

*На правах рукописи*



НАСОНОВА ГАЛИНА ВЛАДИМИРОВНА

**ХАРАКТЕРИСТИКА ИНТЕРФЕРОН-АЛЬФА-ИНДУЦИРОВАННЫХ  
ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК У БОЛЬНЫХ ЛИМФОПРОЛИФЕРАТИВНЫМИ  
ЗАБОЛЕВАНИЯМИ**

14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Новосибирск - 2013

**Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт клинической иммунологии» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук**

**Научный руководитель:**

член-корреспондент РАМН,

доктор медицинских наук, профессор

**Черных Елена Рэмовна**

**Официальные оппоненты:**

**Гайдунь Константин Валентинович**, доктор медицинских наук, профессор, руководитель лаборатории регуляции иммунопоза, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт клинической иммунологии» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук

**Шурлыгина Анна Вениаминовна**, доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории хронофизиологии, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт физиологии» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук

**Ведущая организация:** Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г.Томск

Защита состоится «14» марта 2013 г. в 14.00 часов на заседании диссертационного совета Д 001.001.01. в ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН по адресу: 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН

Автореферат разослан « » февраля 2013г.

**Ученый секретарь диссертационного совета**  
кандидат медицинских наук



**Белгородцев С.Н.**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Дендритные клетки (ДК) являются профессиональными антигенпрезентирующими клетками и играют центральную роль в поддержании врожденного и приобретенного иммунитета как через прямое клеточно-опосредованное взаимодействие, так и за счет продукции цитокинов. ДК обладают способностью примировать наивные Т-клетки и индуцировать иммунный ответ против различных, в том числе опухолевых, антигенов [Banchereau J., 1998 Steinman R.M., 1991]. Несмотря на существование опухоль-ассоциированных антигенов (ОАА) и генерацию цитотоксических лимфоцитов, способных лизировать опухолевые клетки, продолжающийся рост опухоли у большинства пациентов в отсутствие противоопухолевой терапии свидетельствует о слабости иммунного ответа. Одна из причин дефектности противоопухолевого иммунитета связана с неадекватной презентацией ОАА. Ключевую роль в презентации ОАА и активации цитотоксических Т-клеток играют дендритные клетки [Radford K.J., 2005]. Свойства ДК при опухолевых заболеваниях, в том числе при лимфопролиферативных заболеваниях (ЛПЗ), остаются недостаточно изученными.

В настоящее время имеется существенный прогресс в изучении механизмов развития лимфопролиферативных заболеваний. Но, несмотря на разработку новых медикаментозных препаратов и схем терапии достичь полных ремиссий удается менее чем в 40% случаев заболевания, а длительное безрецидивное выживание – в 30%.

По данным литературы большинство исследований проводится на ДК, генерируемых *in vitro* из моноцитов (CD14<sup>+</sup>) периферической крови в присутствии гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) и интерлейкина-4 (ИЛ-4) с последующим добавлением дозревающих стимулов [Wang Y.H., 2009]. Кроме того, генерацию ДК можно индуцировать путем культивирования моноцитов с ГМ-КСФ и интерфероном- $\alpha$  (ИФН- $\alpha$ ). Генерируемые в этом случае ДК (ИФН-ДК) характеризуются следующими особенностями: более высокой миграционной активностью, выраженной антигенпрезентирующей функцией, большей стабильностью в условиях дефицита ростовых факторов, а также способностью стимулировать как Th1-, так и Th2-ответ. Кроме того, ИФН-ДК являются более эффективными стимуляторами CD8<sup>+</sup> эффекторных Т-клеток и обладают выраженной цитотоксической/цитостатической активностью [Lapenta C., 2006, Santini S., 2003]. В литературе имеются отдельные сообщения о фенотипических и функциональных особенностях ДК, получаемых в присутствии ИЛ-4, у больных ЛПЗ, однако данные немногочисленны и зачастую

противоречивы. Свойства ДК у больных ЛПЗ, генерируемых в присутствии ИФН- $\alpha$ , практически не изучены.

Исходя из вышесказанного, была сформулирована **цель исследования**:

Изучить фенотипические и функциональные свойства ИФН-ДК у больных лимфопролиферативными заболеваниями и разработать подходы к регуляции функциональной активности ДК *in vitro*.

**Задачи исследования:**

1. Провести сравнительное исследование поверхностных маркеров, характеризующих дифференцировку и созревание ДК, в культурах ИФН-ДК у здоровых доноров и больных ЛПЗ.
2. Оценить продукцию цитокинов и аллостимуляторную активность ИФН-ДК у больных ЛПЗ в сравнении со здоровыми донорами.
3. Провести сравнительное исследование Th1/Th2 – стимуляторной активности ДК доноров и больных ЛПЗ.
4. Исследовать противоопухолевую цитотоксическую активность ИФН-ДК у больных ЛПЗ и здоровых доноров против опухолевых клеток HEp-2 и Jurkat.
5. Оценить влияние иммуноактивных факторов (производных этиленпиперазина, двуцепочечной ДНК человека, рекомбинантного ИЛ-2) на функциональную активность ИФН-ДК больных ЛПЗ.
6. Оценить влияние ингибитора простагландина E2 - индометацина на аллостимуляторную активность ИФН-ДК у пациентов ЛПЗ.

**Научная новизна.** В представленной работе впервые охарактеризованы фенотипические и функциональные свойства ИФН-ДК у больных с различными формами лимфопролиферативных заболеваний, получивших программную полихимиотерапию. Установлено, что в культурах ИФН-ДК больных преобладают клетки с фенотипом незрелых ( $CD83^-CD1a^+$ ) и промежуточных по степени зрелости ( $CD83^+CD1a^+$ ) ДК, культуры которых содержат меньшее количество терминально дифференцированных ( $CD83^+CD1a^-$ ) и активированных ( $CD25^+$ ) ДК. Впервые показано, что нарушение созревания/активации ИФН-ДК у больных ЛПЗ ассоциированы с нарушением цитокин-продуцирующей функции, в частности, снижением продукции ИФН- $\gamma$  и усилением продукции ИЛ-10. Установлено, что ИФН-ДК обладают сниженной способностью стимулировать пролиферацию Т-клеток в смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ), что сопряжено не только с меньшей зрелостью ДК и повышенной продукцией ими ИЛ-10, но и достаточно высокой экспрессией лиганда к рецептору программированной клеточной смерти - B7-H1. Кроме того, выявлено, что ИФН-ДК обладают повышенной Th2-

стимуляторной активностью, в частности, индуцируют более выраженный прирост ИЛ-4-экспрессирующих Т-клеток в СКЛ. Особенностью ИФН-ДК больных ЛПЗ является также снижение цитотоксической активности ДК против TRAIL-резистентной линии HEp-2, при сохранной цитотоксичности против клеток TRAIL-чувствительной линии Jurkat. Фенотипические и функциональные изменения ИФН-ДК при ЛПЗ наиболее выражены у больных злокачественными лимфомами (ЗЛ) и в меньшей степени - у пациентов множественной миеломой (ММ).

**Теоретическая и практическая значимость.** Теоретическая значимость работы заключается в расширении представлений о количественных и функциональных характеристиках ИФН-ДК при ЛПЗ. Выявленные при ЛПЗ (особенно у больных ЗЛ) фенотипические и функциональные изменения ИФН-ДК свидетельствуют о нарушении дифференцировки/созревания ДК и снижении их способности индуцировать и опосредовать реакции клеточного иммунитета, лежащие в основе противоопухолевой защиты. При этом более выраженные нарушения ИФН-ДК у больных ЗЛ, чем у пациентов ММ, являются еще одним подтверждением патогенетической разнородности данных нозологических форм ЛПЗ. Практическая значимость работы заключается в установлении возможности генерации ИФН-ДК у больных ЛПЗ. Кроме того, показана принципиальная возможность коррекции нарушенных функций ИФН-ДК у больных ЗЛ путем культивирования ДК *in vitro* с рядом иммуноактивных факторов – рекомбинантного ИЛ-2 человека, двуцепочечной ДНК человека и сополимера этиленпиперазина, а также путем обработки ИФН-ДК (при выраженном снижении аллостимуляторной активности) индометацином. Полученные данные диктуют необходимость тестирования свойств ДК при проведении иммунотерапии и обосновывают возможность использования ИФН-ДК для получения клеточных вакцин у пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями.

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. ИФН-ДК при ЛПЗ характеризуются изменением фенотипических и функциональных свойств, которые проявляются задержкой созревания и нарушением функциональной активности в виде повышенной продукции ИЛ-10, снижения аллостимуляторной, цитотоксической и усиления Th2-стимуляторной активности.
2. Изменение фенотипических и функциональных свойств ИФН-ДК более выражены у пациентов ЗЛ, чем у пациентов ММ.
3. Нарушения функциональной активности ИФН-ДК при ЗЛ корригируются *in vitro* путем культивирования ИФН-ДК с сополимером N-окси-1,4-этиленпиперазина и (N-карбоксиил)-1,4-этиленпиперазиний бромида, двуцепочечной ДНК человека,

рекомбинантным ИЛ-2 и обработкой индометацином (при выраженном угнетении аллостимуляторной активности ИФН-ДК).

**Апробация работы.** Основные результаты работы доложены и обсуждены на научно-практических конференциях XIII Международном конгрессе по приполярной медицине (Новосибирск, 2006), «Дни иммунологии в Сибири» (Омск, 2007), на 6-ой отчетной конференции и межлабораторных семинарах ФГБУ НИИ Клинической иммунологии СО РАМН.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 6 печатных работ, в том числе 2 статьи в центральной печати в рецензируемых журналах.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация написана в традиционном стиле и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, 6 глав собственных результатов, обсуждения, заключения и выводов. Материал изложен на 97 страницах машинописного текста, включающего 4 таблицы и 16 рисунков. Прилагаемая библиография содержит ссылки на 123 литературных источника, в том числе 117 иностранных.

#### **Благодарности**

Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю член-корр. РАМН, проф. Е.Р.Черных за поддержку и помощь, оказанную при работе над диссертацией; сотрудникам лаборатории клеточной иммунотерапии за практическую помощь в проведении экспериментальной части исследования.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**Характеристика больных, включенных в исследование.** Диссертационная работа основана на результатах клинико-иммунологического обследования 56 пациентов ЛПЗ и 59 здоровых доноров крови. Пациенты распределялись по нозологическим группам следующим образом: неходжкинские лимфомы – 22 человека, лимфома Ходжкина – 21 человек, множественная миелома – 13 человек. Две трети пациентов имели продвинутые стадии заболевания, основная часть пациентов характеризовались длительностью течения заболевания до 5 лет, на момент обследования все пациенты имели в анамнезе 7 и более курсов химиотерапии. Диагностика лимфопролиферативного заболевания основывалась на результатах клинических исследований (общий анализ крови, общий анализ мочи, биохимическое исследование крови, трепанобиопсия), инструментальных исследований (томографическое исследование, рентгенологическое).

**Иммунологические исследования.** Мононуклеарные клетки (МНК) из венозной гепаринизированной крови выделяли методом градиентного центрифугирования и в концентрации  $0,1 \times 10^6$ /лунку культивировали в 96-луночных круглодонных планшетах для иммунологических исследований в полной культуральной среде RPMI-1640 при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе.

*Дендритные клетки генерировали* путем культивирования прилипающей фракции МНК в присутствии ГМ-КСФ (Sigma-Aldrich, 40 нг/мл) и ИФН- $\alpha$  (Роферон-А, Roche, Швейцария, 1000 Ед/мл) в течение 3 суток. На последующие 24 часа в качестве дозревающего стимула вносили ЛПС (*E.colli* 0114:B4, Sigma-Aldrich, 10 мкг/мл). В отдельной серии экспериментов в культуры ДК совместно с ЛПС добавляли препараты на основе производного этиленпиперазина (сЭП, 5 мкг/мл), двуцепочечной ДНК человека (дцДНК, 5 мкг/мл), а также рекомбинантного интерлейкин-2 человека (рИЛ-2, 100 ЕД/мл). В отдельной серии экспериментов ДК дополнительно инкубировали в течение 45 минут при 37°C с индометацином в дозе 50 мкг/мл.

*Оценку поверхностных маркеров* проводили методом проточной цитофлуориметрии, используя меченные фикоэритрином (PE) анти-CD1a, анти-CD123, анти-B7-H1 мАТ (BD PharMingen, США) и анти-CD14 (Сорбент, Москва), меченные APC анти-CD11c мАТ (BD PharMingen, США), меченные FITC анти-CD25, анти-CD83 (BD PharMingen, США).

*Концентрацию цитокинов* ФНО- $\alpha$ , ИЛ-4, ИФН- $\gamma$  («Вектор-Бест», Новосибирск), ИЛ-10 («Цитокин», Санкт-Петербург) определяли в культуральных супернатантах ДК методом иммуноферментного анализа.

*Определение внутриклеточной экспрессии цитокинов* в CD3<sup>+</sup>-популяции лимфоцитов периферической крови проводили методом трехцветной проточной цитометрии (FACS Calibur, Becton Dickinson) с использованием APC-меченных моноклональных анти-CD3-антител, FITC-конъюгированных анти-ИФН $\alpha$  и PE-меченных анти-ИЛ-4-антител.

*Аллостимуляторную активность* ДК оценивали в реакции смешанной культуры лимфоцитов (СКЛ). В качестве отвечающих клеток использовали МНК доноров ( $0,1 \times 10^6$ /лунку), стимуляторами служили дендритные клетки в соотношении МНК:ДК 10:1. Пролиферативный ответ оценивался на 5 сут радиометрически по включению <sup>3</sup>H-тимидина (1 мкКю/лунку), вносимого за 18 ч до окончания культивирования.

*Цитотоксическую активность* ДК в отношении опухолевых клеток оценивали по лизису клеток-мишеней опухолевых линий HEp-2 (клетки эпителиальной карциномы гортани человека) и Jurkat (Т-клеточная лимфома) дендритными клетками в соотношениях

40:1, 20:1 и 10:1 для клеточной линии НЕР-2 и 2:1, 1:1 и 1:2 для клеток линии Jurkat. Процент цитотоксичности в тесте с <sup>3</sup>Н-тимидином рассчитывали по формуле:  $[1 - (\text{имп/мин в культурах с эффекторными клетками} / \text{имп/мин в контрольных культурах в отсутствие эффекторных клеток})] \times 100\%$ . Расчет цитотоксической активности ( % ) в МТТ-тесте проводили по формуле:  $[1 - (\text{ОП}_{\text{э+м}} - \text{ОП}_{\text{э}}) / \text{ОП}_{\text{м}}] \times 100$ , где ОП<sub>э+м</sub> – значение оптической плотности в опытных сериях; ОП<sub>э</sub> – значение оптической плотности в лунках с эффекторами; ОП<sub>м</sub> – значение оптической плотности в лунках с мишенями.

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

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Задачей первого этапа явилось сравнительное исследование фенотипических маркеров в культурах ИФН-ДК у больных ЛПЗ в сравнении с культурами ИФН-ДК здоровых доноров (табл.1).

Таблица 1

#### Фенотипическая характеристика ИФН-ДК здоровых доноров и больных ЛПЗ

маркеры (%)	доноры n=13	ЛПЗ n=20	ЗЛ n=10	ММ n=10
CD14 <sup>+</sup>				
M ± SE	8,6±1,4	23,6±3,3*	28,1±5,8*	19,1±3,04*
Me	9,0	24,0	27,0	20,0
min-max	2,0-18,0	2,0-75,0	5,0-75,0	2,0-30,0
CD1a <sup>+</sup>				
M ± SE	10,4±2,07	13±2,7	21,1±3,88*, <sup>≠</sup>	5,05±1,34*
Me	10,0	8,0	20,5	4,65
min-max	1,6-32	0,34-39,0	5,2-39,0	0,34-13,3
CD83 <sup>+</sup>				
M ± SE	25,6±2,54	20,2±2,7	17,2±3,39*	23,1±4,1
Me	24,5	17,9	15,6	23,2
min-max	10,0-54,0	4,0-45,6	4,0-37,0	5,0-45,6
CD25 <sup>+</sup>				
M ± SE	25,0±3,49	11,06±2,36*	10,4±3,4*	11,7±3,4*
Me	26,0	8,0	5,5	10,5
min-max	9,0-44,0	0,3-32,0	1,0-28,0	0,3-32,0
CD1a <sup>+</sup> CD83 <sup>+</sup>				
M ± SE	19,0±2,35	13,3±2,58*	6,6±0,97*	19,9±4,1
Me	16,5	8,5	6,05	22,0
min-max	9,0-32,7	2,0-40,0	2,0-12,0	2,9-40,0
CD1a <sup>+</sup> CD83 <sup>+</sup>				
M ± SE	4,6±1,02	7,45±2,1	11,7±3,8	3,1±0,76
Me	5,5	4,56	6,6	2,55
min-max	0,4-13,0	0,4-37,0	2,0-37,0	0,4-7,0

**Примечание:** представлены данные в виде средних значений M ± SE, %; Me – медиана; min – max – значения минимум – максимум в исследуемых группах; n – число пациентов. \* p<sub>U</sub> < 0,01- достоверность различий между контрольной (доноры) и группой пациентов. <sup>≠</sup> p<sub>U</sub> < 0,01- достоверность различий между группами пациентов с ЗЛ и ММ.



Учитывая, что дифференцировка моноцитов в миелоидные ДК сопровождается потерей молекулы CD14 и появлением CD1a, а в последующем - снижением экспрессии CD1a и появлением CD83, оценка указанных молекул позволяет оценить состояние дифференцированности/зрелости ДК. ДК больных отличались более высоким содержанием CD14<sup>+</sup> клеток, причем у больных ЗЛ возрастание данной популяции было более выраженным, чем у пациентов ММ. У больных также отмечалось возрастание относительного числа незрелых CD1a<sup>+</sup> клеток и снижение зрелых CD83<sup>+</sup> клеток, преимущественно за счет пациентов ЗЛ. Снижение численности ДК с наличием активационного маркера CD25 было характерно как для больных ЗЛ, так и для пациентов ММ. Анализ совместной экспрессии CD1a и CD83 молекул на поверхности ДК показал, что клетки больных ЗЛ отличались практически 3-кратным снижением числа терминально-дифференцированных (CD83<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup>) и более чем двукратным возрастанием относительного содержания незрелых клеток (CD83<sup>+</sup>CD1a<sup>+</sup>). В то же время содержание указанных субпопуляций ДК в группе больных ММ не отличалось от таковых у доноров.

Одной из особенностей ИФН-ДК является экспрессия молекулы CD123 (рис 1.)

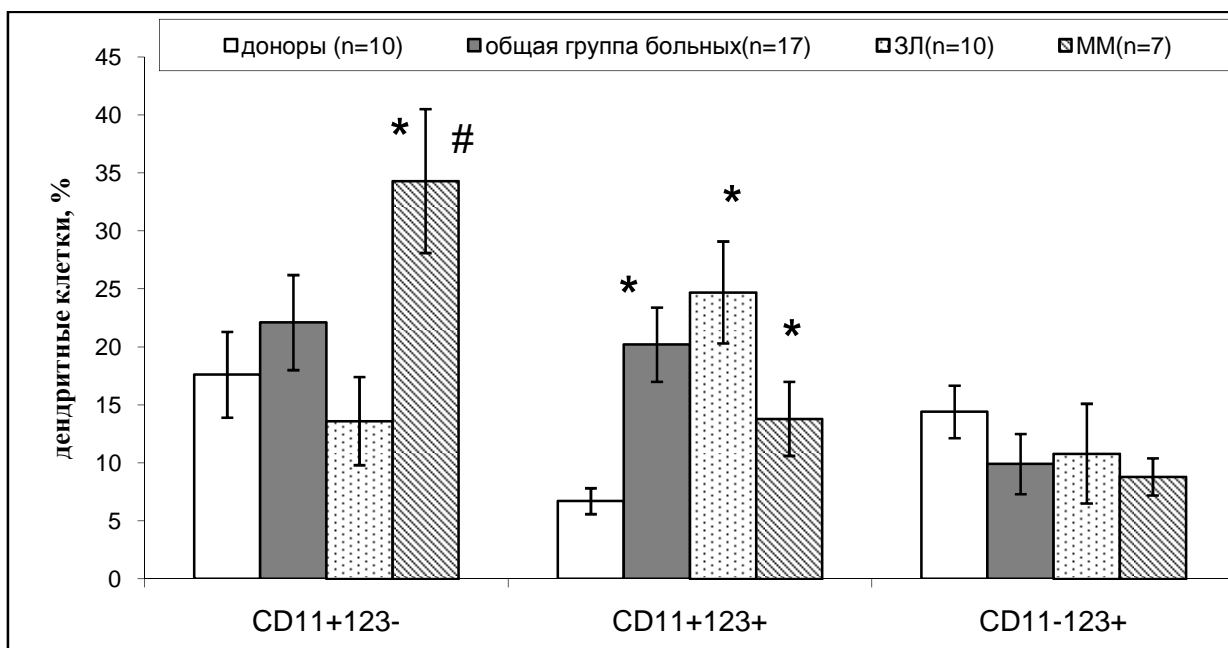


Рисунок 1. Экспрессия CD11c и CD123 в культурах ИФН-ДК больных ЛПЗ

Представлены средние значения ( $M \pm S.E.$ , %) относительного содержания различных субпопуляций ДК. \* -  $p_U < 0,05$  – достоверность различий по сравнению с донорами (U – критерий Вилкоксона-Манна-Уитни). # -  $p_U < 0,05$  – достоверность различий между группами пациентов ЗЛ и ММ (U – критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

У доноров большая часть CD123<sup>+</sup> клеток сосредоточена в популяции CD11c<sup>-</sup>, тогда как у больных ЛПЗ данный маркер обнаруживался среди CD11c<sup>+</sup> ДК, соответственно,

количество CD11c<sup>+</sup>CD123<sup>+</sup> клеток было достоверно повышено, причем как у больных злокачественными лимфомами, так и множественной миеломой (рис.1).

Поскольку молекула CD123 экспрессируется на моноцитах и ее экспрессия снижается по мере дифференцировки моноцитов в ДК, можно полагать, что возрастание CD11c<sup>+</sup>CD123<sup>+</sup> клеток является еще одним свидетельством задержки дифференцировки ИФН-ДК и их менее зрелого фенотипа.

Сравнительный анализ продукции цитокинов в культурах ДК больных и доноров показал, что пациенты характеризовались сниженной продукцией ИФН- $\gamma$  за счет пациентов ЗЛ. Вторым ярким отличительным признаком было выраженное возрастание концентрации ИЛ-10, также наиболее характерное для больных ЗЛ (табл. 2).

Таблица 2

**Продукция цитокинов дендритными клетками доноров и больных ЗЛ и ММ**

показатели	доноры n=17	ЛПЗ n=25	ЗЛ n=12	ММ n=13
ИФН- $\gamma$ , пг/мл				
M $\pm$ SE	113 $\pm$ 55,1	83,5 $\pm$ 22,7	35,0 $\pm$ 17,2*	142,4 $\pm$ 35,4
Me	36	34,2	11,3	150,3
min-max	3,5-792,2	1,0-340,6	1,0-118,6	1,0-340,6
ИЛ-4, пг/мл				
M $\pm$ SE	3,6 $\pm$ 1,4	1,5 $\pm$ 0,46	2,0 $\pm$ 0,93	1,1 $\pm$ 0,32
Me	2,5	0,8	0,55	1,0
min-max	0,1-23,9	0,1-6,9	0,1-6,9	0,19-2,97
ФНО- $\alpha$ , пг/мл				
M $\pm$ SE	745,4 $\pm$ 73,6	794,7 $\pm$ 103,9	813,3 $\pm$ 93,6	744,9 $\pm$ 338,6
Me	819,9	881,9	867,3	1034,0
min-max	214,9-1102	69,9-1130,6	197,4-1036,7	69,9-1130,6
ИЛ-10, пк/мл				
M $\pm$ SE	82,0 $\pm$ 13,6	266,2 $\pm$ 48,2 *	444,3 $\pm$ 59,3*	114,8 $\pm$ 41,6
Me	98,8	156,5	446,9	62,1
min-max	38,8-131,2	1,5-733,9	121,7-733,9	1,5-513,5

**Примечание:** представлены средние значения с ошибкой средней (M $\pm$ SE), медианы (Median) и min – max – значения минимум – максимум в исследуемых группах концентрации цитокинов (пг/мл) в цельных супернатантах ДК больных злокачественной лимфомой и множественной миеломой. \* - P<sub>U</sub><0,05 -достоверность различий между ИФН-ДК доноров и пациентов ЛПЗ.

Учитывая данные фенотипического анализа о снижении экспрессии CD83 и CD25 и повышении CD1a в культурах ДК больных, было высказано предположение, что задержка созревания и активации ДК у больных может быть обусловлена повышенной продукцией ИЛ-10. Чтобы проверить это предположение, была исследована корреляционная зависимость данных показателей (рис.2).

Корреляционный анализ показал наличие сильной обратной зависимости между концентрацией ИЛ-10 и экспрессией дендритными клетками маркеров зрелых (CD83) и активированных (CD25) ДК в каждой группе больных. В то же время уровень продукции

ИЛ-10 прямо коррелировал с количеством CD1a – позитивных клеток, представляющих менее зрелые ДК.

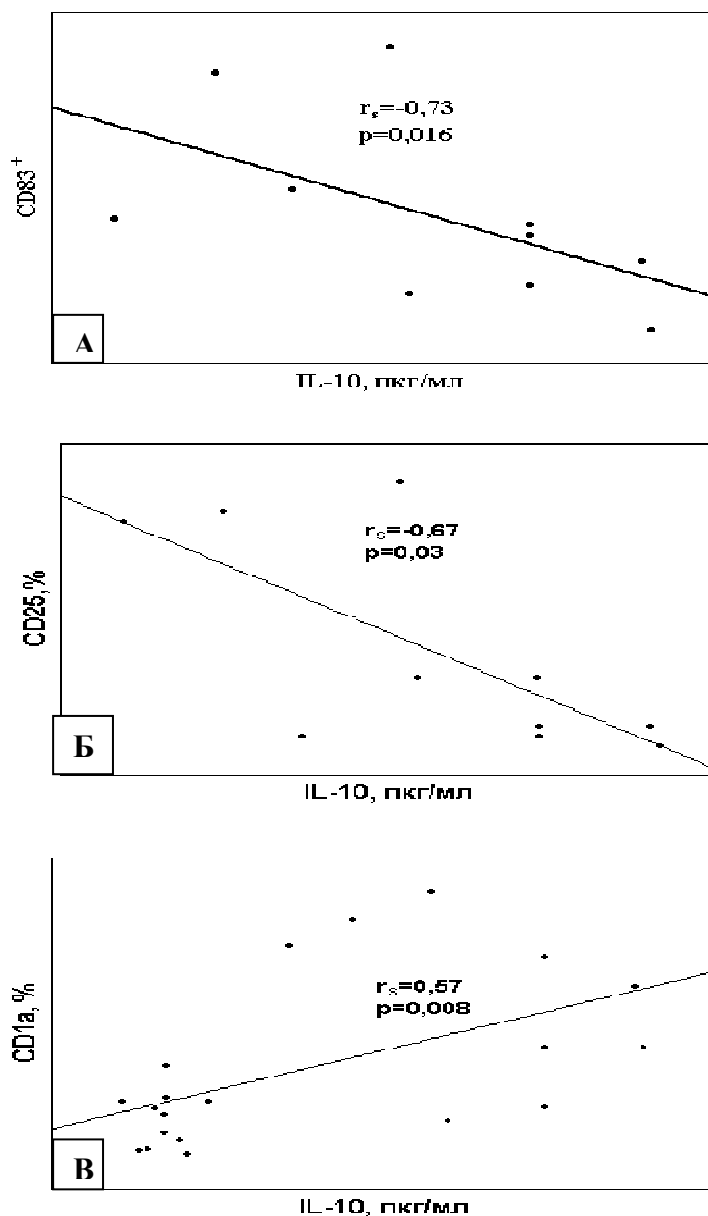
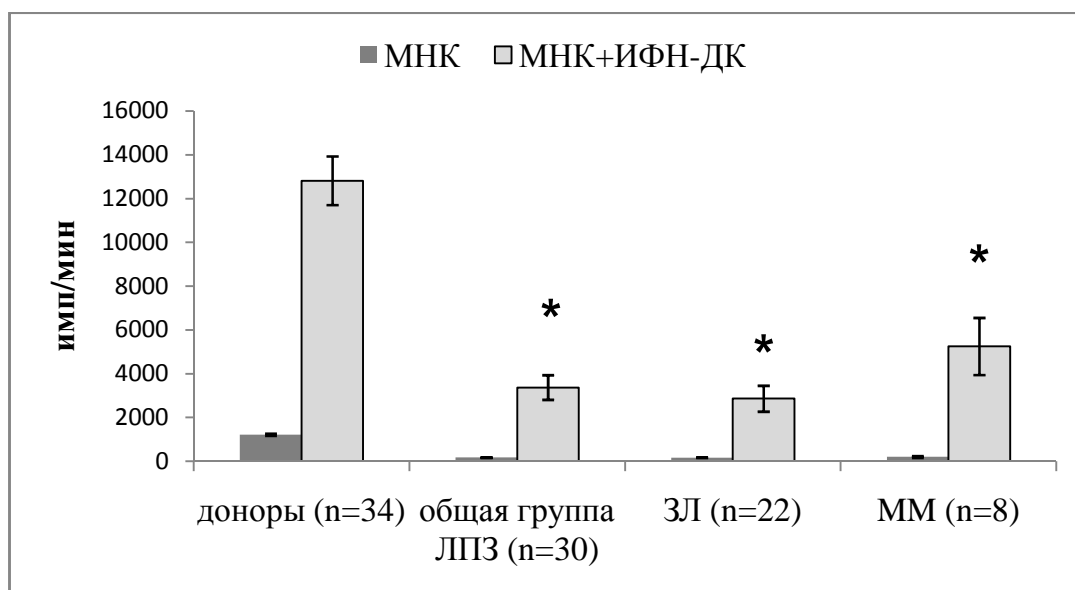


Рисунок 2 (А, Б, В). Корреляционная зависимость уровня экспрессии CD83, CD25, CD1a и продукции ИЛ-10

$r_s$  – коэффициент корреляции по Спирмену;  $p$  – достоверность различий по сравнению с донорами.

Выявленные выше нарушения созревания ДК и изменения их цитокинпродуцирующей функции в сторону усиления продукции ИЛ-10 и снижения продукции ИФН- $\gamma$  позволили предположить, что ДК при лимфопролиферативных заболеваниях могут быть функционально дефектны. Одним из важных показателей функциональной активности ДК является аллостимуляторная активность, т.е. способность ДК индуцировать пролиферативный ответ аллогенных Т-клеток в СКЛ (рис. 3).



**Рисунок 3. Аллостимуляторная активность ДК здоровых доноров и больных ЛПЗ**

Представлены средние значения ( $M \pm S.E.$ ) спонтанной пролиферативной активности МНК (МНК) и ответа в СКЛ, индуцированного ИФН-ДК (МНК+ИФН-ДК) пациентов ЛПЗ (общая группа), ЗЛ, ММ и здоровых доноров. Респондеры – МНК доноров ( $0,1 \times 10^6$ /лунку), стимуляторы – аллогенные дендритные клетки здоровых доноров или больных ЛПЗ, ЗЛ, ММ в соотношении МНК:ДК 10:1 ( $0,1 \times 10^5$ /лунку). Уровень пролиферации (имп/мин) оценивали по включению  $^3H$ -тимидина, вносимого за 18 ч до окончания культивирования. \* -  $p_U < 0,05$  - достоверность различий по сравнению с ДК доноров (U – критерий Вилкоксона-Мана-Уитни).

Сравнительный анализ способности ДК доноров и больных стимулировать пролиферацию Т-клеток выявил снижение аллостимуляторной активности ДК пациентов по сравнению со здоровыми донорами. Интенсивность пролиферативного ответа в СКЛ, индуцированного ДК пациентов, была практически в 4 раза ниже по сравнению с уровнем пролиферативного ответа в СКЛ в присутствии ДК доноров. При анализе в подгруппах с различными нозологическими формами снижение способности стимулировать пролиферацию Т-клеток было характерно как для ДК больных ЗЛ, так и ММ.

Низкая аллостимуляторная активность ДК может быть обусловлена не только незрелостью ДК и изменением продукции цитокинов, но и их повышенной супрессорной или проапоптогенной активностью. Недавние исследования показали, что важную роль в детерминировании функциональной активности ИФН-ДК против Т-лимфоцитов играет молекула В7-Н1, которая при взаимодействии с PD-1 рецептором на Т-клетках индуцирует анергию и апоптоз Т-клеток. Усиление экспрессии данной молекулы может обуславливать повышенную супрессорную активность ДК при онкологических и инфекционных заболеваниях. Сравнительный анализ показал, что ДК больных ЗЛ отличались практически двукратным увеличением относительного содержания клеток, экспрессирующих PD-1 лиганд (В7-Н1) по сравнению со здоровыми донорами (рис. 4).

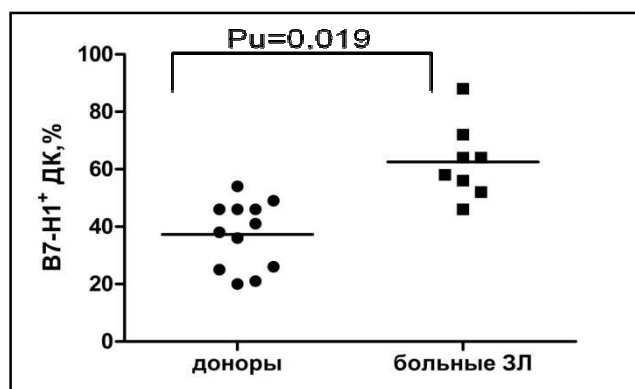


Рисунок 4. Экспрессия В7-Н1 на дендритных клетках больных ЗЛ

Представлены индивидуальные значения относительного содержания В7-Н1<sup>+</sup> ДК. \* -  $P_U < 0,05$  – достоверность различий по сравнению с донорами (U – критерий Вилкоксона-Манна-Уитни). Горизонтальные линии – средние значения в исследуемых группах.

Выявленные изменения продукции цитокинов, стимулирующих Th1 или Th2 ответ, в совокупности с нарушенной способностью стимулировать пролиферацию Т-клеток в СКЛ позволили предположить, что ДК пациентов могут характеризоваться измененной Th1- или Th2-стимуляторной активностью. Поэтому следующим разделом работы явилось исследование способности ДК активировать Т-хелперные клетки 1-го или 2-го типа. Для этого исследовалось количество Т-клеток с внутриклеточным содержанием ИФН- $\gamma$  или ИЛ-4 в СКЛ (табл. 3).

Таблица 3

**Влияние ДК здоровых доноров и больных ЛПЗ на внутриклеточную экспрессию Т-клетками ИФН- $\gamma$  и ИЛ-4**

Источник ДК	CD3 <sup>+</sup> ИФН- $\gamma$ <sup>+</sup> Т-клетки (%)			CD3 <sup>+</sup> ИЛ-4 <sup>+</sup> Т-клетки (%)		
	МНК <sub>0</sub>	МНК + ДК	ИВ <sub>ДК</sub>	МНК <sub>0</sub>	МНК + ДК	ИВ <sub>ДК</sub>
Доноры (n=18)	1,83±0,3	6,35±0,61	5,4±1,1	1,3±0,2	1,6±0,3	1,6±0,3
Больные ЛПЗ (n=22)	1,2±0,06	5,7±0,3	5,3±0,7	1,5±0,1	5,5±0,7	3,6±0,4*
Больные ЗЛ (n=10)	1,33±0,1	5,83±0,6	5,4±1,4	1,9±0,1	7,7±1,1*	4,2±0,6*
Больные ММ (n=12)	1,36±0,1	6,11±0,58	5,51±1,4	1,9±0,1	2,3±1,1	2,0±0,24

**Примечание:** представлено относительное содержание CD3<sup>+</sup>Т-клеток с внутриклеточной экспрессией ИФН- $\gamma$  и ИЛ-4 в культурах МНК, лишенных моноцитов (МНК<sub>0</sub>), и активированных ДК (МНК + ДК) здоровых доноров и больных ЛПЗ. ИВ<sub>ДК</sub> – индекс влияния ДК. \* -  $p_U < 0,05$  - достоверность различий показателей по сравнению с донорами (U – критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

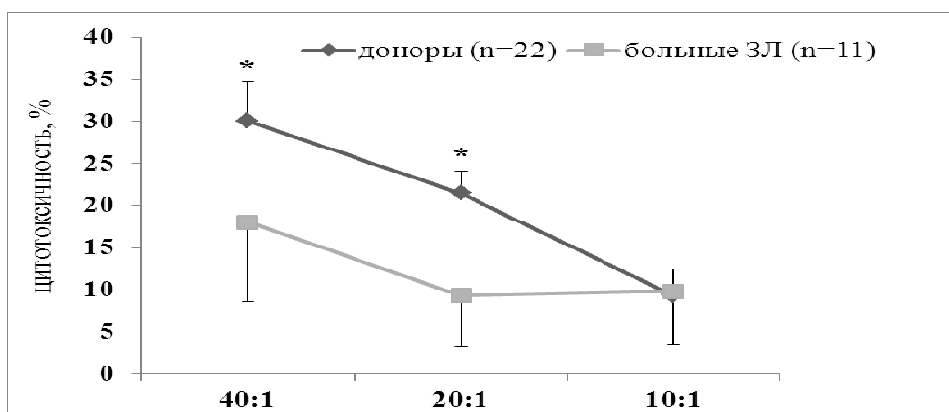
ДК больных обладали сходной с донорскими значениями стимулирующей активностью в отношении генерации ИФН- $\gamma$ -продуцирующих клеток, однако отличались

более выраженной способностью активировать Т-клетки, продуцирующие ИЛ-4. Это проявлялось большим приростом количества  $CD3^+ИЛ-4^+$  Т-клеток в культурах СКЛ, индуцированных ДК больных, по сравнению с аналогичными показателями в культурах СКЛ, индуцированных ДК доноров.

При анализе различных нозологий в общей группе больных ЛПЗ наибольшие изменения функциональной активности ДК наблюдались в группе пациентов ЗЛ. ДК этих пациентов достоверно сильнее стимулировали прирост  $CD3^+ИЛ-4^+$  Т-клеток. В группе больных ММ Th2-стимуляторная активность ДК была практически сходной с таковой для ДК здоровых доноров.

Одной из важных эффекторных функций дендритных клеток является цитотоксическая активность, играющая важную роль в элиминации опухолевых клеток. В связи с этим отдельный раздел был посвящен сравнительной оценке цитотоксической активности ИФН-ДК у здоровых доноров и больных ЛПЗ. Данная часть исследований проводилась в группе пациентов ЗЛ, так как именно при этой нозологии выявлялись наиболее выраженные изменения фенотипических и функциональных свойств.

Сравнительная оценка показала, что ДК больных отличались сниженной цитотоксической активностью против TRAIL-резистентной линии Нер-2. В частности, цитотоксичность ДК больных была двукратно ниже, чем у ДК доноров (рис. 5).

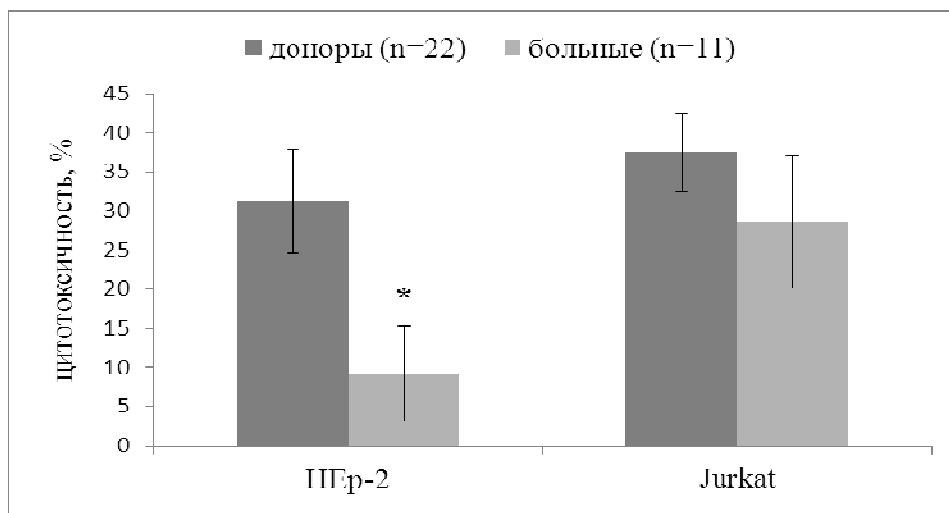


**Рисунок 5. Цитотоксическая активность ИФН-ДК здоровых доноров и больных ЗЛ против клеток линии Нер-2**

Представлены средние значения ( $M \pm SE$ ) цитотоксической активности ИФН-ДК доноров (n=22) и больных (n=11) против опухолевой линии Нер-2. Клетки-эффекторы (ДК) и меченные  $^3H$ -тимидином клетки-мишени (Нер-2) культивировали в соотношении 40:1, 20:1 и 10:1 в течение 18 ч. \* -  $p < 0,05$  - достоверность различий между донорами и больными.

Наряду с оценкой лизиса опухолевых клеток в тесте с  $^3H$ -тимидином, для оценки цитотоксической активности ИФН-ДК был также использован МТТ-тест. В данной серии экспериментов цитотоксическая активность оценивалась не только против клеток TRAIL-

резистентной линии НЕР-2, но и против TRAIL-чувствительной линии Jurkat. Так же, как и в тесте с  $^3\text{H}$ - тимидином, ИФН-ДК больных обладали сниженной цитотоксической активностью против клеток линии НЕР-2. В то же время цитотоксическая активность ДК больных против опухолевых клеток линии Jurkat оставалась сохранный (рис. 6).



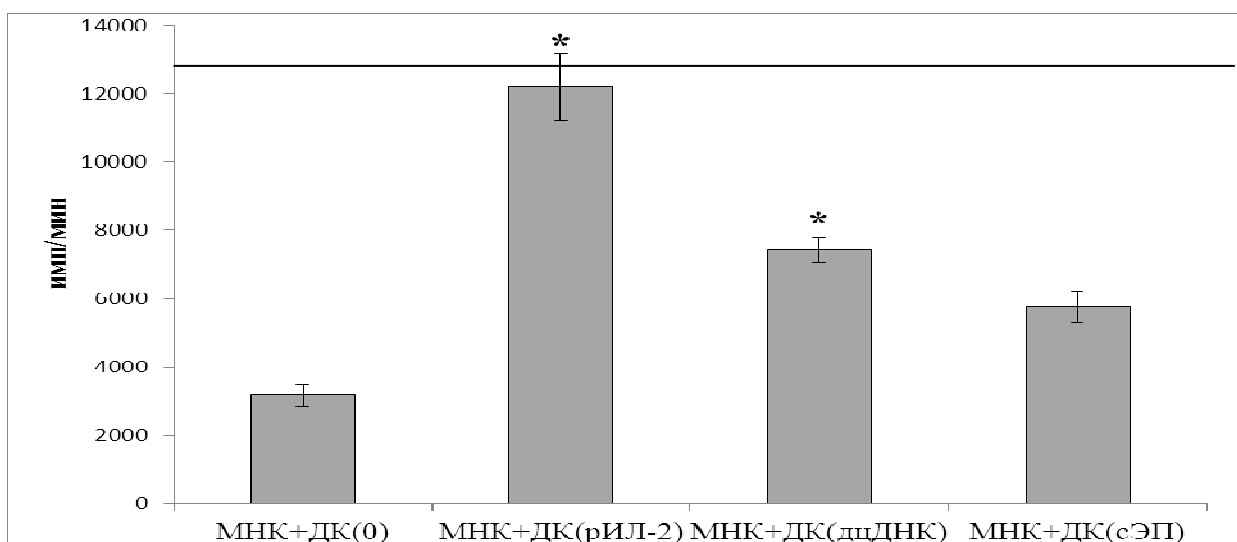
**Рисунок 6. Цитотоксическая активность ИФН-ДК больных ЗЛ против клеток линии НЕР-2 и клеток линии Jurkat**

Представлены средние значения ( $M \pm SE$ ) цитотоксической активности ИФН-ДК больных ЗЛ против опухолевой линии НЕР-2 и Jurkat. Оценка цитотоксической активности ДК проводилась с помощью МТТ-теста. ДК и клетки НЕР-2 и Jurkat культивировали в соотношении 1:1 в течение 24 ч. \* -  $p < 0,05$  - достоверность различий между донорами и больными.

Одним из важных аспектов, обуславливающих эффективность иммунотерапии, является полноценность генерируемых ДК. Поэтому выявленные изменения фенотипа и функциональной активности, генерируемых у больных ЛПЗ, побудили к поиску подходов, направленных на восстановление функциональной активности ДК. В качестве потенциальных иммунокорректоров были выбраны рекомбинантный интерлейкин-2 человека (рИЛ-2), двуцепочечная ДНК человека (дцДНК) и сополимер производного этиленпиперазина (сЭП), обладающие выраженной иммуностимуляторной активностью.

В качестве интегрального показателя функциональной активности ДК в данной серии экспериментов исследовали способность ДК к стимуляции пролиферативного ответа Т-лимфоцитов в СКЛ (рисунок 7).

Сравнение эффективности исследуемых соединений показало, что все три иммуноактивных фактора обладали способностью усиливать аллостимуляторную активность ДК. При этом наиболее выраженным стимулирующим эффектом обладал рИЛ-2, восстанавливающий способность ДК стимулировать пролиферативный ответ Т-клеток практически до уровня донорских значений.



**Рисунок 7. Влияние иммуноактивных факторов на аллостимуляторную активность ДК пациентов злокачественными лимфомами**

Представлены средние значения ( $M \pm SE$ ) аллостимуляторной активности ЛПС-стимулированных ИФН-ДК больных ЗЛ ( $n=20$ ). \* -  $P_U < 0,05$  - достоверность различий между интактными ИФН-ДК больных (0) и ИФН-ДК больных, культивированными в присутствии сЭП, дцДНК или рИЛ-2 (U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни). Горизонтальная линия – средний уровень значений аллостимуляторной активности ДК доноров.

Убедившись в способности исследованных иммуноактивных факторов оказывать позитивный эффект на аллостимуляторную активность ДК больных, на следующем этапе была исследована возможность стимуляции дефектной цитотоксической активности ДК с помощью указанных медиаторов. Цитотоксическую активность ИФН-ДК оценивали против клеток опухолевых линий Нер-2 и Jurkat в МТТ-тесте. Сравнение средних показателей цитотоксичности интактных и модифицированных ДК показало (табл. 4), что все анализируемые иммуноактивные факторы достоверно усиливали исходно низкую цитотоксическую активность ДК больных ЗЛ против клеток Нер-2. В то же время эти факторы не влияли на исходно сохранную цитотоксическую активность ДК против клеток линии Jurkat.

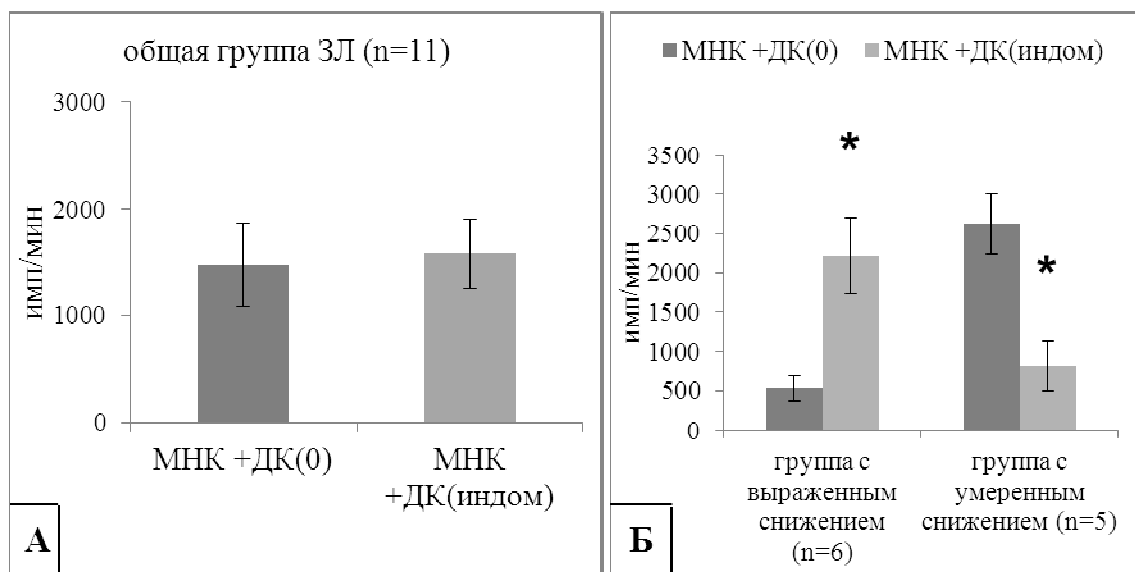


**Влияние иммуноактивных факторов на цитотоксическую активность ДК  
пациентов ЗЛ против клеток линии Нер-2 и Jurkat**

	Нер-2 (%)	Jurkat (%)
ДК(0) (доноры)	31,3 ± 6,6	37,65 ± 4,98
ДК (больные)		
ДК (0)	10 ± 4,4 <sup>#</sup>	28,6 ± 8,4
ДК (+ рИЛ-2, 100ЕД/мл)	36 ± 5,3*	30 ± 4,8
ДК (+ сЭП, 2нг/мл)	34 ± 4,9*	31 ± 3,9
ДК (+ дцДНК, 5 мкг/мл)	21 ± 2,8*	30 ± 3,3

**Примечание:** представлены средние значения ( $M \pm SE$ ) цитотоксической активности ИФН-ДК доноров ( $n=22$ ) и больных ЗЛ ( $n=7$ ) против опухолевых клеток линии Нер-2 и Jurkat. ДК и клетки Нер-2 и Jurkat культивировали в соотношении 1:1 в течение 24 ч. <sup>#</sup>-  $P_U < 0,05$ - достоверность различий между интактными ЛПС-стимулированными ИФН-ДК здоровых доноров (ДК доноры) и больных (ДК(0)). \* -  $P_U < 0,05$  -достоверность различий между интактными ИФН-ДК больных (0) и ИФН-ДК больных, культивированными в присутствии сЭП, дцДНК или рИЛ-2 (U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Согласно данным литературы, одним из универсальных медиаторов, способных опосредовать супрессорные свойства антигенпрезетирующих клеток, является простагландин E2 (ПГЕ2). В этом случае можно предполагать, что подавление повышенной продукции ПГЕ2 будет способствовать усилению стимуляторных свойств ДК пациентов. Чтобы проверить это предположение, было проведено сравнительное исследование аллостимуляторной активности интактных ДК больных ЗЛ и ДК, предобработанных индометацином. В целом по группе обработка индометацином не влияла на средние показатели аллостимуляторной активности (рис. 8 А). Тем не менее, при анализе индивидуальных значений обращало внимание, что, несмотря на снижение аллостимуляторной активности ДК у всех обследованных больных, ДК существенно различались по величине данного показателя (рис.8 Б). В частности, выделялось две подгруппы пациентов с выраженным ( $n=6$ ) и умеренным ( $n=5$ ) угнетением аллостимуляторной активности. В группе пациентов с выраженным снижением аллостимуляторной активности ДК обработка индометацином повышала способность ДК стимулировать пролиферацию Т-лимфоцитов, а в группе пациентов с умеренным снижением аллостимуляторной активности эффект был противоположным, т.е. обработка индометацином приводила к подавлению аллостимуляторной активности.



**Рисунок 8. Влияние индометацина на аллостимуляторную активность ИФН-ДК пациентов ЗЛ**

Представлены средние значения ( $M \pm SE$ ) пролиферативной активности в СКЛ. Респондеры – аллогенные МНК, стимуляторы – интактные (ДК0) и предобработанные индометацином ДК ЗЛ. А – данные по общей группе пациентов ЗЛ, Б – данные по подгруппам в зависимости от исходного уровня пролиферативной активности пациентов ЗЛ. \* -  $p_U < 0,05$ , достоверность различий между интактными ЛПС-стимулированными ИФН-ДК больных ЗЛ и обработанными индометацином (U – критерий Вилкоксона-Мана-Уитни).

Таким образом, стимулирующий эффект индометацина на способность ДК индуцировать пролиферацию Т-клеток проявляется исключительно в культурах ДК с выраженным угнетением аллостимуляторной активности.

### ВЫВОДЫ

1. Культуры ИФН-ДК, генерированные от больных ЛПЗ, характеризуются большим содержанием незрелых и промежуточных по степени зрелости ДК ( $CD14^+$ ,  $CD11c^+CD123^+$  и  $CD83^+CD1a^+$ ) и снижением относительного содержания терминально-дифференцированных ( $CD83^+CD1^+$ ) и активированных ( $CD25^+$ ) ДК, что в наибольшей степени выражено при злокачественной лимфоме и свидетельствует о задержке дифференцировки/созревания ДК.
2. По сравнению со здоровыми донорами, ИФН-ДК больных ЗЛ отличаются сниженным уровнем продукции ИФН- $\gamma$  и повышенной продукцией ИЛ-10 (содержание которого обратно коррелирует со степенью зрелостью ДК), что свидетельствует об изменении цитокинпродуцирующей функции ДК и роли ИЛ-10 в нарушении дифференцировки и созревания ДК при ЗЛ.

3. При лимфопролиферативных заболеваниях ИФН-ДК характеризуются низкой способностью стимулировать пролиферацию аллогенных Т-клеток в культурах СКЛ, что указывает на снижение аллостимуляторной активности ИФН-ДК и в совокупности с выявленным возрастанием экспрессии В7-Н1 свидетельствует о повышенном проапоптогенном потенциале ДК.
4. ДК больных ЛПЗ обладают сходной с ДК доноров способностью индуцировать генерацию CD3<sup>+</sup>ИФН- $\gamma$ <sup>+</sup> Т-клеток, но большей активностью (у больных ЗЛ) в отношении генерации CD3<sup>+</sup>ИЛ-4<sup>+</sup> Т-клеток, что свидетельствует о доминировании Th2-стимуляторной активности у больных ЗЛ.
5. ИФН-ДК больных злокачественными лимфомами характеризуются сниженной цитотоксической активностью против опухолевой линии Нер-2, однако эффективно лизируют клетки линии Jurkat, что свидетельствует об избирательной дефектности цитотоксической активности против TRAIL-резистентных Нер-2 - опухолевых клеток.
6. Культивирование ИФН-ДК больных ЗЛ с сополимером N-окси-1,4-этиленпиперазина и (N-карбоксиил)-1,4-этиленпиперазин бромид, двуцепочечной ДНК человека и интерлейкином-2, а также обработка индометацином (при выраженном угнетении аллостимуляторной активности) восстанавливают исходно низкую аллостимуляторную и цитотоксическую активность ДК, что демонстрирует принципиальную возможность коррекции функций ДК у больных злокачественными лимфомами.

#### **Список работ, опубликованных по теме диссертации**

1. Насонова Г.В., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Крючкова И.В., Сергеевичева В.В., Лисуков И.А., Останин А.А., Черных Е.Р. Свойства IFN- $\alpha$ -индуцированных дендритных клеток у больных злокачественными лимфомами // (Материалы межрегиональной научно-практической конференции «Дни иммунологии в Сибири» Омский научный вестник – 2007 - №3 – С. 242
2. Леплина О.Ю., Насонова Г.В., Тихонова М.А., Крючкова И.В., Лисуков И.А., Останин А.А., Черных Е.Р. Характеристика IFN- $\alpha$ -индуцированных дендритных клеток у больных злокачественными лимфомами // **Гематология и трансфузиология.** – 2008 - №3 – С. 24-29.
3. Леплина О.Ю., Насонова Г.В., Тихонова М.А., Крючкова И.В., Лисуков И.А., Останин А.А., Черных Е.Р. IFN- $\alpha$ -индуцированные дендритные клетки у больных множественной миеломой // **Сибирский онкологический журнал.** – 2009. - №6(36). – С. 37-43.
4. Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Насонова Г.В., Мишинов С.В., Ступак В.В., Крючкова И.В., Останин А.А., Черных Е.Р. Характеристика функциональной активности интерферон-индуцированных дендритных клеток у здоровых доноров и

- больных злокачественными заболеваниями // Цитокины и воспаление. – 2010. – Т.9. - №3. – С. 78.
5. Насонова Г.В., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Крючкова И.В., Останин А.А., Черных Е.Р. Экспрессия В7-Н1 на IFN- $\alpha$ -индуцированных дендритных клетках у больных злокачественными лимфомами // Материалы всероссийской научно-практической конференции «Дни иммунологии в Сибири», Абакан. – 2011. – С. 101-103.
  6. Насонова Г.В., Тихонова М.А. Возможность коррекции аллостимуляторной активности ИФН $\alpha$ -индуцированных дендритных клеток больных злокачественными лимфомами *in vitro* // Вестник Уральской медицинской академической науки.- 2011.- № 2/1 (35).- С. 49-50.