

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:
ИССЛЕДОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ФЕНОТИПА И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ
АКТИВНОСТИ ИФН-ДК У БОЛЬНЫХ С ОНКОПАТОЛОГИЕЙ (ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫЕ
ГЛИОМЫ, ЛИМФОМЫ) И ИНФЕКЦИОННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ (ГЕПАТИТ В и С,
ТУБЕРКУЛЕЗ)
(промежуточный, 3 этап)

Руководитель работ
проф., д.м.н.

_____ Е.Р. Черных
подпись

Новосибирск 2011

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 (раздел 3.2)
	подпись	
с.н.с., к.м.н.	_____	О.Ю. Леплина (разделы 1, 2, 3.2, 3.3)
	подпись	
с.н.с., к.м.н.	_____	Е.Я. Шевела (раздел 3.2)
	подпись	
с.н.с., к.м.н.	_____	М.А. Тихонова (разделы 1, 2, 3.2, 3.3)
	подпись	
с.н.с., к.м.н.	_____	Л.В. Сахно (разделы 3.2, 3.3)
	подпись	
зав. отделением Клиники иммунопатологии, к.м.н.	_____	Н.М. Старостина (разделы 3.2, 3.3)
	подпись	
н.с., к.м.н.	_____	Н.В. Селедцова (раздел 3.2)
	подпись	
н.с., к.м.н.	_____	В.В. Сергеевичева (раздел 3.2)
	подпись	
аспирант	_____	Т.В. Тыринова (разделы 3.2, 3.3)
	подпись	
аспирант	_____	Е.В. Баторов (раздел 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 3.1, 3.4, 3.5)
	подпись	
н.с., к.б.н.	_____	А.С. Проскурина (разделы 3.1, 3.4, 3.5)
	подпись	
н.с., к.б.н.	_____	К.Е. Орищенко (разделы 3.1, 3.4, 3.5)
	подпись	
аспирант	_____	Е.А. Алямкина (разделы 3.1, 3.4, 3.5)
	подпись	
аспирант	_____	Е.В. Долгова (разделы 3.1, 3.4, 3.5)
	подпись	

Реферат

Отчет 51 с., 10 таблиц, 24 источника.

Ключевые слова – дендритные клетки, ИФН- α , Th1, Th2, цитокины, регуляторные CD4+CD25+CD127–CD8+ Т-клетки, рак молочной железы, ДНК человека злокачественные глиомы, лимфомы, хронические гепатиты, туберкулез.

Объектом исследования являются дендритные клетки человека.

Целью настоящего этапа являлось исследование особенностей фенотипа и функциональной активности ИФН-ДК у больных с онкопатологией и инфекционными заболеваниями. В рамках тематики этапа предполагалось оценить экспрессию поверхностных маркеров, отражающих дифференцировку и активацию ДК, а также их функциональную (цитокин-секреторную) активность и способность к стимуляции Th1- и Th2-Т-клеток. Планировалось также оценить относительное и абсолютное количество регуляторных CD4+CD25+CD127– Т-клеток в периферической крови больных раком молочной железы, прошедших курсы программной химиотерапии в ходе проведения II фазы клинических испытаний препарата фрагментированной ДНК человека Панаген.

Проведенные исследования продемонстрировали принципиальную возможность генерации *ex vivo* из моноцитов крови больных с онкопатологией (злокачественными глиомами, гемобластомами) и инфекционными заболеваниями (гепатиты В и С, туберкулез легких) популяции ИФН-ДК в количествах, достаточных для проведения иммунотерапии с использованием индивидуальных лечебных вакцин. Показано, 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 явных 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 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. В то же время, у больных злокачественными глиомами, множественной миеломой, хроническими вирусными гепатитами (не осложненными развитием цирроза печени), туберкулезом легких (с сохранным 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.

При исследовании фенотипа и функциональной активности ИФН-ДК у больных с онкопатологией и инфекционными заболеваниями использован разработанный ранее (на 1-2 этапе) 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 подготовке лекционного курса для клинических ординаторов Научно-исследовательского института клинической иммунологии СО РАМН, а также для последующего его включения в образовательный процесс на кафедре иммунологии Новосибирского государственного медицинского университета и Медицинском факультете 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	16
3 Результаты и обсуждение	19
3.1 Определение экспрессии поверхностных маркеров, отражающих дифференцировку и активацию ДК	19
3.2 Определение продукции Th1/провоспалительных и Th2/противовоспалительных цитокинов	28
3.3 Определение Th1- и Th2-стимуляторной активности	31
3.4, 3.5 Определение относительного и абсолютного количества регуляторных Т-клеток (CD4+CD25+CD127-) у больных с онкопатологией, участвующих в исследовании препарата Панаген на II фазе клинических испытаний	38
Заключение	42
Список использованных источников	48

Определения, обозначения и сокращения

ГМ-КСФ	гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
ДК	дендритные клетки
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ИЛ	интерлейкин
ИФН	интерферон
МНК	моноклеарные клетки
ППД	туберкулиновый очищенный белковый дериват
СКЛ	смешанная культура лимфоцитов
ФНО- α	фактор некроза опухоли альфа
ХВГВ	хронический вирусный гепатит В
ХВГС	хронический вирусный гепатит С
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 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 В7-Н1 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 гемоиммунопоеза (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 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 противоинфекционного иммунного ответа.

Тем не менее, эффективность генерации и фенотипическая/функциональная характеристика ИФН-ДК у больных с онкопатологией и хроническими инфекционными заболеваниями (гепатиты, туберкулез) остаются крайне мало изученными вопросами.

Поэтому целью третьего этапа работы явилось исследование особенностей фенотипа и функциональной активности ИФН-ДК у больных с онкопатологией (злокачественные глиомы, лимфомы) и инфекционными заболеваниями (гепатит В и С, туберкулез). Предполагалось решить следующие задачи: 1) оценить экспрессию поверхностных маркеров, отражающих дифференцировку и активацию ИФН-ДК; 2) определить способность ИФН-ДК, полученных от больных, продуцировать Th1/провоспалительные и Th2/противовоспалительные цитокины; 3) оценить способность ИФН-ДК больных к активации Th1- и Th2- Т-клеток в смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ); 4) оценить количественное содержание регуляторных CD4+CD25+CD127- Т-клеток в периферической крови больных раком молочной железы, прошедших курсы программной химиотерапии в ходе

проведения II фазы клинических испытаний препарата фрагментированной ДНК человека (Панаген).

Проведенные исследования продемонстрировали 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. Показано, 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

явных 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 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. В то же время, у больных злокачественными глиомами, множественной миеломой, хроническими вирусными гепатитами (не осложненными развитием цирроза печени), туберкулезом легких (с сохранным 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.

Основная часть

1 Литературный обзор

Как известно, индукция эффективного Т-клеточного иммунного ответа во многом зависит от функциональной активности антиген-презентирующих клеток, среди которых ДК являются наиболее профессиональными. Именно ДК обладают уникальной способностью праймировать наивные Т-клетки, а также играют ключевую роль в запуске противоопухолевого и противовирусного иммунного ответа [3].

Недавно появились первые сообщения, что опухолевый рост ассоциирован с количественным и функциональным дефектом ДК [16, 20]. Однако, свойства ДК при злокачественных заболеваниях остаются крайне мало изученными. Исследования циркулирующих ДК периферической крови у больных глиобластомой выявили снижение количества миелоидных (CD11c+) и плазмацитоидных (CD123+) ДК и увеличение доли незрелых ДК, экспрессирующих HLA-DR антигены (Lin-DR+). Эти ДК отличались низкой способностью к захвату антигена, стимуляции пролиферации Т-клеток и продукции ИФН- γ . Причем селективная аккумуляция незрелых ДК возрастала на фоне появления рецидива [15]. В то же время исследования ДК, генерируемых из периферической крови больных, не выявили их дефекта. Так, Rapp с соавт. показал, что из периферической крови больных можно генерировать зрелые миелоидные ДК в таком же количестве и практически с таким же фенотипом как и у здоровых доноров [17]. По сравнению с донорами, ДК больных отличались незначительными изменениями в экспрессии CD80 и HLA-DR молекул.

Изменение количества и/или функции ДК может являться причиной нарушения антигенспецифического иммунного ответа у больных с вирусными инфекциями. Так, у больных хроническим вирусным гепатитом В (ХВГВ) обнаружено снижение продукции ИФН- α плазмоцитоидными ДК [2]. У больных ХВГВ отмечается также количественный дефицит циркулирующих миелоидных ДК, особенно, при трансформации гепатита в цирроз печени. Миелоидные ДК, выделенные из периферической крови больных гепатитом В, характеризуются сниженной экспрессией костимуляторных молекул (CD80, CD86) и низкой аллостимуляторной активностью [6, 19]. Функциональная дефектность миелоидных ДК выявляется также в случае их генерации из моноцитов периферической крови в присутствии ГМ-КСФ и ИЛ-4. Так, например, показано, что полученные *in vitro* ДК отличаются низкой продукцией ИЛ-12 и не способны эффективно стимулировать пролиферацию и продукцию Th1-цитокинов Т-клетками в ответ на специфический антиген [22].

С количественными и функциональными изменениями ДК связывают также нарушение специфического Т-клеточного иммунного ответа при туберкулезной инфекции [13, 11]. Хотя ДК не являются первичными мишенями инфицирования, они могут подвергаться негативному действию со стороны *M. tuberculosis* [9]. Кроме того дефектность ДК, генерируемых их моноцитов периферической крови, может быть обусловлена изменением функциональной активности моноцитов при туберкулезной инфекции [23]. Количество миелоидных и плазмацитоидных ДК в периферической крови больных туберкулезом легких значительно снижено, а плазмацитоидные ДК характеризуются сниженным уровнем продукции ИФН- α ,

при этом в случае успешной антибактериальной терапии количество плазмацитоидных ДК и продукция ими ИФН- α восстанавливается [12].

Все описанные изменения касаются ДК, выделенных из периферической крови или индуцированных *in vitro* в присутствии ГМ-КСФ и ИЛ-4. Между тем генерация ДК в условиях замены ИЛ-4 на ИФН- α (ИФН-ДК) представляется более физиологичным подходом, поскольку ИФН- α является ранним медиатором врожденного иммунного ответа и продуцируется в больших количествах в ответ на стимуляцию инфекционными антигенами и провоспалительными цитокинами. Кроме того, ИФН-ДК, имеют ряд отличительных особенностей – быстрее генерируются, характеризуются более высокой миграционной активностью и цитотоксическим потенциалом. Кроме того, по сравнению с ИЛ4-ДК эти клетки более активно стимулируют CD8 Т-лимфоциты и индуцируют более сбалансированный иммунный ответ, поскольку наряду с выраженной Th1-стимулирующей способностью обладают умеренной Th2-стимулирующей активностью [18, 5]. Однако исследование свойств ИФН-ДК при патологиях не проводилось, поэтому целью работы явилось: исследование особенностей фенотипа и функциональной активности ИФН-ДК у больных с онкопатологией и инфекционно-воспалительными заболеваниями.

2 Материалы и методы

В исследование были включены 38 больных (18 мужчин и 20 женщин) злокачественными опухолями головного мозга (ЗОГМ), которые были прооперированы и наблюдались в клинике нейрохирургии ФГУ «Новосибирский НИИ травматологии и ортопедии МЗ и СР РФ». Возраст больных варьировал от 16

до 69 лет (в среднем $42,3 \pm 3,8$). Среди обследованных больных у 42,6% пациентов диагностировалась гистологически верифицированная глиобластома, у 57,4% – астроцитомы 3 степени анаплазии.

Группу пациентов со злокачественными лимфомами составили 10 пациентов (5 мужчин и 5 женщин в возрасте от 14 до 41 года), включая 4 пациентов с лимфомой Ходжкина и 6 больных с агрессивными вариантами неходжкинских лимфом. Группа обследованных больных множественной миеломой включала 12 человек (5 мужчин и 7 женщин), в возрасте от 48 до 69 лет. Стадию заболевания определяли согласно классификации Durie & Salmon (1975) – 1 пациент со 2 стадией и 11 пациентов с 3Б стадией заболевания.

В исследование были включены также 37 больных с хроническими вирусными гепатитами в возрасте от 24 до 56 лет, из них 18 больных с ХВГВ и 19 пациентов с ХВГС. У пятнадцати пациентов был диагностирован цирроз печени как исход хронической вирусной инфекции.

Иммунологические исследования были проведены также в группе 90 больных туберкулезом легких: 65 (72%) мужчин и 25 (28%) женщин в возрасте от 20 до 64 лет. В зависимости от уровня пролиферативного ответа мононуклеарных клеток на туберкулиновый очищенный белковый дериват (ППД) больные туберкулезом легких были разделены на 2 подгруппы: с сохранным ответом (>12500 имп/мин, $n=50$) и сниженным ответом (<12500 имп/мин, $n=40$) ответом на ППД.

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 ИФН- α (Роферон-А, Roche, Швейцария, 1000 Ед/мл) с последующим дозреванием с липополисахаридом *E.colli* (0114:B4, Sigma-Aldrich, 10 мкг/мл) в течение 24 ч.

Фенотипирование ДК проводили методом одноцветной или двухцветной проточной цитофлуориметрии (FACS Calibur, Becton Dickinson) с использованием FITC-, APC- или PE-меченных антител (CD1a, CD11c, CD14, CD25, CD83, CD86–PharMingen, США, HLA-DR-Медбиоспектр, Москва).

Производство цитокинов (ФНО- α , ИФН- γ , ИЛ-4, ИЛ-10) в цельных культурах ДК оценивали методом иммуноферментного анализа, используя соответствующие тест-системы производства «Вектор-Бест», Новосибирск (ФНО- α , ИФН- γ , ИЛ-4) и «Цитокин», С-Пб (ИЛ-10).

Способность ИФН-ДК активировать Th1- и Th2-ответ в аллогенной СКЛ оценивали по количеству Т-клеток, содержащих внутриклеточно ИФН- γ и ИЛ-4, соответственно. Определение экспрессии внутриклеточных цитокинов в CD3+ популяции лимфоцитов периферической крови проводили методом трехцветной проточной цитометрии (FACSCalibur, Becton Dickinson). Для этого МНК доноров, истощенных от фракции адгезивных клеток (моноцитов), культивировали в 96-луночных планшетах в полной культуральной среде с 10% FCS в присутствии (опыт) и в отсутствие (контроль) ИФН-ДК в соотношении 10:1 в течение 72 ч. За 18 ч до конца инкубации в культуру добавляли брэфелдин (10 мкг/мл, ISN, США) – блокатор транспорта протеинов из аппарата Гольджи. Затем, клетки отмывали ЗФР,

содержащим 0,1% азида натрия, 0,02% ЭДТА, 10% сыворотки доноров АВ (IY) группы и инкубировали 15 мин при комнатной температуре с 5 мкл APC-меченных моноклональных анти-CD3 антител (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-меченными анти-ИЛ-4 антителами (Becton Dickinson, США). Образцы анализировали на проточном цитометре с использованием программы Cellquest . Цитокин-экспрессирующие клетки, отнесенные к лимфоцитарному региону, оценивали по параметрам прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния.

Оценку количественного содержания регуляторных CD4+CD25+CD127⁻ T-клеток в периферической крови проводили с использованием 3-цветной проточной цитофлюориметрии (FACS Calibur, Becton Dickinson) из 0,5 мл лейкозвеси.

Статистическую обработку полученных результатов проводили методами описательной, параметрической и непараметрической статистики на персональном компьютере с использованием программы «STATISTICA 6.0».

3 Результаты и обсуждение

3.1 Определение экспрессии поверхностных маркеров, отражающих дифференцировку и активацию ДК

Онкопатология

Проведенное нами сравнение эффективности генерации ИФН-ДК у здоровых доноров и больных с онкологическими заболеваниями показало, что аналогично донорам моноциты периферической крови этих пациентов в результате 3-суточного культивирования с ГМ-КСФ и ИФН- α теряли способность прилипать к

пластику и приобретали типичные морфологические черты ДК. Жизнеспособность ИФН-ДК во всех экспериментах была не менее 90% и не различалась между исследуемыми группами. Популяция прилипающих к пластику клеток у больных со злокачественными опухолями головного мозга, злокачественными лимфомами и множественной миеломой, также как и у здоровых доноров, была представлена в основном CD14⁺ моноцитами (77–93%). Выход ИФН-ДК у больных злокачественными опухолями головного мозга, злокачественными лимфомами и множественной миеломой не отличался от выхода ДК у доноров ($0,1 \pm 0,01 \times 10^6$ ДК из 10^6 МНК) и составлял в среднем $0,13 \pm 0,01 \times 10^6$ ДК из 10^6 МНК. Как и у доноров, большинство ИФН-ДК, генерируемых у больных, несли HLA-DR молекулы и не экспрессировали CD14 (моноцитарный маркер). Причем более чем на 50% клеток выявлялись костимуляторные молекулы (CD86) (табл. 1).

Таблица 1 – Фенотипическая характеристика ИФН-ДК у больных с онкопатологией

Маркеры	Доноры (n=18)	Больные злокачественными опухолями головного мозга (n=19)	Больные злокачественными лимфомами (n=10)	Больные множественной миеломой (n=12)
CD14	8,7 ± 1,4	17,7 ± 2,6 *	28,1 ± 5,8 *	17,7 ± 2,1 *
CD86	62,4 ± 3,2	65,2 ± 4,4	60,8 ± 3,4	63,5 ± 1,8
HLA-DR	90,7 ± 3,6	86,0 ± 2,5	91,0 ± 1,5	89,8 ± 4,2
CD11c	28,7 ± 2,2	40,8 ± 3,8 *	38,2 ± 5,6	48,0 ± 6,5 *
CD1a	10,4 ± 2,0	19,3 ± 4,5 *	21,1 ± 3,9 *	7,1 ± 1,35
CD83	29,4 ± 2,9	22,6 ± 1,9 *	17,3 ± 3,4 *	22,5 ± 5,9

CD25	25,1 ± 3,5	19,2 ± 2,3	10,4 ± 3,4 *	7,7 ± 2,1 *
CD123	24,9 ± 2,64	34,0 ± 4,6 *	35,5 ± 6,5*	23,8 ± 4,9
CD83+CD1a-	20,1 ± 2,0	15,8 ± 2,3 *	6,6 ± 0,98*	18,3 ± 5,8
CD83+CD1a+	4,7 ± 1,0	7,4 ± 2,6 *	11,8 ± 3,8 *	4,2 ± 0,8
CD83-CD1a+	5,4 ± 1,9	13,5 ± 3,2 *	9,3 ± 2,9	3,0 ± 1,5 *
CD11c+CD123-	17,6 ± 3,7	22,9 ± 3,2 *	18,6 ± 3,8	34,3 ± 5,3*
CD11c+CD123+	6,7 ± 1,1	17,4 ± 2,9*	24,7 ± 4,4*	13,8 ± 3,2 *
CD11c-CD123+	14,3 ± 2,3	16,2 ± 3,5 *	10,1 ± 4,3 *	8,6 ± 1,6

Примечание: представлены средние значения (M±S.E.) относительного содержания различных субпопуляций клеток (%), * – $P_u < 0,05$ – достоверность различий по сравнению с донорами, U – критерий Вилкоксона-Манна-Уитни.

Тем не менее, отмечался ряд особенностей. Так, у больных злокачественными глиомами и лимфомами регистрировалось повышенное содержание клеток с фенотипом моноцитов (CD14+) и незрелых ДК (CD1a+). В то же время, относительное количество клеток с маркером зрелых (CD83) и активированных (CD25) ДК было умеренно снижено. Поскольку маркеры CD83 и CD1a характеризуют различные стадии созревания миелоидных ДК, в отдельной серии экспериментов мы исследовали коэкспрессию CD83 и CD1a молекул на ДК. В отличие от здоровых доноров, у которых большинство CD83-клеток не несли молекулу CD1a, значительная часть ИФН-ДК больных экспрессировала одновременно CD83 и CD1a-молекулы, либо только CD1a-молекулы. В результате у больных отмечалось увеличение общего количества как незрелых CD1a+CD83- ДК, так и CD83+CD1a+ ДК промежуточной степени зрелости.

Одной из особенностей ИФН-ДК является наличие на них рецептора к интерлейкину-3 (CD123). Данный маркер высоко экспрессируется на плазмацитоидных ДК и практически отсутствует на ДК, генерируемых в присутствии ГМ-КСФ и ИЛ-4 [18]. Как следует из представленных выше данных, относительное содержание CD123+ клеток у больных злокачественными опухолями головного мозга и злокачественными лимфомами было повышено. Причем одновременное исследование экспрессии CD123 и CD11c показало, что у доноров большая часть CD123+ клеток сосредоточена в CD11c⁻ популяции, тогда как у больных злокачественными глиомами и лимфомами данный маркер распределялся равномерно в популяциях CD11c⁺ и CD11c⁻ клеток. Соответственно, относительно количество CD11⁺CD123⁺ клеток у больных было более чем в 2 раза повышено.

Следует отметить, что в отличие от больных злокачественными глиомами и лимфомами ИФН-ДК больных множественной миеломой практически не отличались от таковых у здоровых доноров. Это позволило заключить, что при множественной миеломе в культуре *in vitro* генерируется популяция ДК, в целом сопоставимая с аналогичной популяцией здоровых доноров.

Важно также подчеркнуть, что, несмотря на то, что среди ДК больных оставалось повышенным относительное количество CD14+ моноцитов, а доля активированных CD25+ ДК была достоверно ниже, тем не менее, у больных генерировалось большее количество миелоидных CD11c⁺ ДК ($48,0 \pm 6,5$ vs $28,7 \pm 2,2\%$ у доноров, $p < 0,05$), при этом среди них сохранялись нормальные пропорции зрелых CD83+ ДК, включая терминально дифференцированные CD83+CD1a⁻

клетки, и незрелых CD83–CD1a+ ДК, а также CD83+CD1a+ клеток промежуточной степени зрелости.

Полученные данные свидетельствуют о возможности генерации ИФН-ДК из популяции моноцитов больных злокачественными опухолями головного мозга. В то же время увеличение субпопуляции CD14+, CD1a+CD83– и CD1a+CD83+ и снижение субпопуляции зрелых (CD1a–CD83+) и активированных (CD25+) ДК указывает на некоторую задержку дифференцировки и созревания миелоидных ДК у больных злокачественными опухолями головного мозга. Другой особенностью является увеличение у больных субпопуляции ДК с наличием CD123 молекулы. Присутствие CD123 на ИФН-ДК может быть связано со способностью ИФН-α блокировать снижение экспрессии данной молекулы на поверхности моноцитов по мере их дифференцировки в ДК [4]. Соответственно, в случае задержки дифференцировки ДК у больных, CD123 может сохраняться на большем количестве ДК. Увеличение CD11c+CD123+ клеток может также отражать особенности функциональной активности моноцитов больных, например, увеличение на них экспрессии рецепторов к ИФН-α [5]. Кроме того, нельзя исключить наличие среди прилипающих к пластику клеток предшественников плазмацитоидных ДК и, соответственно, их увеличение при злокачественных глиомах. Так, увеличение CD123+ плазмацитоидных клеток отмечается рядом авторов при опухолевых заболеваниях, например, при злокачественных опухолях головы и шеи [8], а также метастазирующих формах рака яичника [7, 21].

Особенности фенотипа ДК у больных могут быть связаны с изменением функциональных свойств моноцитов, которые являются источником генерации ДК. Действительно, ранее нами было показано, что моноциты больных

злокачественными глиомами отличаются более низкой экспрессией HLA-DR антигенов и наличием супрессорной активности [1]. В то же время известно, что простагландин E2 и ИЛ-10, опосредующие супрессорную активность моноцитов, ингибируют дифференцировку моноцитов, индуцированную ГМ-КСФ и ИЛ-4 [10].

Хронические вирусные гепатиты

На сегодняшний день хронические вирусные гепатиты В (ХВГВ) и С (ХВГС) занимают лидирующее положение в структуре хронических диффузных заболеваний печени. Хотя точные механизмы персистенции вирусной инфекции до конца не раскрыты, одной из основных причин хронизации признают дефект клеточного иммунитета, в частности, нарушение антигенспецифического ответа, направленного на элиминацию вируса. Как известно, индукция эффективного Т-клеточного иммунного ответа во многом зависит от функциональной активности антигенпрезентирующих клеток, среди которых ДК являются наиболее профессиональными.

Популяция прилипающих к пластику МНК у больных хроническими гепатитами, так же как и у здоровых доноров, была представлена в основном CD14⁺-моноцитами (82–86%). В результате культивирования моноцитов с ГМ-КСФ и ИФН- α в течение 3 суток клетки теряли способность прилипать к пластику и приобретали типичные морфологические черты ДК. При этом сравнительный фенотипический анализ позволил выявить ряд особенностей ДК у больных вирусными гепатитами (табл. 2).

Так, при ХВГВ ДК имели фенотип, во многом сходный с таковым у доноров, однако количество активированных ДК, экспрессирующих CD25, у данной

категории больных было достоверно снижено преимущественно за счет пациентов с исходом в цирроз печени.

Таблица 2 – Фенотипическая характеристика ДК у больных хроническими гепатитами

Группы	CD14	CD1a	CD83	CD25
Доноры (n=18)	8,7±1,4	10,4±2,0	29,4±2,9	25,1±3,5
<i>Больные ХВГВ</i>				
Общая группа (n=12)	10,9±2,8	10,4±2,6	27,3±4,1	17,7±3,0*
Больные гепатитами (n=7)	14,3±7,9	16,6±5,9	28,3±3,9	22,6±3,9
Больные циррозом печени (n=5)	8,6±2,5	7,8±2,4	27,7±7,2	15,2±4,8*
<i>Больные ХВГС</i>				
Общая группа (n=12)	11,6±2,9	13,8±5,3	23,2±2,9	16,6±3,7*
Больные гепатитами (n=6)	11,9±3,7	18,6±7,7*	18,7±3,0*	22,0±4,0
Больные циррозом печени (n=6)	12,0±3,1	8,7±1,2	25,8±4,0	11,0±3,2*

Примечание. представлены средние значения (M±S.E.) относительного содержания различных субпопуляций клеток (%), * – $P_u < 0,05$ – достоверность различий по сравнению с донорами, U – критерий Вилкоксона-Манна-Уитни.

В группе больных ХВГС также регистрируется снижение числа активированных CD25+ ДК в основном за счет больных с циррозом печени. Кроме того, в подгруппе больных ХВГС была отмечена задержка дифференцировки ДК, которая проявлялась увеличением количества незрелых CD1a+ ДК в сочетании с уменьшением доли зрелых клеток, экспрессирующих CD83. Таким образом, у больных гепатитом С фенотип генерируемых *in vitro* ДК отличается более выраженными изменениями, которые свидетельствуют о нарушении процессов

дифференцировки/созревания ДК. При этом независимо от типа вируса (В или С) трансформация гепатита в цирроз печени сопровождается снижением относительного количества активированных CD25+ ДК.

Туберкулез легких

Исследование фенотипа ИНФ-ДК показало (табл. 3), что по сравнению со здоровыми донорами эффективность генерации ДК у больных туберкулезом легких была снижена, о чем свидетельствовало более высокое содержание CD14+ клеток в исследуемых культурах. Причем у пациентов со сниженным уровнем пролиферативного ответа на ППД (подгруппа №2) количество CD14+ моноцитов в популяции ИНФ-ДК было в 2 раза выше, чем у больных первой подгруппы и в 4 раза выше, чем у здоровых доноров.

Таблица 3 – Фенотипическая характеристика ДК у больных туберкулезом легких с сохранным и сниженным антигенспецифическим ответом

Фенотип	Здоровые доноры (n=18)	Больные туберкулезом легких		
		В целом по группе (n=38)	Подгруппа №1 (n=28)	Подгруппа №2 (n=10)
CD14+	8,7 ± 1,4	19,6 ± 2,5 *	17,2 ± 2,7 *	30,0 ± 5,4 * #
CD25+	25,1 ± 3,5	9,6 ± 1,2 *	8,8 ± 1,3 *	12,1 ± 2,9 *
CD1a+	11,8 ± 2,5	11,8 ± 1,4	10,7 ± 1,4	14,6 ± 3,7
CD83+	23,3 ± 2,7	32,4 ± 2,9	34,2 ± 3,7	27,8 ± 3,4
CD11c+	28,3 ± 2,6	30,2 ± 2,7	29,5 ± 3,2	34,2 ± 5,3
CD123+	27,5 ± 2,3	25,2 ± 1,8	24,0 ± 2,0	25,0 ± 2,7

CD1a+CD83–	6,9 ± 2,0	5,3 ± 0,8	4,5 ± 0,7	7,5 ± 2,0
CD1a+CD83+	5,0 ± 1,0	6,5 ± 1,0	6,2 ± 1,1	7,1 ± 2,3
CD1a-CD83+	18,9 ± 2,6	25,9 ± 2,8	28,0 ± 3,6	20,7 ± 2,9
CD11c+CD123–	21,4 ± 4,4	18,0 ± 1,9	15,4 ± 2,1	24,8 ± 3,3 #
CD11c+CD123+	8,9 ± 1,1	11,5 ± 1,5	11,9 ± 2,0	10,4 ± 2,0
CD11c–CD123+	17,5 ± 1,2	12,2 ± 1,1 *	11,3 ± 1,2 *	14,6 ± 2,5

Примечание: представлено относительное содержание (%) различных субпопуляций ДК в виде средних значений ($M \pm S.E.$), * – $P_U < 0,05$ достоверность различий показателей по сравнению с донорами; # – $P_U < 0,05$ достоверность различий в подгруппах у больных туберкулезом легких с сохранным (№1) и сниженным (№2) ППД-ответом, U – критерий Вилкоксона-Манна-Уитни.

Для изучения степени зрелости ДК были исследованы маркеры CD1a и CD83, так как известно, что по мере созревания миелоидные ДК теряют CD1a молекулы и начинают экспрессировать на своей поверхности CD83 антигены. Было установлено, что больные туберкулезом легких и здоровые доноры были сопоставимы между собой по относительному содержанию клеток с фенотипом CD1a+CD83–, CD1a+CD83+ и CD1a–CD83+. Однако относительное содержание зрелых активированных ДК, экспрессирующих CD25+, у больных туберкулезом легких было снижено более чем в 2 раза. Следует отметить, что при анализе культур ИФН-ДК идентифицировались ДК с маркером CD123. При этом относительное содержание этих клеток у доноров и больных не различалось, тогда как относительное содержание ДК с фенотипом плазмацитоидных ДК (CD11c–CD123+) у больных было снижено. Уменьшение количества плазмацитоидных ДК в периферической крови и уровня продукции ИФН- α в культурах МНК у больных

туберкулезом легких отмечено Lichtner и др., что по мнению авторов является причиной неэффективного ответа на патоген [12]. Однако в наших исследованиях снижение субпопуляции CD11c–CD123+ ДК было наиболее выраженным у пациентов с сохранным антигенспецифическим ответом и поэтому вряд ли являлось причиной дефекта ППД-реактивности.

Таким образом, по сравнению со здоровыми донорами ИФН-ДК больных туберкулезом легких отличаются по эффективности генерации и степени зрелости/активации ДК. Важно отметить, что наибольшие различия по содержанию CD14 клеток и изменению соотношения субпопуляций миелоидных ДК, наблюдаются в подгруппе больных со сниженным ППД-ответом. Именно эти пациенты характеризуются также изменением свойств моноцитов крови, в частности, наличием у них выраженной супрессорной активности и увеличением количества CD14+CD16+ клеток. Поскольку моноциты, с одной стороны, являются источником генерации ДК, а с другой стороны, способны продуцировать регуляторные цитокины, влияющие на эффективность генерации ДК, можно предположить, что дисфункции моноцитов являются одной из причин выявленных нами изменений фенотипа ИФН-ДК у больных туберкулезом легких.

3.2 Определение продукции Th1/провоспалительных и Th2/противовоспалительных цитокинов

Поскольку способность ДК активировать Т-клетки во многом связана со спектром и уровнем продуцируемых ими цитокинов, в отдельной серии экспериментов была исследована продукция Th1/провоспалительных (ИФН- γ , ФНО- α) и Th2/противо-воспалительных (ИЛ-4, ИЛ-10) цитокинов в супернатантах

генерируемых культур ИФН-ДК. Из данных таблицы 4 видно, что ДК больных злокачественными опухолями головного мозга характеризовались сходной с донорами способностью к секреции данных цитокинов.

ДК больных лимфомами характеризовались сниженной способностью секретировать ИФН- γ (соответственно 35 ± 17 против 113 ± 55 пг/мл у здоровых доноров, $pU < 0,05$). Продукция ФНО- α у этих пациентов определялась на достаточно высоком уровне и достоверно не различалась с таковой у доноров.

ДК больных множественной миеломой активно секретировали ИФН- γ и ФНО- α на достаточно высоком уровне, сопоставимом со средними значениями здоровых доноров. Продукция ИЛ-4 во всех анализируемых группах, включая больных злокачественными лимфомами и множественной миеломой была минимальной. В то же время уровень ИЛ-10 в супернатантах ДК больных злокачественными лимфомами и множественной миеломой был достоверно выше, чем в культурах ДК доноров. Наибольшие изменения регистрировались у больных злокачественными лимфомами. Продукция ИЛ-10 ДК этих пациентов была повышена в 5 раз. ДК больных множественной миеломой также характеризовались повышенной способностью секретировать ИЛ-10 ($102,0 \pm 16,2$ vs 82 ± 13 пг/мл у доноров, $pU < 0,05$). Однако в этом случае повышенный уровень продукции ИЛ-10 (индивидуальные значения продукции ИЛ-10 выходили за верхнюю границу квартильного диапазона нормы) выявлялся только у половины обследованных больных множественной миеломой (6/12). Полученные данные указывают на то, что ДК больных злокачественными лимфомами отличаются дефектом продукции ИФН- γ и высокой продукцией ИЛ-10.

Таблица 4 – Продукция Th1/провоспалительных и Th2/противовоспалительных цитокинов ДК в различных группах больных

Группы	Концентрация цитокинов (пг/мл)			
	ИФН- γ	ИЛ-4	ФНО- α	ИЛ-10
Доноры (n=17)	113,1 \pm 55,1	2,32 \pm 0,62	745,4 \pm 73,6	82,1 \pm 13,7
Злокачественные опухоли головного мозга (n=15)	146,5 \pm 39,6	2,0 \pm 0,75	744 \pm 87	153,4 \pm 48,3*
Злокачественные лимфомы (n=12)	35,0 \pm 17,2*	2,0 \pm 0,93	795 \pm 103	444 \pm 59,3 *
Множественная миелома (n=14)	127,7 \pm 35,0	1,1 \pm 0,32	813,4 \pm 97,4	102 \pm 16,2 *
Гепатит В (n=15)	250,8 \pm 87,7*	2,3 \pm 0,82	658,5 \pm 13,4	121,6 \pm 34,5
Гепатит С (n=14)	146,4 \pm 42,5	3,9 \pm 2,1	815,3 \pm 58,5	566 \pm 91 *
Циррозы (n=10)	237,6 \pm 165,5	3,03 \pm 1,6	859,2 \pm 64,9	459 \pm 39,6*
Туберкулез легких (n=28)	18,3 \pm 1,6 *	5,7 \pm 2,3	933,6 \pm 36,3	500,1 \pm 50,8 *

Примечание: представлены средние значения (M \pm SE) концентрации цитокинов (пг/мл) в цельных супернатантах ДК, n – число наблюдений, * – P_u достоверность различий по отношению к донорам, U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни

ДК больных ХВГВ активно продуцировали ИФН- γ на уровне, статистически достоверно превышающем донорские значения. Следует отметить, что хроническое течение гепатита В, осложненное развитием цирроза печени, сопровождалось умеренным, но не критичным снижением интенсивности секреции ИФН- γ . В подгруппе больных ХВГС продукция ИФН- γ была сопоставима с донорскими значениями, при этом, однако, трансформация инфекции вируса

гепатита С в цирроз печени сопровождалась выраженным угнетением способности ДК к синтезу данного цитокина. Достоверных различий в уровне продукции ФНО- α и ИЛ-4 в анализируемых подгруппах больных гепатитами и здоровых доноров выявлено не было. В то же время секреция ИЛ-10 ДК больных ХВГС, а также пациентов с циррозом печени вне зависимости от вирусной этиологии (ХВГВ и ХВГС) была значимо выше, чем у доноров.

Исследование продукции цитокинов ДК у больных туберкулезом легких показало, что по сравнению со здоровыми донорами уровень продукции ИФН- γ был снижен в 6 раз, а продукция ИЛ-10 была увеличена в 6 раз. В то же время продукция ФНО- α и ИЛ-4 в культурах ДК больных и доноров не различалась.

Таким образом, полученные данные показали, что задержка созревания/активации ДК при патологии может быть ассоциирована с изменением уровня продуцируемых ими цитокинов, в частности, снижением продукции ИФН- γ и усилением продукции ИЛ-10. Однако указанные изменения имеют различную степень выраженности при различных видах онкопатологии и инфекционных заболеваний. Наибольшие изменения цитокин-продуцирующей функции ДК характерны для больных злокачественными лимфомами и туберкулезом легких. В то же время у больных с внутримозговыми опухолями и вирусными гепатитами генерируемые ДК характеризуются менее выраженными изменениями.

3.3 Определение Th1- и Th2-стимуляторной активности

Чтобы выяснить, какой тип Т-лимфоцитов активируется в присутствии ИФН-ДК и меняется ли Th1 и Th2 стимуляторная активность ДК, генерируемых у больных с онкопатологией и инфекционными заболеваниями, на следующем этапе

была исследована способность ДК стимулировать Т-клетки к продукции Th1 и Th2 цитокинов. Для этого исследовалось количество CD3+ Т-клеток с внутриклеточной экспрессией ИФН- γ и ИЛ-4 в смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ), индуцированной ДК доноров и больных (табл. 5).

Анализ внутриклеточной продукции Т-клетками ИФН- γ и ИЛ-4 в СКЛ показал, что стимуляция аллогенных МНК ДК здоровых доноров во всех случаях приводила к четкому усилению продукции ИФН- γ в популяции Т-лимфоцитов (таблица 5), что проявлялось в среднем 5-кратным возрастанием относительного содержания ИФН γ - продуцирующих CD3+ Т-клеток. ДК всех анализируемых пациентов со злокачественными опухолями головного мозга также стимулировали внутриклеточную экспрессию ИФН- γ в популяции CD3+ Т-лимфоцитов. Однако, увеличение количества ИФН γ -позитивных CD3+ Т-клеток было менее выраженным. Исследование внутриклеточной экспрессии ИЛ-4 показало, что возрастание числа ИЛ-4-продуцирующих CD3+ Т-клеток в присутствии ДК доноров проявлялось в виде тенденции и регистрировалось только в 40% случаев. Аналогично донорам ДК больных злокачественными опухолями головного мозга также не обладали выраженной Th2-стимулирующей активностью. Так, в целом по группе достоверного усиления внутриклеточной продукции ИЛ-4 в СКЛ не выявлялось. При этом, даже в случаях, когда регистрировалось увеличение ИЛ-4-содержащих Т-клеток, Th2-стимуляторная активность ДК доноров и больных ($2,9 \pm 0,97$ и $2,23 \pm 0,33$ соответственно) была ниже, чем Th1-стимуляторная активность.

Таблица 5 – Содержание Т-клеток с внутриклеточной экспрессией ИФН- γ и ИЛ-4 в культурах СКЛ, индуцированных ИФН-ДК доноров и различных групп больных

Источник ДК	CD3+ИФН- γ + Т-клетки (%)			CD3+ИЛ-4+ Т-клетки (%)		
	ДК(-)	ДК(+)	ИВ	ДК(-)	ДК(+)	ИВ
Доноры (n=18)	1,83± 0,3	6,4± 0,6	5,4 ±1,1	1,3 ± 0,2	2,9 ± 0,3	2,7±0,25
Больные злокачественными опухолями головного мозга (n=12)	0,94±0,24	2,7±0,5*	3,5±0,6*	1,7±0,1	2,3±0,36	1,3±0,24
Больные злокачественными лимфомами (n=10)	1,33 ± 0,1	5,8 ± 0,6	5,4 ±1,4	1,9 ± 0,1	7,7±1,1*	4,2±0,6*
Больные множественной миеломой (n=12)	1,36 ± 0,1	6,1 ±0,58	5,5 ±1,4	1,9 ± 0,1	2,3 ± 1,1	2,0 ± 0,2
Больные ХВГВ (n=12)	1,45 ±0,5	5,0 ± 2,1	4,9 ± 1,9	1,5 ± 1,2	3,0 ± 1,0	2,4 ± 3,6
Больные ХВГВ+цирроз печени (n=6)	1,42 ±0,1	5,9 ± 1,4	4,5 ± 0,6	1,3 ± 0,3	4,7± 0,2*	2,9 ± 0,1*
Больные ХВГС (n=13)	1,4 ±0,45	5,1 ± 0,7	3,4 ± 1,1	1,4 ± 0,7	1,8 ± 0,9	1,7 ± 0,9
Больные ХВГС+цирроз печени (n=6)	1,6 ±0,34	4,0 ± 0,9	2,9 ± 1,7	1,3 ± 0,5	4,1± 0,9*	2,7 ± 0,7*
Больные туберкулезом легких (n=36)	1,9 ± 0,1	3,1 ± 0,4*	1,8 ± 0,2*	2,0 ± 0,2	4,7 ± 0,6*	2,2 ± 0,2*

Примечание: представлено относительное содержание (%) CD3+ Т-клеток здоровых доноров с внутриклеточной экспрессией ИФН- γ и ИЛ-4, в культурах МНК, лишенных моноцитов и активированных ДК здоровых доноров или больных в течение 48 часов. * – $P_u < 0,05$ – достоверность различий при стимуляции ДК доноров и больных; u – критерий Вилкоксона-Манна-Уитни.

С целью анализа способности ДК больных злокачественными опухолями головного мозга активировать Th1 и Th2 ответ, была также исследована продукция Th1/провоспалительных и Th2/противо-воспалительных цитокинов в супернатантах СКЛ (табл. 6). ИФН-ДК доноров индуцировали в СКЛ существенную продукцию ИФН- γ , ФНО- α и ГМ-КСФ. В отличие от доноров, ДК больных индуцировали менее выраженную продукцию ФНО- α и практически не вызывали усиления продукции ГМ-КСФ. Продукция ИФН- γ была умеренно снижена, однако выявленные различия не были статистически значимы. Анализ Th2-цитокинов показал, что ДК доноров в СКЛ практически не индуцировали ИЛ-5 и ИЛ-13, но стимулировали продукцию ИЛ-10. По сравнению с донорами ДК больных индуцировали более высокий уровень продукции ИЛ-5 и ИЛ-13, но менее выраженную продукцию ИЛ-10.

Таблица 6 – Влияние ДК доноров и больных злокачественными опухолями головного мозга на продукцию Т-лимфоцитами Th1/Th2 цитокинов в СКЛ

Цитокины	Концентрация цитокинов (пг/мл)				
	ДК(-)	ДК(+) доноров (n=10)	ИВ	ДК(+) больных злокачественными опухолями головного мозга (n=12)	ИВ
ИФН- γ	28 \pm 25	476 \pm 109*	39 \pm 4,6	292 \pm 90*	15 \pm 4,5
ФНО- α	116 \pm 57	940 \pm 293*	14 \pm 0,8	241 \pm 102*#	8 \pm 2,2
ИЛ-13	2,0 \pm 0,01	15 \pm 8,8	8 \pm 3,9	179 \pm 52*#	89 \pm 26#
ИЛ-5	2,0 \pm 0,01	11 \pm 0,9*	6 \pm 1,5	170 \pm 39*#	85 \pm 19#

ИЛ-10	26±14	407±81*	19±1,2	123±56*#	8±2,1
ГМ-КСФ	2,0±0,01	144±6*	73±13	2,0±0,01* #	1,0±0,01 #

Примечание: представлены средние значения концентрации цитокинов (пг/мл) и индексы влияния ДК (ИВ) на продукцию цитокинов в 48-часовых супернатантах первичной и СКЛ. Первичная СКЛ. МНК здоровых доноров, лишенных прилипающей фракции, культивировали 48 часов в отсутствие ДК(-), присутствие ДК(+) доноров или больных злокачественными опухолями головного мозга, после чего в супернатантах определяли концентрацию цитокинов. $P_u < 0,05$ – достоверность различий по сравнению с уровнем спонтанной продукции; # $P_u < 0,05$ – достоверность различий в присутствие ДК доноров и больных злокачественными опухолями головного мозга.

Согласно данным литературы, ИФН-ДК индуцируют *in vitro* эффективную продукцию ИФН- γ в СКЛ [18]. Наряду с этим в супернатантах первичной СКЛ обнаруживается продукция Th2 цитокинов (ИЛ-10, ИЛ-4), источником которых, судя по внутриклеточной продукции цитокинов, являются Th0 и Th2 [5]. Способность ИФН-ДК к активации клеточного (Th1-зависимого) и гуморального (Th2-зависимого) иммунного ответа продемонстрирована также *in vivo* в модели SCID мышей [24]. С этой точки зрения, полученные нами данные о том, что ИФН-ДК здоровых доноров активируют Th1 и одновременно обладают умеренной Th2-стимулирующей активностью, индуцируя продукцию Th2 цитокинов в СКЛ, согласуются с результатами исследований других авторов. В то же время нами впервые продемонстрировано, что помимо ИФН- γ данный тип ДК стимулирует эффективную продукцию ГМ-КСФ, ФНО- α – цитокинов, обеспечивающих выживаемость, дифференцировку и созревание ДК. Как следует из представленных выше данных, ИФН-ДК больных обладали способностью активировать Th1 ответ. Однако при этом, ДК больных характеризуются умеренно сниженной ИФН- γ -

стимулирующей активностью в культурах первично активированных Т-клеток. При сравнении Th2-стимулирующей активности ДК больных и здоровых доноров мы получили разноречивые данные. С одной стороны, содержание ИЛ-4-продуцирующих CD3⁺ Т-клеток в культурах первичной СКЛ, индуцированной ДК больных и здоровых доноров, не различалось. Более того, ДК больных слабее индуцировали продукцию ИЛ-10 в супернатантах первичной СКЛ. С другой стороны, ДК больных стимулировали более высокий уровень ИЛ-5 и ИЛ-13 в первичной СКЛ. Таким образом, при анализе цитокинов в супернатантах СКЛ, ДК больных характеризовались повышенной Th2-стимулирующей активностью.

ДК больных лимфомами обладали сходной стимулирующей активностью в отношении активации Т-клеток к продукции ИФН- γ , однако отличались более выраженной способностью стимулировать продукцию ИЛ-4, что проявлялось достоверным увеличением количества CD3⁺ИЛ-4⁺ Т-клеток (с $1,9 \pm 0,1$ до $7,7 \pm 1,1\%$, $p < 0,05$). Таким образом, если ИФН-ДК доноров активировали преимущественно Th1 ответ, то ДК больных злокачественными лимфомами обладали как Th1, так и Th2 стимулирующей активностью.

ДК больных множественной миеломой обладали сходной с донорами способностью стимулировать Т-клетки к продукции ИФН- γ (ИВ_{ДК} $5,5 \pm 1,4$ vs $5,4 \pm 1,1$ у доноров), и такой же низкой Th2-поляризующей активностью (ИВ_{ДК} в отношении CD3⁺ИЛ-4⁺ Т-клеток составил $2,0 \pm 0,2$). Таким образом, ИФН-ДК больных множественной миеломой, также как и ДК доноров, активируют преимущественно Th1 ответ. Из данных таблицы 5 видно, что ДК больных ХВГВ и ХВГС были сопоставимы с ДК доноров по уровню Th1- и Th2-стимулирующей активности, поскольку примерно в равной степени усиливали экспрессию как

ИФН- γ , так и ИЛ-4 в Т-лимфоцитах. В то же время, у больных гепатитами с исходом в цирроз печени регистрировалось усиление Th2-поляризирующей активности ДК, что проявлялось достоверным увеличением в СКЛ количества ИЛ-4+CD3+Т-клеток.

ДК больных туберкулезом легких также усиливали внутриклеточную продукцию ИФН- γ , однако, в меньшей степени, чем здоровые доноры. При этом отмечалась тенденция к более выраженной стимуляции внутриклеточной продукции ИЛ-4. Кроме того, для оценки Th1/Th2-стимулирующей активности ДК больных туберкулезом легких был проведен также анализ цитокинов, продуцируемых в СКЛ. Как видно из данных таблицы 7, продукция ИФН- γ Т-клетками при стимуляции ДК больных туберкулезом легких была значимо ниже, чем при стимуляции ДК здоровых доноров. Так же, как и у доноров, ДК больных не стимулировали продукцию ИЛ-4 в данных культуральных условиях.

Таблица 7 – Влияние ДК здоровых доноров и больных туберкулезом легких на секрецию цитокинов СКЛ

Цитокины (пг/мл)	ДК(-)	ДК доноров (+) n=13	ДК больных туберкулезом легких (+) n=22
ИФН- γ	85 \pm 48	1834 \pm 351	807 \pm 185*
ИЛ-4	0,23 \pm 0,15	2,0 \pm 1,0	1,7 \pm 1,6

Примечание: представлены средние значения (M \pm SE) концентрации ИФН- γ и ИЛ4 в супернатантах вторичной СКЛ. МНК здоровых доноров, истощенные от прилипающих к пластику клеток, культивировали 5 суток в присутствии ДК доноров и больных туберкулезом легких, с последующей рестимуляцией соответствующими ДК в течение последующих 48 ч в качестве контроля. * – $p < 0,05$ – достоверность различий по сравнению с донорами.

Таким образом, как у больных с онкопатологией, так и с инфекционными заболеваниями вирусной и бактериальной природы, генерируемые ИФН-ДК имеют ряд особенностей, проявляющихся снижением Th1- и/или усилением Th2-стимуляторной активности. При этом наиболее выраженные изменения цитокин-секреторной активности характерны для ДК, полученных от больных злокачественными лимфомами и туберкулезом легких, характеризующихся значимой задержкой созревания ИФН-ДК.

3.4, 3.5 Определение относительного и абсолютного количества регуляторных Т-клеток (CD4+CD25+CD127-) у больных с онкопатологией, участвующих в исследовании препарата Панаген на II фазе клинических испытаний

Субпопуляция CD4+CD25+CD127- Т-клеток представляет у человека регуляторные Т-клетки с супрессорной активностью, которые могут включать как естественные, так и индуцированные регуляторные Т-клетки. Большинство опухолевых заболеваний сопровождается увеличением в циркуляции и/или опухолевом микроокружении данной популяции клеток. При этом возрастание численности регуляторных Т-клеток рассматривается в качестве ключевого механизма подавления противоопухолевого иммунитета и ускользания опухоли от иммунного надзора.

Генерация регуляторных Т-клеток индуцируется с участием ДК, обладающих толерогенными свойствами. Проведенные нами исследования показали, что ДК, генерируемые у больных с онкопатологией, имеют ряд свойств, присущих толерогенным ДК, в частности отличаются признаками незрелости, сниженной Th1- и/или повышенной Th2-стимуляторной активностью. В этой связи

можно полагать, что изменение свойств ДК при онкопатологии может способствовать генерации регуляторных Т-клеток.

Известно также, что иммуносупрессивные препараты могут индуцировать или усиливать толерогенные свойства ДК. Соответственно химиотерапия может потенцировать генерацию регуляторных Т-клеток. С другой стороны, проведенные нами ранее исследования показали, что препарат Панаген, обладающий лейкостимулирующим действием, оказывает также стимулирующее влияние на созревание и функциональную активность ДК. Исходя из этого, одной из задач этапа стало исследование количественного содержания регуляторных Т-клеток у больных раком молочной железы и анализ изменений данной популяции Т-клеток в процессе проведения программной химиотерапии, в том числе в комбинации с препаратом ДНК человека Панаген.

Как видно из таблицы 8, относительное и абсолютное содержание CD4+CD25+CD127– регуляторных Т-клеток в периферической крови пациентов больных раком молочной железы имело тенденцию к возрастанию. Действительно у половины больных (у 10 из 23 пациентов) относительное количество регуляторных Т-клеток выходило за верхнюю границу квартильного диапазона донорских значений (>10%).

Таблица 8 – Содержание CD4+CD25+CD127– регуляторных Т-клеток в периферической крови здоровых доноров и больных раком молочной железы

		Относительное содержание (%)	Абсолютное количество ($\times 10^9/\text{л}$)
Доноры	M \pm SE	8,07 \pm 0,8	0,13 \pm 0,01

(n=13)	Mediana	9,0	0,11
	LQ-UQ	6,0-10,0	0,08-0,16
Больные (n=23)	M±SE	9,26±0,76	0,16±0,02
	Mediana	10,0	0,16
	LQ-UQ	6,0-12,0	0,1-0,22

Примечание: представлены средние значения (M±SE), медианы (Mediana) и квартильный диапазон (LQ-UQ) относительного и абсолютного содержания популяции CD4+CD25+CD127– регуляторных Т-клеток в периферической крови здоровых доноров и больных раком молочной железы.

После проведения первого и второго курса химиотерапии относительное и абсолютное количество регуляторных Т-клеток достоверно не менялось (табл. 9). Причем важно отметить, что у больных с изначально повышенным содержанием регуляторных Т-клеток, дальнейшего увеличения численности этих клеток после двух курсов химиотерапии не наблюдалось.

Таблица 9 – Содержание CD4+CD25+CD127– регуляторных Т-клеток у больных раком молочной железы на программной химиотерапии

		Относительное содержание (%)	Абсолютное количество (×10 ⁹ /л)
До начала химиотерапии (день 0, n=23)	M±S.E	9,26±0,76	0,16±0,02
	Mediana	10,0	0,16
	LQ-UQ	6,0-10,0	0,1-0,22
После первой химиотерапии (день 21, n=22)	M±S.E	8,39±0,9	0,16±0,03
	Mediana	9,0	0,14

	LQ-UQ	7,0-12,0	0,07-0,24
После второй химиотерапии (день 42, n=20)	M±S.E	9,8±0,8	0,16±0,03
	Mediana	9,0	0,16
	LQ-UQ	8,0-12,0	0,09-0,22

Примечание: представлены средние значения (M±SE), медианы (Mediana) и квартильный диапазон (LQ-UQ) относительного и абсолютного содержания популяции CD4+CD25+CD127– клеток в периферической крови доноров и пациентов больных раком молочной железы на фоне лечения.

При анализе популяции регуляторных клеток в группе пациентов, принимавших препарат Панаген, и в группе Плацебо статистически значимых изменений выявлено не было (табл. 10).

Таблица 10 – Содержание CD4+CD25+CD127– регуляторных Т-клеток у больных раком молочной железы на программной химиотерапии на фоне приема препарата Панаген и в группе Плацебо

			Относительное содержание (%)	Абсолютное количество (×10 ⁹ /л)
Плацебо	До начала химиотерапии (n=3)	M±S.E	12,3±2,7	0,22±0,07
		Mediana	14,0	0,21
		LQ-UQ	7-16	0,1-36
	После первой химиотерапии (n=3)	M±S.E	12,0±1,1	0,23±0,01
		Mediana	12,0	0,24
		LQ-UQ	10-14	0,21-0,26
После второй химиотерапии	M±S.E	9,6±2,6	0,12±0,06	

	(n=3)	Mediana	10,0	0,12
		LQ-UQ	5-14	0,06-0,18
Панаген	До начала химиотерапии (n=18)	M±S.E	8,68±0,7	0,15±0,02
		Mediana	10,0	0,1
		LQ-UQ	6-11	0,1-0,22
	После первой химиотерапии (n=16)	M±S.E	7,24±1,1	0,14±0,03
		Mediana	8,0	0,12
		LQ-UQ	2-11	0,03-0,23
	После второй химиотерапии	M±S.E	9,94±0,9	0,17±0,03
		Mediana	9,0	0,16
		LQ-UQ	8-12	0,09-0,2
n		14	11	

Примечание: представлены средние значения ($M \pm SE$), медианы (Mediana) и квартильный диапазон (LQ-UQ) относительного и абсолютного содержания популяции CD4+CD25+CD127- клеток в периферической крови доноров и пациентов.

Таким образом, можно заключить, что у больных раком молочной железы в половине случаев регистрируется повышенное содержание CD4+CD25+CD127- регуляторных Т-клеток в периферической крови. Проведение двух курсов химиотерапии не приводит к увеличению данной популяции клеток независимо от приема препарата ДНК человека Панаген.

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 то же время свойства ДК, генерируемых *in vitro* из периферической крови больных с указанными патологиями, исследованы в гораздо меньшей степени. Особенно это касается ДК, генерируемых при замене ИЛ-4 на ИФН- α . Применение ИФН-индуцированных ДК обсуждается в качестве перспективной альтернативы ИЛ4-ДК, поскольку эти клетки обладают более высокой миграционной активностью и стабильностью. Однако насколько эффективно генерируются ИФН-ДК у больных с патологией и насколько сохранна их иммуностимуляторная активность, остается открытым вопросом.

Проведенные исследования показали, что ИФН-ДК, генерируемые у пациентов с онкопатологией и инфекционными заболеваниями отличаются признаками задержки дифференцировки и созревания, что проявляется увеличением в культурах ДК 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+).

Изменения фенотипа ДК были в наибольшей степени выражены у больных с онкопатологией и в меньшей степени – у больных с инфекционными заболеваниями. Среди больных с онкопатологией эти 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. При этом сравнение больных, инфицированных вирусом гепатита В и вирусом гепатита С

наиболее выраженные нарушения были характерны для больных с вирусным гепатитом С, а также пациентов с ХВГВ и ХВГС с исходом в цирроз печени. Аналогичным образом, признаки задержки дифференцировки/созревания ДК средней степени выраженности регистрировались у больных с туберкулезом легких, причем в большей степени у больных с нарушением антигенспецифического ответа на ППД.

Культуры, генерируемые *in vitro* ДК у больных с онкопатологией и инфекционными заболеваниями, отличались также от ДК доноров по цитокин-продуцирующей функции, в частности характеризовались снижением продукции Th1/провоспалительных цитокинов и/или усилением секреции Th2/противовоспалительных цитокинов. Наиболее выраженные изменения продукции цитокинов в культурах ДК больных с онкопатологией отмечались в группе пациентов со злокачественными лимфомами (снижение продукции ИФН- γ и ФНО- α и 5-кратное усиление продукции ИЛ-10). Изменения цитокин-продуцирующей функции ДК больных злокачественными глиомами и миеломной болезнью было менее выраженным и проявлялось умеренным возрастанием секреции ИЛ-10. При исследовании больных с вирусными гепатитами и туберкулезом легких наибольшие изменения в продукции цитокинов отмечались в культурах ДК пациентов с туберкулезной инфекцией. ДК больных туберкулезом легких отличались выраженным угнетением продукции ИФН- γ и одновременным усилением продукции ИЛ-10. В то же время у больных с вирусными гепатитами усиление продукции ИЛ-10 отмечалось только в культурах ДК, полученных у пациентов с ХВГС.

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. У больных с онкопатологией эти изменения были в наибольшей степени выражены у больных злокачественными лимфомами, в меньшей степени – у пациентов со злокачественными опухолями головного мозга и практически не выявлялись у больных множественной миеломой. Причем изменение Th1/Th2 стимулирующей активности ДК могли проявляться как умеренным снижением Th1-стимулирующей активности (у больных злокачественными опухолями головного мозга), так и усилением Th2-стимулирующей активности (у больных злокачественными лимфомами). При инфекционных заболеваниях изменение способности ДК активировать Th1/Th2 ответ было наиболее выраженным у больных туберкулезом легких и проявлялось одновременным снижением Th1-стимулирующей и увеличением Th2-стимулирующей активности. В то же время у больных с ХВГВ и ХВГС изменение регуляторной активности ДК проявлялось усилением Th2-стимулирующей активности и только у пациентов с исходом хронического гепатита в цирроз печени независимо от типа вирусной инфекции.

Полученные в целом данные свидетельствуют о том, что ДК у больных с онкопатологией и инфекционными заболеваниями могут отличаться 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.

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 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. В то же время, у больных злокачественными глиомами, множественной миеломой, хроническими вирусными гепатитами (не осложненными развитием цирроза печени), туберкулезом легких (с сохранным 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.

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, использованы при подготовке лекционного курса для клинических ординаторов НИИ клинической иммунологии СО РАМН, а также для последующего его включения в образовательный процесс на кафедре иммунологии Новосибирского государственного медицинского университета и Медицинском факультете Новосибирского государственного университета.

Предусмотренные календарным планом задания выполнены полностью.

Список использованных источников

1. Хонина Н.А., Центнер М.И., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Ступак В.В., Никонов С.Д., Черных Е.Р., Останин А.А. Характеристика и механизмы иммунных нарушений у больных со злокачественными опухолями головного мозга // *Вопр. онкологии.*- 2002.- Т. 48, № 2.- С. 196-201.
2. Arima S, Akbar S.M., Michitaka K., Horiike N, Nuriya H., Kohara M., Onji M. Impaired function of antigen-presenting dendritic cells in patients with chronic hepatitis B: localization of HBV DNA and HBV RNA in blood DC by in situ hybridization // *Int. J. Mol. Med.*- 2003.- Vol. 11.- P. 169-174.
3. Banchereau J., Steinman R.M. Dendritic cells and control of immunity. // *Nature.*- 1998.- V.392. – P.245-252.
4. Buelens C., Bartolome E.J., Amraouzi Z., Boutriaux M., Salmon I., Thielemans K., Willems F., Goldman M. Interleukin-3 and interferon β cooperate to induce differentiation of monocytes into dendritic cells with potent T-cell stimulatory properties.// *Blood.*-2002.-Vol.99.-P.993-998.
5. Della-Bella S.D., Nicola S., Riva A. et al. Functional repertoire of dendritic cells generated in granulocyte macrophage-colony stimulating factor and interferon α // *J.of Leukocyte Biology.* 2004. – V. 75. – P.106-116.
6. 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.- Vol. 20.- P. 234-242.
7. Farkas L., Beiske K., Lund-Johansen F. et al. Plasmacytoid dendritic cells accumulate in cutaneous lupus erythematosus lesions // *Am.J Phathology/.* – 2001. – V.159. – P.237-243.

8. Hartmann E., Wollenderg B., Rothenfusser S. et al. Identification and functional analysis of tumor-infiltration plasmacytoid dendritic cells on head and neck cancer // *Cancer Reseach.* – 2003. – V. 63. P. 6478-6487.
9. Herrmann J.L., Tailleux L., Nigou J., Giquel B., Puzo G. et al. The role of human dendritic cells in tuberculosis: protector or non-protector?// *Rev. Mal. Respir.-* 2006.- Vol.3.-P.621-628
10. Kalinski, P., J. H. Schuitemaker, C. M. Hilkens, M. L. Kapsenberg. Prostaglandin E2 induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a+CD83+ dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation// *J. Immunol.-* 1998. - V 161(8) – P 2804 -2809.
11. Kapsenberg M.L. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization // *Nature Rev. Immunol.* – 2003. – Vol. 3. – P.984-993.
12. Lichtner M., Rossi R., Mengoni F., Vignoli S., Colacchia B., Massetti A.P., Kamga I., Hosmalin A., Vullo V. and Mastroianni C.M. Circulating dendritic cells and interferon- α production in patients with tuberculosis: correlation with clinical outcome and treatment response // *Clin. Exp. Immunol.-* 2006.- V.143.-P.329–337.
13. Mariotti M., Teloni R., Iona E., Fattorini L., Romagnoli G., Gagliardi M.C., Orefici G., Nisini R. Mycobacterium tuberculosis diverts alpha interferon–induced monocyte differentiation from dendritic cells into immunoprivileged macrophage-like host cells // *Infect. Immun.* – 2004. – Vol. 72. – P.4385-4392.
14. Parlato S., Santini S., Lapenta C., Di Pucchio T., Logozzi M., Spada M., Giammarioly A., Malorni W., Fais S., Bellardelli F. Expression of CCR-7, MIP-3b, and Th1 chemokines in type I IFN-induced monocyte-derived dendritic cells –

- importance for the rapid acquisition of potent migratory and functional activities // Blood.- 2001.– Vol.98. – P. 3022-3029.
15. Pinzon-Charry A., Hoy C.S.K., Lahertyz R., Maxwell T., Walker D., Gardinerb R.A., O'Connor L., Pyke C., Schmidt C., Furnival C. Lo'pez J.A. A Population of HLA-DR+ Immature Cells Accumulates in the Blood Dendritic Cell Compartment of Patients with Different Types of Cancer// Neoplasia . – 2005. - Vol. 7. - No. 12. – P. 1112 – 1122
 16. Pinzon-Charry A., Maxwell T., Lopez J.A. Dendritic cell dysfunction in cancer: a mechanism for immunosuppression // Immunol Cell Biol.- 2005.- Vol. 83.- P. 451—461
 17. Rapp M., Ozcan Z., Steiger H.J., Werhet P., Sabel M.C., Sorg R.V. Cellular immunity of patients with malignant glioma:prerequisites for dendritic cell vaccination immunotherapy// J.Neurosurgery.- 2006.-Vol.105.-P.41-50
 18. Santini S., Pucchini T., Lapenta C et al. 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
 19. Tavakoli S., Schwerin W., Rohwer A., Hoffmann S., Weyer S., Weth R., Meisel H., Diepolder H., Geissler M., Galle P.R., Bocher H.F. Phenotype and function of monocyte derived dendritic cells in chronic hepatitis B virus infection//J General Virology.- 2004.- Vol. 85.- P. 2829-2836.
 20. Vanderheyde, N., Vandenabeele, P., Goldman, M. & Willems, F. Distinct mechanisms are involved in tumoristatic and tumoricidal activities of monocyte-derived dendritic cells. Immunology Letters, 2004, 91, 99-101.

21. Zou W., Machelon V., Colomb-L, Hermin A. et al. Stromal-derived factor-1 in human tumor recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. – Nat. Medicine. – 2001. – V.7. P.1339-1346.
22. Zheng B.J., Zhou J., Qu D., Siu K.L., Lam T.W., Lo H.Y., Lee S.S., Wen Y.M. Selective functional deficit in dendritic cell – T cell interaction is a crucial mechanism in chronic hepatitis B virus infection // J Viral Hepatitis.- 2004.- Vol. 11.- P. 217-224.
23. 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.
24. Santini S., Lapenta C., Logozzi M., et al. Type I Interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cells development and activity in vitro and in HU-PBL-SCID mice // J. Exp. Med . 2000. Vol. 191. P. 1777-1788.