

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА «ПРОФЕТАЛЬ» НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ МОНОНУКЛЕАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ И ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Черешнев В.А.¹, Лебединская О.В.², Родионов С.Ю.³,
Ахматова Н.К.⁴, Шубина И.Ж.⁴, Лебединская Е.А.²,
Гаврилова Т.В.¹, Киселевский М.В.⁴

¹ Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург;

² ГОУ ВПО «Пермская государственная медицинская академия» МЗ РЗ, Пермь;

³ Филиал Института иммунологии и физиологии УрО РАН, Пермь;

⁴ Онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Резюме. Исследовано действие препарата «Профеталь», основным действующим компонентом которого является лиофилизированный и стабилизированный декстраном человеческий α -фетопротеин, на функциональные свойства мононуклеарных лейкоцитов (МЛ) периферической крови здоровых доноров и возможность генерации из них зрелых дендритных клеток (ДК).

Показано, что введение в культуры оптимальных доз данного препарата вызывает статистически достоверное повышение пролиферативной способности, уровня бласттрансформации МЛ и их цитотоксической активности по отношению к опухолевой линии К-562, а также индуцирует созревание антиген-презентирующих дендритных клеток.

На основании полученных данных сделан вывод, что «Профеталь» является активным иммуномодулирующим фактором и может быть использован для генерации цитотоксических лимфоцитов и зрелых ДК с целью их применения в биотерапии онкологических и инфекционных заболеваний.

Ключевые слова: «Профеталь», α -фетопротеин, мононуклеарные лейкоциты, дендритные клетки, иммунофенотип, функциональная активность.

*Chereshnev V.A., Lebedinskaya O.V., Rodionov S.Yu., Ahmatova N.K., Shubina I.Zh.,
Lebedinskaya E.A., Gavrilova T.V., Kisselevsky M.V.*

THE EFFECTS OF 'PROFETAL' PREPARATION UPON FUNCTIONAL ACTIVITY OF HUMAN MONONUCLEAR LEUKOCYTES AND DENDRITIC CELLS

Abstract. The effects of 'Profetal', a drug containing liophylized, dextran-stabilized human alpha-fetoprotein as main active component, were investigated on peripheral donor blood mononuclear leukocytes (ML), with respect to their functional properties and the potential to generate mature dendritic cells (DC).

Addition of the drug to cell cultures at optimal doses was shown to cause significant increase in their proliferative capacity and ML blastic transformation levels, and enhanced cytotoxicity towards K562 tumor cells, as well as to induce maturation of antigen-presenting dendritic cells.

On the basis of the data obtained, a conclusion is made that 'Profetal' is an active immunomodulatory factor, and it may be applied for generation of cytotoxic lymphocytes and mature DC, aiming to apply them for the biotherapy of oncological and infectious diseases. (*Med. Immunol.*, 2005, vol.7, № 5-6, pp 525-534)

Адрес для переписки:

Лебединская Елена Александровна,
614039, г. Пермь, ул. Полины Осипенко, д. 61, кв. 74.
Тел.: (3422) 44-55-23. E-mail: lebedin@mail.ru

Введение

В настоящее время ведутся интенсивные работы по внедрению в клиническую практику онкологии методов адоптивной иммунотерапии, осно-

ванных на экстракорпоральной активации эффекторов противоопухолевого иммунитета. Наибольший интерес представляют лимфокин-активированные киллеры (ЛАК), генерированные *in vitro* при инкубации мононуклеарных лейкоцитов (МЛ) периферической крови с цитокинами [2, 12, 13, 19] и специфические вакцины на основе дендритных клеток (ДК) [16, 20, 23, 27]. ЛАК представляют собой крупные лимфоциты типа иммунобластов, характеризуются активностью натуральных киллеров (НК) и способны эффективно лизировать опухолевые клетки [13]. Для получения ЛАК используют интерлейкин-2 (IL-2) и интерферон- α (INF- α).

ДК рассматриваются как особая субпопуляция антиген-презентирующих клеток, характеризующаяся рядом морфологических и иммунофенотипических особенностей. Данные клетки, пульсированные *in vitro* различными пептидами, способны презентировать антигены наивным Т-лимфоцитам *in vivo* и индуцировать иммунные реакции против опухолей и бактериальных инфекций [1, 2, 3, 9]. Конструирование вакцин против определенных бактериальных патогенных компонентов и опухолевых клеток основывается и на возможности ДК презентировать антиген, и на их способности к паракринному высвобождению цитокинов, таких, например, как интерлейкин-12 (IL-12) [22], который активирует не только натуральные киллеры, но натуральные киллеры — Т-клетки (НКТ) и Т-лимфоциты, индуцируя пролиферацию, цитотоксическую активность и дифференцировку Th-1 клеток [22, 24, 25]. Дендритные клетки получают из клеток-предшественников [30] или моноцитов периферической крови человека [26, 29], а также из CD34⁺ предшественников костного мозга [20]. Для получения ДК обычно используют гранулоцит-макрофагально-колониестимулирующий фактор (GM-CSF) и интерлейкин-4 (IL-4), а в качестве индуктора созревания применяют фактор некроза опухолей и ряд других препаратов [5, 7, 9].

Вместе с тем до настоящего времени не исследована возможность применения для активации рассматриваемых эффекторов таких биорегуляторов, как α -фетопротеин (АФП), который, как нами ранее было установлено на эмбриональных фибробластах, проявляет свойства стимулятора пролиферации и индуктора дифференцировки [8, 17].

В связи с этим целью настоящего исследования явилось изучение влияния препарата «Профеталь», основным действующим компонентом которого является человеческий α -фетопротеин, на цитотоксическую и пролиферативную активность мононуклеарных лейкоцитов периферической крови и процесс генерации из них дендритных клеток.

Материалы и методы

Выделение мононуклеарных лейкоцитов. МЛ выделяли из стабилизированной гепарином (25 Ед./мл) периферической крови 30 здоровых доноров на одноступенчатом градиенте фикола («Pharmacia», США, плотностью 1,077 г/см³) центрифугированием при 400 g в течение 30 минут. Мононуклеарные клетки, образовавшие интерфазное кольцо, собирали пипеткой и трехкратно отмывали в среде 199 (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов РАМН, Москва, Россия). После каждой отмывки в 10-кратном объеме среды клетки осаждали центрифугированием при 200 g.

Культивирование клеток опухолевой линии К-562. Клетки эритробластного лейкоза человека линии К-562 культивировали в среде RPMI-1640 (ICN, США) с добавлением глутамина, 5% эмбриональной телячьей сыворотки и гентамицина при 37°C в атмосфере 4% CO₂.

Препараты. В работе использован препарат «Профеталь» (производства ЗАО «Институт новых медицинских технологий», г. Пермь, Россия), включающий лиофилизированный и стабилизированный декстраном человеческий α -фетопротеин. Исследуемые дозы — 0,001; 0,01; 0,1; 1,0 и 10,0 мкг/мл.

Цитотоксический тест. Цитотоксическую активность МЛ определяли на НК-чувствительной линии опухолевых клеток К-562. Опухолевые клетки (1x10⁴ в 1 мл) инкубировали в культуральной среде с МЛ, обработанными препаратом «Профеталь» в концентрациях 0,001; 0,01; 0,1; 1,0 и 10,0 мкг/мл (при соотношении клетки-мишени/эффекторы 1:5, 1:2, 1:1 и 1:0,5) в плоскостных 96-луночных микропланшетах («Costar», Франция) 18 часов. Затем в лунки добавлялся витальный краситель МТТ («Sigma», США) и по оптической плотности, измеряемой на мультискане МСС-340 («Labsystem», Финляндия), рассчитывался процент лизиса опухолевых клеток (процент цитотоксичности).

Оценка пролиферативной активности мононуклеарных лейкоцитов. Оценку пролиферативной активности МЛ при действии препарата «Профеталь» проводили в колориметрическом тесте с использованием витального красителя AlamarBlue («Biosours», США) в стерильных условиях, используя ламинарный бокс с горизонтальным потоком воздуха («JuanVFS 906», Франция). Клеточную взвесь (по 5x10³ клеток) в обогащенной среде RPMI 1640 («ПанЭко», Россия) вносили в лунки 96-луночного плоскостного планшета («Costar», Франция). Затем добавляли препарат «Профеталь» в концентрациях от 0,01 до 10,0 мкг/мл. Планшеты помещали в CO₂-инкубатор («Binder», Германия) при 37°C и 5% CO₂. Клетки инкубировали в течение 72 часов. По окончании инкубации в лунки вносили 10% краситель AlamarBlue («Biosource», США). Флюоресценцию измеряли после четырехчасовой инкубации при

37°C, 5% CO₂ на флюориметре Versa Fluor V13 («Втокал», Россия) при длине волны возбуждения 530-560 нм, эмиссии 590 нм и выражали в условных единицах (у.е.) флюоресценции. Рассчитывали индекс стимуляции (ИС), представляющий собой отношение пролиферативной активности МЛ при стимуляции препаратом к спонтанной пролиферативной активности мононуклеарных лейкоцитов.

Культивирование дендритных клеток. Мононуклеарные лейкоциты, выделенные из периферической крови, ресуспендировали в среде RPMI 1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки в концентрации 1x10⁶ клеток/мл и инкубировали в течение 4 ч. Затем удаляли не прилипшие клетки, к которым добавляли по 10 нг/мл мышинного рекомбинантного гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) и IL-4 («Biosource», США). Клетки инкубировали в обогащённой среде RPMI 1640 при 4,5% CO₂ и 37°C в течение 3 суток, после чего повторно добавляли те же цитокины. На шестые сутки производили смену среды с добавлением препарата «Профеталь» в концентрации 1,5 мкг/мл. На 9 сутки собирали и исследовали полученные клетки.

Анализ фенотипа ДК. Фенотип генерированных клеток исследовали с использованием моноклональных антител («Caltag Laboratories», США) против соответствующих антигенов. Клетки отмывали холодным фосфатно-солевым буфером (ФСБ) и окрашивали FITC (флюоресцеинизотионидат) и PE (фикоэритрин)-мечеными антителами согласно инструкции производителя. Затем отмывали 2 раза холодным ФСБ. Результаты учитывали на проточном цитометре FACS Calibur («Becton Dickinson», США). На клетках, полученных из мононуклеаров периферической крови доноров, исследовали уровни экспрессии молекул CD14, CD34, CD80, CD83, CD1a и CD11c. Гейт (окно) популяции клеток устанавливали на основе комбинации прямого и бокового светорассеяния и размера клеток. При учете результатов подсчитывали 10000 клеток в гейте. Статистическая обработка материала проведена при помощи программного пакета WIN MDI 2.8.

Морфо-гистохимическое исследование. Через 9 суток после начала культивирования из центрифугата

надосадочной жидкости культур МНК периферической крови, активированных GM-CSF, IL-4 и препаратом «Профеталь», были сделаны мазки, которые окрашивали на РНК по Браше с контрольной обработкой РНК-азой, эозин-азуром по Романовскому-Гимза, реактивом Шиффа по Шабадашу с контролем амилазой на гликоген и гликозаминогликаны [4]. В окрашенных по Браше мазках подсчитывали процентное содержание выявляемых клеток. Статобработка данных проводилась с использованием программы «ИПСО» (Россия).

Световая, фазово-контрастная микроскопия и фотографирование клеток, генерированных из мононуклеаров периферической крови, меченных антителами, во взвеси и в окрашенных мазках проводили с помощью системы AxioVision 4 (фирмы Carl Zeiss, Германия).

Результаты

Функциональная активность мононуклеарных лейкоцитов

Как следует из данных, представленных в табл. 1, «Профеталь» оказывает стимулирующее влияние на уровень цитотоксической активности МЛ по отношению к опухолевым клеткам линии К-562. Этот показатель достоверно повышается при воздействии препарата в концентрациях 0,01–10,0 мкг/мл по сравнению со спонтанной цитотоксичностью МЛ, достигая максимальных значений при инкубации с препаратом в дозе 1,0 мкг/мл. Самая низкая из испытанных концентраций препарата не сказывается на противоопухолевой активности МЛ.

Исследуемый препарат в используемых дозах проявляет себя также как митогенный фактор для мононуклеарных лейкоцитов крови здоровых доноров (табл. 2). Количество бластных форм в пульсированных им культурах увеличивается в 3–7 раз (в зависимости от дозы препарата) по сравнению с контрольной группой, а индекс стимуляции пролиферативной активности МЛ примерно составляет, соответственно от 3,2 (при дозе 0,01 мкг/мл) до 6,9 (при дозе 10,0 мкг/мл). При этом 97–98% мононуклеарных клеток сохраняют жизнеспособность.

Табл. 1. ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА «ПРОФЕТАЛЬ» НА ЦИТОТОКСИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ МОНОНУКЛЕАРОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ К ЛИНИИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК К-562 (n=15)

Концентрация препарата мкг/мл	Уровень цитотоксичности, %	
	Препарат «Профеталь»	МЛ (контроль)
10,0	78,0±4,6*	24,4±3,97
1,0	73,2±4,1*	
0,1	96,7±4,1**	
0,01	77,3±3,9*	
0,001	24,7±2,6	

Достоверность различий между контрольной (МЛ) и экспериментальными группами: * p < 0,05; ** p < 0,01.

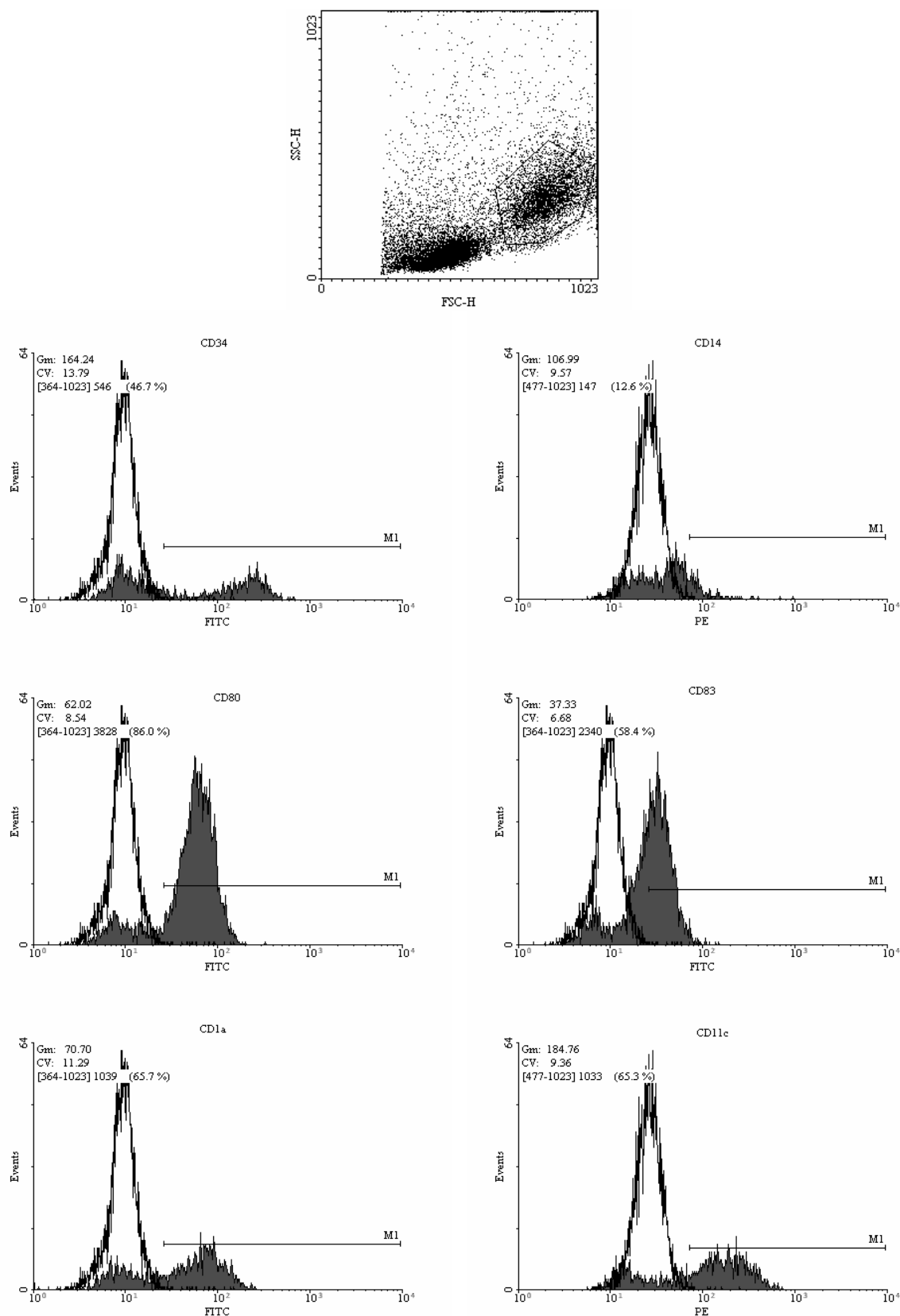


Рис. 1. Гистограммы, отражающие экспрессию поверхностных молекул (кластеров детерминации) зрелых ДК, полученных с использованием препарата «Профеталь» (1,5 мкг/мл): Верхний ряд, дотплот – светорассеяние (популяция зрелых ДК в очерченной области), на гистограммах левый пик – аутофлуоресценция клеток при использовании изотипического контроля, правый – флуоресценция (FITC – флуоресцеинизотиоцианат и R-PE – фикоэритрин) после окрашивания соответствующими антителами. По оси ординат – количество клеток, по оси абсцисс – интенсивность флуоресценции. Обозначения: CD – дифференцировочные антигены.

Табл. 2. ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА «ПРОФЕТАЛЬ» НА ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ И МИТОГЕНЕЗ МОНОНУКЛЕАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ (n=15)

Условия культивирования		Бластные формы, у.е M±m	Индекс стимуляции, M±m	Жизнеспособные клетки, % M±m
Контроль	–	0,095±0,02	–	98,0±0,5
α-фето-протеин (мкг/мл)	10,0	0,655±0,05**	6,9	96,9±0,6
	1,0	0,517±0,04**	5,4	97,5±0,8
	0,1	0,510±0,07**	5,4	98,0±2,5
	0,01	0,309±0,03*	3,2	98,0±2,4

Достоверность различий между контрольной и экспериментальными группами: * p < 0,05; ** p < 0,01.

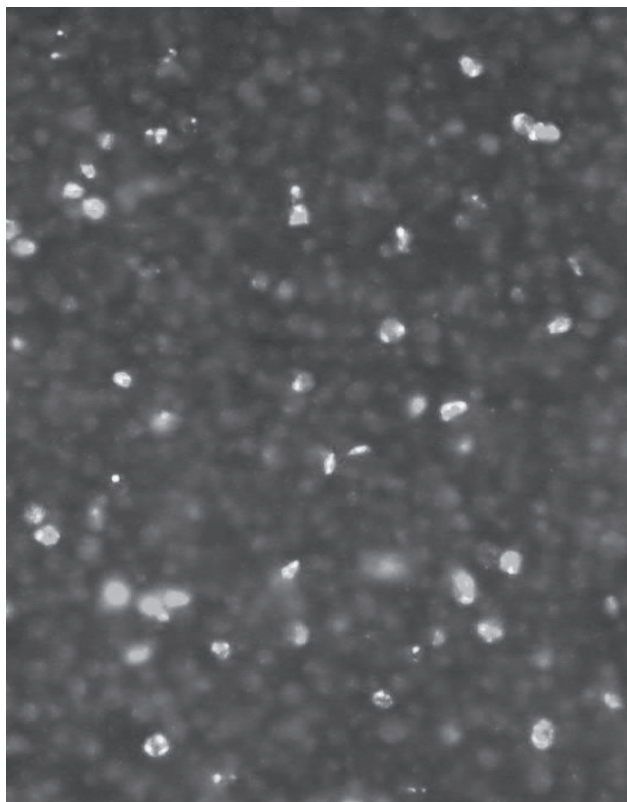
Влияние препарата на созревание ДК

Изучение дендритных клеток, полученных при коинкубации МЛ с GM-CSF и IL-4 в течение 6 суток, показало, что они имеют типичные морфологические и иммунофенотипические признаки незрелых ДК. Практически все рассматриваемые клетки экспрессируют на своей поверхности характерные для ДК маркер CD1a и костимулирующие молекулы (CD40, CD80 и CD86).

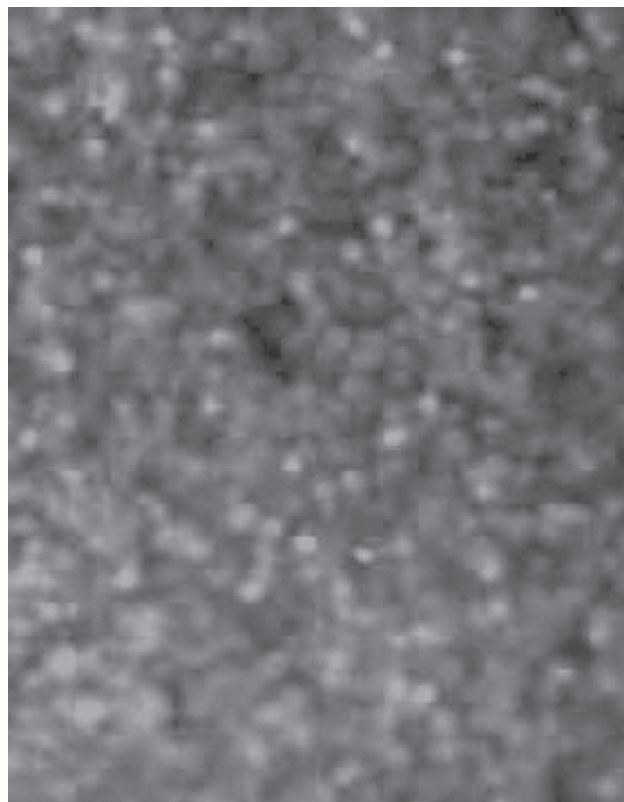
Влияние препарата «Профеталь» на созревание ДК оценивали, основываясь на изменении уровня экспрессии дифференцировочных молекул CD14, CD34, CD80, CD83, CD1a, CD11c и данных световой микроскопии культур через 3 суток после добав-

ления данного препарата к незрелым ДК. Согласно полученным данным, при стимуляции рассматриваемым препаратом большая часть незрелых ДК дифференцируется в зрелые формы, так как они приобретали высокий уровень экспрессии поверхностных молекул CD80, CD83, CD1a и CD11c (рис. 1, 2).

При исследовании иммунофенотипа обращает на себя внимание тот факт, что среди клеток, генерированных под действием общепринятых цитокинов, но с добавлением препарата «Профеталь», достаточно большое количество клеточных форм активно экспрессирует на своей поверхности молекулы антигенов, характеризующих популяцию клеток-предшественников — CD34⁺/CD45⁺ (рис. 1).



А



Б

Рис. 2. Зрелые дендритные клетки, генерированные из МЛ периферической крови доноров и меченные флуоресцирующими антителами, в культуральной взвеси на 9-е сутки инкубации (3 суток после пульсации препаратом «Профеталь»).

Микрофотография дендритных клеток при фазово-контрастной микроскопии: А) ДК CD83⁺. Окраска флуоресцеинизотиоцианатом (FITC). Ок. 10, об. 40. Б) ДК CD1a⁺. Окраска фикоэритрином (PE). Ок. 10, об. 40.



Рис. 3. Дендритные клетки, генерированные из МЛ периферической крови доноров, в культуре, активированной GM-CSF и интерлейкином-4 (7-е сутки инкубации). Микрофотография дендритной клетки, прилипшей к дну культурального сосуда. Окраска фуксином Циля. Ок. 10, об. 100.

При световой (рис. 3) и фазово-контрастной (рис. 2, 4) микроскопии выявлялись дендритные клетки, имеющие овальную, неправильную звездчатую или вуалевидные формы с характерными цитоплазматическими отростками. Цитоплазма дендритных клеток окрашивалась базофильно по Романовскому-Гимза, а при окраске по Браше в ней определялся исчезающий после обработки РНК-зой пиронинофильный компонент, свидетельствующий о наличии в клетках РНК (рис. А). Обработка Шифф-реактивом выявляла в цитоплазме ШИК-положительные гранулы, интенсивность окраски которых слегка уменьшалась после воздействия амилазой, что говорит о наличии в клетках как гликогена, так и гликозаминогликанов (рис. 5Б).

После пульсации культуры дендритных клеток, генерированных из мононуклеарных лейкоцитов периферической крови доноров, исследуемым препаратом, несколько изменялись гистохимические характеристики ДК. Цитоплазма приобретала более яркую пиронинофильную окраску, отражающую повышенное содержание в ней РНК. Пиронинофильные ядрышки в ядрах становились более крупными и многочисленными (Рис. 6А). Возрастало

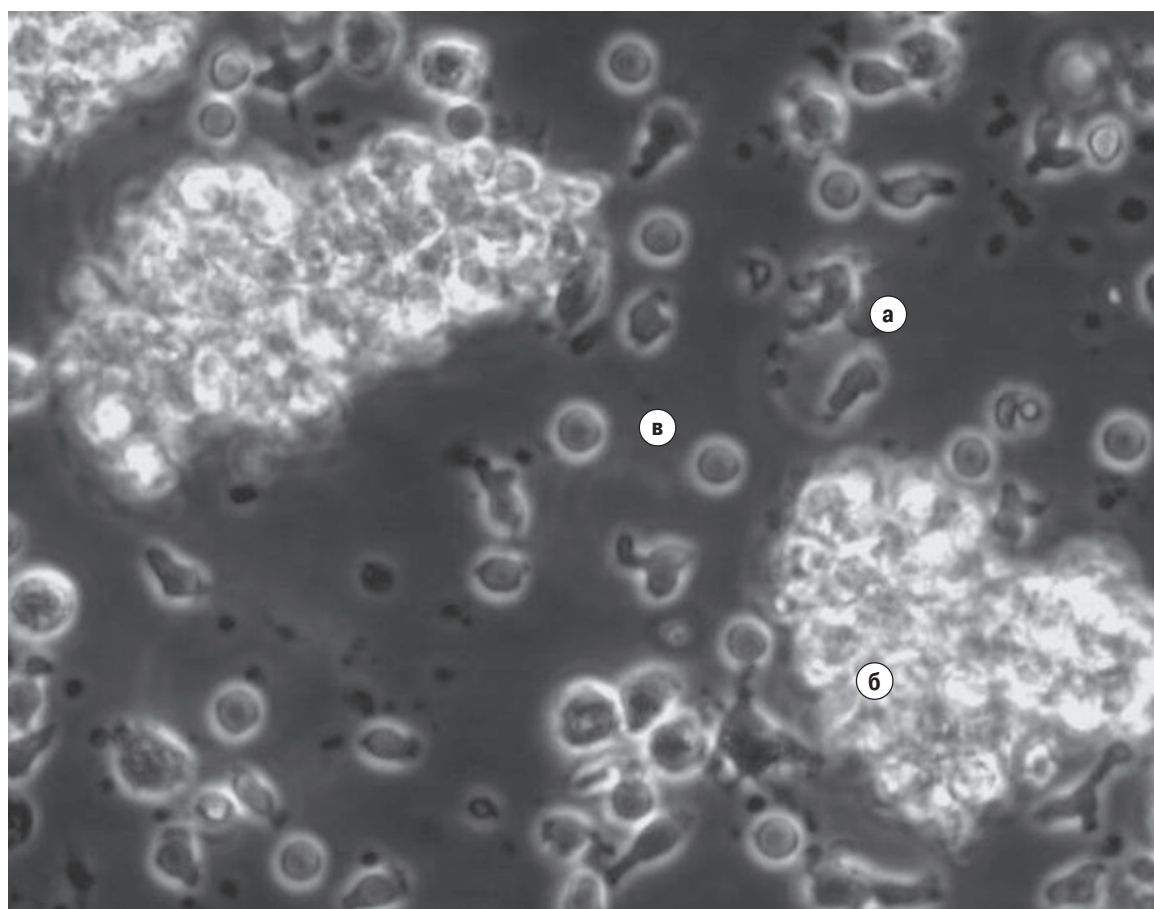
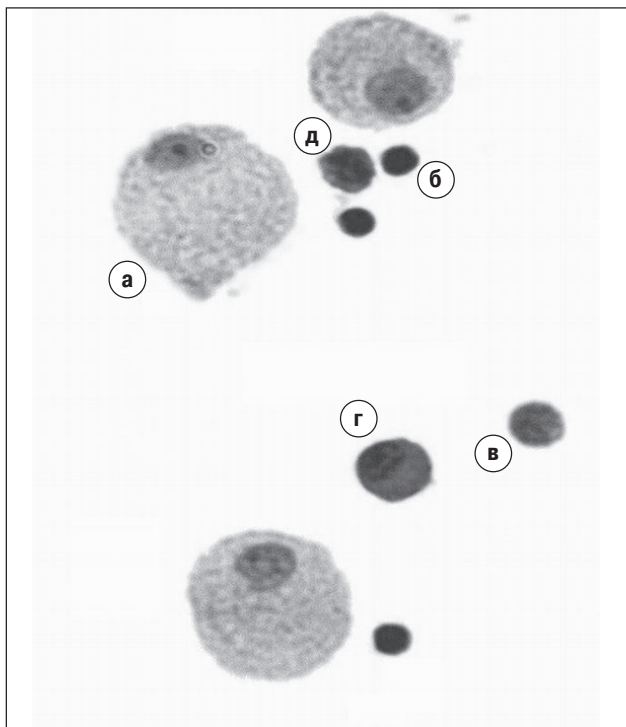
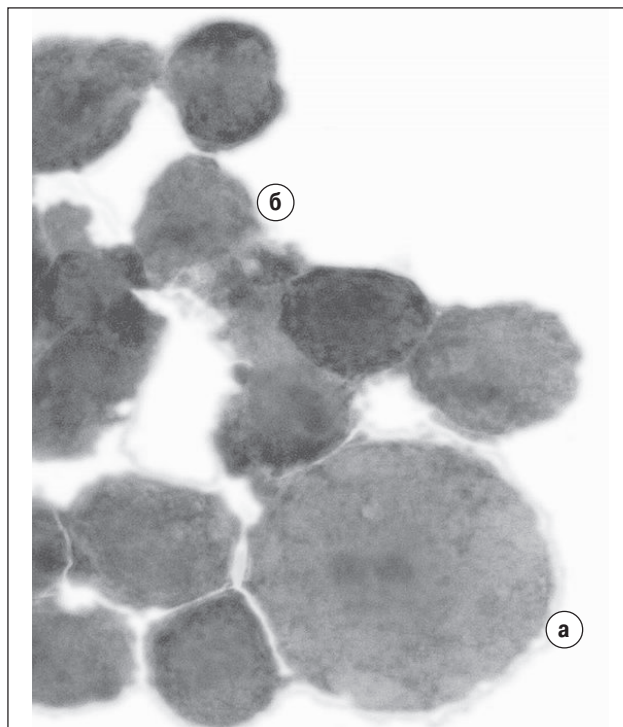


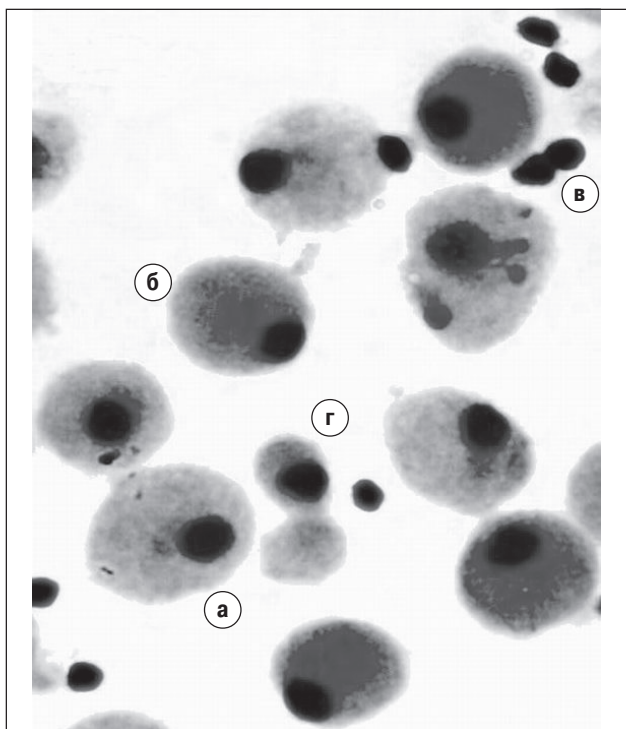
Рис. 4. Мононуклеарные клетки периферической крови доноров в культуре на 9 сутки инкубации (3 сутки после пульсации препаратом «Профеталь»). Микрофотография клеток при фазово-контрастной микроскопии культуральной взвеси в тёмном поле. Ок. 10, об. 40. а) зрелые ДК; б) колонии активированных лимфоцитов; в) бласты.



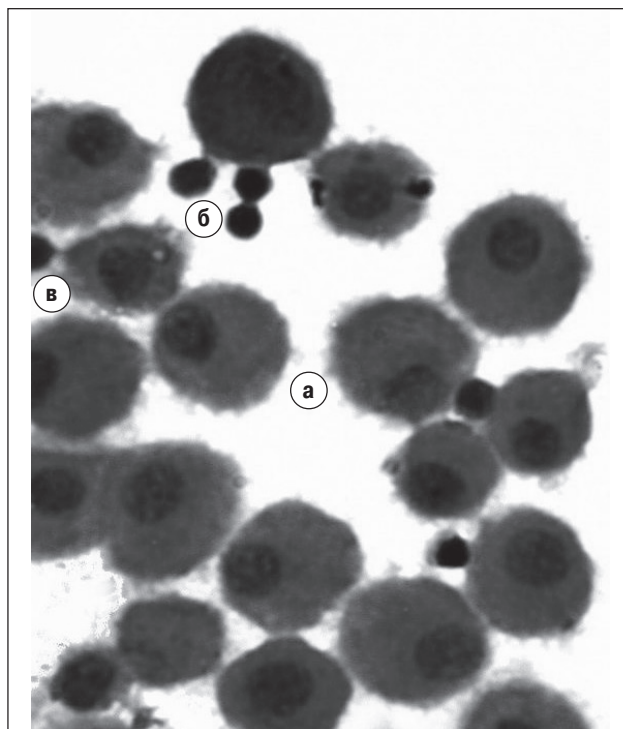
А



А



Б



Б

Рис. 5. Дендритные клетки, генерированные из МЛ периферической крови доноров, в культуре, активированной GM-CSF и интерлейкином-4 (7-е сутки инкубации). Микрофотография клеток в мазке культуральной взвеси. А) Окраска метиловым зелёным-пиронином по Браше. Ок. 10, об. 90. а) дендритная клетка, б) лимфоциты; в) моноцит; г) макрофаг; д) гранулоцит. Б) Окраска Шифф-реактивом по Шабдашу с контрольной обработкой амилазой. Ок. 10, об. 90. а) незрелая ДК; б) зрелая ДК; в) лимфоциты; г) макрофаг.

Рис. 6. Зрелые дендритные клетки, генерированные из МЛ периферической крови доноров, в культуре на 9-е сутки инкубации (3 сутки после пульсации препаратом «Профеталь»). Микрофотография клеток в мазке культуральной взвеси. А) Окраска метиловым зелёным-пиронином по Браше. Ок. 10, об. 90. а) зрелая ДК; б) макрофаг. Б) Окраска Шифф-реактивом по Шабдашу. Ок. 10, об. 90. а) зрелые ДК; б) лимфоциты; в) макрофаг.

также содержание гликогена и гликозаминогликанов (ШИК-положительные гранулы при окраске по Шабдашу имели более крупные размеры и увеличивались в количестве) (рис.6Б). В мазках появлялись клетки с морфологическими и гистохимическими характеристиками ДК в состоянии деления и многочисленные бластные формы (рис. 7).

Обсуждение

Препарат «Профеталь» оказывает существенное влияние на функциональную активность и дифференцировку мононуклеарных лейкоцитов периферической крови человека, а также на созревание генерированных из них дендритных клеток.

При введении в культуру исследуемых доз данного препарата статистически достоверно повышается и пролиферативная активность и уровень бласттрансформации МЛ. Это явление может рассматриваться, по-видимому, как проявление дедифференцировки зрелых лимфоцитов периферической крови под влиянием препарата «Профеталь», что подтверждается высоким содержанием в культурах CD34⁺/CD45⁺ клеток, относящихся к популяции стволовых гемопоэтических клеток. Очевидно также, что «Профеталь», индуцируя созревание ДК, усиливает их антигенпрезентирующую

способность и возможность стимулировать пролиферацию МЛ.

Увеличение цитотоксической активности мононуклеарных лейкоцитов под действием препарата может свидетельствовать о генерации активированных лимфоидных элементов.

Как известно, на поверхности мембран ДК экспрессируются маркеры антигенного представления (CD1a, МНС I, МНС II), костимулирующие молекулы (CD80, CD86, CD40), маркер терминальной дифференцировки CD83, маркеры моноцитов/макрофагов (CD14, CD68, CD115), адгезивные молекулы (CD54, CD58, семейство молекул CD11, CD29 и т.д.), хемокиновые рецепторы (CCR 1, 2, 5, 6, 7, CXCR4), цитокины и цитокиновые рецепторы (IL-12 и CD25) и другие молекулы [6, 10, 11, 15, 18, 23]. Изменение наборов поверхностных молекул дендритных клеток связано с изменением их функций в ходе созревания. Основная тенденция определяется переходом от захвата и процессинга антигена к процессам межклеточного взаимодействия. Зрелые ДК обладают рядом особенностей, позволяющих им максимально эффективно, по сравнению с незрелыми формами, представлять антиген эффекторам иммунных реакций. Только зрелые ДК экспрессируют высокий уровень костимулирующих молекул, обеспечивающих формирование вспомогательных сигнала

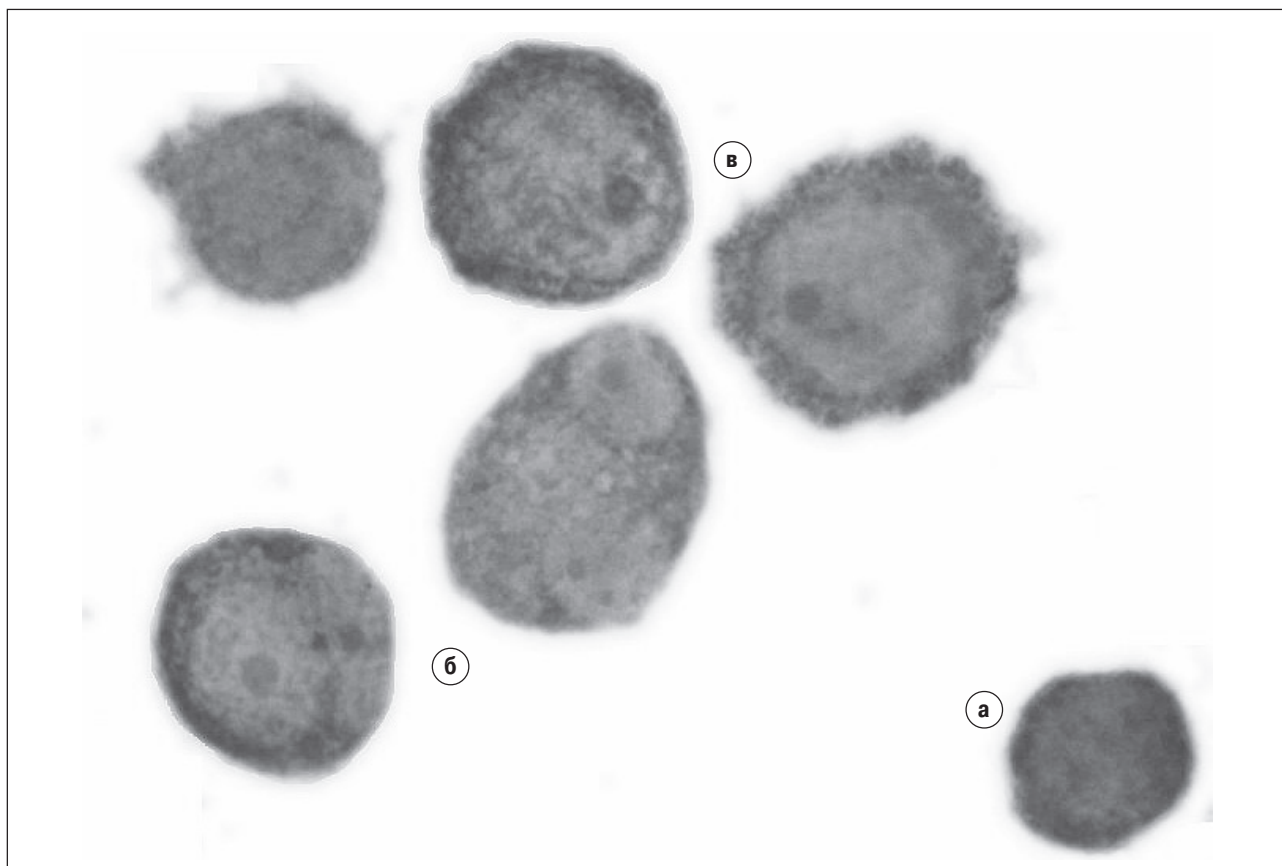


Рис. 7. Мононуклеарные клетки периферической крови доноров, в культуре на 9-е сутки инкубации (3 сутки после пульсации препаратом «Профеталь»).

лов при активации лимфоцитов, и высокий уровень молекул МНС I и МНС II, обеспечивающих эффективное представление антигена [28]. Зрелые ДК секретируют значительное количество цитокинов и хемокинов, необходимых для хемотаксиса и активации Т-клеток и других эффекторов иммунной системы [14, 21].

Практически все дендритные клетки, полученные в наших опытах из МЛ доноров при активации препаратом «Профеталь», имели иммунофенотипические признаки зрелых ДК: высокий уровень экспрессии маркеров антигенного представления (CD1a), костимулирующих молекул (CD80), адгезивных молекул (CD11c) и, наконец, основной показатель зрелости ДК — высокий уровень экспрессии антигена терминальной дифференцировки — CD83. Данные морфологических исследований соответствовали функциональным и иммунофенотипическим показателям, характеризующим клетки, полученные в культурах при действии препарата, как зрелые ДК.

Следовательно, изученный препарат в данных концентрациях является активным иммуномодулирующим фактором, способным вызывать созревание дендритных клеток, и может повышать цитотоксическую и пролиферативную способность мононуклеарных лейкоцитов. Весьма вероятно, что «Профеталь» приводит к дедифференцировке зрелых лимфоцитов вплоть до образования стволовых гемопоэтических клеток. Препарат может быть использован для биотерапии онкологических и инфекционных заболеваний.

Список литературы

1. Барышников А.Ю. Взаимоотношение опухоли и иммунной системы организма // Практическая онкология. - 2003. - Т. 4. - № 3. - С. 127-129.
2. Киселевский М.В., Титов К.С., Тер-Ованесов М.Д. Перспективы адоптивной иммунотерапии радикально оперированного рака желудка // Российский биотерапевтический журнал. - 2002. - № 4. - С. 46-48.
3. Кузнецова А.В., Данилова Т.И., Гладских О.П., Иванов А.А., Пальцев М.А. Дендритные клетки и их использование в иммунотерапии // Молекулярная медицина. - 2003. - № 3. - С. 3-17.
4. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия / М.: Мир, 1969. - С. 128-131.
5. Пальцев М.А. Введение в молекулярную медицину / Под редакцией Пальцева М.А. - М.: ОАО Изд-во «Медицина», 2004. - 496 с.
6. Пашенков М.В., Пинегин Б.В. Основные свойства дендритных клеток // Иммунология. - 2001. - № 3. - С. 7-16.
7. Родина А.В., Москалева Е.Ю., Беляев Д.Л. Получение функционально активных дендритных кле-

ток человека с использованием препарата лейкинферон в качестве индуктора созревания // Аллергия, астма и клиническая иммунология. - 2003. - Т. 7. - № 9. - С. 19-27.

8. Черешнев В.А., Родионов С.Ю., Черкасов В.А., Малютина Н.Н., Орлов О.А. / Альфа-фетопротеин. - Екатеринбург: УрО РАН, 2004. - 376 с.

9. Чикилева И.О., Халтурина Е.О., Киселевский М.В. Современные подходы и направления в иммунотерапии и иммунопрофилактике злокачественных новообразований // Молекулярная медицина. - 2003. - № 2. - С. 40-50.

10. Ardavin C, Martinez del Hoyo G., Martin P. Origin and differentiation of dendritic cells // Trends in Immunology. - 2001. - V. 22. - P. 691-700.

11. Banchereau J., Steinman R. M. Dendritic cells and the control of immunity // Nature - 1998. - V. 392. - P. 245-252.

12. Blymenberg A.G., Kiselevski M.V., Gorbunova V.A., Volkov S.V., Kadagidze Z.G. Immunotherapy IL-2/LAK for the treatment of platinum and taxman-resistant advanced // International journal of gynecological cancer. - 2002. - V. 12. - N. 5. - P. 70.

13. Carlens S., Gilljam M., Chambers B.J., Aschan J., Guven H., Ljunggren H.G., Christensson B., Dilber M.S. A new method for *in vitro* expansion of cytotoxic human CD3-CD56+ natural killer cells // Hum. Immunol. - 2001. - V. 62. - P. 1092-1098.

14. Chen Z., Dehm S., Bonham K. DNA array and biological characterization of the impact of the maturation status of mouse dendritic cells on their phenotype and antitumor vaccination efficacy // Cell Immunol.- 2001.- V. 214.- P. 60-71.

15. Cho B.K. A proposed mechanism for the induction of cytotoxic T lymphocyte production by heat shock fusion proteins // Immunity. - 2000. - V. 12. - P. 263-272.

16. Dhodapkar M.V. Active immunization of humans with dendritic cells // J. Clin. Immunol. - 2000. - V. 20. - P. 167-173/

17. Dudich E.I., Semenkova L.N., Dudich I.V. et al. Alpha-fetoprotein-induced apoptosis of cancer cells // Bull. Biol. Med. - 2000. - V. 130. - № 12. - P. 1127-1133.

18. Enk A.H. & Jonuleit H. How do dendritic cells prevent autoimmunity: what is a mature dendritic cell in the mouse? // Trends in Immunology. - 2001. - V. 22. - P. 547-553.

19. Falk C.S., Noessner E., Weiss E.H., Schendel D.J. Retaliation against tumor cells showing aberrant HLA expression using lymphokine activated killer-derived T cells // Cancer Res. - 2002. - V. 62. - P. 480-487.

20. Ferlazzo G., Wesa A., Wei W.Z. Dendritic cells generated from CD34+ progenitor cells or from monocytes differ in their ability to activate antigen-specific CD8+ T cells // J. Immunol. - 1999. - V. 163. - P. 35-97.

21. Granucci F., Andrews D.M., Degli-Esposti M.A. IL-2 mediates adjuvant effect of dendritic cells // Trends in Immunology. - 2002. - V. 23. - P. 169-171.
22. Heufler C., Koch F., Stanzl U. Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 developments as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells // J. Immunol. - 1996. - V. 26. - P. 659-668.
23. Jefford M., Maraskovsky E., Cebon J., Davis I. D. The use of dendritic cells in cancer therapy // Lancet Oncol. - 2001. - V. 2. - P. 343-353.
24. Keller R. Dendritic cells: their significance in health and disease // Immunol. Letters. - 2001. - V. 78. - P. 113-122.
25. Lotze M.T. Thomson A.W. Dendritic cells. Biology and clinical applications / N-Y.: Academic Press. - 1999. - P. 214-237.
26. Nishiyama T., Tachibana M., Horiguchi Y. Immunotherapy of bladder using autologous dendritic cells pulsed with human lymphocyte antigen-A24-specific MAGE-3 peptide // Clin. Cancer. Res. - 2001. - V. 7. - P. 23-31.
27. Nouri-Shirazi M., Banchereau J., Fay J. Dendritic cell based tumor vaccines // Immunol. Letters. - 2000. - V. 74. - P. 5-10.
28. Reid C.D.L. Dendritic cells and immunotherapy for malignant disease / C.D.L. Reid // British J. Haematol. - 2001. - V. 112. - P. 874-887.
29. Thurner B., Haendle I., Roder C. Vaccination with MAGE-3 A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma // J. Exp. Med. - 1999. - V. 190. - P. 1669-1678.
30. Valone F.H., Small E., MacKezie M. Dendritic cell-based treatment of cancer: closing in on a cellular therapy // Cancer J. - 2001. - V. 7. - P. 53-61.

*поступила в редакцию 28.07.2005
принята к печати 15.11.2005*