

На правах рукописи



Облеухова Ирина Александровна

**ИНДУКЦИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ОТВЕТА *IN VITRO*  
АУТОЛОГИЧНЫМИ ДЕНДРИТНЫМИ КЛЕТКАМИ,  
НАГРУЖЕННЫМИ ОПУХОЛЕВЫМИ АНТИГЕНАМИ**

14.03.09 –Клиническая иммунология, аллергология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Новосибирск-2013

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

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук,  
профессор

**Сенников Сергей Витальевич**

**Официальные оппоненты:**

**Аутеншлюс Александр Исаевич** доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, главный научный сотрудник, руководитель лаборатории физико-химической индикации иммунных процессов.

**Леплина Ольга Юрьевна**, доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт клинической иммунологии» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, отдел клинической иммунологии, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии.

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт онкологии» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, г. Томск

Защита диссертации состоится «\_\_ \_\_\_\_\_» 2013 г. в \_\_ 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 «\_\_» \_\_\_\_\_ 2013 г.

**Ученый секретарь диссертационного совета,**  
кандидат медицинских наук



**Белгородцев С.Н.**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы.

В структуре смертности населения злокачественные заболевания занимают второе место, уступив лишь болезням сердечно-сосудистой системы [Чиссов, 2012]. В основе иммунопатогенеза злокачественных новообразований кроме низкой иммуногенности опухоли, лежит также подавление функциональной активности антигенпрезентирующих клеток, таких как дендритные клетки [Almand, 2000; Pinzon-Charry, 2005; Akira, 2006], у которых в процессе канцерогенеза возникает большая вероятность изменения механизмов дифференцировки в зрелые формы, кросс-презентации антигенов [Черных, 2002; Dela Bella, 2003; Gabrilovich, 2004]. Установлено, что плотность дендритных клеток, инфильтрующих первичный очаг опухоли при колоректальном раке снижается в три раза, по сравнению с нормальной слизистой тканью [Schwaab, 2001], а увеличение количества зрелых дендритных клеток в ткани опухоли сопряжено с увеличением процента пятилетней выживаемости при раке молочной железы [Coventry, 2003]. Но, несомненно, кроме количества, ответная иммунная реакция организма, направленная на элиминацию опухолевых клеток, во многом зависит от функционального состояния дендритных клеток. Дендритные клетки принадлежат к профессиональным антигенпрезентирующим клеткам, обладают уникальной способностью к захвату антигена, его процессингу, и представлению в комплексе с HLA I или II для праймирования наивных Т-клеток или активации Т-клеток, со свойствами натуральных киллеров, во вторичных лимфоидных органах [Пашенков, 2001; Broeke, 2003; Fujii, 2004; Kurabayashi, 2004; Koch, 2006; Lan, 2009]. Свободные (несвязанные) антигены не распознаются Т-лимфоцитами даже в том случае, если эти клетки экспрессируют рецепторы, соответствующие антигену. Для того чтобы инициировать иммунный ответ, антиген должен быть представлен на поверхности дендритной клетки в комплексе с HLA молекулами и в ассоциации с другими поверхностными молекулярными структурами (костимулирующие, адгезивные) [Zitvogel, 2002]. В настоящее время наряду с прочими методами консервативной терапии злокачественных новообразований, специфическая иммунотерапия является современным и перспективным способом лечения, основной целью которой является индукция и поддержание длительного иммунного ответа, направленного на распознавание и элиминацию опухолевых клеток [Hsu, 1996; Santin, 2000; Jonuleit, 2001; Nair, 2002; Hung, 2008; Finn, 2012; Stiff, 2013]. Особую роль в иммунотерапии занимает развитие новых подходов, в частности вакциноterapia на основе дендритных клеток. Конечная цель реализации эффекта такой ДК-вакциноterapia заключается в достижении достаточной иммуногенности опухолевых антигенов; создании условий для их эффективной презентации; преодолении местной или системной иммуносупрессии [Zhang, 2004]. Одним из способов преодоления иммуносупрессии, вызванной канцерогенезом, и усиления эффективности противоопухолевого иммунного ответа является получение дендритных клеток онкологического больного, нагруженных антигеном *ex vivo*, применяя в качестве адьювантов рекомбинантные цитокины (IL-2, IFN- $\alpha$ , GM-CSF) [Pickl, 1996; Thurner, 1999; Santini, 2000], кроме того эффективность противоопухолевого иммунного ответа может зависеть и от иммунорегуляторных цитокинов, в частности от IL-18, IL-12, которые известны своим синергическим эффектом [Yoshimoto, 1998; Munk, 2011].

Таким образом, представляется актуальным изучение влияния аутологических, нагруженных антигенами опухолевого лизата, дендритных клеток и рекомбинантных

цитокинов (интерлейкина-18 и интерлейкина-12) на модуляцию противоопухолевого иммунного ответа в совместной культуре мононуклеарных клеток онкологических больных.

### **Цель работы:**

Изучить эффективность индукции противоопухолевой цитотоксической активности мононуклеарных клеток больных онкологическими заболеваниями с помощью аутологичных дендритных клеток, нагруженных антигенами опухолевого лизата, и цитокинов (интерлейкина-18 и интерлейкина-12).

### **Задачи:**

1. Охарактеризовать по фенотипическим и функциональным показателям дендритные клетки, генерированные из прилипшей фракции мононуклеарных клеток периферической крови больных онкологическими заболеваниями.
2. Исследовать влияние антиген-нагруженных дендритных клеток на пролиферативную активность МНК.
3. Изучить влияние антиген-нагруженных дендритных клеток на цитотоксическую активность МНК против аутологичных опухолевых клеток.
4. Оценить цитотоксический потенциал МНК по экспрессии перфорина, гранзимаВ, после совместного культивирования с антиген-нагруженными дендритными клетками.
5. Исследовать влияние антиген-нагруженных дендритных клеток на продукцию IFN- $\gamma$ , IL-4 мононуклеарными клетками неприлипшей фракции периферической крови.

### **Научная новизна работы**

Установлено, что аутологичные, зрелые, нагруженные лизатом дендритные клетки при совместном культивировании с мононуклеарными клетками периферической крови больных эпителиальным раком яичника индуцируют цитотоксический потенциал эффекторных клеток (повышение их цитотоксической активности против аутологичных опухолевых клеток яичника, накопление перфорина, увеличение продукции IFN- $\gamma$ ). Совместное культивирование генерированных дендритных клеток, нагруженных опухолевым лизатом, с мононуклеарными клетками периферической крови больных колоректальным раком оказывает стимулирующее влияние на цитотоксическую активность по отношению к опухолевым клеткам, на накопление перфорина, гранзимаВ лимфоцитами. Применение rhIL-18 совместно с rhIL-12 при сокультивировании МНК и ДК способствует усилению эффектов, оказываемых дендритными клетками при обеих патологиях (повышение цитотоксической активности против аутологичных опухолевых клеток, накопление перфорина, гранзимаВ, увеличение продукции IFN- $\gamma$ ). Дендритные клетки, генерированные в течение 4-х дневного клеточного протокола из прилипшей фракции МНК периферической крови больных колоректальным раком и больных эпителиальным раком яичника, обладают фенотипическими и функциональными особенностями, характерными для данной популяции клеток.

## **Теоретическая и практическая значимость работы**

Полученные данные по зависимости фенотипических и функциональных характеристик дендритных клеток, генерированных из предшественников периферической крови, от типа злокачественного процесса позволяют расширить современные представления об участии дендритных клеток в противоопухолевом иммунном ответе.

Выявленные результаты свидетельствуют об эффективности только совместного использования цитокинов rhIL-18 и rhIL-12, обладающих синергическим эффектом, для индукции противоопухолевого иммунного ответа *in vitro* у больных колоректальным раком или эпителиальным раком яичника, что связано с их способностью индуцировать иммунные реакции преимущественно по Th1 типу.

Практическая значимость работы заключается в экспериментальном обосновании способа индукции клеточного иммунного ответа в культуре МНК, который может быть основой новой клеточной технологии лечения колоректального рака или эпителиального рака яичника. Получен патент на изобретение № 2458985 «Способ генерации антиген-специфических цитотоксических клеток с противоопухолевой активностью», а также получено положительное решение от 16.10.2013 на патент № 2012103822 «Способ генерации антиген-специфических цитотоксических клеток с активностью против клеток рака яичника».

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

1. Дендритные клетки, нагруженные антигенами опухолевого лизата оказывают индуцирующий эффект на противоопухолевую цитотоксическую способность мононуклеарных клеток периферической крови больных эпителиальным раком яичника и больных колоректальным раком
2. IL-18 и IL-12, применяемые совместно при сокультивировании зрелых аутологичных ДК и мононуклеарных клеток больных колоректальным раком, а также больных эпителиальным раком яичника, оказывают адьювантную роль в развитии противоопухолевого цитотоксического ответа *in vitro*.

### **Апробация материалов диссертации**

Материалы диссертации доложены и обсуждены на:

- 1). Семинарах экспериментального отдела ФГБУ НИИ КИ СО РАМН (Новосибирск, 2008, 2012, 2013).
- 2). Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Дни иммунологии в Сибири», посвященной 20-летию юбилею красноярского краевого Центра по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями (Красноярск, 1-3 марта 2010 года).
- 3). V региональной конференции молодых ученых-онкологов, посвященной памяти академика РАМН Н.В.Васильева «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии» (Томск, 23 апреля 2010 года).
- 4). 8-й отчетной конференции НИИКИ СО РАМН «Имунопатогенез и иммунотерапия основных заболеваний человека: от эксперимента к клинике» (Новосибирск, 21-23 июня 2011 года).
- 5). VII региональной конференции молодых ученых-онкологов, посвященной памяти академика РАМН Н.В.Васильева «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии» (Томск, 27 апреля 2012 года).
- 6). «Конференции по дендритным клеткам и их роли при норме и патологии» в рамках Объединенного иммунологического форума - 2013

(Нижний Новгород, 30 июня-05 июля 2013 года). 7). «XV международном конгрессе по иммунологии» (Италия, Милан, 22-27 августа 2013 года).

### **Публикации.**

По теме диссертации опубликовано 20 научных работ, в том числе 2 статьи в журналах, рекомендованных ВАК для публикации материалов диссертационных работ. Получен 1 патент на изобретение. Получено 1 положительное решение на получение патента на изобретение.

### **Личный вклад автора в проведение исследования.**

Результаты, представленные в данной работе, получены лично автором на базе лаборатории молекулярной иммунологии ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН.

### **Структура и объем диссертации.**

Диссертация изложена на 109 страницах машинописного текста, состоит из обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения, заключения и выводов. Библиографический указатель включает 182 источника, из них 162 зарубежных. Работа иллюстрирована 22 рисунками, 1 таблицей и 3 схемами.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **Объект исследования**

В работе использовалась гепаринизированная периферическая венозная кровь (ПК) пациентов, больных злокачественными новообразованиями различной локализации, а также биопсийный материал опухоли, полученный при операции от 122 пациентов, проходящих лечение на базе МБУЗ г. Новосибирска Городской клинической больницы № 1, МБУЗ г. Новосибирска Городской клинической больницы № 11, на базе Новосибирского областного онкологического диспансера, а также на базе Клиники ФГБУ «НИИ онкологии» СО РАМН г. Томска. Критерием включения в исследование служило отсутствие до оперативного вмешательства проведения химио- и/или радиотерапии. От всех пациентов было получено информированное согласие на проведение исследования.

**Таблица 1.** Характеристика групп пациентов больных онкологическими заболеваниями различной локализации

Пол	Мужчины- 42,6 % (52/122) Женщины- 57,4 % (70/122)
Возраст	Средний возраст – 63,2±1,0
Диагноз	Эпителиальный рак яичника - 22,1 % (27/122). Средний возраст – 56,3±2,4
	Колоректальный рак - 62,3 % (76/122). Средний возраст – 66,1±1,2
	Аденокарцинома желудка – 8,2 % (10/122). Средний возраст – 62±2,43
	Аденокарцинома легкого – 7,4 % (9/122). Средний возраст – 60,77±2,4

### **Получение аутологичных клеток опухоли и опухолевых антигенов в составе лизата опухолевых клеток.**

Аутологичные клетки опухоли выделяли из биопсийного образца, полученного при операции, путем механического гомогенизирования (гомогенизатор Поттера). Полученные клетки делили на две равные части. Одну замораживали в FCS (РАА,

Австрия), содержащей 10% DMSO (Panreac, Испания). А из другой - получали смесь опухолевых антигенов. Концентрацию белка определяли по методу Бредфорд и спектрофотометрическим методом (NanoDrop 2000C и соответствующее программное обеспечение).

### **Выделение мононуклеарных клеток из периферической крови больных онкологическими заболеваниями и получение прилипающей фракции мононуклеарных клеток.**

Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли стандартным методом путем центрифугирования цельной крови в градиенте плотности фиколл-урографина ( $\rho=1,077$  г/л) согласно [Boyum, 1968]. Выделение моноцитов ПК проводилось методом адгезии на пластике [Wahl, 1995].

### **Получение зрелых дендритных клеток, нагруженных антигенами опухолевого лизата**

Дифференцировку моноцитов в незрелые ДК осуществляли под действием rhGM-CSF (50 нг/мл) и rhIL-4 (100 нг/мл) (Peprotech, США) при концентрации клеток 1 млн/мл в течение 48 часов [Obermaier, 2003]. Через 48 часов культивирования к незрелым дендритным клеткам представляли антигены в составе лизата опухолевой ткани (с концентрацией белка 100 мкг/мл в течение 18 часов). Для получения зрелых дендритных клеток дальнейшую культивацию клеток проводили в присутствии TNF $\alpha$  (25нг/мл) в течение 24 часов.

### **Анализ фенотипических и функциональных показателей полученных дендритных клеток.**

Для анализа фенотипических характеристик дендритных клеток использовали соответствующие меченые флюорохромом моноклональные антитела CD83 PE, CD86 FITC (BD Pharmingen, США), HLA-DR FITC (Сорбент, Россия) с последующим анализом при помощи метода проточной цитофлуориметрии. Для оценки способности полученных дендритных клеток к захвату антигена определяли их эффективность по отношению к рецептор-опосредованному эндоцитозу с помощью FITC-декстрана (Sigma, США). Результаты представлены в виде отношения интенсивностей флуоресценции клеток, захватывающих декстран при +4C<sup>0</sup> и при +37C<sup>0</sup> и умноженной на 100 %(индекс эндоцитозной активности).

### **Совместное культивирование антиген-нагруженных дендритных клеток и мононуклеарных клеток неприлипшей фракции периферической крови.**

Полученные дендритные клетки подвергались совместному культивированию с мононуклеарными клетками неприлипшей фракции (МНК) (0,5-1 млн/лунку) в течение 48 часов для праймирования специфического антигена (в соотношении ДК:МНК=1:10) с добавлением 100 нг/мл рекомбинантного человеческого IL-18 (rhIL-18) (ООО «Центр инженерной иммунологии», г. Новосибирск, Россия), 10 нг/мл рекомбинантного человеческого IL-12 (rhIL-12) (Peprotech, USA), как совместно, так и по отдельности или совсем без добавления цитокинов. В качестве контроля использовались МНК неприлипшей фракции, культивированные в присутствии ДК(0), которым не представлялись антигены опухолевого лизата (группа МНК+ДК(0)).

### **Определение пролиферативной активности мононуклеарных клеток**

Определение пролиферативной активности МНК по включению <sup>3</sup>H-тимидина нуклеопротейные фракции клеток. <sup>3</sup>H-тимидин вносили по 1 μCi/лунка за 16-18 часов до конца культивирования.

#### **Определение цитотоксической активности моноклеарных клеток против аутологичных клеток опухоли**

После совместного культивирования МНК неприлипшей фракции и ДК в присутствии или отсутствии rhIL-18 и/или rhIL-12, а также культивирования клеток контрольных групп в течение 5-ти суток, клеточную суспензию отмывали, а затем культивировали полученные клетки в объеме 50 мкл с концентрацией клеток 1 млн/мл совместно с, предварительно размороженными, аутологичными клетками опухоли в соотношении 10:1 соответственно в течение 18 часов. Схема рассадки клеток предложена фирмой производителем используемого набора «CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay» (Promega, США). Цитотоксический эффект рассчитывался по формуле предложенной фирмой производителем используемого набора и выражался в процентах.

#### **Определение содержания перфорин-позитивных клеток и гранзимВ - позитивных клеток**

После совместного культивирования МНК неприлипшей фракции и ДК в присутствии rhIL-18 и rhIL-12, а также культивирования клеток контрольных групп отмывали клеточную суспензию, а затем культивировали полученные клетки в объеме 500 мкл с концентрацией клеток 1 млн/мл в присутствии антигенов опухолевого лизата (100 мкг/мл) в течение 72 часов в лунках 48-луночного планшета, после чего методом проточной цитофлуориметрии определяли относительное содержание как в общей популяции, так и в CD8+ лимфоцитах, перфорин-позитивные или гранзимВ-позитивные клетки

#### **Определение продукции IL-4, IFN-γ в кондиционных средах клеточных культур**

Уровень продукции IFN-γ, IL-4 в кондиционных средах МНК неприлипшей фракции, предварительно сокультивированных со зрелыми аутологичными ДК определялся с помощью иммуноферментного анализа. Определение содержания цитокина проводилось с помощью коммерческого набора фирмы «Вектор-Бест», Россия.

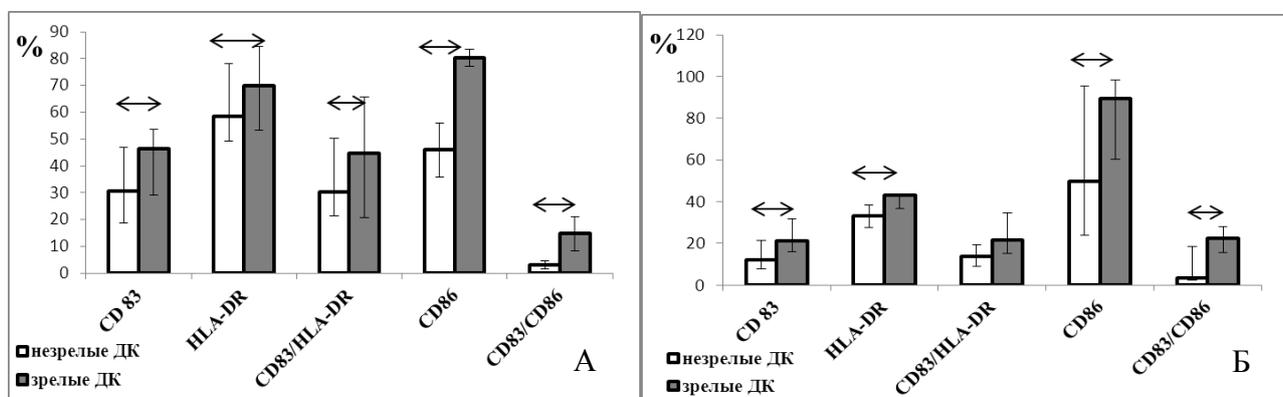
#### **Статистическая обработка результатов**

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью программы «Statistica 7.0». Проверка выборки на нормальность распределения проводилась с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. При нормальном распределении результатов, данные представлялись в виде среднего и ошибки среднего, при ненормальном – в виде медианы и диапазона значений квартилей (25% и 75%), а для проверки гипотез о достоверности различий использовали непараметрический критерий Манна-Уитни и Уилкоксона. В пояснениях к иллюстрациям количество лиц в группе обозначено как n.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

**Получение зрелых аутологичных антиген-нагруженных дендритных клеток из моноклеарных клеток периферической крови больных злокачественными новообразованиями различной нозологии**

Для получения незрелых дендритных клеток прилипающая фракция МНК ПК больных онкологическими заболеваниями культивировалась в полной среде с добавлением rhGM-CSF (50нг/мл) и rhIL-4 (100 нг/мл) в течение 48 ч. Для получения дендритных клеток, нагруженных антигенами опухолевого лизата, использовались аутологичные антигены (с концентрацией белка 100 мкг/мл, в течение 18 ч.) в составе лизата опухолевых клеток. В качестве созревающего стимула применялся rhTNF $\alpha$  (25 нг/мл) в течение 24 ч. По экспрессии таких маркеров, как CD83, CD86, HLA-DR оценивалась популяция генерированных ДК. На рис.1 продемонстрирован уровень относительного содержания CD83+, CD86+ и HLA-DR+ дендритных клеток, генерированных из МНК ПК больных онкологическими заболеваниями различной локализации. Показано, что в результате применяемого клеточного протокола удалось получить зрелые ДК из предшественников ПК больных эпителиальным раком яичника (рис.1А), а также колоректальным раком (рис.1Б), что подтверждается значимым приростом процента позитивных клеток, экспрессирующих молекулы CD83, HLA-DR, CD86.



**Рис.1 Относительное содержание CD83+, CD86+, HLA-DR+ дендритных клеток (ДК), полученных из прилипающей фракции мононуклеарных клеток периферической крови больных: А – эпителиальным раком яичника (n=9), Б – колоректальным раком (n=11).** Примечание: Здесь и на рис.2. Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала. Стрелкой на рисунке обозначены статистические значимые отличия при  $p < 0,05$ .

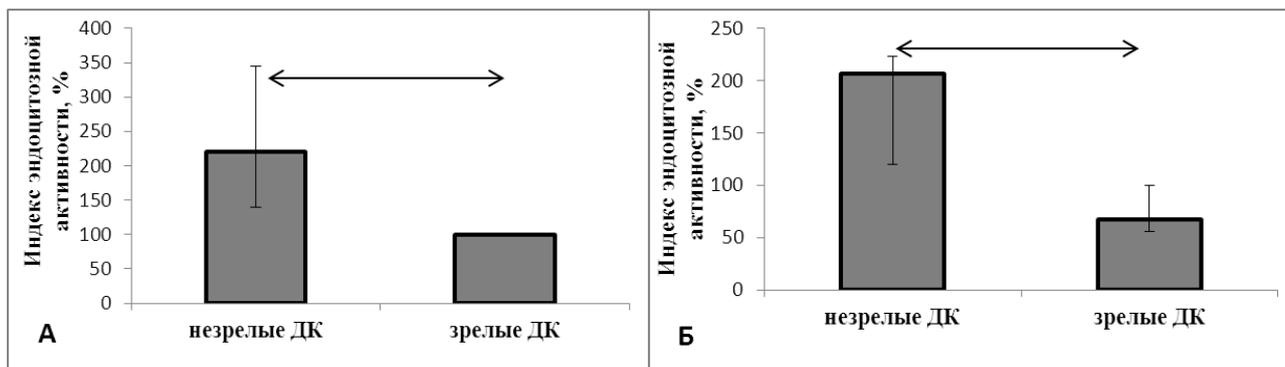
Незрелые ДК – прилипшая фракция МНК, культивированных в течение 48-ми часов в присутствии rhGM-CSF (50нг/мл) и rhIL-4 (100 нг/мл).

Зрелые ДК – прилипшая фракция МНК, культивированных в течение 48-ми часов в присутствии rhGM-CSF (50нг/мл) и rhIL-4 (100 нг/мл), с последующим праймированием антигенами опухолевого лизата в течение 18 часов и добавлением rhTNF $\alpha$  (25 нг/мл) в течение 24 часа.

В случае аденокарциномы желудка достоверные результаты были получены только по содержанию CD83+ и CD83+/CD86+ дендритных клеток, а по количеству HLA-DR+, CD86+ клеток прослеживается тенденция к увеличению экспрессии вышеперечисленных маркеров на дендритных клетках в зависимости от их степени зрелости. При определении относительного содержания CD83+, HLA-DR+, CD86+ дендритных клеток, генерированных из предшественников ПК больных аденокарциномой легкого, не было получено значимых результатов. Причиной этого возможно стало требование иных условий культивирования в рамках используемого клеточного протокола для получения зрелых ДК, специфическая особенность антигенов опухолевого лизата, которыми праймируются ДК, а также исходное состояние мононуклеарных клеток при данных патологиях. Согласно литературным данным влияние лизата опухолевых клеток на фенотип ДК *in vitro* не однозначно, поскольку содержащиеся в опухолевой клетке компоненты могут обладать

супрессивным действием на процессы созревания и способность презентировать антиген ДК [Gatello, 2001].

Для исследования способности генерированных ДК захватывать антиген проводилась оценка активности в отношении рецептор-опосредованного эндоцитоза (с помощью захвата FITC-декстрана) при +4°C и при +37°C. Степень захвата FITC-декстрана ДК определялась по формуле: Индекс эндоцитозной активности =  $(MFI_{37^{\circ}C} / MFI_{4^{\circ}C}) \times 100\%$ , где  $MFI_{37^{\circ}C}$  – интенсивность флюоресценции меченых клеток при +37°C, а  $MFI_{4^{\circ}C}$  – интенсивность флюоресценции меченых клеток при +4°C.



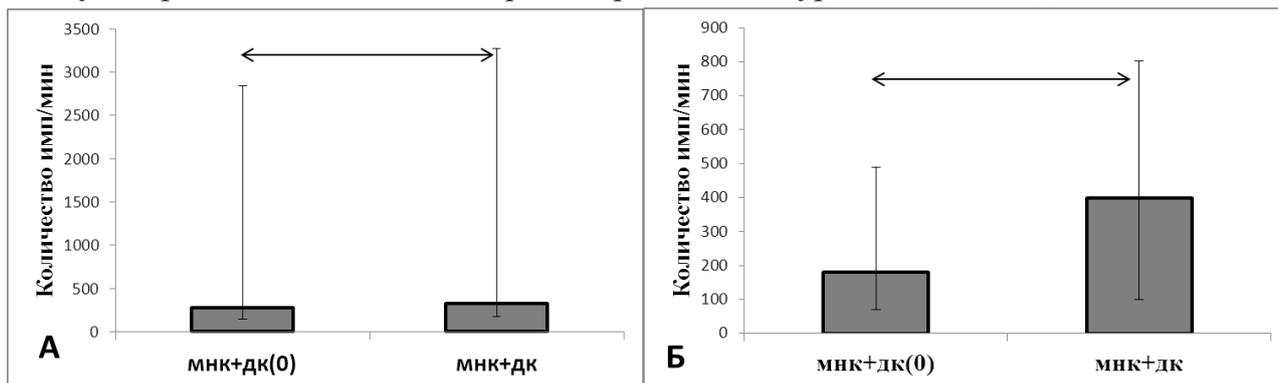
**Рис.2** Эндоцитозная активность в зависимости от степени зрелости дендритных клеток (ДК), полученных из прилипающей фракции мононуклеарных клеток периферической крови больных: А – эпителиальным раком яичника (n=7), Б – колоректальным раком (n=10).

При сравнении этого показателя установлено, что интенсивность захвата антигена незрелыми дендритными клетками, полученных из прилипающей фракции МНК ПК больных аденокарциномой желудка и аденокарциномой легкого, не изменилась по сравнению с аналогичным показателем у зрелых дендритных клеток, что, в совокупности с результатами, полученными при определении относительного содержания CD83+, HLA-DR+, CD86+ дендритных клеток ставит под сомнение факт достижения степени зрелости генерированных дендритных клеток при данных патологиях. В случае колоректального рака и эпителиального рака яичника (рис.2) показано понижение индекса эндоцитозной активности, свидетельствующее об эффективном захвате антигена незрелыми ДК по механизму рецептор-опосредованного эндоцитоза, и о сохранении способности зрелых ДК к неспецифическому связыванию декстрана без проникновения его в клетку. Таким образом, генерированные за 48 часов из предшественников ПК больных эпителиальным раком яичника и колоректальным раком, незрелые ДК обладали высокой способностью к эндоцитозу на ранних этапах созревания, а еще через 42 часа после праймирования антигенами опухолевого лизата приобрели фенотип зрелых ДК, что подтверждается увеличением относительного содержания CD83+, HLA-DR+, CD86+ клеток, по мере их созревания, в совокупности со снижением способности к эндоцитозному захвату антигена. Полученные данные определили ход исследования по использованию праймированных антигенами опухолевого лизата, зрелых ДК для модуляции цитотоксического противоопухолевого иммунного ответа при колоректальном раке и эпителиальном раке яичника *in vitro*.

**Индукция цитотоксического противоопухолевого иммунного ответа *in vitro* с помощью антиген-нагруженных дендритных клеток больных эпителиальным раком яичника и больных колоректальным раком**

**Влияние антиген-нагруженных дендритных клеток на пролиферативную активность мононуклеарных клеток *in vitro* больных эпителиальным раком яичника и больных колоректальным раком**

Для определения эффективности модуляции противоопухолевого иммунного ответа с помощью полученных ДК оценивали пролиферативную активность МНК ПК больных эпителиальным раком яичника и больных колоректальным раком, предварительно культивированных с антиген-нагруженными ДК через пять суток. Для контроля состояния функциональной активности МНК неприлипшей фракции исследовали пролиферативную активность клеток в ответ на поликлональный стимулятор конконавалина, которая сохранялась на уровне свежесыведенных клеток.



**Рис.3 Влияние антиген-нагруженных дендритных клеток на пролиферативную активность мононуклеарных клеток неприлипшей фракции периферической крови больных эпителиальным раком яичника (А, n=7) и больных колоректальным раком (Б, n=6) *in vitro*.** Примечание: данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала. Стрелкой на рисунке обозначены статистические значимые отличия при  $p < 0,05$ .

МНК+ДК(0) – МНК неприлипшей фракции ПК больных, культивированные в присутствии дендритных клеток, не обработанных лизатом опухолевой ткани

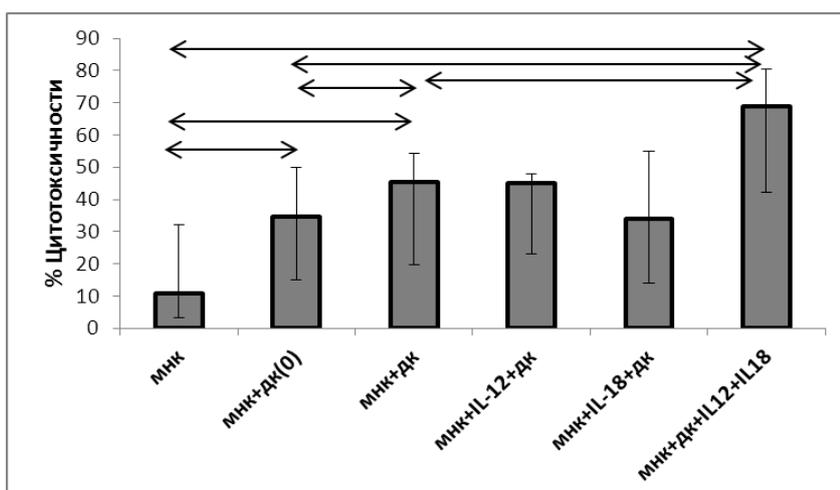
МНК+ДК – МНК неприлипшей фракции ПК больных, культивированные в присутствии дендритных клеток, обработанных лизатом опухолевой ткани

Показано, что антиген-нагруженные ДК способны активировать пролиферативный потенциал МНК ПК больных эпителиальным раком яичника и больных колоректальным раком (рис.3). Таким образом, показано, что совместное культивирование зрелых ДК, праймированных антигенами опухолевого лизата, с МНК привело к стимуляции пролиферативной активности *in vitro* иммунокомпетентных клеток больных колоректальным раком и больных эпителиальным раком яичника.

**Влияние *in vitro* антиген-нагруженных дендритных клеток и rhIL-18 с rhIL-12 на цитотоксическую активность мононуклеарных клеток больных эпителиальным раком яичника и больных колоректальным раком**

Для определения воздействия зрелых, праймированных антигенами опухолевого лизата, ДК на цитотоксическую активность МНК против аутологичных клеток опухоли, проводили цитотоксический тест, основанный на определении уровня в кондиционной среде лактатдегидрогеназы, высвободившейся из лизированных клеток *in vitro*. Для стимуляции и поддержания направленной дифференцировки наивных Т-клеток в Th-1 типа добавляли rhIL-18 при совместном культивировании зрелых антиген-нагруженных дендритных клеток и МНК. В целях индукции цитотоксической активности эффекторных клеток *in vitro* при сокультивировании МНК и ДК применяли рекомбинантные цитокины rhIL-18 и rhIL-

12, как по отдельности, так и совместно. IL-18-один из провоспалительных/иммуностимулирующих цитокинов, используемых при иммунотерапии онкологических заболеваний, он принимает непосредственное участие в формировании эффективного противоопухолевого иммунного ответа, который связан с повышением продукции IFN- $\gamma$  Т-клетками и NK-клетками, а также с усилением цитолитической активности NK-клеток и цитотоксических Т-лимфоцитов [Nakanishi, 2001; Gracie, 2003]. IL-12 известен в качестве активатора NK-клеток и цитотоксических Т-лимфоцитов. In vivo источником синтеза IL-12 могут быть моноциты, макрофаги, дендритные клетки, нейтрофилы, В-лимфоциты. Этот цитокин стимулирует дифференцировку Т-лимфоцитов в Th1, усиливает синтез IFN- $\gamma$  и IgG и, тем самым, индуцирует противоопухолевый иммунитет. Зачастую, IL-12 применяется совместно с провоспалительным цитокином IL-18, вызывая стимуляцию продукции IFN- $\gamma$  CD4+ Т-лимфоцитами [Munk, 2011]. В результате проведенного исследования установлено, что совместное культивирование МНК ПК больных колоректальным раком с аутологичными ДК, нагруженные опухолевым лизатом, приводит к повышению уровня цитотоксической активности иммунокомпетентных клеток в 1,3 раза (рис.4) по сравнению с группой, где МНК были культивированы в присутствии ДК(0), которые не были праймированы опухолевым лизатом. Выяснено, что добавление rhIL-18 при совместном культивировании ДК и МНК больных колоректальным раком не привело к усилению цитотоксической активности МНК по сравнению с клетками, культивированными без rhIL-18 (рис.4). Причиной полученного эффекта может быть недостаточная способность rhIL-18 индуцировать цитотоксическую активность иммунокомпетентных клеток онкологических больных без дополнительных факторов, таких как rhIL-12 [Baxevanis, 2003]. В результате исследования, установлено, что добавление по-отдельности либо rhIL-12, либо rhIL-18 не привело к ожидаемому эффекту (рис.3) в отличие от применения rhIL-12 совместно с rhIL-18 при культивировании ДК, нагруженных антигенами опухолевого лизата, с МНК, что оказало стимулирующее влияние на цитотоксическую активность иммунокомпетентных клеток при данной патологии, подтвержденное повышением процента цитотоксичности МНК против опухолевых клеток кишечника в 1,5 раза по сравнению с аналогичной группой, но без стимуляции цитокинами (рис.4).



**Рис.4** Влияние антиген-нагруженных дендритных клеток rhIL-12, rhIL-18, на цитотоксическую активность мононуклерных клеток неприлипшей фракции против аутологичных клеток колоректального рака in vitro (n=28). Примечание: Культивирование проводилось в течение 5-ти суток, данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала. Стрелкой на рисунке обозначены статистические значимые отличия при  $p < 0,05$ .

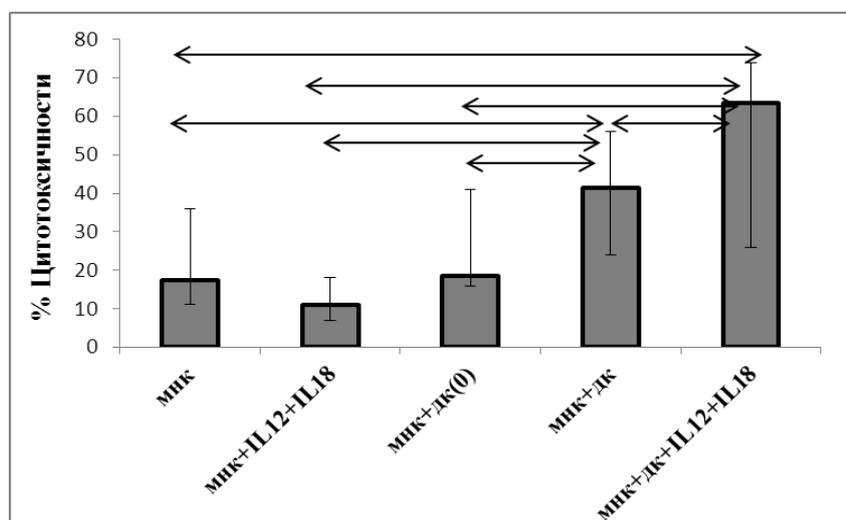
МНК - МНК неприлипшей фракции ПК больных колоректальным раком

МНК+ДК(0) - МНК неприлипшей фракции ПК больных колоректальным раком, культивированные в присутствии дендритных клеток, не обработанных лизатом опухолевой ткани

МНК+ДК – МНК неприлипшей фракции ПК больных колоректальным раком, культивированные в присутствии ДК, обработанных лизатом опухолевой ткани

МНК+ДК+IL12 и/или IL18 – МНК неприлипшей фракции ПК больных колоректальным раком, культивированные в присутствии ДК, обработанных лизатом опухолевой ткани, а также в присутствии rhIL-12 (10 нг/мл) и/или rhIL-18 (100 нг/мл).

При проведении цитотоксического теста, определяющего цитотоксическую активность МНК больных эпителиальным раком яичника по отношению к аутологичным опухолевым клеткам, при сокультивировании МНК и ДК применяли rhIL-12 совместно с rhIL-18. В результате обнаружено, что ДК, нагруженные опухолевым лизатом, обладают индуцирующим эффектом на способность эффекторных клеток к цитотоксической активности, что подтверждается увеличением исследуемого показателя в 2,2 раза по сравнению с контрольной группой (МНК+ДК(0)) (рис.5). Добавление цитокинов оказало аналогичный стимулирующий эффект выраженный повышением процента цитотоксичности эффекторных клеток в 1,5 раза по сравнению с группой, где интерлейкины не добавлялись при сокультивировании МНК и ДК (рис.5).



**Рис.5** Влияние антиген-нагруженных дендритных клеток rhIL-12, rhIL-18, на цитотоксическую активность мононуклеарных клеток неприлипшей фракции против аутологичных клеток эпителиального рака яичника *in vitro* (n=10). Примечание: Культивирование проводилось в течение 5-ти суток, данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала. Стрелкой на рисунке обозначены статистические значимые отличия при  $p < 0,05$ .

МНК - МНК неприлипшей фракции ПК больных эпителиальным раком яичника

МНК+IL12+IL18 – МНК неприлипшей фракции ПК больных эпителиальным раком яичника, культивированные в присутствии rhIL-12 (10 нг/мл) и rhIL-18 (100 нг/мл).

МНК+ДК(0) - МНК неприлипшей фракции ПК больных эпителиальным раком яичника, культивированные в присутствии ДК, не обработанных лизатом опухолевой ткани

МНК+ДК – МНК неприлипшей фракции ПК больных эпителиальным раком яичника, культивированные в присутствии ДК, обработанных лизатом опухолевой ткани

МНК+ДК+IL12+IL18 – МНК неприлипшей фракции ПК больных эпителиальным раком яичника, культивированные в присутствии ДК, обработанных лизатом опухолевой ткани, а также в присутствии rhIL-12 (10 нг/мл) и rhIL-18 (100 нг/мл).

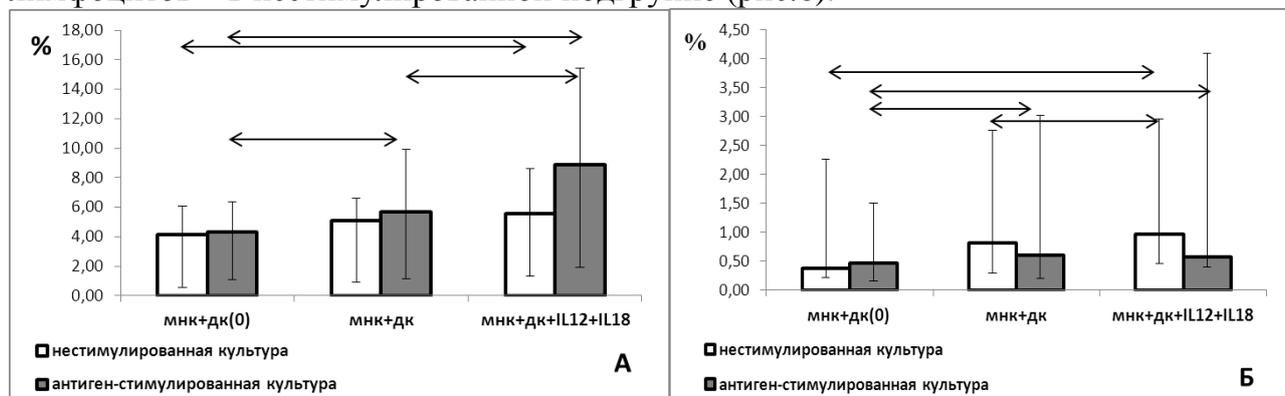
Таким образом, полученные данные доказали, что ДК, праймированные антигенами опухолевого лизата, способны индуцировать *in vitro* цитотоксическую активность МНК больных эпителиальным раком яичника и больных колоректальным

раком. Добавление в совместную культуру МНК и ДК цитокинов: rhIL-12 совместно с rhIL-18 привело к увеличению процента гибели опухолевых клеток.

**Влияние *in vitro* антиген-нагруженных дендритных клеток и rhIL-18 с rhIL-12 на экспрессию перфорина, гранзима В мононуклеарными клетками больных эпителиальным раком яичника и больных колоректальным раком**

Для исследования механизма цитотоксической активности иммунокомпетентных клеток, больных эпителиальным раком яичника и больных колоректальным раком, определяли содержание перфорин-позитивных клеток в общей популяции лимфоцитов и в CD8+ клетках после совместного культивирования МНК с ДК. Перфорин - мономерный внутриклеточный белок, являясь одним из ключевых факторов цитотоксичности, вызывает образование пор в клетках-мишенях, что приводит к их лизису [Masson, 1985].

Установлено, что ДК, нагруженные антигенами опухолевого лизата и без цитокинов, и в сочетании с цитокинами rhIL-12 и rhIL-18 оказали стимулирующее влияние на накопление перфориновых гранул лимфоцитами как общей популяции (рис.6А), так и CD8+ лимфоцитами (рис.6Б), в антиген-стимулированной подгруппе, в сравнении со случаем, где в совместную культуру МНК пациентов, больных эпителиальным раком яичника, добавлялись только ДК(0), которые не были праймированы антигенами опухолевого лизата (рис.6Б). Также обнаружено увеличение относительного содержания перфорин-позитивных клеток в ответ на добавление цитокинов среди общей популяции лимфоцитов в антиген-стимулированной подгруппе, а среди CD8+ лимфоцитов – в нестимулированной подгруппе (рис.6).



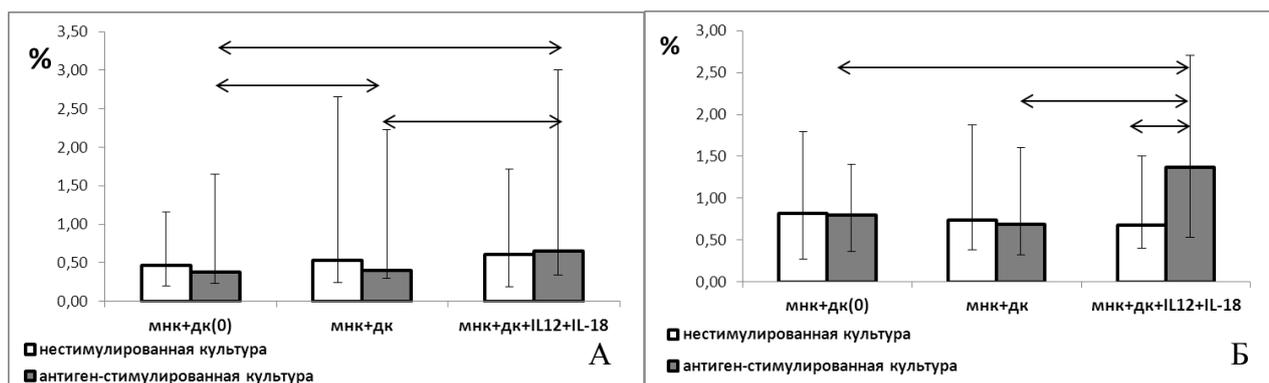
**Рис.6 Влияние антиген-нагруженных дендритных клеток и rhIL-12 с rhIL-18 на относительное содержание перфорин-позитивных лимфоцитов (А, n=9) и CD8+лимфоцитов (Б, n=7) больных эпителиальным раком яичника *in vitro*.** Примечание: Здесь и на рис 7-9. Совместное культивирование проводилось в течение 48 часов до добавления антигенов лизата опухолевой ткани с последующим культивированием (нестимулированная культура), еще в течение 72 часа, после добавления (антиген-стимулированная культура), данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала. Стрелкой на рисунке обозначены статистические значимые отличия при  $p < 0,05$ .

МНК+ДК(0) - МНК неприлипшей фракции ПК больных эпителиальным раком яичника, культивированные в присутствии дендритных клеток, не обработанных лизатом опухолевой ткани

МНК+ДК – МНК неприлипшей фракции ПК больных эпителиальным раком яичника, культивированные в присутствии ДК, обработанных лизатом опухолевой ткани

МНК+ДК+IL12+IL18 – МНК неприлипшей фракции ПК больных эпителиальным раком яичника, культивированные в присутствии ДК, обработанных лизатом опухолевой ткани, а также в присутствии rhIL-12 (10 нг/мл) и rhIL-18 (100 нг/мл).

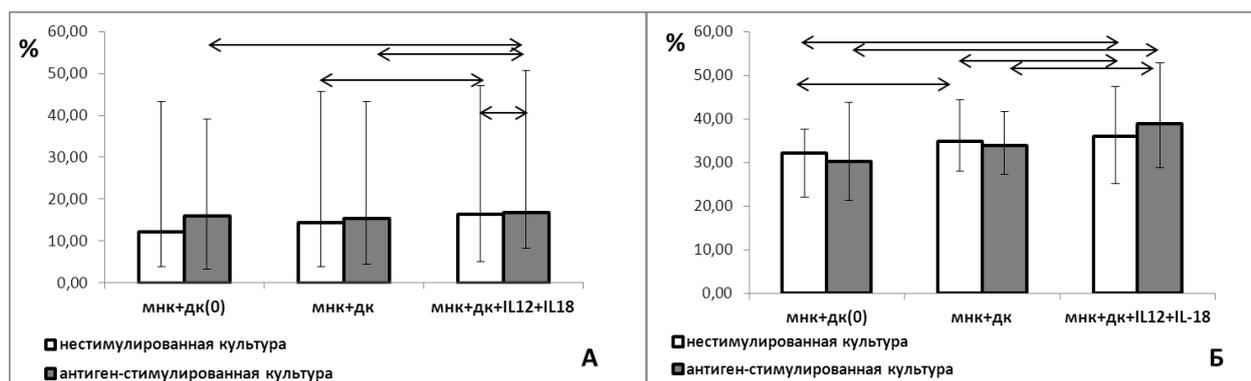
Аналогичное стимулирующее воздействие на накопление исследуемой протеазы как лимфоцитами общей популяции, так и CD8+ лимфоцитами пациентов, больных колоректальным раком, оказали ДК в сочетании с цитокинами в антиген-стимулированной подгруппе по сравнению с контролем, где присутствовали ДК(0), не обработанные антигенами опухолевого лизата (рис.7), наряду с этим доказано индуцирующее влияние ДК на относительное содержание перфорин-позитивных лимфоцитов (рис.7). Обнаружено, что добавление цитокинов как среди всей популяции лимфоцитов, так и среди CD8+ субпопуляции лимфоцитов способствует повышению относительного содержания перфорин-позитивных клеток в антиген-стимулированной подгруппе (рис.7).



**Рис.7 Влияние антиген-нагруженных дендритных клеток и rhIL-12 с rhIL-18 на относительное содержание перфорин-позитивных лимфоцитов (А, n=28) и CD8+лимфоцитов (Б, n=22) больных колоректальным раком in vitro.**

Наряду с перфорином, как маркером потенциальной цитотоксической активности клеток-эффекторов, гранзимВ является одним из наиболее эффективных индукторов апоптоза. Эта сериновая протеаза обладает способностью превращать относительно неактивные внутриклеточные белки апоптотической системы - прокаспазы, в активные каспазы, а также самостоятельно разрушать большое число цитоплазматических и ядерных протеинов [Andrade, 1998]. Поэтому для оценки способности ДК, праймированных антигенами лизата, к индукции противоопухолевого иммунного ответа, определяли содержание гранзимВ-позитивных лимфоцитов в совместной культуре МНК и ДК. В результате проведенного исследования установлено увеличение in vitro относительного содержания гранзимВ-позитивных CD8+лимфоцитов больных эпителиальным раком яичника в ответ на добавление rhIL-12 совместно с rhIL-18, и в нестимулированной, и в антиген-стимулированной подгруппах (рис.8А), а среди общей популяции лимфоцитов только в антиген-стимулированной подгруппе. При определении относительного содержания гранзимВ-позитивных клеток, как среди общей популяции лимфоцитов, так и среди CD8+ лимфоцитов, больных колоректальным раком, обнаружено стимулирующее влияние на исследуемый показатель совместного культивирования с ДК, праймированных опухолевым лизатом, по сравнению с группой МНК+ДК(0) в нестимулированной подгруппе (рис.8Б). Установлено увеличение относительного содержания гранзимВ-позитивных клеток в ответ на добавление цитокинов rhIL-12 и rhIL-18 в культуру МНК+ДК, в обеих подгруппах среди субпопуляции CD8+ лимфоцитов (рис.8Б), а среди общей популяции лимфоцитов в спонтанной подгруппе. Также обнаружено индуцирующее влияние совместного культивирования с ДК и интерлейкинами на накопление гранзимаВ как общей популяции лимфоцитов, так и

CD8+ лимфоцитами (рис.8Б) по сравнению с группой, где МНК культивировались с ДК(0) в обеих подгруппах.



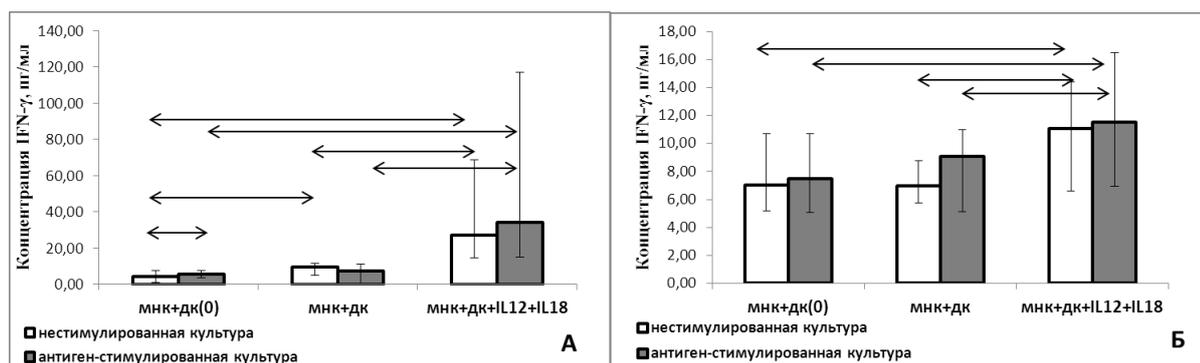
**Рис.8** Влияние антиген-нагруженных дендритных клеток и rhIL-12 с rhIL-18 на относительное содержание гранзимВ-позитивных CD8+лимфоцитов больных эпителиальным раком яичника (А, n=8) и больных колоректальным раком (Б, n=15) *in vitro*.

Таким образом, показано стимулирующее влияние ДК, праймированных опухолевым лизатом, на накопление перфориновых гранул лимфоцитами, в том числе и CD8+ лимфоцитами, в совместной культуре МНК ПК, больных эпителиальным раком яичника, а добавление в совместную культуру МНК и ДК цитокинов rhIL-18 с rhIL-12 способно усилить исследуемый эффект, выраженный повышением относительного содержания не только перфорин-позитивных клетках, но и гранзим В-позитивных лимфоцитов. При изучении цитотоксического потенциала эффекторных клеток в совместной культуре МНК, больных колоректальным раком обнаружено, что генерированные ДК, нагруженные опухолевым лизатом, способны, как самостоятельно, так и в присутствии цитокинов rhIL-18 и rhIL-12 индуцировать цитотоксическую активность эффекторных клеток, которая реализуется посредством перфорин-гранзимВ-опосредованной апоптотической гибели опухолевых клеток *in vitro*.

***Влияние антиген-нагруженных дендритных клеток и rhIL-18 с rhIL-12 на продукцию IFN-γ, IL-4 в культуре мононуклеарных клеток больных эпителиальным раком яичника и больных колоректальным раком***

Для определения поляризации иммунного ответа под влиянием ДК, нагруженных антигенами опухоли, определяли уровень продукции IFN-γ, IL-4 в кондиционных средах МНК в нестимулированной и в антиген-стимулированной подгруппах. Обнаружено достоверное увеличение содержание IFN-γ, в совместной культуре МНК и ДК, праймированных антигенами лизата опухолевых клеток яичника (рис.9А), по сравнению с ДК(0) в нестимулированной подгруппе, что указывает на способность полученных ДК стимулировать развитие иммунных реакции характерных для Th-1 иммунного ответа. Следует отметить, что наибольшее содержание IFN-γ в обеих подгруппах выявлено в культуре МНК, сокультивированных с антиген-нагруженными ДК в сочетании с rhIL-12 и rhIL-18, что объясняется синергическим влиянием обоих цитокинов на стимуляцию продукции медиаторов Th1 типа (рис.8А). Также обнаружено достоверное повышение концентрации IFN-γ в кондиционной среде при сокультивировании МНК и ДК(0) в ответ на добавление антигенов лизата опухолевых клеток яичника (рис.9А), объяснением этого может быть реакция, выраженная усилением продукции IFN-γ в культуре МНК, в ответ на первичное

взаимодействие с антигенами опухолевого лизата. При колоректальном раке индуцирующее влияние на продукцию IFN- $\gamma$  в культуре МНК, показали ДК, нагруженные антигенами лизата, в присутствии rhIL-12 и rhIL-18 в обеих подгруппах по сравнению с контрольными группами (рис.9Б). Установлено, что добавление цитокинов в совместную культуру МНК и ДК также ведет к повышению уровня продукции IFN- $\gamma$  мононуклеарными клетками больных колоректальным раком (рис.9Б). Для оценки возможной стимуляции продукции цитокинов Th2-типа определяли содержание IL-4 в кондиционной культуре МНК, сокультивированных с ДК(0), ДК и ДК+ rhIL-12+rhIL-18. Полученные данные по содержанию IL-4 не имели достоверных различий между группами и подгруппами при обеих патологиях, что указывает на отсутствие значимого влияния на стимуляцию цитокинов Th2-типа, участвующих в регуляции преимущественно гуморального иммунного ответа.



**Рис.9 Влияние антиген-нагруженных ДК и rhIL-12 с rhIL-18 на уровень продукции IFN- $\gamma$  мононуклеарными клетками периферической крови больных эпителиальным раком яичника (А, n=11) и больных колоректальным раком (Б, n=30) *in vitro*.**

В результате проведенных исследований показана возможность генерирования зрелых, праймированных антигенами опухолевого лизата, дендритных клеток (ДК) из клеток предшественников ПК пациентов больных эпителиальным раком яичника и больных колоректальным раком. Установлена способность полученных ДК инициировать цитотоксическую активность по отношению к аутологичным опухолевым клеткам при колоректальном раке и эпителиальном раке яичника, а также стимулировать цитотоксический потенциал эффекторных клеток ПК пациентов больных эпителиальным раком яичника, посредством увеличения количества лимфоцитов общей популяции, экспрессирующих внутриклеточный белок перфорин и CD8+ субпопуляции лимфоцитов, и повышение уровня продукции IFN- $\gamma$  в культуре мононуклеарных клеток. Использование рекомбинантных цитокинов IL-18, IL-12 по отдельности в качестве активаторов индукции иммунного ответа Th-1 типа не привело к ожидаемым результатам. Добавление rhIL-12 и rhIL-18 в совместную культуру мононуклеарных клеток с антиген-нагруженными дендритными клетками, способствует в большей степени стимуляции развития клеточных иммунных реакций в культуре мононуклеарных клеток больных эпителиальным раком яичника (повышение противоопухолевой цитотоксической активности, накопление перфорина, гранзима В лимфоцитами общей популяции и CD8+ лимфоцитами, уровня продукции IFN- $\gamma$ ). При колоректальном раке обнаружена способность ДК и самостоятельно, и в присутствии рекомбинантных цитокинов rhIL-12 и rhIL-18 к индукции цитотоксического потенциала лимфоцитов *in vitro* (повышение противоопухолевой цитотоксической активности, увеличение перфорин, гранзимВ-позитивных лимфоцитов, а уровня продукции IFN- $\gamma$  в присутствии интерлейкинов).

## ВЫВОДЫ

1. Аутологичные дендритные клетки, генерированные из прилипающей фракции моноклеарных клеток периферической крови больных эпителиальным раком яичника, и больных колоректальным раком обладают фенотипическими и функциональными свойствами, присущими антигенпрезентирующим клеткам (повышение уровня экспрессии CD83, CD86, HLA-DR, снижение способности к рецептор-опосредованному захвату антигена в зависимости от степени зрелости), что говорит о возможности генерации ДК при данных патологиях в условиях культивирования в течение 4-х дневного клеточного протокола
2. Аутологичные дендритные клетки, нагруженные опухолевым лизатом, оказывают индуцирующее влияние на цитотоксический потенциал, что проявляется в повышении цитотоксической активности МНК против аутологичных опухолевых клеток яичника, повышении пролиферативной активности МНК и накоплении перфорины лимфоцитами неприлипшей фракции периферической крови больных эпителиальным раком яичника, что указывает на индукцию клеточно-опосредованного механизма цитотоксичности в данных условиях
3. Генерированные из периферической крови больных колоректальным раком дендритные клетки, нагруженные опухолевым лизатом, оказывают индуцирующее влияние на цитотоксический потенциал, что проявляется в повышении цитотоксической активности МНК против аутологичных опухолевых клеток кишечника, повышении пролиферативной активности МНК и в накоплении перфорины, гранзима В лимфоцитами неприлипшей фракции периферической крови больных колоректальным раком
4. Установлено, что в присутствии дендритных клеток, нагруженных опухолевым лизатом, в культуре моноклеарных клеток больных эпителиальным раком яичника повышается содержание IFN- $\gamma$ , и отсутствует влияние на продукцию IL-4, что свидетельствует об изменении баланса цитокинов Th1/Th2 в сторону формирования иммунных реакций преимущественно по клеточному типу, в данных условиях
5. Применение рекомбинантных цитокинов rhIL-12 совместно с rhIL-18 при сокультивировании моноклеарных клеток больных эпителиальным раком яичника, и больных колоректальным раком, с дендритными клетками, нагруженными опухолевым лизатом, приводит к повышению цитотоксической активности, накоплению перфорины, гранзима В, увеличению уровня продукции IFN- $\gamma$ , что свидетельствует об адьювантной роли используемых совместно rhIL-12 и rhIL-18 в формировании клеточных иммунных реакций *in vitro*
6. Аутологичные дендритные клетки, полученные из прилипающей фракции моноклеарных клеток периферической крови больных эпителиальным раком яичника, и больных колоректальным раком обладают характерными фенотипическими и функциональными свойствами данной популяции и способны индуцировать противоопухолевую цитотоксическую активность лимфоцитов *in vitro*, как самостоятельно, так и в присутствии rhIL-12 с rhIL-18

## СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Сенников С.В., Жеребцова Н.О., Хрипко О.П., Шевченко Ю.А., Якушенко Е.В., Облеухова И.А., и соавт. Модуляция специфического иммунного ответа аутологичными,

- активированными дендритными клетками *in vitro*. // Материалы московской международной конференции «Биотехнология и медицина»– 2006. – С. 141.
2. Якушенко Е.В., Шевченко Ю.А., Хрипко О.П., Жеребцова Н.О., Облеухова И.А., и соавт. Методические подходы к оценке эффективности генерации дендритных клеток и модуляции специфического иммунного ответа // Российский иммунологический журнал. – 2008. – Т.2(11) №2-3. – С. 126-127.
3. Шевченко Ю.А., Хрипко О.П., Облеухова И.А., Сенников С.В. Дендритные клетки и перспективы их клинического применения. // В сб. науч. тр.: «Клеточные технологии. Теоретические и прикладные аспекты» Новосибирск, Наука. – 2009. – С. 36-53.
4. Сенников С.В., Шевченко Ю.А., Хрипко О.П., Облеухова И.А., и соавт. Экспериментальные подходы к разработке клеточных протоколов модуляции специфических иммунных реакций с помощью дендритных клеток. // В сб. науч. тр.: «Клеточные технологии. Теоретические и прикладные аспекты» Новосибирск, Наука. – 2009. – С. 53-75.
5. Курилин В.В., Облеухова И.А., и соавт. Стимуляция цитотоксического ответа против опухолевых клеток больных колоректальным раком в культуре мононуклеарных клеток с помощью дендритных клеток. // Дни иммунологии в Сибири: Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием под ред. В.А.Козлова, С.В.Смирновой, В.Т.Манчука. Красноярск Изд-во КрасГМУ. – 2010. – С. 147-149.
6. Курилин В.В., Облеухова И.А., и соавт. Модуляция цитотоксического противоопухолевого ответа в культуре мононуклеарных клеток с помощью дендритных клеток // Сибирский онкологический журнал. – 2010. – № S1. – С. 64-65
7. Курилин В.В., Облеухова И.А., Лопатникова Ю.А., Сенников С.В. Культивирование зрелых дендритных клеток из мононуклеарных клеток периферической крови. // Цитокины и воспаление Материалы Всероссийской научной конференции «Молекулярно-генетические основы функционирования цитокиновой сети в норме и при патологии» Новосибирск 15-17 сентября 2010г. – 2010. – Т.9. – №3. – С. 77-78.
8. Курилин В.В., Облеухова И.А., Якушенко Е.В., Якушенко В.К. Влияние дендритных клеток и цитокинов на стимуляцию цитотоксического ответа против опухолевых клеток больных колоректальным раком в культуре мононуклеарных клеток. // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2010. – №2/1(29). – С. 159-160.
9. Курилин В.В., Облеухова И.А., и соавт. Использование дендритных клеток для стимуляции цитотоксического противоопухолевого ответа в культуре мононуклеарных клеток. // «Иммунотерапия и иммуногенез основных заболеваний человека: от эксперимента к клинике». Под ред. В.А.Козлова и С.В.Сенникова, Новосибирск. – 2011. – С. 77-80.
10. Курилин В.В., Облеухова И.А., и соавт. Модуляция опухолеспецифичной цитотоксической иммунной реакции в совместной культуре мононуклеарных и дендритных клеток больных колоректальным раком. // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2011. – № 2/1 (35). – С. 164-165.
11. Облеухова И.А., и соавт. Модуляция цитотоксического противоопухолевого иммунного ответа аутологичными, нагруженными антигеном дендритными клетками больных эпителиальным раком яичника *in vitro*// Сибирский онкологический журнал. – 2012. № S1. – С. 115-116.
12. Курилин В.В., Облеухова И.А., и соавт. Использование дендритных клеток для стимуляции цитотоксического противоопухолевого ответа в культуре мононуклеарных клеток // Иммуногенез и иммуногенез основных заболеваний человека: от эксперимента к клинике. Материалы 8-й отчетной конференции НИИКИ СО РАМН Новосибирск. – 2011. – С. 77-80.
13. Oblehova I., et. al. Effect of mature dendritic cells primed with autologous tumor antigens, patients with epithelial ovarian cancer to stimulate the cytotoxic activity of mononuclear cells *in vitro* //Frontiers in Immunology doi=10.3389/conf.fimmu.2013.02.00140. 15-th International Congress of Immunology (ICI). Milan, Italy– 2013.

14.Курилин В. В., Хантакова Ю. Н., Облеухова И.А., Шевченко Ю. А., Куликова Е. В., Якушенко В. К., Соколов А. В., Сенников С. В. Стимуляция дендритными клетками in vitro противоопухолевой цитотоксической активности моноклеарных клеток больных колоректальным раком // **Медицинская иммунология**. – 2013. – Т.15. – №.3. – С. 235-246.

15.Облеухова И.А., Курилин В.В., Гончаров М.А., Тархов А.В., Красильников С.Э., Сенников С.В. Влияние зрелых дендритных клеток, праймированных аутологичными опухолевыми антигенами, больных эпителиальным раком яичника на стимуляцию цитотоксического иммунного ответа в культуре моноклеарных клеток // **Клеточные технологии в биологии и медицине**. – 2013. –№.3. – С. 169-173.

16.Облеухова И.А., и соавт. Влияние IL-12, IL-18, и дендритных клеток, праймированных лизатом опухоли, на цитотоксическую активность моноклеарных клеток при колоректальном раке //Российский иммунологический журнал, Тезисы объединенного иммунологического форума. Нижний-Новгород, 30 июня-5 июля. – 2013. – Т.7(16). – №2-3. – С. 346.

17.Курилин В.В., Куликова Е. В., Облеухова И.А., и соавт. Влияние различных способов доставки опухолевых антигенов на эффективность стимуляции цитотоксической клеточной реакции против аутологичных опухолевых клеток//Российский иммунологический журнал, материалы объединенного иммунологического форума, Нижний-Новгород, 30 июня-5 июля. – 2013. – Т.7(16) . – №2-3. – С. 343.

#### **Патенты:**

Патент на изобретение № 2458985 «Способ генерации антиген-специфических цитотоксических клеток с противоопухолевой активностью» Сенников С.В., Курилин В.В., Облеухова И.А., Лопатникова Ю.А., Якушенко Е.В., Якушенко В.К. Дата публикации 20.08.2012, Бюл. № 23.

Положительное решение от 16.10.2013 на заявку на изобретение № 2012103822 «Способ генерации антиген-специфических цитотоксических клеток с активностью против клеток рака яичника». Сенников С.В., Облеухова И.А., Курилин В.В., Красильников С.Э., Тархов А.В., Гончаров М.А.

#### **Список сокращений:**

ПК–периферическая кровь

МНК–моноклеарные клетки

ДК–дендритные клетки