

ЗАВИСИМОСТЬ ФЕНОТИПА ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ОТ СОДЕРЖАНИЯ ПРОВосПАЛИТЕЛЬНЫХ МОНОЦИТОВ КРОВИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ПОЧКИ

Савченко А.А.¹, Борисов А.Г.¹, Кудрявцев И.В.^{2,3}, Мошев А.В.¹

¹ ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“, обособленное подразделение «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

² ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Целью исследования явилось изучение зависимости фенотипа дендритных клеток (ДК), дифференцированных из моноцитов, от количества провоспалительных моноцитов в крови у больных раком почки (РП). Обследовано 28 больных РП (T3N0M0, светлоклеточный тип) в возрасте 40-55 лет до хирургического лечения. Диагноз верифицирован гистологически. В качестве контрольной группы проведено обследование 31 практически здоровых людей аналогичного возрастного диапазона. Мононуклеарные клетки выделяли из гепаринизированной венозной крови центрифугированием в градиенте плотности Histopaque®-1077 с последующей адсорбцией на пластике в среде RPMI-1640 в присутствии 10% аутологичной сыворотки. Незрелые ДК (нДК) генерировали из моноцитов крови путем культивирования в течение 5 суток с GM-CSF и IFN α . Активацию ДК (аДК) индуцировали внесением в среду инкубации лизата опухолевых клеток и TNF α с последующей инкубацией в течение 48 часов. Для приготовления лизата аутологичных опухолевых клеток использовали фрагмент опухоли. Фенотипирование моноцитов крови и ДК различной степени зрелости проводили методом проточной цитометрии. У больных РП в периферической крови снижается количество CD14⁺CD16⁺ моноцитов (до 42% от уровня общих моноцитов) относительно контрольного диапазона. В связи с этим анализ зависимости фенотипа ДК, дифференцированных из моноцитов, от количества провоспалительных моноцитов в крови был проведен путем сравнения показателей с высоким содержанием провоспалительных моноцитов в крови у больных РП (> 42%, приближается к уровню контрольного диапазона) и низким (< 42%). Установлено, что у больных РП с низким количеством в крови провоспалительных моноцитов (< 42%) повышается содержание толерогенных нДК в клеточной культуре. Особенностью фенотипа нДК у пациентов с высоким содержанием провоспалительных моноцитов в крови (> 42%) является относительное увеличение экспрессии молекул, осуществляющих антиген-презентацию и костимуляцию. При созревании/активации фенотип дендритных клеток у больных РП с различным содержанием провоспалительных моноцитов различается сильнее. У больных с низким уровнем провоспалительных моноцитов в крови в клеточной культуре формируется пул зрелых ДК с низким уровнем экспрессии CD86- и HLA-DR-рецепторов, что, соответственно, характеризу-

Адрес для переписки:

Кудрявцев Игорь Владимирович
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197376, Россия, Санкт-Петербург,
ул. Акад. Павлова, 12.
Тел.: 8 (812) 234-16-69.
E-mail: igorek1981@yandex.ru

Address for correspondence:

Kudryavtsev Igor V.
Institute of Experimental Medicine
197376, Russian Federation, St. Petersburg,
Acad. Pavlov str., 12.
Phone: 7 (812) 234-16-69.
E-mail: igorek1981@yandex.ru

Образец цитирования:

А.А. Савченко, А.Г. Борисов, И.В. Кудрявцев, А.В. Мошев «Зависимость фенотипа дендритных клеток от содержания провоспалительных моноцитов крови у больных раком почки» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 4. С. 689-702.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-689-702

© Павлова А.А. и соавт., 2019

For citation:

A.A. Savchenko, A.G. Borisov, I.V. Kudryavtsev, A.V. Moshev "Interdependence between the phenotype of dendritic cells and amounts of blood proinflammatory monocytes in patients with kidney cancer", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 4, pp. 689-702.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-689-702

DOI: 10.15789/1563-0625-2019-4-689-702

ет слабую костимулирующую и антигенпрезентирующую активность. У больных с высоким уровнем провоспалительных моноцитов в клеточной культуре формируется пул активированных ДК с высоким уровнем функциональной активности. Выявленные различия фенотипа ДК от субпопуляционного состава моноцитов крови у больных РП характеризуют механизмы программирования клеточной дифференцировки в зависимости от микроокружения, в том числе и патогенного характера (на фоне опухолевого роста).

Ключевые слова: дендритные клетки, моноциты, рак почки, фенотип, костимулирующие молекулы, презентация антигена

INTERDEPENDENCE BETWEEN THE PHENOTYPE OF DENDRITIC CELLS AND AMOUNTS OF BLOOD PROINFLAMMATORY MONOCYTES IN PATIENTS WITH KIDNEY CANCER

Savchenko A.A.^a, Borisov A.G.^a, Kudryavtsev I.V.^{b,c}, Moshev A.V.^a

^a Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Science Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

^b Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

^c First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. The aim of the study was to investigate an interdependence between the phenotype of dendritic cells (DC) differentiated from monocytes and the number of pro-inflammatory monocytes in peripheral blood of patients with kidney cancer (KC). The study involved 28 patients at the age of 40-55 years suffering with KC (T3N0M0, clear cell type) before surgical treatment. The diagnosis was verified histologically. 31 healthy age-matched persons were examined as a control group. Mononuclear cells were isolated from heparinized venous blood by centrifugation in a Histopaque®-1077 density gradient followed by plastic adsorption in RPMI 1640 medium supplied with 10% autologous serum. Immature DCs (iDCs) were generated from blood monocytes by culturing for 5 days with GM-CSF and IFN α . Activation of DCs (mDCs) was induced by incubation with the tumor cell lysate and TNF α , followed by incubation for 48 hours. A tumor fragment was used to prepare the lysate of autologous tumor cells. Phenotyping of blood monocytes and DC at various maturation stages was performed by flow cytometry. The numbers of CD14⁺CD16⁺ monocytes in peripheral blood of KC patients were decreased (up to 42% of the total monocyte level) against the control ranges. In this regard, the analysis of the dependence between the phenotype of DCs differentiated from monocytes and the number of pro-inflammatory blood monocytes was carried out by comparing the groups with a high content of pro-inflammatory monocytes in the blood in KC patients (> 42%, near-control range) and low content (resp., < 42%). We have found that the contents of tolerogenic iDC in cell culture are increased in KC patients with low amounts of pro-inflammatory monocytes in blood (< 42%). A relatively increased expression of antigen-presenting and co-stimulatory molecules proved to be the specific feature of iDC phenotype in patients with high contents (> 42%) of pro-inflammatory monocytes in blood. The phenotype of dendritic cells in KC patients with different content of proinflammatory monocytes during maturation/activation showed more differences. In the patients with low levels of pro-inflammatory monocytes, the cell pool of *in vitro* maturing DCs was characterized by low level of CD86 and HLA-DR receptor expression, thus reflecting a weak co-stimulating and antigen-presenting activity. In the patients with high levels of pro-inflammatory monocytes in blood, the *in vitro* activated DCs showed higher level of functional activity using the above markers. The revealed differences in the DC phenotype and interrelations with amounts of blood monocyte subpopulations in KC patients may presume the programmed cell differentiation mechanisms depending on the microenvironment, under pathogenic conditions (i.e., in presence of malignant tumor growth).

Keywords: dendritic cells, monocytes, kidney cancer, phenotype, costimulatory molecules, antigen presentation

Введение

Дендритные клетки (ДК) являются профессиональными антигенпрезентирующими клетками, которые инициируют и регулируют Т-клеточный иммунный ответ, а также отвечают за развитие иммунной толерантности [11, 21, 23]. Данные механизмы реализуются за счет экспрессии антигенов главного комплекса гистосовместимости I и II класса (МНС I и МНС II), комплекса костимуляторных молекул (в первую очередь антигенов CD80 и CD86), а также синтеза и секреции цитокинов и хемокинов. Установленные механизмы функциональной активности ДК определили развитие технологий получения дендритноклеточных вакцин на основе дифференцировки моноцитов крови в ДК в условиях *in vitro*. В настоящее время вакцины на основе ДК используются при лечении широкого спектра онкологических и инфекционных заболеваний. Так, в работе Wang и соавт. (2017) представлены результаты применения дендритноклеточной вакцины при лечении рака пищевода. Установлено, что активированные ДК индуцировали специфический противоопухолевый иммунитет и стимулировали секрецию Th1-цитокинов [29]. Получены положительные результаты применения вакцины на основе ДК при лечении рецидивирующей герпетической инфекции [2]. В исследовании Hsu и соавт. (2018) показана эффективность применения вакцины на основе ДК в достижении длительной ремиссии при остром миелоидном лейкозе [14]. При использовании дендритноклеточной вакцины в сочетании с химиотерапией также выявлена эффективность при лечении рака поджелудочной железы [31].

Однако функциональная активность ДК в противоопухолевых вакцинах не всегда оказывается на высоком уровне. Одной из причин данной проблемы определяется отсутствие единых стандартов получения и способов активации ДК в условиях *in vitro*. Доказано, что применение различных комплексов цитокинов при индукции дифференцировки моноцитов в ДК, сроки инкубации и способы антигенной нагрузки приводят к созреванию ДК с разным уровнем функциональной активности [3]. У больных злокачественными глиомами головного мозга ДК характеризуются нарушением экспрессии мембранной формы TNF α , что приводит к снижению их функциональной активности [6]. С другой стороны, сама опухоль также вызывает подавление специфического противоопухолевого иммунитета. Установлено, что ряд синтезируемых опухолью гуморальных факторов способен нарушать дифференцировку, созревание и функциональную активность ДК. Исследованием Ning и соавт. (2018) доказано, что экзосомы из карциномы

легкого LLC Lewis, а также клетки рака молочной железы 4T1 ингибировали созревание и миграцию ДК [20]. Vai и соавт. (2018) отмечали, что у больных раком предстательной железы часто выявляются дефекты функциональной активности ДК. Ингибирование созревания и активности ДК осуществляется опухолью за счет синтеза фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), причем по мере увеличения объема опухоли повышается концентрация VEGF, что, в свою очередь, стимулирует подавление активности ДК [7].

Функциональная активность ДК также зависит от исходного состояния моноцитов крови, функциональная активность которых может нарушаться при канцерогенезе. В исследовании Song и соавт. (2016) выявлено, что мембраны экзосом опухолевых клеток покрыты фосфорилированным эпидермальным рецептором фактора роста (EGFR) и рецептором 2 эпидермального фактора роста человека (HER-2), которые повышают выживаемость моноцитов (за счет ингибирования апоптоза) и стимулируют преимущественную их дифференцировку в связанные с опухолью макрофаги (tumor-associated macrophages, TAM), способные стимулировать рост опухоли [24]. ДК, дифференцированные из моноцитов крови больных раком почки (РП), характеризовались сниженной костимуляторной и антигенпрезентирующей активностью за счет пониженного уровня экспрессии CD83 и CD86 [4]. У больных РП в крови нарушается соотношение моноцитарных субпопуляций, наблюдается дисбаланс экспрессии активационных молекул и снижается активность респираторного взрыва моноцитов [5]. Более того, в ряде работ повышение уровня провоспалительных моноцитов (CD14⁺CD16⁺) в циркуляции связывают с увеличением содержания TAM и усилением роста опухоли [16, 30].

Таким образом, целью исследования явилось изучение зависимости фенотипа ДК, дифференцированных из моноцитов в условиях *in vitro*, и количества провоспалительных моноцитов в крови у больных РП.

Материалы и методы

На базе КГБУЗ «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер имени А.И. Крыжановского» обследованы больные РП (Т3N0M0, светлоклеточный тип) в возрасте 40-55 лет до хирургического лечения (n = 28). Диагноз верифицирован гистологически. В качестве контрольной группы было проведено обследование 31 практически здорового человека аналогичного возрастного диапазона.

Мононуклеарные клетки выделяли из гепаринизированной венозной крови центрифугиро-

ванием в градиенте плотности Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich, США) ($\rho = 1,077$). Моноциты выделяли на чашках Петри (ЗАО «Олданс», Россия) путем прилипания к пластику в среде RPMI-1640 в присутствии 10% аутологичной сыворотки. Дифференцировка моноцитов в незрелые ДК (нДК) осуществлялась в течение 5 суток при 37 °С в CO₂-инкубаторе (Sanyo, Япония) во флаконах для культивирования (Greiner Bio One, Германия), в среде RPMI-1640, содержащей 10% аутологичной сыворотки и 100 мкг/мл гентамицина, в присутствии GM-CSF (50 нг/мл, Sigma-Aldrich, США) и IFN α (100 Ед/мл, Sigma-Aldrich, США). Активацию (созревание) ДК (аДК) индуцировали внесением в среду инкубации лизата опухолевых клеток (100 мкг/мл) и TNF α (25 нг/мл, Sigma-Aldrich, США) с последующей инкубацией в течение 48 часов.

Для приготовления лизата опухолевых клеток использовали фрагмент опухоли (1 см³), который механически гомогенизировали в забуференном физиологическом растворе и трижды центрифугировали при +4 °С и 400 g в течение 2 минут (Eppendorf Centrifuge 5804R, Германия) для удаления конгломератов ткани. Супернатант замораживался при температуре -80 °С без криопротекторов и проводился через 3 цикла быстрого замораживания—оттаивания. Полученный гомогенат центрифугировали при 2000 g 15 минут. В супернатанте по методу Брэдфорда измеряли концентрацию белка и замораживали для дальнейшего использования при -80 °С. В культуральную среду для активации ДК у больных РП вносился аутологичный лизат опухолевых клеток, у лиц контрольной группы — сливной лизат опухолевых клеток.

Исследование фенотипа моноцитов крови проводили методом проточной цитометрии с использованием прямой иммунофлуоресценции цельной периферической крови с использованием моноклональных антител (Beckman Coulter, США), меченных FITC (fluorescein isothiocyanate), PE или RD1 (phycoerythrin), ECD (phycoerythrin-Texas Red-X), PC5 (phycoerythrin-cyanin 5) и PC7 (phycoerythrin-cyanin 7) в следующей панели: HLA-DR-FITC/CD14-PE/CD45-ECD/CD64-PC5/CD16-PC7. Фенотипирование ДК различной степени зрелости также проводили методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител (Beckman Coulter, США) в следующей панели: CD80-FITC/CD86-PE/HLA-DR-ECD/CD83-PC5/CD14-PC7. Распределение антител по каналам флуоресценции проводили в соответствии с принципами формирования панелей для многоцветных цитофлуориметрических исследований [1]. Пробоподготовку осуществляли по стандартной методике [12]. Анализ окрашенных клеток проводили на проточ-

ном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, США) Центра коллективного пользования КНЦ СО РАН [28]. В каждой пробе анализировали не менее 50 000 моноцитов или ДК. Определяли ДК с фенотипом CD14-CD83⁺, дальнейшее «гейтирование» и подсчет клеток проходил относительно данного фенотипа. По средней интенсивности флуоресценции (MFI — Mean Fluorescence Intensity) оценивались уровни экспрессии поверхностных рецепторов.

Все исследования выполнены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266.

Описание выборки производили с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 1 и 3 квартилей (Q_{0,25}-Q_{0,75}). Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна—Уитни (Mann—Whitney U test). Достоверность различий показателей в связанных выборках определяли по критерию Вилкоксона (Wilcoxon matched pairs test). Статистический анализ осуществляли в пакете прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007).

Результаты

При обследовании больных РП обнаружено, что относительное количество CD14⁺CD16⁺ моноцитов в крови у них составляет 41,2% (29,3; 54,8), что явилось значительно ниже ($p < 0,001$), чем у лиц контрольной группы — 73,7% (62,3; 81,3). Исходя из данных результатов, все больные были разделены на две группы по медиане количества CD14⁺CD16⁺ моноцитов. Установлено, что у больных РП с высоким процентным содержанием CD14⁺CD16⁺ моноцитов (> 41,2%) наблюдается пониженное количество CD14⁺CD16⁻ моноцитов (24,4% (16,9; 38,1)) в сравнении с пациентами с низким уровнем (< 41,2%) CD14⁺CD16⁺ моноцитов (68,0% (51,3; 75,0), $p < 0,001$). В обеих сформированных группах больных относительное количество CD14⁺CD16⁺ моноцитов было значительно ниже, чем у лиц контрольной группы: $p = 0,044$ — при высоком процентном уровне CD14⁺CD16⁺ клеток, $p < 0,001$ — при низком содержании. Различий по процентному количеству CD14^{dim}CD16⁺ моноцитов между данными группами больных РП не обнаружено. Не выявлено различий между группами больных по процентному содержанию HLA-DR⁺ и CD64⁺ клеток.

Как отмечалось ранее, экспрессия антигена CD80 на дендритных клетках у обследованных лиц распределяется на 2 пика [3]. В связи с этим при исследовании особенности фенотипа дендритных клеток от количества CD14⁺CD16⁺ моноцитов в крови было проведено с выделением дендритных клеток с низкой (CD83⁺CD80^{low}) и высокой (CD83⁺CD80^{high}) экспрессией CD80. При исследовании фенотипа нДК обнаружено, что независимо от количества CD14⁺CD16⁺ моноцитов в крови у больных РП относительно контрольных показателей снижается относительное количество клеток, экспрессирующих CD80^{low}, и повышается доля клеток с экспрессией CD80^{high} (табл. 1). Единственным показателем,

различающимся в зависимости от содержания провоспалительных моноцитов, является уровень CD83⁺CD80^{high}HLA-DR⁺: при низком количестве CD14⁺CD16⁺ моноцитов содержание нДК с данным фенотипом снижается.

Уровни экспрессии исследуемых антигенов (по MFI) на поверхности CD83⁺ и CD80^{low} нДК не зависят от количества CD14⁺CD16⁺ моноцитов в крови у больных РП, но отличаются от контрольных значений (табл. 2). В то же время экспрессия ряда маркеров на CD80^{high} и CD80^{high}CD86^{high} нДК у пациентов с РП значительно различается в зависимости от содержания провоспалительных моноцитов (табл. 3).

ТАБЛИЦА 1. ФЕНОТИП НЕЗРЕЛЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК (В %), ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ *IN VITRO* ИЗ МОНОЦИТОВ КРОВИ, У БОЛЬНЫХ РП С РАЗЛИЧНЫМ КОЛИЧЕСТВОМ CD14⁺CD16⁺ МОНОЦИТОВ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. PHENOTYPE OF IMMATURE DENDRITIC CELLS (IN %) DIFFERENTIATED *IN VITRO* FROM BLOOD MONOCYTES IN PATIENTS WITH KC WITH DIFFERENT AMOUNTS OF CD14⁺CD16⁺ MONOCYTES, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Parameters	Контроль Control n = 31	Больные РП Patients with KC	
		CD14 ⁺ CD16 ⁺ > 41,2% n = 14	CD14 ⁺ CD16 ⁺ < 41,2% n = 14
CD83 ⁺ CD80 ⁺	95,3 (93,8-98,2)	95,9 (91,7-98,1)	97,5 (94,8-99,3)
CD83 ⁺ CD80 ^{low}	73,2 (62,2-76,7)	27,5 (18,6-57,2) p ₁ < 0,001	19,0 (7,3-42,0) p ₁ < 0,001
CD83 ⁺ CD80 ^{high}	20,0 (13,1-22,1)	47,2 (27,3-55,2) p ₁ = 0,009	52,2 (45,7-63,4) p ₁ < 0,001
CD83 ⁺ CD86 ⁺	99,6 (98,5-99,9)	100,0 (99,9-100,0) p ₁ < 0,001	100,0 (99,9-100,0) p ₁ < 0,001
CD83 ⁺ CD80 ^{high} CD86 ^{high}	6,8 (5,8-10,1)	20,9 (12,1-27,9) p ₁ < 0,001	17,6 (17,1-27,4) p ₁ < 0,001
CD83 ⁺ HLA-DR ⁺	99,5 (99,4-99,9)	99,8 (98,1-99,9)	99,9 (99,6-100,0)
CD83 ⁺ CD80 ^{low} HLA-DR ⁺	72,9 (61,8-76,7)	27,5 (18,6-57,2) p ₁ < 0,001	19,0 (7,3-42,0) p ₁ < 0,001
CD83 ⁺ CD80 ^{high} HLA-DR ⁺	17,1 (13,1-22,1)	46,4 (27,2-53,4) p ₁ < 0,001	52,1 (45,6-60,2) p ₁ < 0,001 p ₂ = 0,032
CD83 ⁺ CD80 ^{high} CD86 ^{high} HLA-DR ⁺	6,8 (5,8-10,1)	20,9 (12,1-27,9) p ₁ < 0,001	17,6 (17,1-27,4) p ₁ < 0,001
CD83 ⁺ CD80 ^{low} CD86 ⁺	73,0 (62,2-76,2)	27,5 (18,6-57,2) p ₁ < 0,001	19,0 (7,3-42,0) p ₁ < 0,001
CD83 ⁺ CD80 ^{high} CD86 ⁺	20,0 (13,1-22,1)	47,2 (27,3-55,2) p ₁ = 0,010	52,2 (45,7-63,4) p ₁ = 0,005

Примечание. p₁ – статистически значимые различия с показателями контрольной группы; p₂ – статистически значимые различия между группами больных с высоким (> 42%, приближается к уровню контрольного диапазона) и низким (< 42%) содержанием провоспалительных моноцитов в периферической крови.

Note. p₁, statistically significant differences versus controls; p₂, statistically significant differences between two groups of KC patients with high (> 42%, approaching the control range) and low (< 42%) content of pro-inflammatory monocytes in peripheral blood.

ТАБЛИЦА 2. УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ АНТИГЕНОВ НА НЕЗРЕЛЫХ CD83⁺ И CD80^{low} ДК (в о. е.), ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ *IN VITRO* ИЗ МОНОЦИТОВ КРОВИ, В ЗАВИСИМОСТИ ОТ КОЛИЧЕСТВА CD14⁺CD16⁺ МОНОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ РП, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. EXPRESSION LEVELS OF ANTIGENS ON IMMATURE CD83⁺ AND CD80^{low} DC (in r.u.) DIFFERENTIATED *IN VITRO* FROM BLOOD MONOCYTES IN DEPENDING ON THE AMOUNT OF CD14⁺CD16⁺ MONOCYTES IN PATIENTS WITH KC, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Parameters	Контроль Control n = 31	Больные РП Patients with KC	
		CD14 ⁺ CD16 ⁺ > 41,2% n = 14	CD14 ⁺ CD16 ⁺ < 41,2% n = 14
на CD83⁺ клетках on CD83 ⁺ cells			
CD80	4,26 (2,22-4,56)	5,39 (4,75-8,28) p ₁ = 0,003	5,99 (5,39-6,59) p ₁ = 0,017
CD83	8,64 (6,94-10,60)	10,32 (8,56-10,90)	8,76 (7,05-10,70)
CD86	17,90 (15,80-19,90)	17,00 (16,35-33,10)	15,30 (12,00-17,50)
HLA-DR	21,00 (14,20-22,40)	33,10 (27,15-38,30) p ₁ < 0,001	26,50 (19,30-29,20) p ₁ = 0,045
на CD80^{low} клетках on CD80 ^{low} cells			
CD80	1,54 (1,20-2,23)	1,90 (1,85-2,16) p ₁ = 0,002	1,94 (1,90-1,96) p ₁ = 0,004
CD83	5,71 (4,65-9,21)	8,82 (7,70-11,00)	7,18 (6,99-8,37)
CD86	6,58 (3,75-9,96)	9,61 (7,04-11,60) p ₁ = 0,044	6,70 (6,01-7,73) p ₂ = 0,037
HLA-DR	13,30 (7,68-15,50)	27,85 (20,45-35,90) p ₁ = 0,008	23,70 (20,50-26,80) p ₁ = 0,017

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table. 1.

В зависимости от содержания в крови больных РП CD14⁺CD16⁺ моноцитов значительно различается фенотип аДК в культуре клеток (табл. 4). Причем при различном уровне провоспалительных моноцитов в крови пациентов с РП содержание аДК с фенотипами CD83⁺CD80^{low}, CD83⁺CD80^{high} и CD83⁺CD80^{low}HLA-DR⁺ в культуре клеток изменяется в противоположном направлении относительно контрольных значений. При этом обнаружено, что уровни экспрессии большинства исследуемых рецепторов на мембране аДК у больных с низким содержанием CD14⁺CD16⁺ моноцитов в крови снижены относительно показателей контрольных значений и уровней, выявленных у пациентов с высоким количеством провоспалительных моноцитов (табл. 5 и 6).

В процессе созревания аДК *in vitro* у лиц контрольной группы снижается процентное содер-

жание CD83⁺CD80^{low} клеток (p = 0,043) и повышается количество CD83⁺CD80^{high} клеток (p = 0,046) (см. табл. 1 и 4). Кроме того, у лиц контрольной группы в культуре аДК понижается относительное количество CD83⁺CD80^{low}HLA-DR⁺ (p = 0,017), CD83⁺CD80^{high}HLA-DR⁺ (p = 0,009) и CD83⁺CD80^{low}CD86⁺ клеток (p = 0,010), но при повышении уровня CD83⁺CD80^{high}CD86⁺ клеток (p = 0,039). У больных РП с высоким уровнем в крови CD14⁺CD16⁺ моноцитов при созревании аДК в культуре увеличивается относительное содержание CD83⁺CD80^{low} (p = 0,042), CD83⁺CD80^{low}HLA-DR⁺ (p = 0,044) и CD83⁺CD80^{low}CD86⁺ клеток (p = 0,046), но при понижении уровней CD83⁺CD80^{high}CD86^{high} (p = 0,013) и CD83⁺CD80^{high}CD86^{high}HLA-DR⁺ клеток (p = 0,012). У обследованных пациентов с низким количеством в крови CD14⁺CD16⁺ моноцитов в культуре аДК увеличивается процентное содер-

ТАБЛИЦА 3. УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ АНТИГЕНОВ НА НЕЗРЕЛЫХ CD80^{high} И CD80^{high}CD86^{high} ДК (в о. е.), ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ *IN VITRO* ИЗ МОНОЦИТОВ КРОВИ, В ЗАВИСИМОСТИ ОТ КОЛИЧЕСТВА CD14⁺CD16⁺ МОНОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ РП, Ме (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 3. EXPRESSION LEVELS OF ANTIGENS ON IMMATURE CD80^{high} AND CD80^{high}CD86^{high} DC (in r. u.) DIFFERENTIATED *IN VITRO* FROM BLOOD MONOCYTES IN DEPENDING ON THE AMOUNT OF CD14⁺CD16⁺ MONOCYTES IN PATIENTS WITH KC, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Parameters	Контроль Control n = 31	Больные РП Patients with KC	
		CD14 ⁺ CD16 ⁺ > 41,2% n = 14	CD14 ⁺ CD16 ⁺ < 41,2% n = 14
на CD80^{high} клетках on CD80 ^{high} cells			
CD80	4,75 (3,80-6,60)	7,06 (5,78-8,74) p ₁ = 0,003	6,18 (5,18-7,75) p ₁ = 0,028
CD83	6,44 (5,01-10,30)	7,62 (6,17-10,06)	7,23 (6,47-8,15)
CD86	6,04 (4,78-7,38)	10,57 (7,66-12,90) p ₁ = 0,039	8,01 (7,88-8,40) p ₁ = 0,004
HLA-DR	9,79 (5,23-14,50)	22,60 (17,65-29,40) p ₁ = 0,003	16,00 (14,30-22,50) p ₁ = 0,027 p ₂ = 0,041
на CD80^{high}CD86^{high} клетках on CD80 ^{high} CD86 ^{high} cells			
CD80	7,62 (3,34-8,29)	7,01 (6,57-9,50)	8,91 (7,86-9,80)
CD83	78,40 (70,20-115,0)	70,40 (53,90-95,65)	46,60 (40,20-55,00) p ₁ = 0,045 p ₂ = 0,048
CD86	12,10 (5,55-19,50)	11,70 (9,11-13,25)	9,76 (9,17-11,20)
HLA-DR	126,0 (125,0-221,0)	58,55 (41,10-103,0) p ₁ = 0,028	35,20 (33,40-44,20) p ₁ = 0,004 p ₂ = 0,039

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table. 1.

жание CD83⁺CD80^{high} клеток (p = 0,048) и понижается уровень CD83⁺CD80^{high}CD86^{high}HLA-DR⁺ клеток (p = 0,026).

При созревании (активации) дендритных клеток у лиц контрольной группы уровни экспрессии исследуемых рецепторов на CD83⁺ и CD80^{low} аДК не меняются (см. табл. 2 и 5). У больных РП при высоком уровне в крови CD14⁺CD16⁺ моноцитов увеличивается экспрессия молекул CD83 и CD86 на CD80^{low} аДК (p < 0,001 в обоих случаях). У обследованных пациентов с низким содержанием CD14⁺CD16⁺ моноцитов в крови при созревании дендритных клеток на поверхности CD83⁺ аДК снижается экспрессия CD83 (p = 0,028), CD86 (p = 0,041) и HLA-DR (p < 0,001). Кроме того, у лиц данной группы также понижается экспрес-

сия антигенов CD83 (p = 0,011), CD86 (p = 0,030) и HLA-DR (p < 0,001) на CD80^{low} аДК.

У лиц контрольной группы при созревании дендритных клеток на поверхности CD80^{high} аДК повышается экспрессия HLA-DR (p < 0,001) и понижается экспрессия CD83 по поверхности CD80^{high}CD86^{high} аДК (p = 0,039) (см. табл. 3 и 6). У больных РП с высоким уровнем содержания в крови CD14⁺CD16⁺ моноцитов при созревании дендритных клеток на поверхности CD80^{high} аДК повышается уровень CD80 (p < 0,001) и CD86 (p < 0,001), а на поверхности CD80^{high}CD86^{high} аДК – увеличивается плотность HLA-DR (p = 0,048). У пациентов с низким уровнем CD14⁺CD16⁺ моноцитов в крови при созревании дендритных клеток на поверхности CD80^{high} аДК снижается экспрессия CD83 (p = 0,035), CD86

ТАБЛИЦА 4. ФЕНОТИП АКТИВИРОВАННЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК (В %), ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ *IN VITRO* ИЗ МОНОЦИТОВ КРОВИ, У БОЛЬНЫХ РП С РАЗЛИЧНЫМ КОЛИЧЕСТВОМ CD14⁺CD16⁺ МОНОЦИТОВ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 4. PHENOTYPE OF ACTIVATED DENDRITIC CELLS (IN %) DIFFERENTIATED *IN VITRO* FROM BLOOD MONOCYTES IN PATIENTS WITH KC WITH DIFFERENT AMOUNTS OF CD14⁺CD16⁺ MONOCYTES, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Parameters	Контроль Control n = 31	Больные РП Patients with KC	
		CD14 ⁺ CD16 ⁺ > 4 1,2% n = 14	CD14 ⁺ CD16 ⁺ < 41,2% n = 14
CD83 ⁺ CD80 ⁺	99,5 (98,7-99,7)	96,1 (91,3-97,8) p ₁ = 0,027	98,2 (93,7-99,2)
CD83 ⁺ CD80 ^{low}	31,8 (16,3-40,7)	60,4 (56,4-62,3) p ₁ = 0,025	12,1 (10,6-43,3) p ₁ = 0,009 p ₂ < 0,001
CD83 ⁺ CD80 ^{high}	45,3 (26,5-55,9)	30,5 (27,0-36,5) p ₁ = 0,014	73,7 (48,6-81,9) p ₁ = 0,017 p ₂ < 0,001
CD83 ⁺ CD86 ⁺	99,9 (99,7-100,0)	99,7 (99,6-99,9)	99,9 (99,3-99,9)
CD83 ⁺ CD80 ^{high} CD86 ^{high}	13,8 (6,6-35,0)	5,2 (3,2-6,9) p ₁ = 0,014	8,3 (7,7-11,0) p ₁ = 0,004 p ₂ < 0,001
CD83 ⁺ HLA-DR ⁺	99,8 (99,2-99,9)	99,7 (99,6-99,7)	99,6 (98,8-99,7)
CD83 ⁺ CD80 ^{low} HLA-DR ⁺	31,6 (16,2-40,3)	60,3 (56,4-62,3) p ₁ < 0,001	12,0 (10,5-23,3) p ₁ = 0,009 p ₂ < 0,001
CD83 ⁺ CD80 ^{high} HLA-DR ⁺	6,4 (5,2-7,9)	30,4 (26,4-36,2) p ₁ < 0,001	70,8 (48,2-81,5) p _{1,2} < 0,001
CD83 ⁺ CD80 ^{high} CD86 ^{high} HLA-DR ⁺	13,7 (6,7-35,0)	5,3 (3,41-6,8) p ₁ = 0,011	8,2 (7,6-10,8) p ₁ = 0,004 p ₂ < 0,001
CD83 ⁺ CD80 ^{low} CD86 ⁺	31,7 (14,9-40,6)	60,4 (56,4-62,3) p ₁ < 0,001	12,0 (10,6-23,4) p ₁ = 0,009 p ₂ < 0,001
CD83 ⁺ CD80 ^{high} CD86 ⁺	44,9 (26,5-55,9)	39,5 (35,9-41,7)	73,7 (48,5-81,9) p ₁ = 0,017 p ₂ < 0,001

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table. 1.

(p = 0,047) и HLA-DR (p = 0,019), а на поверхности CD80^{high}CD86^{high} аДК уменьшается уровень CD83 (p = 0,012).

Обсуждение

Функциональная активность дендритных клеток определяется целым комплексом молекул, представленных на их поверхности и осуществляющих костимуляцию и презентацию антигенов. При этом активность дендритноклеточной вакцины может определяться не только эффективностью цитокинового «коктейля», индуци-

рующего дифференцировку моноцитов в дендритные клетки в условиях *in vitro*, но и рядом патогенетических факторов *in vivo*. В частности, накопление в окружающей опухоль среде аденозина приводит к снижению функциональной активности ДК [25]. Например, в исследовании Веннасеуг и соавт. (2009) показано, что ганглиозиды, выделяемые клетками меланомы, индуцируют апоптоз дендритных клеток [8]. Однако известные механизмы и факторы защиты опухоли от воздействия иммунной системы могут воздействовать не только на дендритные клетки, но и на моноциты крови, осуществляя их «пере-

ТАБЛИЦА 5. УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ АНТИГЕНОВ НА ЗРЕЛЫХ CD83⁺ И CD80^{low} ДК (в о. е.), ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ *IN VITRO* ИЗ МОНОЦИТОВ КРОВИ, В ЗАВИСИМОСТИ ОТ КОЛИЧЕСТВА CD14⁺CD16⁺ МОНОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ РП, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 5. EXPRESSION LEVELS OF ANTIGENS ON MATURE CD83⁺ AND CD80^{low} DC (in r. u.) DIFFERENTIATED *IN VITRO* FROM BLOOD MONOCYTES IN DEPENDING ON THE AMOUNT OF CD14⁺CD16⁺ MONOCYTES IN PATIENTS WITH KC, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Parameters	Контроль Control n = 31	Больные РП Patients with KC	
		CD14 ⁺ CD16 ⁺ > 41,2% n = 14	CD14 ⁺ CD16 ⁺ < 41,2% n = 14
на CD83⁺ клетках on CD83 ⁺ cells			
CD80	5,77 (4,94-7,29)	4,15 (4,06-4,99)	5,86 (3,80-7,15)
CD83	8,00 (6,95-10,65)	7,09 (6,84-7,41)	4,12 (3,28-4,97) p ₁ = 0,014 p ₂ = 0,028
CD86	20,65 (13,70-41,80)	12,40 (9,07-18,20) p ₁ = 0,044	8,76 (7,85-8,82) p ₁ < 0,001 p ₂ = 0,009
HLA-DR	15,15 (9,67-22,80)	21,50 (17,70-23,80) p ₁ = 0,027	9,62 (8,52-10,60) p ₁ < 0,001 p ₂ = 0,008
на CD80^{low} клетках on CD80 ^{low} cells			
CD80	1,52 (1,41-1,87)	2,43 (1,70-2,69) p ₁ = 0,045	1,83 (1,81-1,97)
CD83	5,71(4,87-6,33)	39,14 (35,42-41,68) p ₁ < 0,001	3,23 (2,84-3,36) p ₁ = 0,016 p ₂ < 0,001
CD86	5,71 (3,97-6,77)	38,78 (34,94-41,63) p ₁ < 0,001	3,30 (3,00-3,39) p ₁ = 0,007 p ₂ < 0,001
HLA-DR	10,50 (7,61-11,90)	18,40 (13,60-21,50) p ₁ = 0,014	7,99 (6,90-9,01) p ₁ = 0,039 p ₂ = 0,030

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table. 1.

программирование» и снижая функциональную активность дендритных клеток, которые из них дифференцируются. Нап и соавт. (2014) показали, что IL-10, продукция которого индуцируется гепатоклеточной карциномой, вызывает нарушение созревания и дифференцировку ДК, провоцируя преимущественное формирование клеток с толерогенным фенотипом [13].

При проведении настоящего исследования обнаружено, что у больных РП в периферической крови снижается содержание провоспалительных моноцитов (CD14⁺CD16⁺). При этом в общей группе обследованных больных были выделены (разделены по медиане) лица с вы-

соким (> 41,2%, что приближалось к значениям, выявленным у лиц контрольной группы) и низким количеством (< 41,2%, в 2 и более раз относительно контрольных значений) моноцитов с указанным фенотипом. У больных РП с высоким уровнем провоспалительных моноцитов в крови наблюдалось соответствующее контрольному диапазону содержание классических моноцитов (CD14⁺CD16⁻). Соответственно, у обследованных пациентов с низким уровнем провоспалительных моноцитов выявляется высокое содержание «классических» моноцитов. Различий у двух групп больных РП в относительном количестве моноцитов с фенотипом

ТАБЛИЦА 6. УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ АНТИГЕНОВ НА ЗРЕЛЫХ CD80^{high} И CD80^{high}CD86^{high} ДК (в о. е.), ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ *IN VITRO* ИЗ МОНОЦИТОВ КРОВИ, В ЗАВИСИМОСТИ ОТ КОЛИЧЕСТВА CD14⁺CD16⁺ МОНОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ РП, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 6. EXPRESSION LEVELS OF ANTIGENS ON MATURE CD80^{high} AND CD80^{high}CD86^{high} DC (in r. u.) DIFFERENTIATED *IN VITRO* FROM BLOOD MONOCYTES IN DEPENDING ON THE AMOUNT OF CD14⁺CD16⁺ MONOCYTES IN PATIENTS WITH KC, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Parameters	Контроль Control n = 31	Больные РП Patients with KC	
		CD14 ⁺ CD16 ⁺ > 41,2% n = 14	CD14 ⁺ CD16 ⁺ < 41,2% n = 14
на CD80^{high} клетках on CD80 ^{high} cells			
CD80	5,35 (4,89-8,81)	39,33 (35,67-41,70) p ₁ < 0,001	6,01 (4,65-6,79) p ₂ < 0,001
CD83	6,41 (5,36- 7,15)	6,53 (5,72-6,74)	3,99 (3,33-4,48) p ₁ = 0,014 p ₂ = 0,025
CD86	6,44 (5,22-8,10)	39,69 (36,15-41,75) p ₁ < 0,001	6,44 (5,30-6,63) p ₂ < 0,001
HLA-DR	44,47 (25,07-55,33)	15,10 (14,50-17,10) p ₁ = 0,014	8,25 (7,03-8,51) p _{1,2} < 0,001
на CD80^{high}CD86^{high} клетках on CD80 ^{high} CD86 ^{high} cells			
CD80	6,25 (4,63-8,42)	6,96 (6,89-9,33)	7,03 (6,76-7,44)
CD83	46,85 (30,05-59,15)	85,20 (76,60-91,70) p ₁ = 0,009	26,30 (23,50-29,40) p ₁ = 0,019 p ₂ = 0,008
CD86	14,35 (9,19-19,25)	13,50 (13,20-22,70)	9,92 (8,81-10,40) p ₁ = 0,015 p ₂ = 0,032
HLA-DR	101,8 (76,40-116,5)	118,0 (105,0-148,0)	34,10(32,90-34,10) p _{1,2} < 0,001

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table. 1.

CD14^{dim}CD16⁺ не обнаружено. Также не выявлено различий между сформированными группами больных по процентному количеству моноцитов, экспрессирующих HLA-DR и CD64.

Исследование особенностей фенотипа ДК, полученных при дифференцировке из моноцитов крови в условиях *in vitro*, в зависимости от количества в крови провоспалительных моноцитов, у больных РП позволило обнаружить следующие закономерности. Так, фенотипический состав нДК слабо различается у больных РП в зависимости от количества провоспалительных моноцитов в крови. У обследованных пациентов с низким количеством провоспалительных моноцитов установлено только повышение содержания нДК с фенотипом CD83⁺CD80^{high}HLA-DR⁺ по сравнению с показателями больных с высо-

ким уровнем провоспалительных моноцитов. В целом у больных РП количество нДК с указанным фенотипом значительно выше, чем у лиц контрольной группы. Молекула CD83 является основным маркером ДК, относится к суперсемейству Ig и представляет собой гликозилированный трансмембранный белок с молекулярной массой около 45 кДа, принимает участие в презентации антигенов и инициации адаптивного иммунного ответа [9, 26]. CD80 (или B7.1) является гликозилированным одноцепочечным белком с молекулярной массой 60 кДа, который, совместно с CD86 (или B7.2), определяется как лиганд для CD28 и CD152 на поверхности Т-лимфоцитов [15, 27]. Считается, что CD80 обладает большим сродством к CD152 Т-лимфоцитов, взаимодействие с которым приводит к развитию

толерогенного эффекта, тогда как CD86 взаимодействует с CD28 и, соответственно, вызывает активацию Т-клеток [22]. HLA-DR относится к МНС II класса и участвует в процессах презентации антигенов [10, 19]. Особенностью фенотипа нДК у больных РП с высоким содержанием провоспалительных моноцитов в крови также является увеличение уровней CD86 на CD80^{low}, HLA-DR на CD80^{high} клетках, а также молекул CD83 и HLA-DR на CD80^{high}CD86^{high} нДК.

Независимо от содержания провоспалительных моноцитов в крови у больных РП относительно контрольных значений повышается количество нДК с фенотипом CD83⁺CD80^{high}, CD83⁺CD86⁺, CD83⁺CD80^{high}CD86^{high}, CD83⁺CD80^{high}CD86^{high} HLA-DR⁺ и CD83⁺CD80^{high}CD86⁺, но при понижении уровней CD83⁺CD80^{low}, CD83⁺CD80^{low}HLA-DR⁺ и CD83⁺CD80^{low}CD86⁺ нДК. CD83⁺ нДК в общей группе обследованных пациентов сильнее экспрессируют молекулы CD80 и HLA-DR, CD80^{low} клетки – HLA-DR и CD80^{high} клетки – CD80. Следовательно, у больных РП при дифференцировке моноцитов формируется пул нДК, обладающих высокой способностью к презентации и одновременно к толерогенной стимуляции.

При созревании/активации ДК у здоровых людей в клеточной культуре наблюдается повышение процентного содержания CD83⁺CD80^{high} и CD83⁺CD80^{high}CD86⁺ аДК, но при снижении количества CD83⁺CD80^{low}, CD83⁺CD80^{low}HLA-DR⁺, CD83⁺CD80^{high}HLA-DR⁺ и CD83⁺CD80^{low}CD86⁺ аДК. При этом фенотип аДК у больных РП значительно различается в зависимости от количества провоспалительных моноцитов в периферической крови. Так, в противоположном направлении относительно контрольных значений у больных РП изменяется количество CD83⁺CD80^{low}, CD83⁺CD80^{high}, CD83⁺CD80^{high}CD86^{high}, CD83⁺CD80^{low}HLA-DR⁺, CD83⁺CD80^{high}CD86^{high}HLA-DR⁺ и CD83⁺CD80^{low}CD86⁺ аДК в культуре. Причем у пациентов с высоким уровнем провоспалительных моноцитов изменение фенотипа ДК в процессе их созревания определяется повышением доли клеток с низким уровнем экспрессии CD80 и снижением относительного содержания с высоким уровнем экспрессии данной молекулы. У больных с низким количеством крови провоспалительных моноцитов наблюдается обратная зависимость по изменению количества клеток с высоким и низким уровнем экспрессии поверхностного CD80. Выявленные особенности фенотипа аДК отражают тенденцию формирования клеток с толерогенной стимуляцией у больных РП с низким уровнем провоспалительных моноцитов.

В зависимости от содержания провоспалительных моноцитов в крови значительно различаются уровни экспрессии исследуемых маркеров на поверхности аДК. У больных РП с низким количеством CD14⁺CD16⁺ моноцитов в крови на поверхности CD83⁺ аДК уровень экспрессии CD86 почти в 1,5 раза ниже, чем при высоком содержании провоспалительных моноцитов, а уровень экспрессии HLA-DR – в 2 раза ниже. Следовательно, у больных РП при низком количестве провоспалительных моноцитов в крови формируется фенотип CD83⁺ аДК с низкими способностями к презентации антигена и стимуляции Т-лимфоцитов.

В двух группах больных РП значительно различается распределение экспрессии исследуемых маркеров на поверхности CD80^{low} и CD80^{high} аДК. Обнаружено, что при высоком уровне провоспалительных моноцитов в периферической крови экспрессия CD86 на CD80^{low} аДК более чем в 11 раз, а экспрессия HLA-DR – более чем в 2 раза по сравнению с выявленным у лиц с низким содержанием указанных моноцитов. Подобная тенденция в распределении уровней экспрессии CD86 и HLA-DR сохраняется и на CD80^{high} аДК, что, соответственно, определяет слабую функциональную активность аДК у больных РП с низким содержанием провоспалительных моноцитов.

Считается, что зрелые ДК с фенотипом CD80^{high}CD86^{high} обладают максимальным функциональным потенциалом [17, 18]. На аДК с указанным фенотипом у больных РП с высоким содержанием провоспалительных моноцитов в крови уровень экспрессии CD83 в 3,2 раза превышает таковой у пациентов с низким количеством CD14⁺CD16⁺ моноцитов, тогда как CD86 – в 1,4 раза и HLA-DR – в 3,5 раза. Такое распределение экспрессии данных рецепторов на CD80^{high}CD86^{high} аДК свидетельствует о повышенной способности к презентации антигена и формированию эффективного стимуляционного сигнала для Т-клеток у больных с высоким содержанием провоспалительных моноцитов.

Таким образом, у больных РП в периферической крови снижается количество CD14⁺CD16⁺ моноцитов (до 42% от уровня общих моноцитов) относительно контрольного диапазона. В связи с этим анализ зависимости фенотипа ДК, полученных из моноцитов в условиях *in vitro*, от количества провоспалительных моноцитов в крови был проведен путем сравнения показателей с высоким содержанием провоспалительных моноцитов в крови у больных РП (> 42%, приближается к уровню контрольного диапазона) и низким (< 42%). Установлено, что у больных РП с низким

количеством в крови провоспалительных моноцитов (< 42%) повышается содержание толерогенных нДК в клеточной культуре. Особенностью фенотипа нДК у пациентов с высоким содержанием провоспалительных моноцитов в крови (> 42%) является относительное увеличение экспрессии молекул, отвечающих за презентацию антигена и формирование костимуляционного сигнала. При созревании/активации фенотип ДК у больных РП с различным содержанием провоспалительных моноцитов различается сильнее. У больных с низким уровнем провоспалительных моноцитов в крови в клеточной культуре формируется пул зрелых ДК с низким уровнем экспрессии CD86 и HLA-DR, что, соответственно, указывает на низкий эффекторный потенциал этих ДК с точки зрения презентации антигена и костимуляции Т-клеток. У больных с высоким уровнем провоспалительных моноцитов в кле-

точной культуре формируется пул активированных ДК с высоким уровнем функциональной активности. Выявленные различия фенотипа ДК от субпопуляционного состава моноцитов крови у больных РП характеризуют механизмы программирования клеточной дифференцировки в зависимости от микроокружения, в том числе и патогенного характера (на фоне опухолевого роста).

Благодарности

Данная работа выполнена при финансовой поддержке Краевого государственного автономного учреждения «Красноярский краевой фонд поддержки научной и научно-технической деятельности» (проект «Механизмы метаболического репрограммирования клеток врожденного иммунитета при опухолевом росте»).

Список литературы / References

1. Кудрявцев И.В., Субботовская А.И. Опыт измерения параметров иммунного статуса с использованием шестичетного цитофлуориметрического анализа // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 1. С. 19-26. [Kudryavtsev I.V., Subbotovskaya A.I. Application of six-color flow cytometric analysis for immune profile monitoring. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 1, pp. 19-26. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-19-26.
2. Леплина О.Ю., Старостина Н.М., Блинова Д.Д., Желтова О.И., Олейник Е.А., Тыринова Т.В., Останин А.А., Черных Е.Р. Результаты пилотного клинического исследования вакцин на основе дендритных клеток в лечении рецидивирующей герпесвирусной инфекции // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 5. С. 425-436. Lepkina O.Yu., Starostina N.M., Blinova D.D., Zheltova O.I., Oleinik E.A., Tyrinova T.V., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Results of a pilot clinical trial of dendritic cell based vaccines for treatment of recurrent herpesvirus infection. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, Vol. 18, no. 5, pp. 425-436. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2016-5-425-436.
3. Назаркина Ж.К., Заякина А.В., Лактионов П.П. Влияние условий созревания и способа нагрузки антигенами на получение иммунологически активных дендритных клеток // Молекулярная биология, 2018. Т. 52, № 2. С. 257-269. [Nazarkina Zh.K., Zayakina A., Laktionov P.P. Maturation and antigen loading protocols influence activity of anticancer dendritic cells. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology*, 2018, Vol. 52, no. 2, pp. 257-269. (In Russ.)]
4. Савченко А.А., Борисов А.Г., Кудрявцев И.В., Гвоздев И.И., Мошев А.В. Особенности фенотипа дендритных клеток, дифференцированных из моноцитов крови, у больных раком почки // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 2. С. 215-226. [Savchenko A.A., Borisov A.G., Kudryavtsev I.V., Gvozdev I.I., Moshev A.V. Phenotypic peculiarities of dendritic cells differentiated from blood monocytes in patients with kidney cancer. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, Vol. 20, no. 2, pp. 215-226. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2018-2-215-226.
5. Савченко А.А., Борисов А.Г., Модестов А.А., Мошев А.В., Кудрявцев И.В., Тоначева О.Г., Кощеев В.Н. Фенотипический состав и хемилюминесцентная активность моноцитов у больных почечноклеточным раком // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 2. С. 141-150. [Savchenko A.A., Borisov A.G., Modestov A.A., Moshev A.V., Kudryavtsev I.V., Tonacheva O.G., Koshcheev V.N. Monocytes subpopulations and chemiluminescent activity in patients with renal cell carcinoma. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 2, pp. 141-150. (In Russ.)] doi:10.15789/1563-0625-2015-2-141-150.
6. Тыринова Т.В., Мишинов С.В., Леплина О.Ю., Альшевская А.А., Курочкина Ю.Д., Олейник Е.А., Калиновский А.В., Лопатникова Ю.А., Чернов С.В., Ступак В.В., Сенников С.В., Останин А.А., Черных Е.Р. Роль TNF α /TNF-R1-сигнального пути в реализации цитотоксического эффекта дендритных клеток против глиобластомных линий // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 3. С. 353-364. [Tyrinova T.V., Mishinov S.V., Lepkina O.Yu., Alshevskaya A.A., Kurochkina Yu.D., Oleinik E.A., Kalinovskiy A.V., Lopatnikova Yu.A., Chernov S.V., Stupak V.V., Sennikov S.V., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Role of TNF α /TNF-R1-signaling pathway in cytotoxic activity of dendritic cells against glioblastoma cell lines. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, Vol. 20, no. 3, pp. 353-364. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2018-3-353-364.
7. Bai W.K., Zhang W., Hu B. Vascular endothelial growth factor suppresses dendritic cells function of human prostate cancer. *Onco. Targets Ther.*, 2018, Vol. 11, pp. 1267-1274.
8. Bennaceur K., Popa I., Chapman J.A., Migdal C., Péguet-Navarro J., Touraine J.L., Portoukalian J. Different mechanisms are involved in apoptosis induced by melanoma gangliosides on human monocyte-derived dendritic cells. *Glycobiology*, 2009, Vol. 19, no. 6, pp. 576-582.

9. Chen X., Hao S., Zhao Z., Liu J., Shao Q., Wang F., Sun D., He Y., Gao W., Mao H. Interleukin 35: Inhibitory regulator in monocyte-derived dendritic cell maturation and activation. *Cytokine*, 2018, Vol. 108, pp. 43-52.
10. de Goeje P.L., Klaver Y., Kaijen-Lambers M.E.H., Langerak A.W., Vroman H., Kunert A., Lamers C.H.J., Aerts J.G.J.V., Debets R., Hendriks R.W. Autologous Dendritic cell therapy in mesothelioma patients enhances frequencies of peripheral CD4 T cells expressing HLA-DR, PD-1, or ICOS. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 2034. doi: 10.3389/fimmu.2018.02034.
11. Deicher A., Andersson R., Tingstedt B., Lindell G., Bauden M., Ansari D. Targeting dendritic cells in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell Int.*, 2018, Vol. 18, p. 85.
12. Finak G., Langweiler M., Jaimes M., Malek M., Taghiyar J., Korin Y., Raddassi K., Devine L., Obermoser G., Pekalski M.L., Pontikos N., Diaz A., Heck S., Villanova F., Terrazzini N., Kern F., Qian Y., Stanton R., Wang K., Brandes A., Ramey J., Aghaeepour N., Mosmann T., Scheuermann R.H., Reed E., Palucka K., Pascual V., Blomberg B.B., Nestle F., Nussenblatt R.B., Brinkman R.R., Gottardo R., Maecker H., McCoy J.P. Standardizing flow cytometry immunophenotyping analysis from the human immunophenotyping consortium. *Sci. Rep.*, 2016, Vol. 6, 20686. doi: 10.1038/srep20686.
13. Han Y., Chen Z., Yang Y., Jiang Z., Gu Y., Liu Y., Lin C., Pan Z., Yu Y., Jiang M., Zhou W., Cao X. Human CD14⁺ CTLA-4⁺ regulatory dendritic cells suppress T-cell response by cytotoxic T-lymphocyte antigen-4-dependent IL-10 and indoleamine-2,3-dioxygenase production in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2014, Vol. 59, no. 2, pp. 567-579.
14. Hsu J.L., Bryant C.E., Papadimitriou M.S., Kong B., Gasiorowski R.E., Orellana D., McGuire H.M., Groth B.F.S., Joshua D.E., Ho P.J., Larsen S., Iland H.J., Gibson J., Clark G.J., Fromm P.D., Hart D.N. A blood dendritic cell vaccine for acute myeloid leukemia expands anti-tumor T cell responses at remission. *Oncoimmunology*, 2018, Vol. 7, no. 4, e1419114. doi: 10.1080/2162402X.2017.1419114.
15. Ki K.K., Faddy H.M., Flower R.L., Dean M.M. Packed red blood cell transfusion modulates myeloid dendritic cell activation and inflammatory response *in vitro*. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2018, Vol. 38, no. 3, pp. 111-121.
16. Kwong C., Gilman-Sachs A., Beaman K. An independent endocytic pathway stimulates different monocyte subsets by the $\alpha 2$ N-terminus domain of vacuolar-ATPase. *Oncoimmunology*, 2013, Vol. 2, no. 1, e22978. doi: 10.4161/onci.22978.
17. Li J.G., Du Y.M., Yan Z.D., Yan J., Zhuansun Y.X., Chen R., Zhang W., Feng S.L., Ran P.X. CD80 and CD86 knockdown in dendritic cells regulates Th1/Th2 cytokine production in asthmatic mice. *Exp. Ther. Med.*, 2016, Vol. 11, no. 3, pp. 878-884.
18. Lim T.S., Goh J.K.H., Mortellaro A., Lim C.T., Hämmerling G.J., Ricciardi-Castagnoli P. CD80 and CD86 differentially regulate mechanical interactions of t-cells with antigen-presenting dendritic cells and b-cells. *PLoS ONE*, 2012, Vol. 7, nj. 9, e45185. doi: 10.1371/journal.pone.0045185.
19. Loughland J.R., Minigo G., Burel J., Tipping P.E., Piera K.A., Amante F.H., Engwerda C.R., Good M.F., Doolan D.L., Anstey N.M., McCarthy J.S., Woodberry T. Profoundly reduced CD1c⁺ myeloid dendritic cell HLA-DR and CD86 expression and increased tumor necrosis factor production in experimental human blood-stage malaria infection. *Infect. Immun.*, 2016, Vol. 84, no. 5, pp. 1403-1412.
20. Ning Y., Shen K., Wu Q., Sun X., Bai Y., Xie Y., Pan J., Qi C. Tumor exosomes block dendritic cells maturation to decrease the T cell immune response. *Immunol. Lett.*, 2018, Vol. 199, pp. 36-43.
21. Qian C., Cao X. Dendritic cells in the regulation of immunity and inflammation. *Semin. Immunol.*, 2018, Vol. 35, pp. 3-11.
22. Sansom D.M., Manzotti C.N., Zheng Y. What's the difference between CD80 and CD86? *Trends Immunol.*, 2003, Vol. 24, no. 6, pp. 314-319.
23. Shang N., Fighini M., Shangguan J., Wang B., Sun C., Pan L., Ma Q., Zhang Z. Dendritic cells based immunotherapy. *Am. J. Cancer Res.*, 2017, Vol. 7, no. 10, pp. 2091-2102.
24. Song X., Ding Y., Liu G., Yang X., Zhao R., Zhang Y., Zhao X., Anderson G.J., Nie G. Cancer cell-derived exosomes induce mitogen-activated protein kinase-dependent monocyte survival by transport of functional receptor tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.*, 2016, Vol. 291, no. 16, pp. 8453-8464.
25. Song X., Zhang Y., Zhang L., Song W., Shi L. Hypoxia enhances indoleamine 2,3-dioxygenase production in dendritic cells. *Oncotarget*, 2018, Vol. 9, no. 14, pp. 11572-11580.
26. Souto G.R., Matias M.D.P., Nunes L.F.M., Ferreira R.C., Mesquita R.A. Mature dendritic cell density is affected by smoking habit, lesion size, and epithelial dysplasia in oral leukoplakia samples. *Arch. Oral. Biol.*, 2018, Vol. 95, pp. 51-57.
27. Suryatenggara J., Wibowo H., Atmodjo W.L., Mathew G. Characterization of alpha-fetoprotein effects on dendritic cell and its function as effector immune response activator. *J. Hepatocell. Carcinoma*, 2017, Vol. 4, pp. 139-151.
28. Sutherland D.R., Ortiz F., Quest G., Illingworth A., Benko M., Nayyar R., Marinov I. High-sensitivity 5-, 6-, and 7-color PNH WBC assays for both Canto II and Navios platforms. *Cytometry B Clin. Cytom.*, 2018, Vol. 94, no. 1, pp. 1-15.
29. Wang C., Pu J., Yu H., Liu Y., Yan H., He Z., Feng X. A dendritic cell vaccine combined with radiotherapy activates the specific immune response in patients with esophageal cancer. *J. Immunother.*, 2017, Vol. 40, no. 2, pp. 71-76.
30. Wu M.R., Zhang T., DeMars L.R., Sentman C.L. B7H6-specific chimeric antigen receptors lead to tumor elimination and host antitumor immunity. *Gene Ther.*, 2015, Vol. 22, no. 8, pp. 675-684.
31. Yanagisawa R., Koizumi T., Koya T., Sano K., Koido S., Nagai K., Kobayashi M., Okamoto M., Sugiyama H., Shimodaira S. WT1-pulsed dendritic cell vaccine combined with chemotherapy for resected pancreatic cancer in a phase I study. *Anticancer Res.*, 2018, Vol. 38, no. 4, pp. 2217-2225.

Авторы:

Савченко А.А. — д.м.н., профессор, руководитель лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“», обособленное подразделение «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

Борисов А.Г. — к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“», обособленное подразделение «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

Кудрявцев И.В. — к.б.н., старший научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; доцент кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Мошев А.В. — младший научный сотрудник лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“», обособленное подразделение «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

Authors:

Savchenko A.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Molecular and Cellular Physiology and Pathology, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Science Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Borisov A.G., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Molecular and Cellular Physiology and Pathology, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Science Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Kudryavtsev I.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine; Assistant Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Moshev A.V., Junior Research Associate, Laboratory of Molecular and Cellular Physiology and Pathology, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Science Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Поступила 09.11.2018

Отправлена на доработку 19.11.2018

Принята к печати 27.12.2018

Received 09.11.2018

Revision received 19.11.2018

Accepted 27.12.2018