказывает влияние и на регуляторные CD4+CD25+FoxP3 T-клетки. T-регуляторные клетки преимущественно аккумулируются в микроокружении опухоли и лимфоидных органах [18], где подавляют активацию и пролиферацию других иммунных клеток организма [18-22]. В умеренных дозах циклофосфан не только уменьшает количество T-регуляторных клеток [23-25], но и приводит к снижению их функциональной активности [22, 24], что позволяет ослабить иммуносупрессорный фон в микроокружении опухоли и активировать противоопухолевый иммунный ответ [21, 22, 25].

Существуют препараты, которые способны повышать иммуногенность опухолевых клеток непосредственно в организме. К ним относятся цитостатики антрациклинового ряда – доксорубин, идарубин, митоксантрон. Было показано, что для активации противораковой активности иммунной системы необходима индукция экспозиции белка калретикулина на поверхности клеточной мембраны погибающей клетки [26, 27]. Калретикулин является кальций-связывающим лектиновым шапероном и представлен, главным образом, на эндоплазматической мембране. Его экспозиция на поверхности умирающих клеток служит сигналом «eat-me» для близлежащих фагоцитирующих клеток, в том числе, и для ДК [26, 28]. Такое свойство доксорубина существенно повышает иммуногенность опухоли [27, 29].

Таким образом, использование цитостатиков (циклофосфан и доксорубин) в комбинации с иммунотерапевтическими подходами (использование ДК-вакцин, препаратов нативной ДНК) позволяет в настоящее время сформировать наиболее эффективную противоопухолевую стратегию. Циклофосфан оказывает прямое повреждающее действие на опухолевые клетки и одновременно выключает активность T-регуляторных лимфоцитов. Доксорубин также разрушает опухоль и одновременно делает опухолевый дебрис иммуногенным. ДК, генерированные *in vitro*, или активированные *in situ* препаратом нативной ДНК (Панаген) активируют Th1- и Th2-

клетки, индуцируют генерацию цитотоксических CD8+Pr+ Т-лимфоцитов, и, таким образом, запускают развитие реакций врожденного и адаптивного (клеточного и гуморального) иммунитета, направленных против остаточных опухолевых клеток.

Заключение

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

Важнейшим отличием применения ИФН- α для активации и получения ДК *in vitro* от классического индуктора ИЛ-4, традиционно используемого в зарубежных протоколах, является более физиологичный путь генерации ДК, поскольку ИФН- α является ранним медиатором врожденного иммунитета, тогда как продукция ИЛ-4 в высоких дозах *in vivo* представляется маловероятной.

По нашим данным, 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 гемопоэтические 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 гемоиммунопозеза (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 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 нативной 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 противои инфекционного иммунного ответа.

Проведенные на втором этапе исследования позволили отработать стандарт лабораторного тестирования ДК *in vitro* и определить основные критерии 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 дендритноклеточных вакцин для лечения онкологических и инфекционных (вирусных) заболеваний человека, которая после регистрации в Росздравнадзоре может быть внедрена в практическое здравоохранение.

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

Предусмотренные календарным планом задания выполнены полностью.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Della Bella S., Nicola S., Riva A., Biasin M., Clerici M., Villa M. L. Functional repertoire of dendritic cells generated in granulocyte macrophage-colony stimulating factor and interferon- α // *J. Leuk. Biol.* – 2004. – V. 75. – P.106-116.
2. Parlato S., Santini S., Lapenta C., et al. Expression of CCR-7, MIP-3b, and Th1 chemokines in type I IFN-induced monocyte-derived dendritic cells – importance for the rapid acquisition of potent migratory and functional activities // *Blood.* – 2001. – V. 98. – P. 3022-3029.
3. Santini S., Pucchini T., Lapenta C., Parlato S., Logozzi M., Belardelli F. A new type 1 IFN-mediated pathway for the rapid differentiation of monocytes into highly active dendritic cells // *Stem Cells.* – 2003. – V. 21. – P. 357-362.
4. Moser M., Murphy K. M. Dendritic cell regulation of Th1-Th2 development // *Nat. Immunol.* – 2000. – V. 1. – P. 199-205.
5. Belardelli F., Gresser I. The neglected role of type I interferon in the T-cell response: implications for its clinical use // *Immunol. Today.* – 1996. – V. 17. – P 369-375.
6. Mohty M., Vialle-Castellano A., Nunes J. A., Isnardon D., Olive D., Gaugler B. IFN- α skews monocyte differentiation into Toll-like receptor 7-expressing dendritic cells with potent functional activities // *J. Immunol.* – 2003. – V. 171. – P. 3385-3393.
7. Zhu K. J., Shen Q. Y., Zheng M., Mrowietz U. Effects of calcitriol and its analogues on interaction of MCP-1 and monocyte derived dendritic cells in vitro // *Acta. Pharmacol. Sin.* – 2001. – V. 22. – P. 62-65.
8. Zhu K., Shen Q., Ulrich M., Zheng M. Human monocyte-derived dendritic cells expressing both chemotactic cytokines IL-8, MCP-1, RANTES and their receptors, and their selective migration to these chemokines // *Chin. Med. J. (Engl).* – 2000. – V. 113. – P. 1124-1128.
9. Schuler T., Quin Z., Ibe S., Noben-Trauth N., Blankenstein T. T helper cell type 1-associated and cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunity is impaired in interleukin 4-deficient mice // *J. Exp. Med.* – 1999. – V. 189. – P. 803-810.
10. Millard P. J., Henkart M. P., Reynolds C. W., Henkart P. A. Purification and properties of cytoplasmic granules from cytotoxic rat LGL tumors // *J. Immunol.* – 1994. – V. 132. – P. 3197-3204.
11. Rouvier E., Luciani M. F., Golstein P. Fas involvement in Ca²⁺-independent T cell-mediated cytotoxicity // *J. Exp. Med.* – 1993. – V. 177. – P. 195-200.
12. Liu C. C., Walsh C. M., Young J. D. Perforin: structure and function // *Immunol. Today.* – 1995. – V 16. – P 194-201.

13. Atkinson E. A., Barry M., Darmon A. J., Shostak I., Turner P. C., Moyer R. W., Bleackley R. C. Cytotoxic T lymphocyte-assisted suicide: caspase 3 activation is primarily the result of the direct action of granzyme B // *J. Biol Chem.* – 1998. – V. 273. – P. 21261-21266.
14. Pulendran B. Variegation of the immune response with dendritic cells and pathogen recognition receptors // *J. Immunol.* – 2005. – V. 174. – P. 2457-2465.
15. Олишевский С. В., Козак В. В., Яниш Ю. В., Рыбалко С. Л., Шляховенко В. А. Иммуностимулирующая CpG-ДНК: перспективы клинического применения в онкологии // *Онкология.* – 2006. – Т. 8. – № 2. – С. 209-217.
16. Ishii K. J., Suzuki K., Coban C., Takeshita F., Itoh Y., Matoba H., Kohn L. D., Klinman D. M. Genomic DNA released by dying cells induces the maturation of APCs // *J. Immunol.* – 2001. – V. 167. – P. 2602-2607.
17. Martin D. A., Elkon K. B. Intracellular mammalian DNA stimulates myeloid dendritic cells to produce type I interferons predominantly through a toll-like receptor 9-independent pathway // *Arthritis Rheum.* – 2006. – V. 54. – P. 951-962.
18. Curiel T. J., Coukos G., Zou L., Alvarez X., Cheng P., Mottram P., Evdemon-Hogan M., Conejo-Garcia J. R., Zhang L., Burow M., Zhu Y., Wei S., Kryczek I., Daniel B., Gordon A., Myers L., Lackner A., Disis M. L., Knutson K. L., Chen L., Zou W. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival // *Nat. Med.* – 2004. – V. 10. – P. 942-949.
19. Onizuka S., Tawara I., Shimizu J., Sakaguchi S., Fujita T., Nakayama E. Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody // *Cancer Res.* – 1999. – V. 59. – P. 3128-3133.
20. Shimizu J., Yamazaki S., Sakaguchi S. Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity by removing // *J. Immunol.* – 1999. – V. 163. – P. 5211-5218.
21. Casares N., Arribillaga L., Sarobe P., Dotor J., Lopez-Diaz de Cerio A., Melero I., Prieto J., Borrás-Cuesta F., Lasarte J. J. CD4+/CD25+ regulatory cells inhibit activation of tumor-primed CD4+ T cells with IFN-gamma-dependent antiangiogenic activity, as well as long-lasting tumor immunity elicited by peptide vaccination // *J. Immunol.* – 2003. – V. 171. – P. 5931-5939.
22. Lutsiak M. E., Semnani R. T., De Pascalis R., Kashmiri S. V., Schlom J., Sabzevari H. Inhibition of CD4(+)25+ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide // *Blood.* – 2005. – V. 105. – P. 2862-2668.
23. Ercolini A. M., Ladle B. H., Manning E. A., Pfannenstiel L. W., Armstrong T. D., Machiels J. P., Bieler J. G., Emens L. A., Reilly R. T., Jaffee E. M. Recruitment of latent pools of

- high-avidity CD8(+) T cells to the antitumor immune response // *J. Exp. Med.* – 2005. – V. 201. – P. 1591-1602.
24. Ikezawa Y., Nakazawa M., Tamura C., Takahashi K., Minami M., Ikezawa Z. Cyclophosphamide decreases the number, percentage and the function of CD25+ CD4+ regulatory T cells, which suppress induction of contact hypersensitivity // *J. Dermatol. Sci.* – 2005. – V. 39. – P. 105-112.
 25. Motoyoshi Y., Kaminoda K., Saitoh O., Hamasaki K., Nakao K., Ishii N., Nagayama Y., Eguchi K. Different mechanisms for anti-tumor effects of low- and high-dose cyclophosphamide // *Oncol. Rep.* – 2006. – V. 16. – P. 141-146.
 26. Gardai S. J., McPhillips K. A., Frasch S. C., Janssen W. J., Starefeldt A., Murphy-Ullrich J. E., Bratton D. L., Oldenborg P. A., Michalak M., Henson P. M. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte // *Cell.* – 2005. – V. 123. – P. 321-334.
 27. Obeid M., Panaretakis T., Tesniere A., Joza N., Tufi R., Apetoh L., Ghiringhelli F., Zitvogel L., Kroemer G. Leveraging the immune system during chemotherapy: moving calreticulin to the cell surface converts apoptotic death from "silent" to immunogenic // *Cancer Res.* – 2007. – V. 67. – P. 7941-7944.
 28. Henson P. M., Hume D. A. Apoptotic cell removal in development and tissue homeostasis // *Trends Immunol.* – 2006. – V. 27. – P. 244-250.
 29. Obeid M. ERP57 membrane translocation dictates the immunogenicity of tumor cell death by controlling the membrane translocation of calreticulin // *J. Immunol.* – 2008. – V. 181. – P. 2533-2543.