

# ВЕСЦІ

## НАЦЫЯНАЛЬНАЯ АКАДЭМІЯ НАВУК БЕЛАРУСІ

СЕРЫЯ МЕДЫЦЫНСКІХ НАВУК 2014 № 2

# ИЗВЕСТИЯ

## НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

СЕРИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК 2014 № 2

ЗАСНАВАЛЬНІК – НАЦЫЯНАЛЬНАЯ АКАДЭМІЯ НАВУК БЕЛАРУСІ

Часопіс выдаецца са студзеня 2004 г.

Выходзіць чатыры разы ў год

ЗМЕСТ

### КЛІНІЧНАЯ І ЭКСПЕРЫМЕНТАЛЬНАЯ МЕДЫЦЫНА

Гончаров А. Е., Романова И. В., Залуцкий И. В., Прохоров А. В., Папок В. И. Характеристика культур дендритных клеток для иммунотерапии рака поджелудочной железы .....	4
Нечипуренко Н. И., Пашковская И. Д., Василевская Л. А., Верес А. И. Дисфункциональные проявления у пациентов с диабетической полинейропатией и нейропатическим болевым синдромом и их коррекция ..	13
Юшкевич П. Ф., Висмонт Ф. И., Мрочек А. Г. Противоишемический и антиаритмический эффекты дистантного ишемического пре- и посткондиционирования у крыс с токсическим поражением печени .....	22
Мельниченко Ю. М., Кабак С. Л., Саврасова Н. А., Мехтиев Р. С. Морфология корней и корневых каналов первых и вторых постоянных нижних моляров .....	28
Борисевич Я. Н., Лавинский Х. Х. Гигиеническая оценка статуса питания спортсменов игровых видов спорта .....	33
Городецкая И. В., Евдокимова О. В. Влияние йодсодержащих тиреоидных гормонов на экспрессию ранних генов <i>c-fos</i> и <i>c-jun</i> в миокарде крыс при стрессе .....	42
Висмонт А. Ф., Висмонт Ф. И. Роль аргиназы печени и мочевины крови в процессах теплообмена, детоксикации, формирования тиреоидного статуса и тепловой устойчивости .....	48
Михайлов А. Н., Доманцевич В. А. Фундаментальные и прикладные аспекты дифференциальной лучевой визуализации дегенеративно-дистрофических заболеваний плечевого сустава .....	55
Митюкова Т. А., Окулевич Н. М., Леонова Т. А., Платонова Т. Ю., Кохан С. Б., Маньковская С. В., Кравчук В. Г. Тиреоидный статус пациентов с карциномой щитовидной железы в зависимости от длительности супрессивной терапии тироксинотерапией .....	62

# PROCEEDINGS

## OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS

MEDICINE SERIES 2014 N 2

FOUNDER IS THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS

The Journal has been published since January 2004

Issued four times a year

### CONTENTS

#### CLINICAL AND EXPERIMENTAL MEDICINE

<b>Hancharou A. Y., Ramanava I. U., Zalutsky I. V., Prokhorov A. V., Papok V. I.</b> Generation of dendritic cells cultured for immunotherapy of pancreatic cancer patients .....	4
<b>Nechipurenko N. I., Pashkouskaya I. D., Vasilevskaya L. A., Veres A. I.</b> Disfunctional manifestations and their correction in patients with diabetic polyneuropathy and neuropathic pain .....	13
<b>Jushkevich P. F., Vismont F. I., Mrochek A. G.</b> Antiischemic and antiarrhythmic effects of remote ischemic pre- and postconditioning in rats with the toxic liver injury .....	22
<b>Melnichenka Y., Kabak S., Savrasova N., Mechtiev R.</b> Root and canal morphology of the first and second mandibular molars .....	28
<b>Borisevich Ya. H., Lavinsky H. H.</b> Hygienic evaluation of the nutritional status of athletes of competitive sport ..	33
<b>Gorodetskaya I. V., Evdokimova O. V.</b> Effect of iodine-containing thyroid hormones on the expression of the early genes <i>c-fos</i> and <i>c-jun</i> in the myocardium of rats under stress .....	42
<b>Vismont A. F., Vismont F. I.</b> Participation of liver arginase and blood urine in the processes of heat exchange, detoxication, thyroid status formation, and heat resistance .....	48
<b>Mikhaylov A. N., Domantsevich V. A.</b> Fundamental and applied aspects of differential beam visualization of degenerate and dystrophic diseases of a shoulder joint .....	55
<b>Mityukova T. A., Akulevich N. M., Leonova T. A., Platonova T. Yu., Kohan S. B., Mankovskaya S. V., Kravchuk V. G.</b> Thyroid status of thyroid carcinoma patients according to levothyroxine suppressive therapy and treatment time .....	62
<b>Harmaza Y. M., Kasko L. P., Kozlova N. M., Petrovich V. A., Al-Shachrani M., Slobozhanina E. I.</b> Fluorescence parameters and antioxidant properties of blood plasma in pregnant women with pyelonephritis .....	68
<b>Chernov A. N., Pozdniak L. V.</b> Cytotoxic effects of 4-{3-[5-( <i>n</i> -tolyl)isoxazol-3-yl]ureido}butanoic acid, cisplatin and their combination <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> .....	74
<b>Mityukova T. A., Akulevich N. M., Leonova T. A., Platonova T. Yu., Kohan S. B., Mankovskaya S. V., Kravchuk V. G.</b> Assessment of the individual sensitivity to levothyroxine therapy .....	81
<b>Bagirov I. A., Petina O. V., Aleinikova O. V.</b> Prognostic factors and results of the treatment according protocol ALL MB-2002 of childhood acute lymphoblastic leukemia in Azerbaijan .....	90

#### SURVEYS

<b>Shanko J. G., Stankevich S. K., Zhurauliou V. A.</b> Diagnostics and treatment of nasal liquorrhea .....	98
<b>Kharuzhyk S. A., Zhavrid E. A., Karman A. V.</b> Capabilities of diffusion-suspended magnetic resonance imaging and positron emission tomography for early prediction of the chemotherapy effectiveness of lymphomas .....	107

#### SCIENTISTS OF BELARUS

<b>Vladimir Nikolaevich Kalyunov</b> (To the 80th Anniversary) .....	121
--	-----

## КЛІНІЧНАЯ І ЭКСПЕРЫМЕНТАЛЬНАЯ МЕДЫЦЫНА

УДК 616:612.017.1

А. Е. ГОНЧАРОВ<sup>1,2</sup>, И. В. РОМАНОВА<sup>1,2</sup>, И. В. ЗАЛУЦКИЙ<sup>1</sup>, А. В. ПРОХОРОВ<sup>3</sup>, В. И. ПАПОК<sup>3</sup>

### ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ИММУНОТЕРАПИИ РАКА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

<sup>1</sup>Институт физиологии НАН Беларуси, Минск,

<sup>2</sup>Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь,

<sup>3</sup>Белорусский государственный медицинский университет, Минск

(Поступила в редакцию 10.03.2014)

**Введение.** Рак поджелудочной железы (РПЖ) представляет серьезную проблему для медицины в связи с крайне неблагоприятным прогнозом для жизни. Заболеваемость РПЖ в Беларуси составляет 8–9 случаев на 100 тыс. населения [1]. Пятилетняя выживаемость после радикального хирургического лечения не превышает 5 %, а медиана жизни неоперабельных пациентов составляет 4 мес. [2, 3]. Применение химиотерапии и лучевой терапии у пациентов, страдающих РПЖ, малоэффективно.

В последнее десятилетие во многих странах мира проходят клинические испытания метода иммунотерапии онкологических заболеваний, основанного на использовании дендритных клеток (ДК). Результаты большей части исследований обнадеживающие, на что указывают безопасность и хорошая переносимость терапии с применением ДК, наличие иммунологической и клинической эффективности [4–7]. Так, результаты лечения при помощи ДК 512 пациентов, страдавших метастатическим раком простаты, предоставили убедительные доказательства безопасности и эффективности данного метода, что позволило Управлению по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных препаратов США в 2010 г. одобрить его использование для широкого применения [8].

В настоящее время насчитывается 6 исследований, в которых для терапии РПЖ применяли ДК [9–14]. При этом после проведенной терапии с использованием разных подходов получения ДК наблюдались стабилизация опухолевого процесса и отсутствие побочных эффектов [9, 11, 12]. Отмечена хорошая переносимость такой терапии с увеличением средней продолжительности жизни после постановки диагноза [10–12]. Показано, что ДК пациентов со стабилизацией процесса характеризовались достоверно более высокими показателями экспрессии молекулы CD83 по сравнению с таковой у лиц, у которых отмечалось прогрессирование заболевания [10]. Из 5 пациентов, принимавших участие в клиническом испытании, проведенном в госпитале университета Нагойи (Япония), у 1 наступила частичная ремиссия, у 2 – стабилизация болезни на протяжении более 6 мес. наблюдения [12]. В исследовании Н. Endo и А. Igisawa из госпиталя префектуры Фукусима (Япония) у двоих пациентов, которым вводили ДК (один из которых с отдаленными метастазами в легкие), не выявлено прогрессирования болезни при наблюдении на протяжении свыше 5 лет [13, 14].

Таким образом, перспективы использования ДК в лечении РПЖ весьма высоки. Однако методические подходы, использованные в указанных выше работах, требуют, на наш взгляд, существенной коррекции. Возможность применения ДК в настоящее время ограничивает отсутствие стандартизированного метода их получения, неизвестны антигены, которые были бы наиболее эффективны для праймирования ДК. Количество вводимых ДК составляло в большинстве иссле-

дований не более  $40 \cdot 10^6$  клеток, что, видимо, явно недостаточно для формирования стойкого иммунного ответа и получения выраженного клинического эффекта. Кроме того, в некоторых работах ДК не праймировали антигенами, что вызывает определенные сомнения в возможности таких ДК стимулировать противоопухолевый иммунитет, а также в получении положительных результатов клинических испытаний.

Цель исследования – адаптация метода получения зрелых дендритных клеток, праймированных антигенами опухоли, для иммунотерапии пациентов, страдающих раком поджелудочной железы.

**Объекты и методы исследований.** Исследовано 5 образцов периферической крови пациентов, страдающих РПЖ, 2 образца опухоли поджелудочной железы, любезно предоставленных сотрудниками кафедры онкологии Белорусского государственного медицинского университета. В работе использовано также 6 образцов венозной крови доноров. Периферическую кровь в количестве 10–15 мл забирал в стерильные полипропиленовые пробирки с антикоагулянтом средний медицинский персонал УЗ «Минский городской клинический онкологический диспансер». Пробирку доставляли в лабораторию в течение 2–24 ч с момента забора крови. Забор участков опухоли проводили во время хирургического вмешательства. Образцы опухоли размером от 0,5 до 1,0 см в диаметре помещали в пробирку со стерильной транспортной средой (AIM-V). Пробирку доставляли в лабораторию в течение 30–72 ч с момента забора. В этой связи выделить клетки опухоли для постановки цитотоксического теста не представлялось возможным.

**Выделение моноцитов из венозной крови и получение культур моноцитарных дендритных клеток.** Мононуклеарные клетки периферической крови (МПК) выделяли путем центрифугирования образца на градиенте плотности фиколл-пака с плотностью 1077 г/л. Моноциты получали из фракции МПК методом адгезии с последующим культивированием в течение 3 сут в питательной среде AIM-V, содержащей 1 % аутологичной сыворотки пациентов и рекомбинантные человеческие цитокины (50 нг/мл ГМ-КСФ и 25 нг/мл ИЛ-4), в увлажненной атмосфере с 5 %  $\text{CO}_2$  при 37 °С. На 4-е сутки в культуру дополнительно вносили питательную среду с цитокинами. Культивирование прекращали на 7-е сутки, после чего производили подсчет клеток, оценивали их иммунофенотип и жизнеспособность. Для праймирования ДК культивировали на протяжении 6 ч в питательной среде с 100 мкг/мл лизата опухоли. Затем ДК двукратно отмывали от лизата и в течение суток культивировали в увлажненной атмосфере с 5 %  $\text{CO}_2$  при 37 °С в среде, содержащей 25 нг/мл ГМ-КСФ, 12,5 нг/мл ИЛ-4 и ФНО- $\alpha$  (50 нг/мл) в качестве индуктора созревания.

**Криоконсервация мононуклеаров периферической крови.** Для криоконсервации МПК использовали среду, состоящую из 70 % телячьей эмбриональной сыворотки, 10 % ДМСО и 20 % среды AIM-V. Охлаждение клеток осуществляли с использованием программируемого замораживателя, после чего их переносили в жидкий азот для хранения.

**Получение лизата опухоли.** Кусочки опухоли скальпелем тщательно измельчали на фрагменты не более 1 мм толщиной, переносили в полипропиленовую пробирку (2,0 мл), которую затем заполняли до 80 % объема средой AIM-V. Пробирку подвергали не менее чем 10 циклам замораживания-оттаивания. В полученном лизате методом Бредфорда определяли концентрацию белка. Порционно разливали готовый стерильный лизат по пробиркам и хранили в жидком азоте до использования.

**Смешанная культура клеток.** Для изучения способности ДК, праймированных лизатом опухоли, стимулировать активацию и пролиферацию Т-лимфоцитов использовали стандартную методику с некоторыми модификациями. Аутологичные лимфоциты, предварительно инкубированные с CFSE, культивировали со зрелыми праймированными ДК в соотношениях 1:10, 1:20 и 1:40 в 1 мл питательной среды на протяжении 72 ч. Параллельно культивировали лимфоциты в отсутствие ДК и стимуляторов пролиферации (отрицательный контроль), в присутствии не праймированных лизатом опухоли ДК (1:10) и в присутствии 30 мкг/мл фитогемоагглютинаина (положительный контроль). По истечении времени культивирования определяли относительное содержание лимфоцитов, экспрессирующих молекулы активации CD25, CD69 и HLA-DR, и определяли пролиферативную активность клеток.

**Определение пролиферирующих клеток методом проточной цитометрии.** Для выявления пролиферирующих клеток в суспензию лимфоцитов в концентрации  $2 \cdot 10^6$ /мл добавляли 2,5 мкМ

CFSE, инкубировали клетки 10 мин при 37 °С, после чего отмывали двукратно в охлажденном (4–10 °С) DPBS и однократно – в питательной среде. Клетки сокультивировали с ДК, после чего отмывали от питательной среды и инкубировали с антителом к молекуле CD3, добавляли в пробы 7-AAD и учитывали на проточном цитофлуориметре. В процессе анализа выделяли регионы CD3<sup>+</sup> и 7-AAD<sup>-</sup> клеток. В полученном логическом гейте определяли уровень флуоресценции на канале FL1. Для интерполяции полученных результатов и расчета поколений дочерних клеток использовали программу FlowJo.

**Определение иммунофенотипа клеток.** Иммунофенотип МПК, культивированных с ДК в условиях смешанной культуры, и ДК определяли методом проточной цитофлуориметрии с использованием от 3 до 8 цветовых меток. Применяли следующие моноклональные антитела: CD1a, CD3, CD11c, CD14, CD25, CD40, CD54, CD69, CD80, CD83, CD86, CD205, CD206, CD208, CD209, CD273, CD274, HLA-DR и ИФН- $\gamma$  (Becton Dickinson, Beckman-Coulter, США). Для корректной настройки параметров компенсации для каждой группы образцов готовили single-stain контроли. Количество клеток в состоянии апоптоза и мертвых клеток определяли с помощью раствора аннексина V, конъюгированного с FITC, и раствора 7-AAD в концентрации 2 мкг/мл соответственно.

**Определение АСК. Активация.** К крови в количестве 200 мкл добавляли лизат опухоли (2,5; 10; 25 мкг/мл) и 100 мкл DPBS, доводили объем средой RPMI-1640 до 1 мл и культивировали суспензию 18 ч при температуре 37 °С. Затем добавляли монензин (10 мкг/мл) и дополнительно культивировали клетки на протяжении 2 ч.

**Пробоподготовка.** Активированную кровь в количестве 100 мкл инкубировали с моноклональными антителами к CD4 в течение 15 мин при температуре 4 °С. Эритроциты лизировали раствором хлорида аммония. Клетки в количестве  $(1,0-2,0) \cdot 10^5$  фиксировали 4 %-ным раствором параформальдегида, а затем для их пермеабиллизации добавляли 0,1 %-ный раствор сапонины на DPBS. Клетки инкубировали с моноклональными антителами к ИФН- $\gamma$  и соответствующими изотипическими контролями 15 мин при 4 °С и производили учет результатов на проточном цитофлуориметре.

**Исследование морфологии клеток.** Морфологию ДК исследовали при помощи инвертированного микроскопа с использованием метода фазового контрастирования при увеличении 200. Для измерения основных морфологических параметров клетки использовали программу NIS-Elements BR. Оценивали размеры клеток, их форму, наличие и длину цитоплазматических выростов. Для расчета определяли параметры не менее 100 клеток.

**Статистический анализ.** Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программ Statistica и StatPlus [16, 17]. Значения показателей представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха между 25-й и 75-й процентилями. Нормальность распределения величин оценивали с использованием *W*-критерия Шапиро–Вилка. Учитывая отсутствие в большинстве исследованных выборок нормального распределения, для сравнения групп данных и изучения корреляционных взаимосвязей использовали непараметрические методы, для сравнения двух независимых выборок – непараметрический *U*-критерий Манна–Уитни, для сравнения связанных выборок – критерий Уилкоксона и критерий знаков, для сравнения трех и более групп независимых данных – метод рангового анализа вариаций Краскела–Уоллиса и ранговый дисперсионный анализ по Фридмену (Friedman ANOVA). Зависимость между показателями определяли с помощью коэффициента корреляции Спирмана (*R*). В качестве критерия достоверности различий показателей принимали уровень значимости  $p < 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение. Краткая характеристика исследованных образцов крови и опухоли.** В исследовании был использован биоматериал (венозная кровь, образцы опухоли) 5 пациентов, страдавших неоперабельным РПЖ (III–IV стадия), в возрасте от 39 до 72 лет. При этом у одного из пациентов наблюдались отдаленные метастазы в органы (M1).

Перед проведением исследований оценивали количество и состояние образцов крови, количество лейкоцитов. Количество ядросодержащих клеток в группе пациентов с РПЖ составило  $10,4(8,3-11,6) \cdot 10^6$ /мл, в группе доноров –  $6,0(5,0-7,2) \cdot 10^6$ /мл. Относительное и абсолютное содержание CD14<sup>+</sup> моноцитов составило в группе пациентов с РПЖ 6,6 (4,4–7,5) % и  $0,6(0,3-0,8) \cdot 10^6$ /мл, а в группе доноров – 6,6 (3,7–8,6) % и  $0,4(0,2-0,6) \cdot 10^6$ /мл соответственно. Как видно, содержание

моноцитов в образцах венозной крови сильно варьируется, что в некоторых случаях может приводить к невозможности получения достаточного количества моноцитов, необходимых для генерации ДК.

**Адаптация метода получения дендритных клеток.** С целью получения ДК моноциты доноров растили на трех питательных средах: RPMI-1640, AIM-V и SFEM. Питательная среда SFEM (StemCell Technologies, Канада) изготовлена на основе Iscove's MDM с добавлением  $10^{-4}$  М 2-меркаптоэтанол, 2 ммоль L-глутамин, 200 мг/мл трансферрина, 10 мг/мл рекомбинантного человеческого инсулина, 1 % бычьего сывороточного альбумина [18]. Перед использованием в среду добавляли свежий раствор L-глутамин, 50 мкг/мл гентамицин и 20 ммоль HEPES.

Питательная среда RPMI-1640 является базовой средой, часто используемой для получения ДК. В питательную среду RPMI-1640 (Sigma-aldrich, США) добавляли 10 % термоинактивированной телячьей эмбриональной сыворотки (HyClone), свежий раствор L-глутамин, 50 мкг/мл гентамицин и 20 ммоль HEPES.

Питательная среда AIM-V (Invitrogen, США) содержит 0,25 % человеческого сывороточного альбумина, 50 мкг/мл стрептомицин сульфата, 10 мкг гентамицин сульфата [15]. Перед использованием в среду добавляли свежий раствор L-глутамин (2 ммоль) и 20 ммоль HEPES.

Учитывая накопленный в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии положительный опыт использования питательной среды AIM-V для культивирования ДК, был проведен сравнительный анализ трех культур ДК, культивированных на протяжении 7 сут в средах AIM-V, RPMI-1640 и SFEM [19]. Оценивали морфологию клеток, иммунофенотип (экспрессию молекул CD209, CD86, CD1a). Анализ данных показал отсутствие достоверных отличий в экспрессии молекул CD209 ( $H = 1,63; p = 0,44$ ), CD86 ( $H = 4,19; p = 0,2$ ) и CD1a ( $H = 1,65; p = 0,44$ ) клетками, культивированными в разных средах.

Во всех исследованных пробах ДК на 7-е сутки культивирования были морфологически однородны, характеризовались звездчатыми клеточными формами с наличием типичных для этих клеток цитоплазматических отростков (рис. 1). Клетки находились во взвешенном состоянии, некоторые из них были объединены в кластеры. При использовании разных питательных сред значимых различий между такими показателями, как площадь ДК, их диаметр и длина отростков цитоплазмы, не выявлено (данные не представлены). Поскольку достоверных различий в иммунофенотипе клеток при культивировании в средах AIM-V, RPMI-1640 и SFEM не выявлено, питательную среду AIM-V можно рекомендовать для культивирования ДК, особенно учитывая сертификацию этой питательной среды для получения культур клеток *ex vivo* и ее существенно меньшую стоимость в сравнении с SFEM.

**Иммунофенотип ДК.** В ходе исследований получены культуры ДК из моноцитов периферической крови. Медианное количество полученных ДК составило  $4,9(4,1-6,7) \cdot 10^6$  у доноров и  $4,7(4,1-5,5) \cdot 10^6$  у пациентов с РПЖ.

Во всех культурах ДК присутствовала примесь CD11c<sup>-</sup> лимфоцитов (не более 30 %). В табл. 1 приведены данные экспрессии различных молекул дендритными клетками.

Оценка иммунофенотипа полученных культур ДК показала, что большая часть клеток представлена HLA-DR<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CD54<sup>+</sup>CD209<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>CD86<sup>+</sup>CD205<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup> ДК.

Экспрессия молекулы CD14, типичного маркера моноцитов/макрофагов, составила 3,0 (0,1–3,9) % у доноров и 5,8 (4,0–14,4) % у пациентов с РПЖ. В то же время 99,2 (99,0–99,3) % ДК экспрессировали молекулу CD209 (DC-SIGN), которая является одним из значимых маркеров ДК. Принадлежность клеток к миелоидному ростку была подтверждена экспрессией молекулы CD11c – 99,4 (99,2–99,5) %, 35,0 (30,8–39,7) усл. ед.

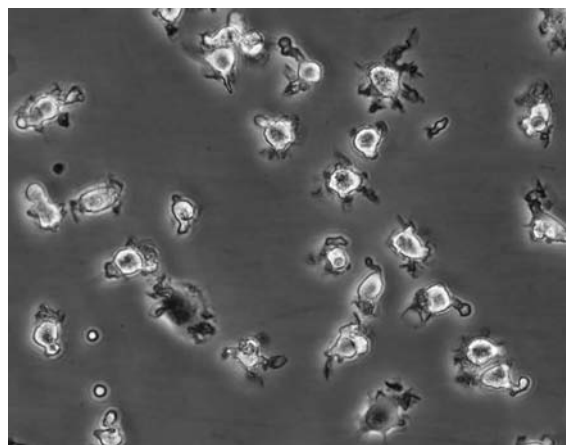


Рис. 1. Микрофотография культуры ДК пациента с РПЖ (4Н)

Т а б л и ц а 1. Иммунофенотип ДК, полученных от пациентов с РПЖ и доноров

Молекула	Доноры (n = 6)	Пациенты с РПЖ (n = 5)	p
Незрелые ДК (7 сут)			
CD11c (%)	99,4 (99,2–99,5)	99,2(99,1–99,8)	0,927
CD11c (RFI)	35,0 (30,8–39,7)	74,8(43,5–86,1)	0,081
CD14 (%)	3,0 (0,1–3,9)	5,8 (4,0–14,4)	0,081
CD1a (%)	43,2 (40,3–63,1)	14,5 (11,9–22,1)	0,028
CD1a (RFI)	19,2 (12,4–22,1)	12,5 (10,2–23,0)	0,648
CD209 (%)	99,2 (99,0–99,3)	99,2 (97,3–99,2)	0,574
CD209 (RFI)	133,4 (112,8–276,8)	166,3 (119,2–218,6)	0,927
CD54 (%)	99,3 (99,0–99,6)	99,0 (99,0–99,5)	0,925
CD54 (RFI)	59,9 (43,7–66,3)	66,3 (58,2–67,2)	0,313
HLA-DR (%)	99,8 (99,7–99,8)	99,9 (99,7–99,9)	0,337
HLA-DR (RFI)	169,7 (155,1–184,7)	192,0 (184,7–212,3)	0,169
CD80 (%)	2,4 (1,9–3,5)	3,7 (2,1–4,2)	0,521
CD80 (RFI)	6,5 (6,0–11,6)	11,0 (10,6–11,6)	0,409
CD86 (%)	90,0 (72,0–93,6)	97,7 (96,4–98,2)	0,028
CD86 (RFI)	23,3 (14,2–35,1)	35,1 (30,6–55,8)	0,233
CD273 (%)	96,2 (95,1–97,7)	95,4 (95,0–97,6)	0,648
CD273 (RFI)	25,1 (24,3–33,6)	30,1 (23,5–35,6)	0,648
CD274 (%)	84,4 (75,4–90,2)	74,1 (72,3–80,4)	0,315
CD274 (RFI)	21,0 (15,7–30,5)	32,5 (21,2–41,2)	0,523
CD205 (%)	91,4 (89,7–95,6)	95,3 (90,6–97,2)	0,464
CD205 (RFI)	30,9 (24,1–42,0)	24,6 (20,0–28,0)	0,411
CD206 (%)	95,5 (94,8–99,6)	99,1 (98,7–99,6)	0,407
CD206 (RFI)	211,9 (197,1–224,7)	214,6 (211,1–250,4)	0,464
CD83 (%)	4,0 (3,1–3,9)	3,1 (2,5–6,9)	0,855
CD208 (%)	0,3 (0,0–0,5)	2,3 (1,0–3,3)	0,054
Зрелые ДК (8 сут)			
CD80 (%)	77,3 (68,9–95,6)	78,0 (66,6–96,9)	0,927
CD83 (%)	70,1 (59,6–89,4)	66,0 (59,8–68,1)	0,523
CD208 (%)	72,2 (64,0–89,5)	78,5 (74,5–79,6)	0,523

Полученные результаты о статистически достоверном уменьшении экспрессии молекулы CD1a ДК пациентов с РПЖ по сравнению с ДК доноров указывают прежде всего на нарушение дифференцировки моноцитов в ДК. Поскольку ранее нами было выявлено снижение экспрессии молекулы CD1a на ДК пациентов с хроническими инфекциями и раком молочной железы, есть основания считать данное явление универсальным для всех иммунодефицитных состояний [20–23].

Показано увеличение относительного числа ДК, экспрессирующих молекулу CD86, у пациентов с РПЖ по сравнению с контролем ( $p = 0,028$ ). В то же время статистически достоверных отличий в экспрессии коингибиторных и коингибиторных молекул CD80, CD273 и CD274 не выявлено ( $p > 0,05$ ).

Все ДК содержали на своей мембране молекулы HLA-DR. Показана экспрессия ДК молекулы адгезии CD54(ICAM-1), молекулы CD205(DEC-205) – рецептора, связывающего аутоантигены мертвых и апоптотических клеток, а также молекулы CD206 – рецептора к маннозе.

В то же время культуры ДК характеризовались функциональной незрелостью, на что указывают низкие показатели экспрессии молекул CD83, CD80 и CD208. Экспрессия этих молекул, являющихся маркерами зрелых ДК, значительно усиливалась после стимуляции индукторами созревания (ФНО- $\alpha$  и аналогами цАМФ), что указывает на возможность эффективной индукции созревания ДК, полученных от пациентов с РПЖ.

С целью определения в культуре ДК мертвых клеток использовали «витальный» интеркалирующий краситель – 7-аминоактиномицин Д, проникающий только через поврежденную клеточную мембрану, а для выявления клеток, находящихся в стадии апоптоза, – аннексин V, конъюгированный с ФИТЦ. В жизнеспособных клетках фосфолипидные компоненты клеточной мембраны

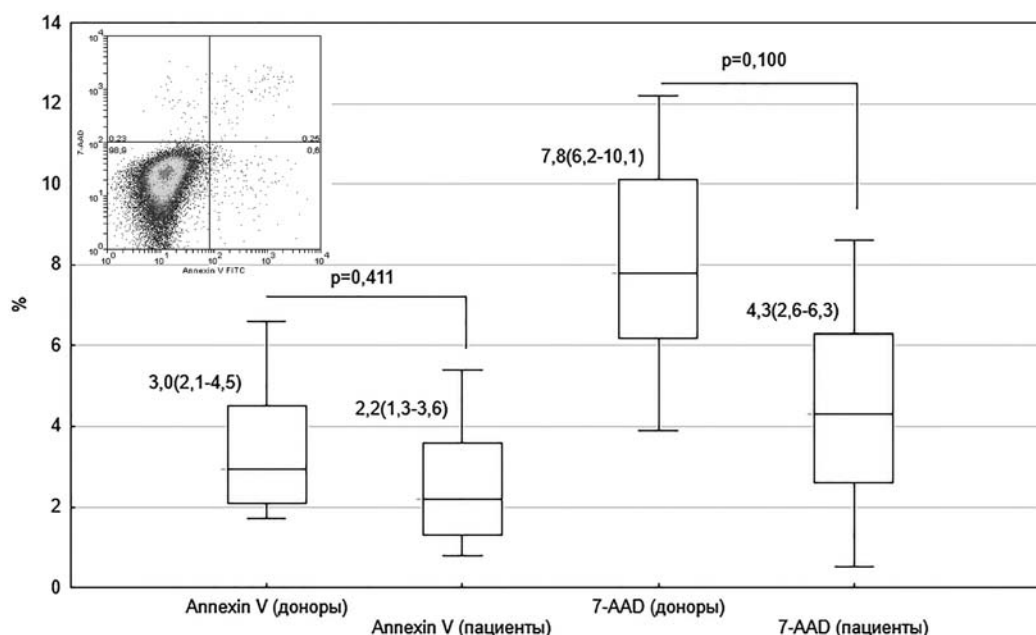


Рис. 2. Относительное число мертвых клеток (7-AAD+) и клеток в состоянии апоптоза (Annexin V<sup>+</sup>)

находятся на ее внутренней поверхности. В процессе апоптоза происходит транслокация фосфатидилсерина на внешнюю поверхность клеточной мембраны. Аннексин V связывается с фосфатидилсеринем в присутствии ионов кальция [24].

Комплексная оценка жизнеспособности и апоптоза клеток методом проточной цитофлуориметрии с использованием 7-AAD и аннексина-V показала, что в культурах ДК содержится не более 10 % мертвых клеток и клеток в состоянии апоптоза, что удовлетворяет требованиям, предъявляемым к культурам ДК (рис. 2). Таким образом, культуры клеток были представлены жизнеспособными дифференцированными моноцитарными ДК, не содержали значимого количества примеси макрофагов и иных клеток.

**Влияние лизатов опухоли на активацию Т-лимфоцитов.** Иммуногенность лизатов опухоли оценивали с помощью ряда тестов, основанных на использовании цельной крови пациентов с РПЖ. Относительное число активированных антигенспецифических Т-лимфоцитов, накапливающих внутриклеточно ИНФ- $\gamma$ , составило 0,12 (0,1–0,16) % в культурах лимфоцитов, культивированных с DPBS в качестве отрицательного контроля (спонтанная активация) (рис. 3).

Добавление форбол-12-миристат-13-ацетата (ФМА) и иономицина в качестве положительного контроля оказывало выраженный эффект на активацию лимфоцитов: более 90 % Т-лимфоцитов экспрессировали молекулу CD69 – маркер ранней активации лимфоцитов, а относительное число ИНФ- $\gamma$ + клеток достигло 22,4 (17,9–25,5) %.

Эффект лизата опухоли в концентрации 10 и 25 мкг/мл в отношении продукции ИНФ- $\gamma$  лимфоцитами был достоверно выше по сравнению с контролем (рис. 4). Продукция ИНФ- $\gamma$  лимфоцитами при стимуляции лизатом опухоли в концентрации 10 и 25 мкг/мл значительно превышала таковую в культурах нестимулированных клеток, а также клеток, стимулированных данным лизатом в концентрации 2,5 мкг/мл ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, наибольшее число ИНФ- $\gamma$ + Т-лимфоцитов выявлено после стимуляции лизатом опухоли в концентрации 25 мкг/мл. Учитывая полученные данные, для дальнейших исследований по праймированию ДК было решено использовать лизат опухоли в указанной концентрации.

**Влияние дендритных клеток, праймированных антигенами опухоли, на пролиферацию и активацию аутологичных Т-лимфоцитов.** Для выявления клонов пролиферирующих клеток использовали CFSE. Это вещество свободно проникает через мембраны клеток и необратимо связывается с внутриклеточными белками и клеточной стенкой. В процессе деления клетки про-



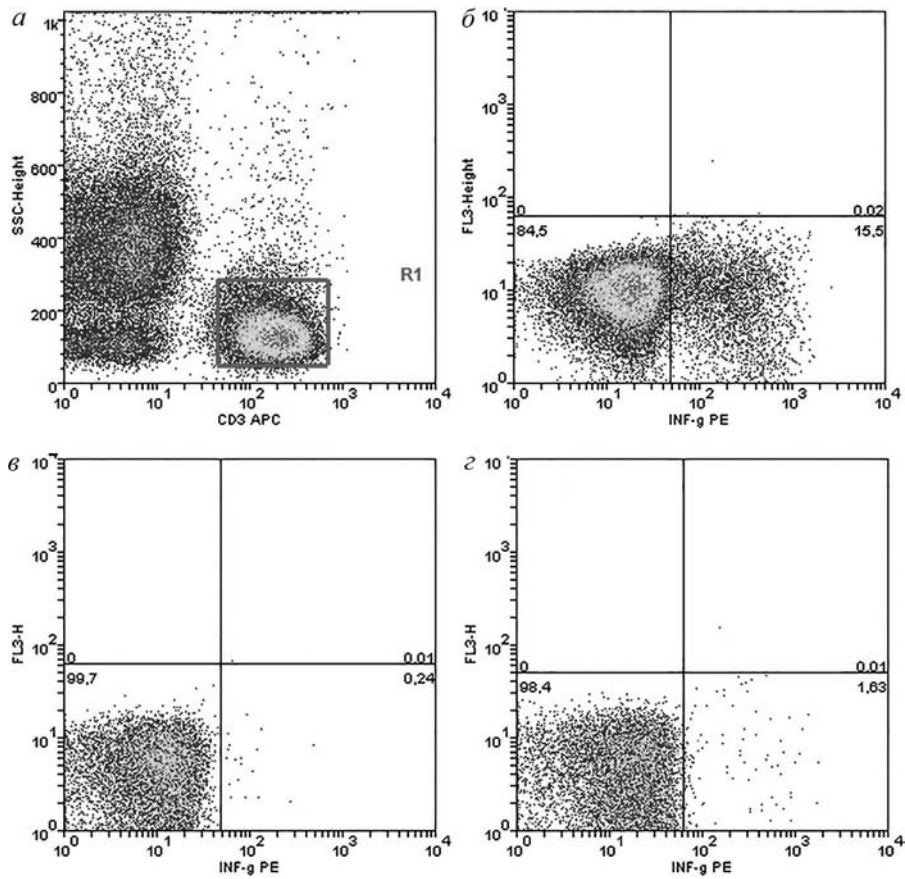


Рис. 3. Результаты исследования иммуногенности лизатов опухоли: *а* – цитограмма флуоресценции в координатах APC/SSC, выделен регион CD3+ Т-лимфоцитов; *б* – внутриклеточное содержание ИНФ- $\gamma$  в Т-лимфоцитах, стимуляция ФМА и иономицином в присутствии монензина; *в* – внутриклеточное содержание ИНФ- $\gamma$  в Т-лимфоцитах, спонтанная продукция в присутствии монензина; *г* – внутриклеточное содержание ИНФ- $\gamma$  в Т-лимфоцитах, стимуляция лизатом опухоли в концентрации 10 мкг/мл в присутствии монензина

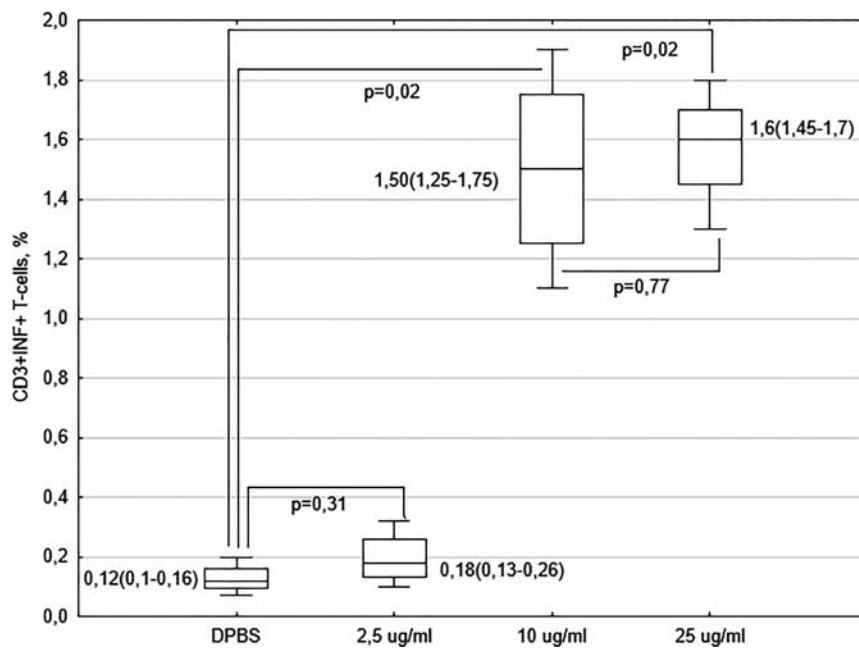


Рис. 4. Влияние лизата опухоли на активацию Т-лимфоцитов ( $n = 4$ )

исходит равномерное распределение CFSE между клетками с двукратным уменьшением уровня флуоресценции.

На проточном цитофлуориметре учитывали жизнеспособные 7-AAD<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup> Т-клетки и на канале FL1 анализировали интенсивность флуоресценции, вызванную свечением CFSE в родительской и дочерних популяциях.

Результаты исследования свидетельствуют о наличии выраженного эффекта ДК на пролиферацию аутологичных Т-лимфоцитов. В отсутствие ДК доля пролиферирующих лимфоцитов составила 1,0 (0,4–1,1) % (рис. 5).

Поликлональный митоген ФГА вызывал формирование клонов дочерних клеток, доля которых после 72 ч культивирования составила более 60 %.

В присутствии непраймированных ДК лимфоциты образовывали дочерние популяции клеток, доля которых составила 3,2 (1,4–5,8) %. Добавление в культуры лимфоцитов ДК, праймированных лизатом опухоли, привело к достоверному увеличению числа дочерних популяций клеток. Наибольшее количество дочерних клеток было выявлено при культивировании ДК с лимфоцитами в соотношении 1:10 (14,3 (9,6–16,6) %), наименьшее – при их соотношении 1:40 (5,6 (2,3–6,0) %).

Установлено, что в смешанной культуре клеток, состоящей из лимфоцитов и ДК в соотношении 20:1 и 10:1, достоверно больше Т-клеток, экспрессирующих маркер активации CD25 (табл. 2). Достоверных различий в экспрессии молекул CD69 (H = 3,9; p = 0,27) и HLA-DR (H = 7,8; p = 0,1) между исследованными образцами CD4<sup>+</sup> лимфоцитов не выявлено (тест Краскела–Уоллиса).

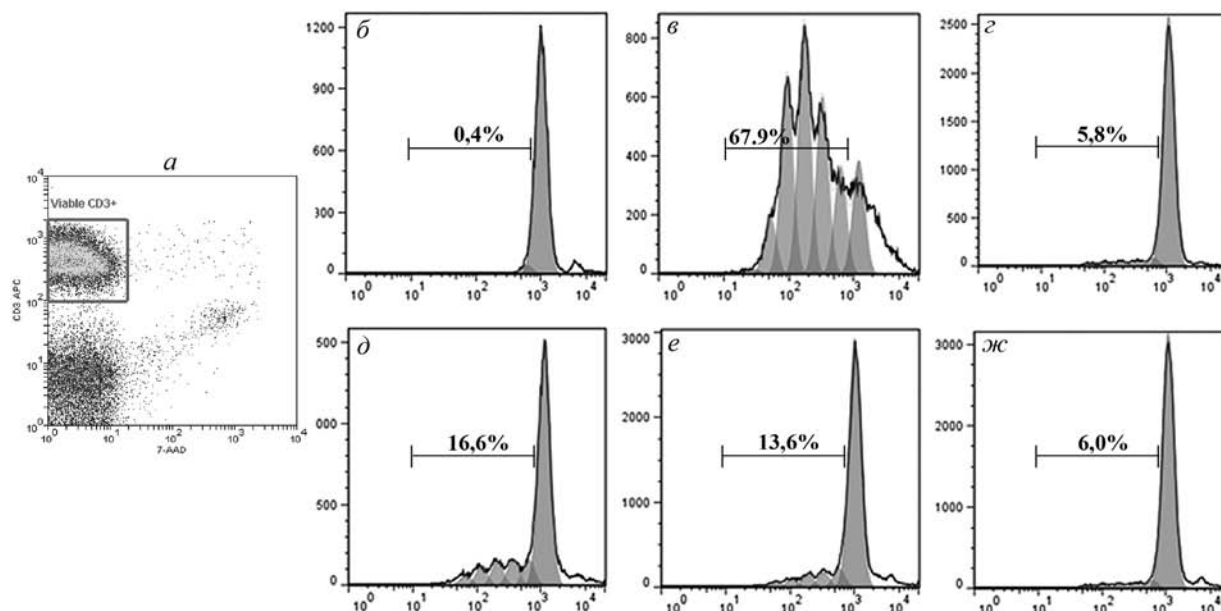


Рис. 5. Влияние ДК на пролиферацию аутологичных CD3<sup>+</sup>Т-лимфоцитов: а – цитограмма флуоресценции в координатах APC/SSC, выделен регион CD3<sup>+</sup> Т-лимфоцитов; б – отрицательный контроль (лимфоциты без ДК) – 0,4 %; в – положительный контроль (ФГА) – 67,9 %; з – непраймированные ДК и лимфоциты 1:10 – 5,8 %; д – ДК и лимфоциты в соотношении 1:10 – 16,6 %; е – ДК и лимфоциты в соотношении 1:20 – 13,6 %; ж – ДК и лимфоциты в соотношении 1:40 – 6,0 %

Т а б л и ц а 2. Влияние ДК на активацию аутологичных CD3<sup>+</sup> Т-лимфоцитов

Молекула активации	Условия культивирования			
	Лимфоциты	Лимфоциты и ДК		
		40:1	20:1	10:1
CD25	21,0(18,0–23,0)	22,0(21,7–22,6)	26,4(23,3–27,6)*	28,2(24,7–30,1)*
CD69	1,0(0,4–2,2)	1,1(0,6–1,8)	1,7(1,2–1,9)	2,5(1,6–2,7)
HLA-DR	1,0(0,9–2,3)	1,8(1,6–2,2)	2,0(1,7–2,4)	1,8(1,4–2,6)

П р и м е ч а н и е. \* – достоверность различий (p < 0,05) по сравнению с отрицательным контролем (лимфоциты).

Таким образом, результаты исследования показывают, что для праймирования ДК пациентов с РПЖ может быть использован лизат опухоли.

**Заключение.** В ходе исследования показана возможность получения дендритных клеток из моноцитов периферической крови пациентов, страдающих раком поджелудочной железы. Полученные дендритные клетки характеризовались высокой жизнеспособностью и низкими показателями апоптоза, зрелым иммунофенотипом (CD1a<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>CD80<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>CD83<sup>+</sup>CD208<sup>+</sup>), типичной морфологией, хорошим ответом на действие индукторов созревания.

Результаты проведенного нами исследования показали, что ДК, праймированные лизатами опухолей поджелудочной железы, способны стимулировать пролиферацию и активацию *in vitro* антигенспецифических Т-клеток, что указывает на потенциальную эффективность их применения для терапии рака поджелудочной железы.

## Литература

1. Статистика онкологических заболеваний в Республике Беларусь (2002–2011): аналит. обзор / Респ. науч.-практ. центр онкологии и мед. радиологии им. Н. Н. Александрова; Белорус. канцер-регистр; под ред. О. Г. Суконко. Минск, 2012. – 333 с.
2. Манзюк Л. В. // Рус. мед. журн. [Электронный ресурс]. 2002. № 24. – Режим доступа: [http://www.rmj.ru/articles\\_1146.htm](http://www.rmj.ru/articles_1146.htm). – Дата доступа: 20.11.2013.
3. Щенотин И. Б. и др. // Клини. онкология. 2011. Т. 4, № 4. С. 18–25.
4. Palucka K., Banchereau J. // Nat. Rev. Cancer. 2012. Vol. 12. P. 265–277.
5. Palucka K., Banchereau J. // Immunity. 2013. Vol. 39, N 1. P. 38–48.
6. Steinman R. M. // Ann. Rev. Immunol. 2012. Vol. 30. P. 1–22.
7. Mantia-Smaldone G. M., Chu C. S. // BioDrugs. 2013. Vol. 27, N 5. P. 453–468.
8. FDA Approves a Cellular Immunotherapy for Men with Advanced Prostate Cancer // FDA news release [Электронный ресурс]. 2010. – Режим доступа: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm210174.htm> – Дата доступа: 19.11.2013.
9. Morse M. A. et al. // Int. J. Gastrointest. Cancer. 2002. Vol. 32, N 1. P. 1–6.
10. Kondo H. et al. // Anticancer Res. 2008. Vol. 28. P. 379–388.
11. Lepisto A. J. et al. // Cancer Ther. 2008. Vol. 6, N B. P. 955–964.
12. Hirooka Y. et al. // Pancreas. 2009. Vol. 38. P. e69–e74.
13. Irisawa A. et al. // Pancreas. 2007. Vol. 35, N 2. P. 189–190.
14. Endo H. et al. // J. Hepatobil. Pancreat. Sci. 2012. Vol. 19. P. 465–475.
15. AIM-V Serum Free Medium [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.lifetechnologies.com/by/en/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-culture/specialty-media/t-cell-media/aim-v-medium.html>. – Дата доступа: 20.11.2013.
16. Реброва О. Ю. // Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica. М., 2008. – 312 с.
17. Genser B. et al. // BMC Immunol. [Электронный ресурс]. 2007. Vol. 8, N 27. – Режим доступа: <http://www.biomedcentral.com/1471-2172/8/27>. – Дата доступа: 12.03.2012
18. Serum-Free Medium for Expansion of Hematopoietic Cells [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.stemcell.com/en/Products/All-Products/StemSpan-SFEM.aspx>. – Дата доступа: 19.11.2013.
19. Гончаров А. Е. и др. // Докл. НАН Беларуси. 2012. Т. 56, № 4. С. 94–102.
20. Гончаров А. Е., Титов Л. П., Жмуровская Л. С. // Здоровоохранение. 2007. № 11. С. 28–32.
21. Гончаров А. Е., Титов Л. П. // Докл. НАН Беларуси. 2008. Т. 52, № 1. С. 92–96.
22. Гончаров А. Е., Титов Л. П., Жмуровская Л. С. // Весці НАН Беларусі. Сер. мед. навук. 2009. № 4. С. 32–38.
23. Титов Л. П., Гончаров А. Е., Путырский Л. А. и др. // Здоровоохранение. 2010. Т. 10. С. 52–55.
24. Van Engeland M. et al. // Cytometry. 1998. Vol. 31, N 1. P. 9.

A. Y. HANCHAROU, I. U. RAMANA, I. V. ZALUTSKY, A. V. PROKHOROV, V. I. PAPOK

### GENERATION OF DENDRITIC CELLS CULTURED FOR IMMUNOTHERAPY OF PANCREATIC CANCER PATIENTS

#### Summary

The method of generation of dendritic cells from monocytes was adapted to clinical practice for immunotherapy of pancreatic cancer patients. The cultures of dendritic cells had typical immunophenotype, morphology, and functional properties. Pancreatic cancer cell lysates were used to prime dendritic cells. The method of priming dendritic cells by these antigens was adapted to clinical practice. It was established that primed DCs induced the activation and proliferation of antigen-specific clones of T-lymphocytes *in vitro*. The criteria of biosafety, quality control, and standardization of dendritic cell cultures, which include cell counts, the study of their morphology, immunophenotype and viability analysis, control microbial contamination, were determined.