УДК: 611.018.21:615.375:616-006
doi:10.22494/cot.v4i2.63

Фенотипові та функціональні властивості диференційованих дендритних клітин у хворих на рак легенів

Крановська Н. М., Скачкова О. В., Совенко В. М., Сидор Р. І., Іномістова М. В., Мельник В. О.
Національний інститут раку, Київ, Україна

e-mail: nkhranovska@ukr.net

РЕЗЮМЕ

Використання дендритних клітин (ДК) в якості «природних ад'ювантів» знаходить широке застосування в різних напрямках імунотерапії раку. Метою дослідження було визначити фенотипові та функціональні властивості ДК, отриманих з моноцитів периферичної крові практично здорових людей та хворих на злоякісні новоутворення.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ. *Дослідження проведено з використанням біологічного матеріалу 40 хворих на недрібноклітинний рак легенів та 10 практично здорових осіб. Моноцити периферичної крові виділяли на градієнті щільності фіколу (1,077) та культивували протягом 8 діб в середовищі RPMI-1640 з додаванням 1 % аутологічної плазми, 100 нг/мл гранулоцитарно-макрофагального колонієстимулюючого фактора, 20 нг/мл інтерлейкіну-4. На 6-ту добу культивування до ДК хворих в якості джерела пухлиноасоційованих антигенів вносили аутологічні ліофілізовані пухлинні клітини, а через 24 год. додавали 100 нг/мл ліпополісахариду та 10 тис. МО/мл 2αb-IFN. Фенотипові та функціональні характеристики клітин визначали за допомогою проточної цитофлуориметрії та полімеразно-ланцюгової реакції з реєстрацією результатів в режимі реального часу.*

РЕЗУЛЬТАТИ. *Встановлено, що ДК хворих до початку імунотерапії мали середній ступінь зрілості та більш толерогенні властивості (вищий рівень експресії мРНК імуносупресивних молекул TGF-β, IDO та меншу кількість біоактивного IL-12) у порівнянні із ДК практично здорових людей. Активність гена CCR7 у ДК хворих практично не порушена, що свідчить про збереження міграційних властивостей у даних клітинах. Виявлено, що рівень експресії маркеру CD83, який визначає ступінь зрілості ДК, зростав з кожним наступним етапом імунотерапії, а рівні експресії мРНК TGF-β, IL-10 та IDO знижувались до рівня у ДК практично здорових людей.*

ВИСНОВКИ. *Таким чином, встановлення біологічних характеристик ДК дасть змогу удосконалити та розробити найбільш ефективні протоколи виготовлення та раціонального застосування ДК-вакцин. Одержані дані свідчать про необхідність подальшої оптимізації технологій одержання ДК у хворих на рак легенів з акцентом на стимуляцію їх Th1–поляризуючих властивостей за рахунок підвищення цитокінсекреторного потенціалу.*

КЛЮЧОВІ СЛОВА: *рак легенів; імунотерапія; дендритні клітини; TGF-β; IDO; IL-12*

Відомо, що найбільш потужні спеціалізовані антигенпрезентуючі дендритні клітини (ДК) здатні активувати всі основні ефектори протипухлинного імунітету, а саме $CD8^+$ Т-клітини, Т-хелпери 1 типу (Th1), натуральні клітини-кілери (НК) і НК Т-лімфоцити (НКТ). Саме тому використання ДК в якості «природних ад'ювантів» знаходить широке застосування в різних сферах імунотерапії, однією зі складових якої є вакцинотерапія раку [1-3].

Існують методи мобілізації ДК в організмі онкологічних хворих, що передбачає введення ростових факторів та цитокінів, таких як гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор (ГМ-КСФ) людини, ліганд Fms-подібної тирозинкінази 3 (FLT-3L), IL-12, IL-15, CD40L і TNF-α. Після експансії ДК *in vivo* хворим вводять пухлинні антигени. Разом з тим констатується, що ендогенні ДК, які дозріли в організмі хворого з онкопатологією, виявляються значно менш ефективними у порівнянні з ДК, які одержані шляхом культивування *in vitro*. Слід зазначити, що в імунотерапії раку найбільшого поширення набули методи вирощування аутологічних ДК з попередників в достатніх кількостях поза організмом, навантаження їх пухлиноасоційованими антигенами (ПАА) та індукції дозрівання з подальшим введенням хворому [4, 5]. У даному випадку імунна

відповідь на ПАА починається *in vitro*, де можна досить точно контролювати кількість і функціональний стан ДК, а закінчується в організмі утворенням специфічних цитотоксичних Т-лімфоцитів (ЦТЛ). Крім того, пластичність функціональної активності незрілих ДК дозволяє, варіюючи умови *in vitro*, одержувати з них клітини з визначеними властивостями, зокрема зі здатністю активувати імунологічні реакції із залученням переважно клітинної ланки імунної системи. Для цього до набору цитокінів, який використовується для культивування ДК, вводять фактори, що стимулюють їхнє дозрівання [6-8].

Ступінь зрілості вважається вкрай важливою характеристикою ДК при їх використанні в якості природних ад'ювантів в складі протипухлинних вакцин [9-11]. Це обумовлено тим, що використання ДК незрілого фенотипу, які володіють слабкими імуногенними властивостями, може призводити до абортивної проліферації і анергії клітин-ефекторів, індукції толерантності до пухлинних антигенів в результаті активації $CD4^+$ та $CD8^+$ регуляторних Т-клітин (T_{reg}), які секретують IL-10 та TGF-β.

Слід зазначити, що чітких критеріїв стандартизації ДК при створенні протипухлинних вакцин не існує. Вони мають відповідати цілому ряду вимог, що відображають їхню здатність до презентації антигенів та стимуляції Т-клітин: бути життєздатними, експресувати високий рівень маркерів зрілості, костимуляторних молекул та молекул адгезії, секретувати цитокіни, мати здатність активувати ЦТЛ та Th1-опосередковану імунну відповідь, а також експресувати хемокіновий рецептор CCR7, який є необхідним для міграції ДК до дренуючих лімфатичних вузлів [12-14].

Як було показано, у онкологічних хворих функціональна активність ДК, отриманих з попередників, як правило, знижена, зокрема вони часто є нечутливими до багатьох активуючих стимулів та залишаються незрілими. Протипухлинна хіміо- та променева терапія також можуть бути причиною зниження ефективності утворення та гальмування дозрівання ДК, що може лімітувати і ускладнювати їхнє застосування [15, 16]. Разом з тим констатується, що незрілі або частково зрілі ДК також є оптимальною популяцією для їхнього використання у протипухлинній імунотерапії [17-19]. Зокрема, перша комерційна вакцина Sipuleucel-T (*Dendreon*, США) для терапії хворих на гормонорефрактерний метастатичний рак передміхурової залози, схвалена FDA, містить суміш незрілих та частково зрілих ДК, навантажених пептидами простатспецифічного антигену [20]. З іншого боку, деякі автори відмічають у зрілих ДК суттєвий недолік – дефіцит хоумінг-рецептора CD62L для міграції до лімфатичних вузлів з кровоносного русла через ендотеліальний шар [21, 22].

На теперішній час оптимальні комбінації індукторів дозрівання ДК для їхнього використання в імунотерапії раку не встановлені, а протоколи одержання функціонально зрілих ДК не є стандартизованими, тому пошук найбільш ефективних поєднань факторів для одержання функціонально зрілих ДК, придатних для використання у складі протипухлинних вакцин, залишається актуальною проблемою. Велика увага приділяється використанню лігандів toll-подібних рецепторів (toll-like receptors – TLR), зокрема ліпополісахариду (LPS) або poly(I:C) [23, 25]. Застосування лігандів TLR у комбінації з цитокінами забезпечує дозрівання ДК, яке супроводжується фенотиповими та функціональними змінами, такими як набуття Th1-поляризуючого потенціалу [24, 26].

У наших попередніх дослідженнях було показано, що поєднання двох активуючих сигналів в схемі отримання моноцитарних ДК (IFN-α та LPS) має істотний модулюючий вплив на їхню цитокін- та хемокін-секреторну активність, обумовлюючи домінування прозапального потенціалу та покращуючи життєздатність [27]. Одержані результати послужили обґрунтуванням використання цієї технології для отримання ДК при імунотерапії хворих на недрібноклітинний рак легенів (НДРЛ).

Оцінку ефективності протипухлинної вакцини на основі дендритних клітин проводили в рамках III фази клінічних випробувань «Рандомізоване подвійне, що проводиться в паралельних групах, дослідження ефективності дендритно-клітинної аутовакцини при її додаванні до стандартного хірургічного лікування у хворих на недрібноклітинний рак легенів IIB–IIIA стадії». У рамках цього дослідження була вивчена ефективність включення протипухлинної вакцини на основі ДК в комплексне лікування таких пацієнтів в ад'ювантному режимі та встановлені особливості розвитку клітинно-опосередкованої імунної відповіді у хворих під впливом протипухлинної імунотерапії.

У результаті клінічного дослідження було встановлено, що застосування протипухлинної вакцини на основі ДК в комплексному лікуванні пацієнтів з НДРЛ сприяло суттєвому підвищенню їхньої 5-річної загальної та безрецидивної виживаності, подовженню часу до початку прогресування захворювання, збільшенню медіани виживаності [28]. Зокрема, показник загальної 5-річної виживаності хворих збільшувався на 25 %, $p < 0,001$; HR= 0,22 (95 % CI: 0,13-0,39).

На теперішній час важливим є визначити у клінічних дослідженнях характеристики ДК, що мають терапевтичну ефективність. Виходячи з цього, метою роботи було дослідити фенотипові та функціональні властивості ДК моноцитарного походження, що застосовувалися в якості клітинної основи в протипухлинній імунотерапії хворих на недрібноклітинний рак легенів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Культивування дендритних клітин. ДК отримано з моноцитів периферичної крові 10 практично здорових людей віком від 23 до 45 років (34,9 ± 5,4) та 40 хворих на НДРЛ IIБ-IIIA стадії віком від 42 до 82 років (53,9 ± 3,4). Лейкоцити розділяли методом центрифугування у градієнті щільності фіколу «Histopaque-1077» (*Sigma*, США), після чого клітини ресуспендували в середовищі RPMI-1640 (*Sigma*, США) з додаванням 2 мМ/л L-глутаміну, 100 мкг/мл стрептоміцину та 100 од/мл пеніциліну (*Дарниця*, Україна) та інкубували у пластиковому культуральному флаконі при температурі 37 °С та 5 % вмісту CO_2 протягом 2-3 годин. Потім клітини злегка струшували та видаляли шляхом змивання ті, що не прикріпилися. Концентрацію клітин доводили до $0,5 \cdot 10^6$/мл середовищем культивування та додавали 1 % аутологічної плазми, 100 нг/мл ГМ-КСФ людини Leucomax (*Novartis*, Індія), 20 нг/мл інтерлейкіну-4 (*Sigma*, США) та культивували 8 діб в CO_2-інкубаторі при температурі 37 °С та 5 % вмісту CO_2. Ростові фактори повторно додавали до ДК на 3-ю добу культивування. На 6-ту добу культивування до ДК хворих в якості джерела пухлиноасоційованих антигенів додавали аутологічні ліофілізовані пухлинні клітини в концентрації 0,05 мг/мл культурального середовища. На 7-му добу дозрівання до ДК додавали 100 нг/мл ліпополісахариду (*Sigma*, США) та 2αb-інтерферону «Лаферобіон» (*Біофарма*, Україна) в концентрації 10 тис. МО/мл. Всі маніпуляції проводили з дотриманням правил асептики.

У хворих на НДРЛ імунотерапію на основі ДК призначали в ад'ювантному режимі після основного лікування. Проведення імунотерапії починали через 10-14 діб після оперативного лікування. Аутологічні ДК вводили внутрішньовенно, кількість клітин на одне введення складала $3,0\text{-}10,0 \cdot 10^6$. Усім хворим проводили 4 ін'єкції (етапи терапії) з періодичністю 1 раз на місяць. Усі хворі були сповіщені про проведення досліджень і дали інформовану згоду на їх виконання. Дослідження проводились згідно належних юридичних та етичних норм, визначених українським законодавством. У хворих на НДРЛ вони проводились в рамках III фази клінічних досліджень (протокол засідання № 5.12-1201/КЕ Центральної комісії з питань етики МОЗ України від 05.11.2009 р.).

Імунофлуоресцентні методи. Аналіз фенотипових характеристик ДК проводили методом проточної цитофлуориметрії з використанням моноклональних антитіл до маркерів CD83, CD86, мічених FITC, та антитіл до HLA-DR, мічених фікоеритрином (*Beckman Coulter*, США). Зразки аналізували на проточному цитофлуориметрі BD FACSCalibur (*Becton Dickinson*, США) за допомогою програмного забезпечення CellQuest-PRO (*Becton Dickinson*, США).

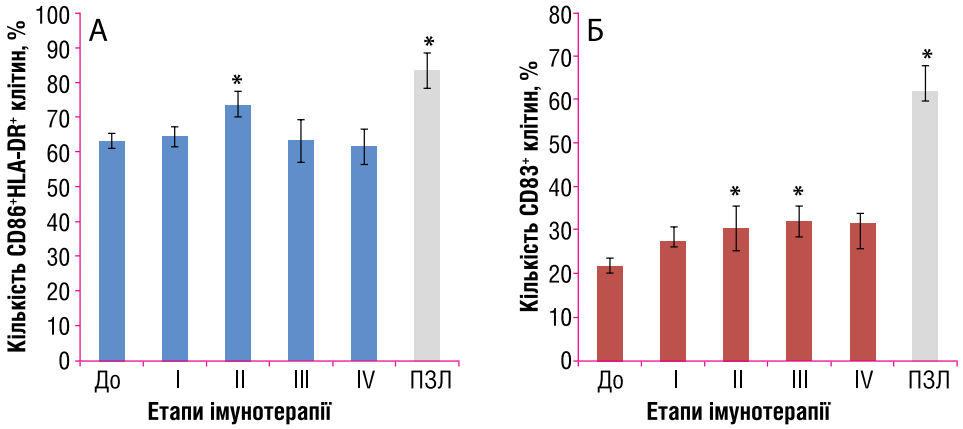


Рис. 1. Фенотипові характеристики дендритних клітин хворих на НДРЛ на етапах проведення імунотерапії (n = 34) та практично здорових людей – ПЗЛ (n = 10).

*Примітка: * – p < 0,05 у порівнянні зі значеннями до початку імунотерапії.*

Метод кількісної полімеразно-ланцюгової реакції (кПЛР). Загальну РНК з клітин виділяли з використанням реагентів «Рибо-золь-А» (*Амплисенс*, Росія) згідно з інструкціями виробника. Для проведення реакції зворотної транскрипції використовували тест-набір ПЛР «Реверта-L-100» (*Амплисенс*, Росія).

Рівень експресії мРНК генів цитокінів IL-12p35, IL-12p40, INF-γ, IL-10, TNF-α та хемокіну CCR7 визначали за допомогою методу кількісної ПЛР з детекцією результатів в режимі реального часу на приладі 7500 Real-Time PCR Systems (*Applied Biosystems*, США) з використанням специфічних праймерів та зондів (для IL-12p35, IL-12p40) або флуорохрома SYBRGreen (*Termo Scientific*, США) для інших. Послідовності праймерів та зондів були підібрані з використанням програми Primer Express® Software v3.0 та синтезовані компанією *Applied Biosystems* (США). Відтворюваність результатів ампліфікації було перевірено в паралельних експериментах шляхом повторення кПЛР на зразках РНК із кожним праймером не менше трьох разів. Після кожного циклу ампліфікації зчитувалась флуоресценція барвника SYBR Green, а по закінченні реакції будувалась крива плавлення для контролю утворення димерів праймерів та специфічності реакції. Початкову кількість мРНК обраховували методом порівняння CT (ΔΔCT), ефективність ПЛР реакцій була однаковою (Ex $=10^{-1/slope}-1$, slope < 0,1). Рівень експресії генів цитокінів оцінювали за допомогою методу ΔΔCT з нормуванням щодо експресії контрольного гена гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (GAPDH).

Визначення концентрації цитокіну IL-12p70 в культуральному середовищі диференційованих ДК проводилось за допомогою твердофазного ферментного імуносорбентного методу (ELISA) із застосуванням тест-системи IL-12 (p70) ELISA Kit Human (*Termo Scientific*, США) згідно з рекомендаціями виробника на автоматичному аналізаторі GBG ChemWell 2910 (США).

Статистичні методи. Статистична обробка проводилася із застосуванням пакета програм Statistica 10.0 (*Stasoft Inc.*, США). Для порівняння даних у двох групах використовували t-критерій Стьюдента та тест Манна-Уітні. Різниця вважалася статистично достовірною при p < 0,05.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

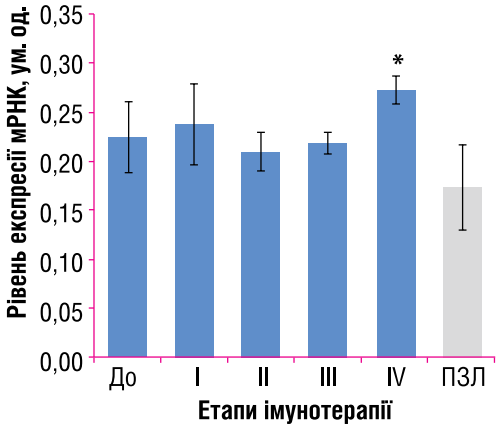
Контроль якості ДК включав оцінку фенотипових характеристик на кінцевому етапі виготовлення ДК-вакцини безпосередньо перед її введенням. Фенотип ДК свідчить про готовність клітин до виконання певних функцій: взаємодії з Т-клітинами, компонентами мікрооточення певних тканин, секреції цитокінів. Основними маркерами ДК, які характеризують ступінь їх зрілості та функціональну здатність, є поверхневі молекули CD80, CD86, CD40, CD83 та HLA-DR та ін. [29-31]. Фенотип ДК залежить від стадії дозрівання та активації.

Як показали наші дослідження, ДК хворих на НДРЛ до початку імунотерапії були частково зрілими (**рис. 1**). Так, рівень одночасної експресії CD86+ та HLA-DR+-антигенів становив 63,50 ± 2,15 %, а експресія антигену CD83 склала 21,44 ± 1,70 % проти 83,39 ± 4,91 % та 62,02 ± 5,67 % відповідно у практично здорових осіб (ПЗЛ), p < 0,05. Виявлено, що рівень експресії маркеру CD83, який визначає ступінь зрілості ДК, дещо зростав з кожним наступним етапом імунотерапії, але не досягав рівня ПЗЛ. Рівень експресії маркерів, що характеризують антигенпрезентуючу функцію ДК, на етапах проведення імунотерапії залишався майже без змін.

Сучасні вимоги до оцінки властивостей ДК не обмежуються лише фенотипом, констатується необхідність визначення функціональної активності, перш за все, Th1 поляризуючої. Після культивування *ex vivo* ДК повинні бути життєздатними, оскільки можуть достатньо довго не зустріти антигенспецифічні Т-клітини в лімфатичних вузлах. Встановлено, що дозрівання ДК полегшує їх виживання і, таким чином, має антиапоптотичну дію – це відбувається переважно при посиленні експресії Bcl-xL та Bcl-2 [32]. Крім того, доведено, що дозрівання ДК захищає їх від елімінації НК клітинами [33].

При дослідженні за допомогою проточної цитометрії експресії антиапоптотичного білка Bcl-2 у ДК хворих на НДРЛ встановлено, що його рівень практично не відрізнявся від рівня у ДК практично здорових людей та майже не змінювався на етапах проведення імунотерапії. Так, відсоток клітин, що експресують Bcl-2, та показник інтенсивності експресії цього білка за середньою інтенсивністю флуоресценції (показник MFI) в ДК хворих на НДРЛ склали 97,51 ± 0,73 % та 1001,16 ± 247,17 од. проти 98,93 ± 1,15 % та 1123,36 ± 215,16 од. в ДК практично здорових осіб відповідно.

Рис. 2. Рівень експресії мРНК CCR7 в дендритних клітинах хворих на НДРЛ на етапах імунотерапії (n = 16) та у практично здорових людей – ПЗЛ (n = 10).



*Примітка: * – p < 0,05 у порівнянні зі значеннями до початку імунотерапії.*

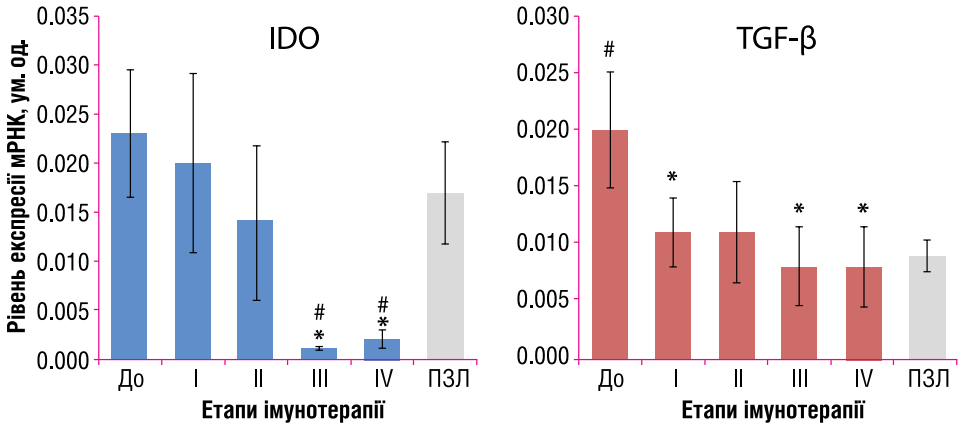


Рис. 3. Рівень експресії мРНК IDO та TGF-β в дендритних клітинах хворих на НДРЛ на етапах імунотерапії (n = 17) та у практично здорових людей – ПЗЛ (n = 10).

Примітки:
** – p < 0,05 у порівнянні зі значеннями до початку імунотерапії;*
 # – p < 0,05 у порівнянні зі значенням у практично здорових осіб.

Реалізація функцій ДК багато в чому визначається їх локалізацією в організмі та здатністю до міграції. Процес міграції ДК регулюється взаємодією хемокінів з їхніми рецепторами та різноманітними протеазами з відповідними рецепторами, наприклад, урокіназний плазміногенний активатор – система (uPA)/uPAR. Основним хемокіновим рецептором, що відповідає за міграцію ДК, є CCR7. Міграцію до Т-зон лімфатичних вузлів забезпечують хемокіни CCL19 (ELC) і CCR21 (SLC), що розпізнаються рецептором CCR7. Ці хемокіни секретуються стромальними клітинами лімфовузлів.

Як показали результати наших досліджень, активність гена CCR7 у ДК хворих на НДРЛ практично не порушена, рівень експресії його мРНК навіть дещо перевищує рівень у ДК практично здорових людей (**рис. 2,** див. с. 158). Слід зазначити, що після IV етапу різниця у рівнях експресії мРНК CCR7 у ДК хворих на НДРЛ та практично здорових людей ставала статистично достовірною.

Одночасно зі здатністю індукувати активацію імунокомпетентних клітин ДК можуть і пригнічувати імунну відповідь. Толерогенні регуляторні властивості ДК обумовлені різними механізмами, в тому числі здатністю експресувати коінгібіторні молекули і рецептори (B7-H1, ILT-2, ILT-3, ILT-4, CD209, CD200R і HLA-G), продукувати імуносупресивні цитокіни (IL-10, IDO, TGF-β) та індукувати генерацію $CD4^+CD25^+$ Treg клітин [34-36].

Толерогенні ефекти ДК супроводжуються набуттям або посиленням експресії певних молекул, для чого необхідна активація генів. Як показали результати наших досліджень, рівень експресії мРНК імуносупресивних молекул у ДК хворих на НДРЛ підвищений порівняно з ДК практично здорових людей, зокрема для TGF-β $p < 0,05$ (**рис. 3**).

До IV етапу проведення імунотерапії рівень експресії мРНК TGF-β знижувався до рівня у практично здорових людей. Рівень експресії мРНК ферменту IDO також суттєво знижувався на III-IV етапах імунотерапії, причому його рівень був значно нижчим порівняно з таким до початку імунотерапії і рівнем у ДК практично здорових людей.

Основним цитокіном, що визначає Th1-поляризуючі властивості дендритних клітин, є IL-12. Біоактивний IL-12p70 – це гетеродимер, який складається з двох субодиниць p35 та p40. Наші дослідження показали, що в рівнях експресії цих цитокінів у ДК хворих на НДРЛ (до початку проведення імунотерапії) та у практично здорових людей суттєвих відмінностей немає (**рис. 4**). Дещо нижчий рівень мРНК IL-12p35 та імуносупресорного IL-10 зареєстровано для клітин практично здорових людей.

Разом з тим дослідження кількості біоактивного IL-12 в культуральному середовищі ДК показало порушення його синтезу у хворих на НДРЛ. Так, кількість цього цитокіну в культуральному середовищі ДК хворих на НДРЛ була суттєво меншою порівняно з практично здоровими особами (**рис. 5**). Одержані дані свідчать про необхідність подальшої оптимізації технологій отримання ДК у хворих на НДРЛ з акцентом на стимуляцію їх Th1-поляризуючих властивостей за рахунок підвищення цитокінсекреторного потенціалу.

Рис. 4. Рівень експресії мРНК цитокінів IL-12p35, IL-12p40 та IL-10 в дендритних клітинах хворих на НДРЛ (n = 17) та практично здорових людей – ПЗЛ (n = 10).

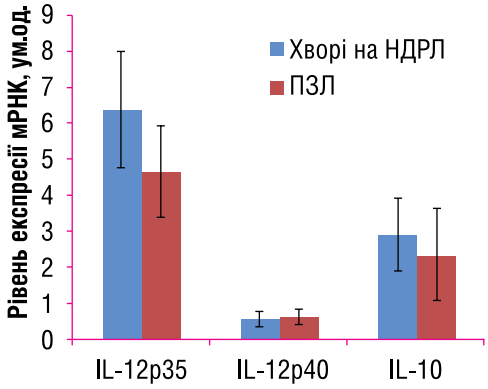
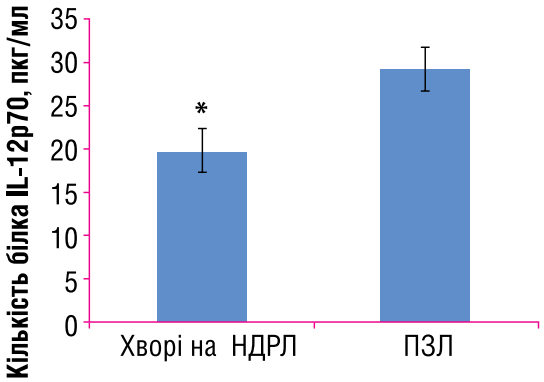


Рис. 5. Кількість білка IL-12p70 в культуральному середовищі дендритних клітин хворих на НДРЛ (n = 17) та практично здорових людей – ПЗЛ (n = 10).



*Примітка: * – p < 0,05 у порівнянні зі значенням у здорових осіб.*

Використання комплексного підходу до створення аутологічних протипухлинних вакцин із використанням сучасних високотехнологічних методів на основі біологічних характеристик ДК дасть змогу удосконалити та розробити найбільш ефективні протоколи виготовлення та раціонального застосування вакцин на основі дендритних клітин, що забезпечить більшу довіру до протипухлинної вакцинотерапії з боку як фахівців, так і пацієнтів і відкриє нові можливості лікування хворих з онкологічними захворюваннями.

ВИСНОВКИ

1. ***Популяції дендритних клітин у хворих на недрібноклітинний рак легенів характеризуються збільшенням відсотка частково зрілих клітин, що свідчить про порушення їх диференціювання та дозрівання.***
2. ***Рівень експресії маркера CD83, що визначає ступінь зрілості ДК, зростає на етапах проведення імунотерапії хворим на НДРЛ.***
3. ***Активність гена CCR7 у ДК хворих на НДРЛ практично не порушена, що може свідчити про збереження їх міграційних властивостей.***
4. ***Рівень експресії антиапоптотичного білка Bcl-2 у ДК хворих на НДРЛ не відрізняється від рівня у практично здорових людей та практично не змінюється на етапах проведення імунотерапії.***
5. ***Рівень експресії мРНК TGF-β та IDO у ДК хворих на НДРЛ суттєво підвищений у порівнянні із практично здоровими людьми та суттєво знижується на етапах проведення імунотерапії.***
6. ***У ДК хворих на НДРЛ порушений синтез біоактивного IL-12, що свідчить про необхідність подальшої оптимізації технології одержання Th1-поляризуючих ДК у хворих на НДРЛ.***

СПИСОК ЦИТОВАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. *Shortman K.* Dendritic Cell Development: Multiple Pathways to Nature's / *K. Shortman, C. Caux* // Adjuvants Stem Cells. – 1997. – **Vol. 15.** – P. 409-419. DOI:10.1002/stem.150409
2. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells / *M. V. Dhodapkar, R. M. Steinman, J. Krasovsky, et al.* // J Exp Med. – 2001. – **Vol. 193, № 2.** – P. 33-38.
3. Dendritic cell immunotherapy: mapping the way / *C. G. Figdor, I. J. de Vries, W. J. Lesterhuis, et al.* // Nat Med. – 2004. – **Vol. 10, № 5** – P. 475-480.
4. Dendritic cell based personalized immunotherapy based on cancer antigen research / *Y. Kawakami, T. Fujita, C. Kudo, et al.* // Front Biosci. – 2008. – **Vol. 13.** – P. 1952-1958.
5. Palucka K. Cancer immunotherapy via dendritic cells / *K. Palucka, J. Banchereau* // Nat Rev Cancer. – 2012. – **Vol. 12, № 4.** – P. 265-277. doi:10.1038/nrc3258
6. *Hettihewa L. M.* Prolonged expression of MHC class I - peptide expression in bone marrow derived retrovirus transfected matured dendritic cells by continuous centrifugation in the presence of IL-4 / L. M. Hettihewa // Indian J Med Res. – 2011. – **Vol. 134, № 5.** – P. 672-678.
7. Optimizing the exogenous antigen loading of monocyte-derived dendritic cells / *D. Dieckmann, E. Schultz, B. Ring et al.* // Int Immunol. – 2005. – **Vol. 17.** – P. 621-635.
8. Immature, Semi-Mature, and Fully Mature Dendritic Cells: Toward a DC-Cancer Cells Interface That Augments Anticancer Immunity / *A. M. Dudek, S. Martin, A. D. Garg, et al.* // Front Immunol. – 2013. – **Vol. 4.** – P. 438-452.
9. *Trepiakas R.* Addition of interferon-alpha to a standard maturation cocktail induces CD38 up-regulation and increases dendritic cell function / *R. Trepiakas, A. E. Pedersenc, I. M. Svanea* // Vaccine. – 2009. – **Vol. 27.** – P. 2213-2219.
10. Differential effect of monophosphoryl lipid A and cytokine cocktail as maturation stimuli of immunogenic and tolerogenic dendritic cells for immunotherapy / *D. Raich-Regue, M. Naranjo-Gomez, L. Grau-Lopez, et al.* // Vaccine. – 2012. – **Vol. 30.** – P.378-387.
11. Generation of Inducible Immortalized Dendritic Cells with Proper Immune Function *In Vitro* and *In Vivo* / *C. Richter, S. Thieme, J. Bandoła, et al.* // PLoS One. – 2013. – **Vol. 8, № 4.** – P. 62621.
12. *Sabado R.* Cancer immunotherapy: dendritic-cell vaccines on the move / *R. Sabado, N. Bhardwaj* // Nature. – 2015. – **Vol. 19, № 519.** – P. 300-301. doi:10.1038/nature14211
13. Dendritic Cells as Pharmacological Tools for Cancer Immunotherapy / *S. Anguille, E. C. Bryant, et al.* // Pharmacol Rev. – 2015. – **Vol. 67, № 4.** – P. 731-753. doi: 10.1124/pr.114.009456.7
14. Phenotype and polarization of autologous t cells by biomaterial-treated dendritic cells / *J. Park, M. H. Gerber, J. E. Babensee* // J Biomed Mater Res A. – 2015. – **Vol. 103, № 1.** – P. 170-184. doi:10.1002/jbm.a.35150
15. Влияние дендритноклеточной аутовакцины на эффективность лечения больных раком яичника / *Н. Н. Храновская, Ю. А. Гриневич, Г. П. Потебня, и др.* // Вопросы онкологии. – **Том 58, № 58.** – 2012. – С. 781-786.
16. *Amigorena S.* Intracellular mechanisms of antigen cross presentation in dendritic cells / *S. Amigorena, A. Savina* // Curr Opin Immunol. – 2010. – **Vol. 22. № 1.** – P.109-117.
17. Клиническое исследование (II фаза) вакцины на основе аутологичных дендритных клеток с иммунологическим адъювантом у больных с меланомой кожи / *И. А. Балдуева, А. В. Новик, В. М. Моисеенко* // Вопросы онкологии. – 2012. – **Т. 58, № 2.** – С. 212-221.
18. *Butterfield L. H.* Dendritic Cells in Cancer Immunotherapy Clinical Trials: Are We Making Progress? / *L. H. Butterfield* // Front Immunol. – 2013. – **Vol. 4.** – P. 454-482.
19. *Vacchelli E.* Dendritic cell-based interventions for cancer therapy / *E. Vacchelli, I. Vitale, A. Eggermont* // Oncolmmunology. – 2013. – **Vol. 2, № 10.** – P. 25771.
20. Sipuleucel T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer / P. W. Kantoff, C. S. Higano, N. D. Shore, et al. // N Engl J Med. – 2010. – **Vol. 363.** – P. 411-422.
21. *Johnson L. A.* Cell Traffic and the Lymphatic Endothelium. / *L. A. Johnson, D. G. Jackson* // Ann N Y Acad Sci. – 2008. – **Vol. 1131.** – P. 119-133.
22. Sphingosine-1-phosphate receptor type-1 agonism impairs blood dendritic cell chemotaxis and skin dendritic cell migration to lymph nodes under inflammatory conditions / *G. Gollmann, H. Neuwirt, C. H. Tripp, et al.* // Int Immunol. – 2008. – **Vol. 18, № 1.** – P. 49-54.
23. Human tumor cells killed by anthracyclines induce a tumor-specific immune response / *J. Fucikova, P. Kralikova, A. Fialova, et al.* // Cancer Res. – 2011. – **Vol. 71, № 14.** – P. 4821-4833. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-0950
24. A clinical grade poly I:C-analogue (Ampligen) promotes optimal DC maturation and Th1-type T cell responses of healthy donors and cancer patients *in vitro* / *H. Navabi, B. Jasani, A. Reece, et al.* // Vaccine. – 2009. – **Vol. 27, № 1.** – P. 107-115. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.10.024
25. *Kalinskia P.* Polarized dendritic cells as cancer vaccines: Directing effector-type T cells to tumors / *P. Kalinskia, H. Okada* // Seminars in Immunology. – 2010. – **Vol. 22.** – P. 173-182.
26. *Mailliard R. B.* α-Type-1 Polarized Dendritic Cells: A Novel Immunization Tool with Optimized CTL-inducing Activity / *R. B. Mailliard, A. Wankowicz-Kalinska, Q. Cai, et al.* // Cancer Resaerch. – 2004. – **Vol. 64.** – P. 5934-5937.

27. Фенотипическая и функциональная характеристика генерированных *in vitro* дендритных клеток человека после активации липополисахаридом и интерфероном-α / *Н. Н. Храновская, О. В. Скачкова, Н. Н. Свергун, и др.* // Імунологія та алергологія. – 2013. – **№ 4**. – С. 72-76.
28. Разработка, обоснование и оценка эффективности противоопухолевой вакцинотерапии на основе дендритных клеток у больных со злокачественными новообразованиями / *Н. Н. Храновская, И. А. Крячок, В. Л. Ганул, и др.* // Клінічна онкологія. – 2014. – **Т. 2, № 14**. – С. 62-70.
29. Противоопухолевая активность дендритных клеток здоровых доноров и больных с опухолями головного мозга / *Е. Р. Черных, О. Ю. Леплина, Т. В. Тыринова, и др.* // Мед. иммунология. – 2010. – **Т. 12, № 3**. – С. 199-206.
30. Optimizing parameters for clinical-scale production of high IL-12 secreting dendritic cells pulsed with oxidized whole tumor cell lysate / *C. L. Chiang, D. A. Maier, L. E. Kandalaft, et al.* // J Transl Med. – 2011. – **Vol. 9**. – P. 198-230.
31. Dendritic Cell Based Tumor Vaccination in Prostate and Renal Cell Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis / *A. Draube, N. Klein-Gonzalez, S. Mattheus, et al.* // PLoS One. – 2011. – **Vol. 6, № 4**. – P. 18801. doi:10.1371/journal.pone.0018801
32. Similar inflammatory DC maturation signatures induced by TNF or Trypanosoma brucei antigens instruct default Th2-cell responses / *K. Pletinckx, B. Stijlemans, V. Pavlovic, et al.* // Eur J Immunol. – 2011. – **№ 41**. – P. 3479–3494. doi: 10.1002/eji.201141631
33. *Motta J. M.* Sensitivity of Dendritic Cells to Microenvironment Signals / *J. M. Motta, V. M. Rumjanek* // J Immunol Res. – 2016. – Retrieved from http://dx.doi.org/10.1155/2016/4753607
34. *Raker V. K.* Tolerogenic Dendritic Cells for Regulatory T Cell Induction in Man / *V. K. Raker, M. P. Domogalla, K. Steinbrink* // Front Immunol. – 2015. – **Vol. 6**. – P. 569. doi:10.3389/fimmu.2015.00569
35. *Manicassamy S.* Dendritic cell control of tolerogenic responses / *S. Manicassamy, B. Pulendran* // Immunol Rev. – 2011. – **Vol. 241, № 1**. – P. 206-227. doi:10.1111/j.1600-065X.2011.01015.x
36. Regulatory Dendritic Cells for Immunotherapy in Immunologic Diseases / *J. R. Gordon, Y. Ma, L. Churchman, et al.* // Front Immunol. – 2014. – **Vol. 5**. – P. 1-19. doi:10.3389/fimmu.2014.00007

СТАТТЯ НА САЙТІ TRANSPLANTOLOGY.ORG

Автори підтверджують відсутність можливих конфліктів інтересів.

Надійшла до редакції 30.10.2016 р.
Прийнята до друку 29.11.2016 р.