

ДОКЛАДЫ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

Выходит шесть номеров в год

Журнал основан в июле 1957 года

МИНСК, БЕЛОРУССКАЯ НАУКА, 2012, ТОМ 56, № 4

Учредитель – Национальная академия наук Беларуси

Редакционная коллегия:

М. В. Мясникович (главный редактор),
А. М. Русецкий (заместитель главного редактора),
С. Я. Килин (заместитель главного редактора),
И. М. Богдевич, Н. А. Борисевич, Г. А. Василевич, П. А. Витязь,
И. Д. Волоотовский, И. В. Гайшун, В. Г. Гусаков, И. В. Залуцкий, О. А. Ивашкевич,
Н. А. Изобов, А. Ф. Ильющенко, Н. С. Казак, А. А. Коваленя,
Ф. Ф. Комаров, И. В. Котляров, В. А. Лабунюк, Ф. А. Лахвич, О. Н. Левко,
А. И. Лесникович, В. Ф. Логинов, А. А. Махнач, А. А. Михалевич, П. Г. Никитенко,
О. Г. Пенязьков, Ю. М. Плескачевский, А. Ф. Смянович, Л. М. Томильчик,
В. М. Федосюк, Л. В. Хотылева, С. А. Чижик, И. П. Шейко

Адрес редакции:

220072, Минск, ул. Академическая, 1, к. 119,
тел. 284-19-19

<http://nasb.gov.by/rus/publications/dan/>

E-mail: doklady@open.by

СОДЕРЖАНИЕ

МАТЕМАТИКА

Янович Л. А., Худяков А. П. Формулы линейной операторной интерполяции с произвольным числом узлов и с произвольными входными функциями.	5
Осиновская А. А., Супруненко И. Д. Унипотентные элементы из подсистемных подгрупп типа A_3 в представлениях специальной линейной группы.	11
Забрейко П. П., Таныгина А. Н. О сходимости метода Ньютона–Канторовича при условии Гальперина–Ваксмана.	16
Бударина Н. В., Берник В. И., О’Доннелл Х. Действительные алгебраические числа третьей степени в коротких интервалах.	23
Деменчук А. К. Управление асинхронным спектром линейных систем с зависимыми блоками полного столбцового ранга.	27

ФИЗИКА

Жестков С. В., Новашинская В. С. О существовании $(1 + 2)$ -мерных солитонов кирального уравнения Шредингера со степенным законом нелинейности.	32
--	----

УДК 616:612.017.1

А. Е. ГОНЧАРОВ¹, член-корреспондент Л. П. ТИТОВ¹, И. В. РОМАНОВА¹,
А. Е. СКРЯГИН², В. В. СОЛОДОВНИКОВА², Н. С. ШПАКОВСКАЯ², Е. М. СКРЯГИНА¹

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ИЗ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ДЛЯ ИММУНОТЕРАПИИ ПАЦИЕНТОВ С ТУБЕРКУЛЕЗОМ

¹Республиканский научно-практический центр
эпидемиологии и микробиологии, Минск

²Республиканский научно-практический центр
пульмонологии и фтизиатрии, Минск

Поступило 27.02.2012

Введение. Одним из перспективных подходов к терапии хронических инфекций является использование аутологичных дендритных клеток (ДК), праймированных антигенами возбудителя заболевания. К настоящему времени опубликованы результаты немногочисленных клинических испытаний по исследованию способности ДК стимулировать иммунный ответ при хронических инфекционных заболеваниях, таких как вирусный гепатит В [1–3], ВИЧ [4] и туберкулез (ТБ) [5].

Проведенные недавно на базе РНПЦ пульмонологии и фтизиатрии клинические испытания способа лечения мультирезистентного ТБ при помощи праймированных антигенами микобактерий моноцитарных ДК показали эффективность такого подхода к иммунотерапии [6]. Тем не менее апробированный способ не лишен недостатков. Так, количество вводимых ДК лимитировано содержанием моноцитов в периферической крови, а используемые для праймирования ДК лизаты аутоштаммов микобактерий трудно полноценно стандартизировать по содержанию отдельных антигенов.

Цель исследования – разработка способа подготовки ДК из гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) с целью терапии ТБ, который был бы лишен недостатков ранее использованного способа [5; 6].

Известно, что источником аутологичных клеток-предшественников для генерации ДК могут быть как моноциты периферической крови, так и ГСК костного мозга (КМ) или пуповинной крови (ПК) [7]. Самым важным принципиальным отличием использования ГСК для получения ДК является возможность их экспансии. Использование рекомбинантных либо синтетических антигенов, содержащих Т-клеточные эпитопы, позволит подготовить ДК, обладающие более мощным потенциалом к дифференцировке «наивных» Т-лимфоцитов в антигенспецифические эффекторные клетки.

Несмотря на то что первые опубликованные статьи, в которых описана технология получения *ex vivo* ДК из ГСК, относятся к середине 1990-х годов, существующие технологии получения клеток недостаточно оптимизированы для использования в клинической практике [8–10]. Например, в большинстве публикаций указано, что в экспериментах была использована питательная среда с добавлением телячьей эмбриональной сыворотки, что является, на наш взгляд, совершенно недопустимым в связи с риском инфицирования различными вирусами и прионами [11–13]. Кроме того, даже следовые количества ксеногенной сыворотки могут вызвать анафилактические реакции у лиц, sensibilized к компонентам сыворотки коров или лошадей. Культивирование стволовых клеток на стандартных питательных средах требует обязательного наличия 5–10 %-ной аутологичной сыворотки (или плазмы) пациента или пулированной АВ-сыворотки доноров. Хотя имеется возможность проверки сыворотки доноров на наличие вирусов иммунодефицита человека, вирусов парентеральных гепатитов, герпес-вирусов и др., всегда

существует риск заражения пациента. Риск значительно повышается при использовании пулированной сыворотки. Несмотря на кажущееся преимущество (особенно в целях биобезопасности) использования аутологичной сыворотки, данная методика не всегда позволяет получать функционально полноценные ДК. По всей видимости, это связано с наличием в сыворотке пациентов цитотоксичных и иммуносупрессивных веществ, которые препятствуют процессу дифференцировки моноцитов в ДК и их дальнейшему созреванию. Кроме того, возникают вопросы стандартизации метода получения ДК, поскольку сыворотки, полученные от разных пациентов, содержат различные биологически активные вещества в широком диапазоне концентраций.

Как указано во множестве публикаций, ГСК культивируют в присутствии рекомбинантных цитокинов – гранулоцитарно-моноцитарного колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) и фактора некроза опухолей (ФНО)- α в качестве основных цитокинов, индуцирующих целенаправленную дифференцировку. К данному цитокиновому «коктейлю», как правило, добавляют также фактор роста стволовых клеток (SCF), лиганд тирозинкиназы-3 фетальной печени (Flt3L), интерлейкин (ИЛ)-4 и другие цитокины, в частности, моноцитарный колониестимулирующий фактор, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, эритропоэтин, ИЛ-7 и тромбопоэтин. Несмотря на то что по утверждению авторов публикаций все вышеперечисленные комбинации цитокинов оказались способны индуцировать направленную дифференцировку ГСК в CD1a⁺ и CD1a⁻ ДК, многообразие цитокиновых «коктейлей», использованных для дифференцировки клеток, требует проведения сравнительных исследований для установления наиболее оптимальной комбинации цитокинов, позволяющей получить при наименьших финансовых затратах функционально полноценные ДК.

Материалы и методы исследования. *Объекты исследования.* В исследовании использовано 5 образцов КМ пациентов с мультирезистентным ТБ легких, 12 образцов ПК, 8 образцов периферической крови пациентов с мультирезистентным ТБ легких, культуры ГСК и ДК.

Подготовка образцов для выделения ГСК. Перед выделением клеток проводили предварительную обработку ПК и КМ, которая включала отделение образцов от клеточных конгломератов через 70–100 мкм фильтры. Мононуклеары выделяли центрифугированием образца на градиенте плотности фиколл-пака с плотностью 1077 г/л. При необходимости лизировали эритроциты в стерильном растворе хлорида аммония. Выделение ГСК осуществляли с использованием наборов для прямой иммуномагнитной сепарации EasySep Human CD34 Positive Selection Kit (Stemcell technologies, Канада). После выделения проводили подсчет CD34⁺ клеток в гемоцитометре, оценку чистоты выделения и жизнеспособности.

Культивирование ГСК и получение культур дендритных клеток. Для накопления необходимого количества ГСК растили на двух средах: AIM-V и SFEM при 37 °С в увлажненной атмосфере с 5 %-ным CO₂ с добавлением цитокинов: 25–60 нг/мл ИЛ-3, 35–50 нг/мл SCF и 35–100 нг/мл Flt3L. Через каждые двое суток заменяли 2/3 питательной среды. На 9–11-е сутки клетки отмывали в DPBS и культивировали в питательной среде AIM-V с 1 %-ной пулированной донорской АВ0-сывороткой с добавлением цитокинов для дифференцировки ГСК в ДК: № 1 – 100 нг/мл ГМ-КСФ, 50 нг/мл ИЛ-4, 10 нг/мл ФНО- α ; № 2 – 100 нг/мл ГМ-КСФ, 50 нг/мл ИЛ-4, 10 нг/мл ФНО- α , 25 нг/мл SCF; № 3 – 100 нг/мл ГМ-КСФ, 50 нг/мл ИЛ-4, 10 нг/мл ФНО- α , 25 нг/мл SCF, 20 нг/мл Flt3L. Каждые 2–3 суток меняли 2/3 питательной среды. На 7–8-е сутки меняли питательную среду, отбирали часть клеток для анализа иммунофенотипа. На 12-е сутки культивирование ДК прекращали, подсчитывали клетки, оценивали их иммунофенотип и жизнеспособность. Для праймирования ДК культивировали на протяжении 6 ч в питательной среде с 5 мкг/мл короткоцепочечных пептидов антигенов Ag85A/B и TB 10.4. Затем ДК отмывали двукратно от пептидов и культивировали в течение суток в среде, содержащей 25 нг/мл ГМ-КСФ, 12,5 нг/мл ИЛ-4, 50 нг/мл ФНО- α и 10⁻⁶М дибутирил-цАМФ в качестве индуктора созревания.

Оценка ответа Т-клеток в смешанной культуре. Для изучения способности ДК, праймированных синтетическими пептидами антигенов микобактерий, стимулировать активацию и пролиферацию антигенспецифических Т-лимфоцитов использовали стандартную методику с некоторыми модификациями. Аутологичные лимфоциты, предварительно инкубированные с 1,5 μ М сукцинимидилового эфира карбоксифлуоресцеиндиацетата (CFSE) культивировали со зрелыми

праймированными ДК в соотношении 1 : 20 в 1 мл питательной среды на протяжении 72 ч. В последние 6 ч культивирования добавляли в среду монензин. По истечении времени культивирования определяли относительное содержание лимфоцитов, содержащих внутриклеточно интерферон (ИНФ)- γ и определяли пролиферативную активность клеток.

Исследование иммуногенности синтетических пептидов. К цельной венозной крови пациентов в количестве 250 мкл добавляли: 1) в качестве отрицательного контроля фосфатный буферный раствор; 2) синтетические короткоцепочечные пептиды антигенов ТВ 10.4 и Ag85A/B в конечной концентрации 1,0, 2,5 и 5,0 мкг/мл; 3) в качестве положительного контроля 25 нг/мл форбол-12-миристан-13-ацетата (ФМА) и 1 мкг/мл иономицина. Доводили объем суспензии питательной средой до 500 мкл и культивировали в течение 2 ч. Затем добавляли во все пробирки 10 мкг/мл монензина и культивировали клетки еще 4 ч. По окончании культивирования определяли относительное число ИНФ- γ^+ -лимфоцитов.

Проточная цитометрия. Для анализа относительного числа ГСК в образцах КМ и ПК использовали антитела к CD34 и CD45 молекулам. Иммунофенотип ГСК (CD45, CD34, CD11c) и ДК (CD11c, CD123, CD1a, CD14, CD40, CD34, CD54, CD80, CD86 и HLA-DR) определяли методом проточной цитофлуориметрии с использованием 3–4 цветовых меток. Для выявления клеток в состоянии апоптоза использовали аннексин V, конъюгированный с FITC (Invitrogen, США), а для детекции мертвых клеток – раствор иодида пропидия (Sigma-Aldrich, США). Для определения внутриклеточных цитокинов исследуемые клетки фиксировали в 4 %-ном растворе параформальдегида, пермеабелизировали в 0,3 %-ном растворе сапонина и инкубировали с моноклональными антителами к внутриклеточным цитокинам и с соответствующими изотипическими контролями. После истечения времени инкубации клетки отмывали от несвязавшихся антител и проводили учет результатов на проточном цитофлуориметре. Для исследования пролиферации предварительно меченые CFSE клетки инкубировали с антителом к молекуле CD3, добавляли в пробы иодид пропидия и учитывали результаты на проточном цитофлуориметре. Интерполяцию полученных результатов и расчет поколений дочерних клеток проводили с использованием программы ModFitLT (Verity Software House, США).

Оценка морфологии клеток. Морфологию ГСК и ДК исследовали при помощи инвертированного микроскопа с использованием метода фазового контрастирования при увеличениях 100 \times , 200 \times и 400 \times , а также при помощи светового микроскопа при увеличении 1000 \times . Для измерения основных морфологических параметров клетки использовали программу NIS-Elements BR (Nikon, Япония). Оценивали размеры клеток, их форму, наличие и длину цитоплазматических выростов, внутриклеточных включений. Ядерно-цитоплазматическое отношение рассчитывали по формуле: ядерно-цитоплазматическое отношение = объем ядра / (объем клетки – объем ядра).

Статистический анализ. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программ Statistica 8.0 (StatSoft, США) и StatPlus 4.9 (AnalystSoft, США). Значения показателей представлены в виде Me (25–75), где Me – медиана, а 25 и 75 – интерквартильный размах в виде 25-й и 75-й процентилей. Нормальность распределения величин оценивали с использованием *W*-критерия Шапиро–Вилка. Учитывая отсутствие в большинстве исследованных выборок нормального распределения, для сравнения групп данных и изучения корреляционных взаимосвязей использовали непараметрические методы. Для сравнения двух независимых выборок использовали *U*-критерий Манна–Уитни, а для сравнения связанных выборок – критерий Уилкоксона. Для сравнения трех и более групп независимых данных был использован метод рангового анализа вариаций Краскела–Уоллиса и ранговый дисперсионный анализ по Фридмену (Friedman ANOVA). В качестве критерия достоверности различий показателей принимали уровень значимости $p < 0,05$ [14].

Результаты и их обсуждение. *Характеристика образцов пуповинной крови и костного мозга.* Учитывая труднодоступность костного мозга здоровых лиц для проведения *in vitro* исследований, часть экспериментов были выполнены с использованием ГСК ПК, функционально схожими с ГСК КМ. Также исследовано 5 образцов КМ пациентов с МЛУ/ШЛУ-ТБ, предоставленных сотрудниками РНПЦ пульмонологии и фтизиатрии.

Перед выделением ГСК оценивали количество ЯСК в образцах ПК и КМ, относительное число ГКС и отбраковывали образцы, расчетное количество ГСК в которых составляло менее $8-9 \cdot 10^5$. Среднее число ГСК в образцах ПК составило 0,4 (0,3–0,7), а в образцах КМ – 0,9 (0,6–1,9). Из 12 исследованных образцов ПК 4 были исключены из исследования по причине низкого содержания ГСК, а из 5 образцов КМ – исключен 1 образец. Среднее количество CD34⁺ ГСК, выделенных из образца пуповинной крови (39,0 (35,0–40,0) мл), составило $1,05(0,8-1,5) \cdot 10^6$ клеток, а из 20,0 (19,0–32,5) мл КМ – $3,2(1,3-10,5) \cdot 10^6$ клеток. Содержание ГСК в суспензии клеток после выделения иммуномагнитной сепарацией составляло во всех случаях более 95 %, а жизнеспособность выделенных ГКС превышала 97 %. Как видно, содержание ГКС в образцах КМ и ПК сильно варьирует, что в некоторых случаях может приводить к невозможности получения достаточного количества ГСК, необходимых для генерации ДК.

Накопление ГКС. С целью экспансии культуры ГСК растили на двух питательных средах: AIM-V и SFEM. Питательная среда AIM-V (Invitrogen, США) содержит дополнительно 0,25 % человеческого сывороточного альбумина, 50 мкг/мл стрептомицина сульфата и 10 мкг гентамицина сульфата. Питательная среда SFEM (StemCell Technologies, Канада) изготовлена на основе Iscove's MDM с добавлением 10^{-4} М 2-меркаптоэтанола, 2 мМ L-глутамина, 200 мг/мл трансферрина, 10 мг/мл рекомбинантного человеческого инсулина и 1 % бычьего сывороточного альбумина. Перед использованием в среды добавляли свежий раствор L-глутамина, 50 мкг/мл гентамицина и 20 мМ HEPES.

Питательная среда AIM-V не заявлена производителем как подходящая для культивирования ГСК. Однако учитывая накопленный в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии положительный опыт использования данной питательной среды для культивирования ДК и лимфоцитов, был проведен сравнительный анализ 4 культур ГСК, культивированных на протяжении 9–11 суток в средах AIM-V и SFEM. Оценивали степень прироста ядродержащих клеток (ЯСК) и содержание среди них CD34⁺ ГСК.

Кратность увеличения ЯСК варьировала от 34,4 до 78,2 раз при использовании среды AIM-V и от 32,8 до 53,6 при использовании среды SFEM ($p < 0,05$). Анализ содержания CD34⁺ клеток в образцах культур ГСК, культивированных в разных питательных средах, также не выявил достоверных различий ($p < 0,05$).

Учитывая, что достоверных различий в интенсивности пролиферации клеток ПК и экспрессии ими молекул CD34 и CD11c при культивировании в средах AIM-V и SFEM выявлено не было, возможно рекомендовать питательную среду AIM-V для культивирования ГСК, особенно учитывая ее гораздо меньшую стоимость в сравнении с SFEM.

Эксперименты с ГСК, выделенными из КМ пациентов с МЛУ-ТБ, показали значительно более слабую способность клеток к пролиферации (ГСК ПК – 47,2(38,8–64,8), ГСК КМ – 19,5(9,5–25,0), $p = 0,02$), что, вероятно, отражает процессы миелосупрессии у пациентов с МЛУ/ШЛУ-ТБ.

Влияние смеси цитокинов на морфологические свойства ДК. Исследовали влияние различных комбинаций цитокинов на морфологию ДК (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Основные параметры ДК, культивированных в разных условиях

Культура клеток	Комбинация цитокинов		
	1	2	3
Площадь, мкм ²	271,93 ± 69,03	243,22 ± 61,43	249,02 ± 56,41
Диаметр, мкм	18,46 ± 2,34	17,46 ± 2,17	17,69 ± 2,03
Длина отростков, мм	8,57 ± 3,32	8,77 ± 2,69	3,39 ± 1,16*

П р и м е ч а н и е. * – статистически достоверные различия, $p < 0,05$.

Несмотря на отсутствие значимых различий площади ДК и их диаметра при использовании различного сочетания цитокинов, размер отростков цитоплазмы был достоверно меньше в культурах ДК, культивированных в питательной среде с комбинацией цитокинов 3. ДК во всех исследованных пробах на 12-е сутки культивирования были морфологически однородны, характеризовались звездчатыми клеточными формами с наличием типичных для ДК цитоплазматических отростков (рис. 1).

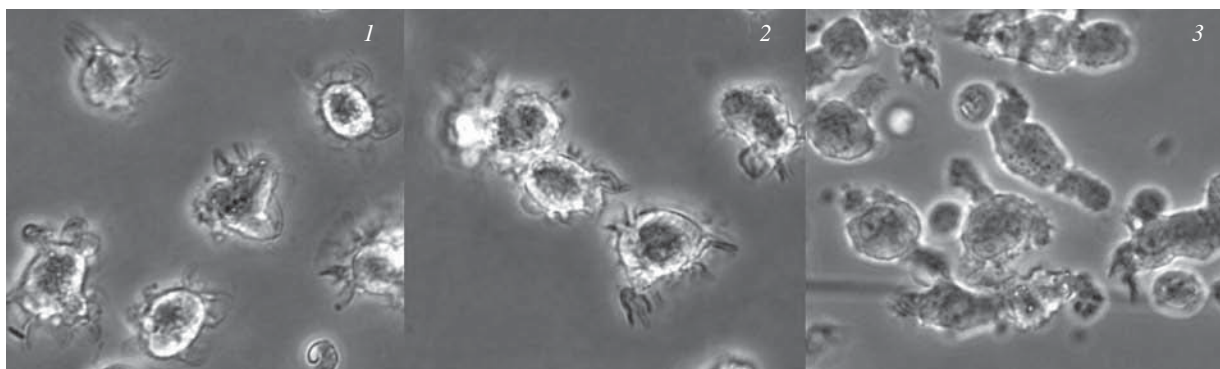


Рис. 1. Микрофотографии первичных культур ДК, полученных путем дифференцировки CD34⁺ ГСК и CD11c⁺ миелоидных клеток-предшественников с комбинацией цитокинов 1–3: фазовый контраст, увеличение 400×

Ядерно-цитоплазматическое отношение ДК, полученных из ГСК – 0,42 (0,36–0,51), практически не отличалось от такового у моноцитарных ДК (результаты предыдущих исследований) – 0,43 (0,35–0,50). Морфология клеток, культивируемых в питательной среде с комбинацией цитокинов 3, была нетипична для ДК: большая часть клеток в культуре имела округлую форму, цитоплазматические выросты на клетках отсутствовали либо имели небольшую длину.

Иммунофенотип ДК, полученных из ГСК КМ. Функциональное состояние клеток иммунной системы во многом определяется степенью экспрессии различных молекул, опосредующих процессы адгезии, распознавания чужеродных структур, а также костимуляции и активации антигенспецифических Т-лимфоцитов. Для оценки фенотипа ДК исследовали экспрессию следующих молекул: ко-рецептора к ЛПС CD14, ГСК-подобной молекулы CD1a, молекулы гистосовместимости HLA-DR, высокоспецифичного маркера-зрелых ДК CD83, костимуляторных молекул CD40, CD80 и CD86, молекулы межклеточной адгезии CD54 (ICAM-1), общего миелоидного маркера CD11c, хемокинового рецептора CD195 (CCR5).

Во всех культурах ДК присутствовала примесь CD11c⁻ клеток, составлявшая не более 30 %. На начальных этапах культивирования культура ДК представлена на 1/3 CD1a⁺ и 1/3 CD14⁺ клетками, практически отсутствуют клетки экспрессирующие обе молекулы. В последующие несколько суток наблюдается рост числа CD1a⁺ клеток за счет дифференцировки CD14⁺ клеток (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Экспрессия основных маркеров ДК ($n = 4$), культивируемых с разными комбинациями цитокинов в течение 11–12 суток

Молекула	Экспрессия молекул под действием комбинации цитокинов, %			Kruskal–Wallis, p
	1	2	3	
CD11c ⁺	75,5(72,5–76,8)	76,1(70,1–80,0)	72,7(69,9–76,2)	0,67
CD11c ⁺ CD14 ⁺	7,2(2,7–17,1)	5,2(3,2–13,4)	17,4(9,9–27,9)	0,44
CD11c ⁺ CD1a ⁺	48,3(40,3–60,9)	38,7(36,8–52,8)	35,1(28,4–39,8)	0,15
CD11c ⁺ HLA-DR ⁺	92,9(87,8–97,6)	92,1(90,6–95,9)	89,9(86,2–94,2)	0,76
CD11c ⁺ CD80 ⁺	32,9(29,7–40,6)	26,6(24,4–35,6)	25,4(21,3–29,3)	0,15
CD11c ⁺ CD86 ⁺	60,4(57,7–68,5)	53,5(47,7–68,5)	44,4(40,2–49,1)	0,04
CD11c ⁺ CD195 ⁺	15,5(3,8–32,8)	26,8(11,2–45,4)	44,9(33,8–51,9)	0,17
CD11c ⁺ CD40 ⁺	76,1(58,9–82,2)	75,5(62,6–79,1)	73,8(56,9–78,4)	0,87
CD11c ⁺ CD83 ⁺	9,3(4,7–13,4)	12,8(6,6–14,0)	5,2(4,0–7,0)	0,47
CD11c ⁺ CD123 ⁺	29,3(20,6–33,9)	27,7(19,5–38,1)	28,0(20,8–32,5)	0,99
CD11c ⁺ CD54 ⁺	86,6(64,9–91,7)	79,1(65,3–90,7)	74,4(66,4–86,1)	0,84
CD34 ⁺	2,7(1,2–3,5)	2,1(1,4–3,8)	1,4(1,3–3,9)	0,87

Несмотря на нетипичную морфологию, иммунофенотип ДК, культивируемых с комбинацией цитокинов 3 в целом был характерен для ДК. ДК, культивируемые в питательной среде с комбинацией цитокинов 3, характеризовались достоверно более слабой экспрессией молекулы CD86 по сравнению с ДК, культивируемыми со смесью цитокинов цитокинами 1 ($p = 0,02$). Статистически достоверных отличий в экспрессии других молекул установлено не было.

Комплексная оценка жизнеспособности и апоптоза клеток методом проточной цитофлуориметрии показала, что в культурах CD11c⁺ ДК содержится не более 3 % мертвых клеток и клеток в состоянии апоптоза.

Оценка способности ДК, праймированных антигенами микобактерий, стимулировать пролиферацию и активацию аутологичных Т-лимфоцитов. Для оценки иммуногенности антигенов *M. tuberculosis* ставили ряд тестов с цельной кровью пациентов с МЛУ ТБ. Относительное число активированных антигенспецифических Т-лимфоцитов, накапливающих внутриклеточно ИНФ- γ , составило 0,1(0,1 – 0,14) % в культурах лимфоцитов, культивированных с DPBS в качестве отрицательного контроля (спонтанная активация) (рис. 2).

Добавление ФМА и иономицина в качестве положительного контроля оказало выраженный эффект на активацию лимфоцитов: более 90 % Т-лимфоцитов экспрессировали молекулу CD69 – маркер ранней активации лимфоцитов, а относительное число ИНФ- γ ⁺ клеток достигло 14,3(12,5–24,6) %.

Эффект пептидов антигена Ag85A/B на активацию лимфоцитов во всех исследованных концентрациях достоверно не отличался от контроля ($p > 0,05$) (рис. 3).

Эффект ТВ 10.4 в концентрациях 1 мкг/мл и 2,5 мкг/мл в отношении продукции ИНФ- γ лимфоцитами был достоверно выше в сравнение с контролем (рис. 3). Продукция ИНФ- γ лимфоцитами при стимуляции пептидом ТВ 10.4 в концентрации 5 мкг/мл значительно превышала таковую в культурах нестимулированных клеток, а также клеток, стимулированных данным пептидом в концентрации 1 и 2,5 мкг/мл ($p < 0,05$).

Таким образом, наибольшее число ИНФ- γ ⁺ Т-лимфоцитов выявлено после стимуляции пептидом антигена ТВ 10.4 в концентрации 5 мкг/мл. Учитывая полученные данные, для дальней-

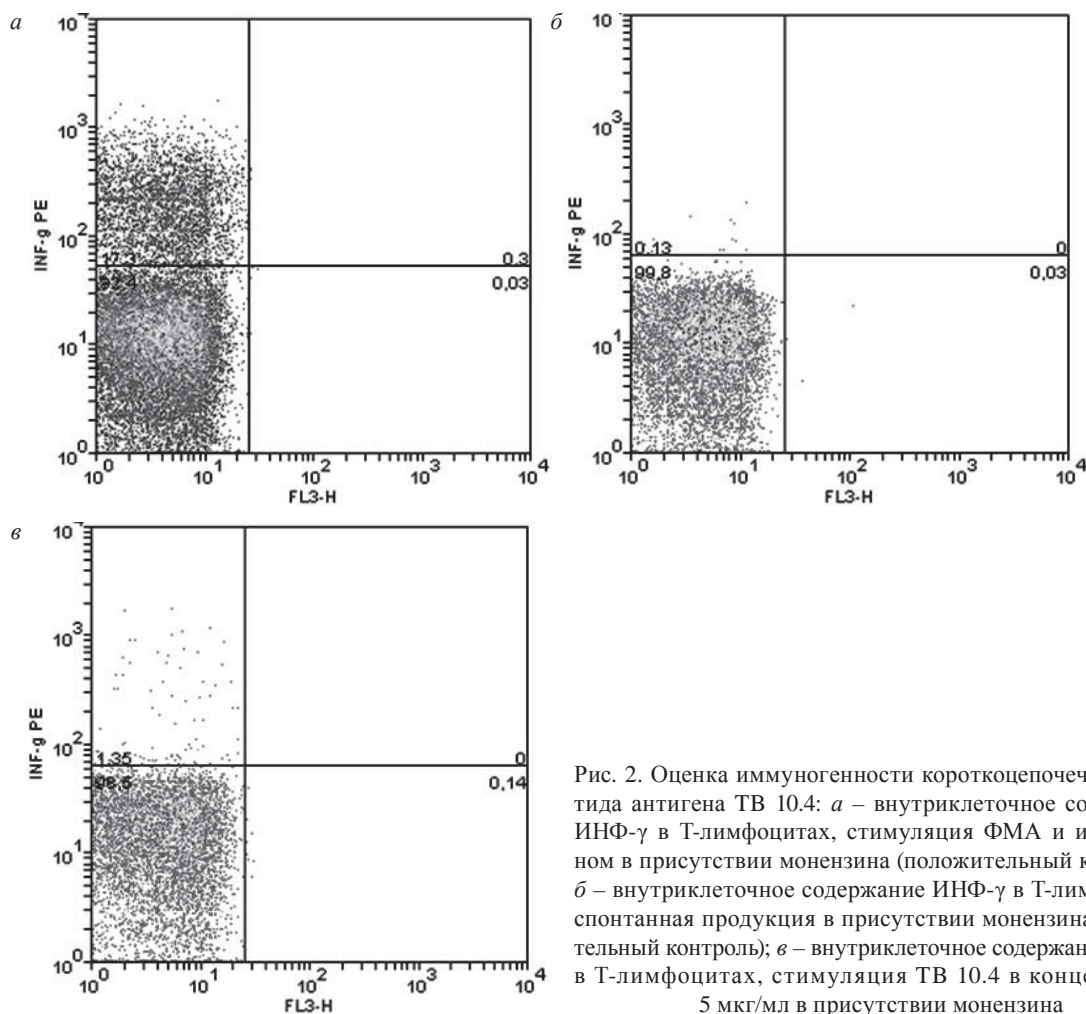


Рис. 2. Оценка иммуногенности короткоцепочечного пептида антигена ТВ 10.4: а – внутриклеточное содержание ИНФ- γ в Т-лимфоцитах, стимуляция ФМА и иономицином в присутствии монензина (положительный контроль); б – внутриклеточное содержание ИНФ- γ в Т-лимфоцитах, спонтанная продукция в присутствии монензина (отрицательный контроль); в – внутриклеточное содержание ИНФ- γ в Т-лимфоцитах, стимуляция ТВ 10.4 в концентрации 5 мкг/мл в присутствии монензина

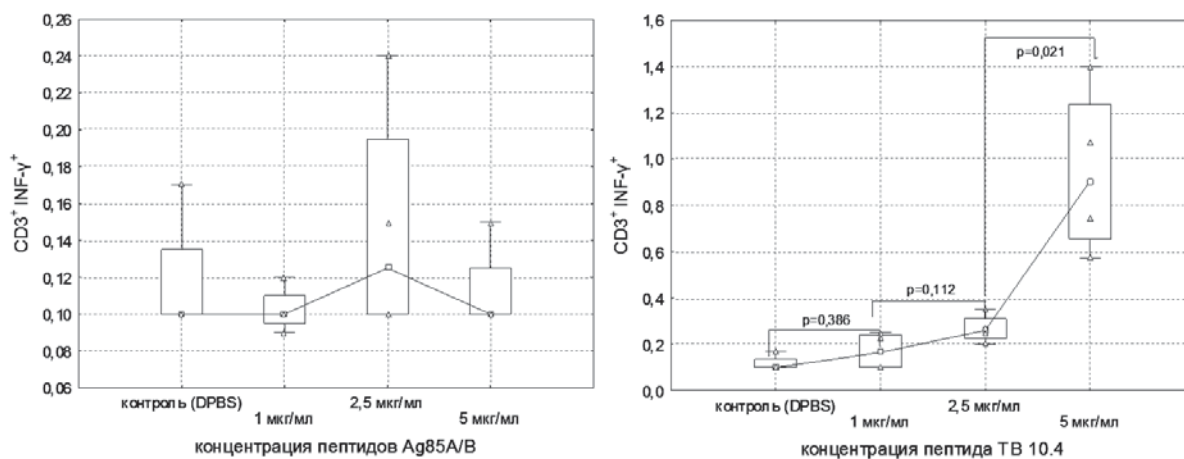


Рис. 3. Влияние пептидов Ag85A/B и ТВ 10.4 на активацию аутологичных Т-лимфоцитов ($n = 4$)

ших исследований по праймированию ДК было решено использовать данный пептид в указанной концентрации.

ДК, праймированные ТВ 10.4 в концентрации 5 мкг/мл, сокультивировали с аутологичными лимфоцитами в соотношении 1 : 20 и изучали эффект ДК на пролиферацию Т-лимфоцитов и продукцию ими ИНФ-γ.

Относительное число Т-лимфоцитов, содержащих внутриклеточно ИНФ-γ, после культивирования в присутствии ДК, праймированных пептидом ТВ 10.4, было существенно выше, чем число лимфоцитов, культивированных без ДК или в присутствии зрелых непраймированных ДК (рис. 4).

Относительное число CD3⁺ИНФ-γ⁺ лимфоцитов, культивированных в качестве контроля, составило 0,17(0,09–0,23) %. Непраймированные ДК при сокультивировании с лимфоцитами незначительно увеличивали продукцию ИНФ-γ до 0,27(0,24–0,30) % ($p = 0,083$). Продукция ИНФ-γ антигенспецифическими Т-лимфоцитами, стимулированными ТВ 10.4-праймированными ДК, составила 1,11(0,80–1,41) %, что достоверно выше показателей лимфоцитов и лимфоцитов + ДК ($p = 0,021$).

Для выявления клонов пролиферирующих клеток использовали CFSE. В отсутствие ДК число пролиферирующих лимфоцитов составляло 0,25(0,15–0,43) %. В присутствии непраймированных ДК лимфоциты образовывали дочерние популяции клеток, число которых составило 1,9(1,31–2,47) %. Добавление в культуры лимфоцитов ДК, праймированных пептидом антигена ТВ 10.4, привело к увеличению числа дочерних популяций клеток до 5,7(4,20–7,16) %.

Таким образом, проведенные исследования показывают возможность использования пептида антигена ТВ 10.4 для праймирования мДК больных ТБ.

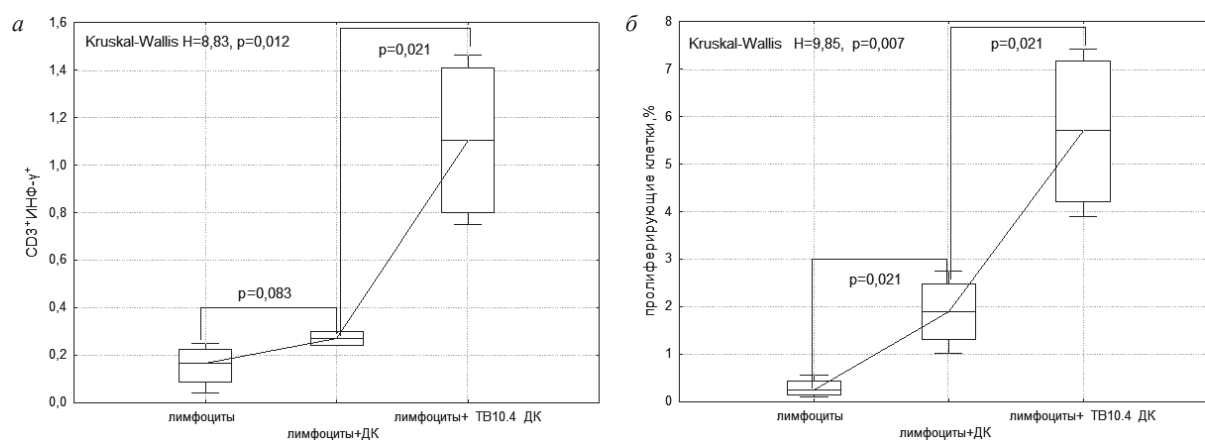


Рис. 4. Влияние ДК, праймированных ТВ 10.4, на активацию (а) и пролиферацию (б) аутологичных Т-лимфоцитов ($n = 4$)

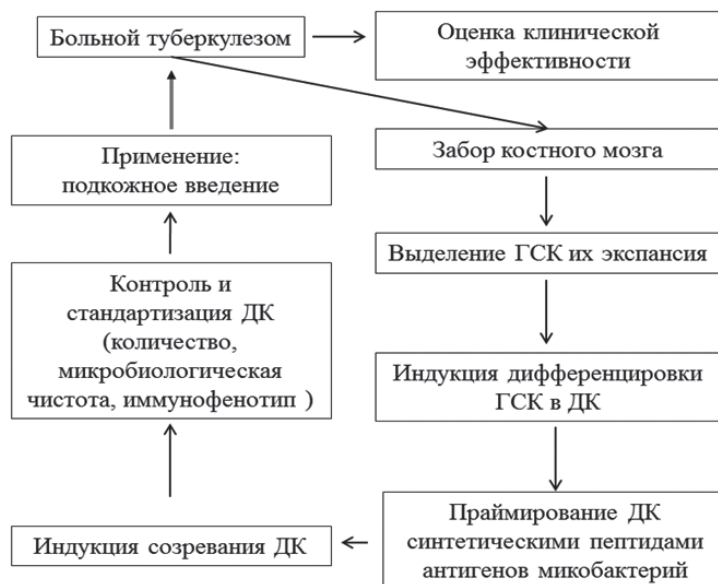


Рис. 5. Схема подготовки культур ДК для иммунотерапии туберкулеза

Результаты проведенных исследований позволили разработать схему подготовки культур аутологичных ДК, предназначенных для терапии больных МЛУ ТБ (рис. 5).

Заключение. Проведенные исследования позволили оптимизировать и адаптировать к клинической практике метод получения ДК из ГСК костного мозга и пуповинной крови. Для культивирования ГСК и ДК использована бессывороточная питательная среда AIM-V, сертифицированная для использования в лечебных целях. Для генерации ДК из ГСК подобрана оптимальная комбинация GM-CSF, IL4 и TNF- α . Установлено, что на 6–8-е сутки культивирования происходит дифференцировка CD11c⁺ клеток-предшественников в CD14⁺ и CD1a⁺ клетки. К 11–12-м суткам CD14⁺ клетки дифференцируются в CD1a⁺ и CD1a⁻ ДК, характеризующиеся слабой экспрессией молекул CD40, CD80, CD86, CD54, CD195 и CD83, что свидетельствует об их функциональной «незрелости».

Было установлено, что добавление SCF в первые сутки существенно не повлияло на количество ДК, их морфологию и иммунофенотип. В то же время добавление FLT3/Flk2 L приводило к формированию ДК с нехарактерной морфологией.

Адаптирована к клинической практике методика праймирования ДК антигенами микобактерий. Для праймирования ДК отобран иммуногенный короткоцепочечный пептид антигена ТВ 10.4. Праймированные ДК индуцировали активацию и пролиферацию *in vitro* антигенспецифических Т-лимфоцитов, что позволяет надеяться на клиническую эффективность их применения.

Результаты работы могут быть использованы для подготовки культур дендритных клеток из гемопоэтических стволовых клеток костного мозга и пуповинной крови с целью дальнейшего использования не только для лечения туберкулеза, но и других хронических инфекционных, а также онкологических заболеваний.

Литература

1. Titov L. P., Hancharou A. Y., Zhmurovskaya L. S. et al. // J. Allergy Clin. Immunol. 2010. Vol. 125, N 2. Suppl. P. AB13.
2. Chen M., Li Y., Zhang D. et al. // World J. Gastroenterol. 2005. Vol. 11, N 12. P. 1806–1808.
3. Akbar S. M. F., Furukawa S., Horiike N. et al. // J. Vir. Hepatitis. 2011. Vol. 18. P. 408–414.
4. Allard S. D., Keersmaecker B., Goede A. L. et al. // Clin. Immunol. 2012. Vol. 142, N 3. P. 252–268.
5. Hancharou A. Y., Titov L. P., DuBuske L. M. // Allergy. 2010. Vol. 65. Suppl. 99. P. 507.
6. Тутов Л. П., Гончаров А. Е., Скрягина Е. М. и др. // Здоровоохранение. 2012. № 1. С. 53–60.
7. Pham V. P., Dang H. L., Vu B. N. et al. // In Vitro Cell. Dev. Biol. 2011. Vol. 47. P. 368–375.

8. *Caux C., Dezutter-Dambuyant C., Schmitt D. et al. // Nature. 1992. Vol. 360. P. 258–261.*
9. *Reid C. D. L., Stackpoole A., Meager A. et al. // J. Immunol. 1992. Vol. 149. P. 2681–2688.*
10. *Santiago-Schwarz F., Belilos E., Diamond B. et al. // J. Leukocyte Biol. 1992. Vol. 52. P. 274–281.*
11. *Mackensen A., Herbst B., Chen J. et al. // Int. J. Cancer. 2000. Vol. 86. P. 385–392.*
12. *Paczesny S., Li Y., Li N. et al. // J. Leukoc. Biol. 2007. Vol. 81. P. 957–967.*
13. *Guo Y., Hirokawa M., Takahashi N. et al. // Int. J. Hematol. 2010. Vol. 91. P. 61–68.*
14. *Genser B., Cooper P. J., Yazdanbakhsh M. // BMC Immunology. 2007. Vol. 8, N 27.*

A. Y. HANCHAROU, L. P. TITOV, I. U. RAMANAVA, A. E. SKRAHIN, V. V. SOLODOVNIKOVA, N. S. SHPAKOVSKAYA,
A. M. SKRAHINA

andrei.hancharou@gmail.com

OPTIMIZATION OF THE METHOD OF DENDRITIC CELL GENERATION FROM HEMATOPOIETIC BONE MARROW DERIVED STEM CELLS FOR THE PURPOSES OF IMMUNOTHERAPY OF PATIENTS WITH TUBERCULOSIS

Summary

For generation of dendritic cells from hematopoietic stem cells derived from bone marrow an optimal combination of cytokines was selected, including GM-CSF, IL4 and TNF- α . For dendritic cell priming peptides of TB 10.4 antigen were selected. Dendritic cells loaded with these peptides stimulated the production of INF- γ and proliferation of autologous T-cells. The method of dendritic cell generation may be used in the cellular immunotherapy of patients with tuberculosis.

стволов и проксимальных отделов длинных нервов), аутонейропластики или невротизации (>7,0 см на любом уровне плечевого сплетения);

установление приоритета дифференцированной невротизации стволов или проксимальных отделов длинных нервов плечевого сплетения, в зависимости от обширности и распространенности повреждения плечевого сплетения: стволов – при тотальном параличе мышц верхней конечности с преганглионарным повреждением плечевого сплетения; проксимальных отделов длинных нервов – при субтотальном параличе мышц верхней конечности с повреждением длинных нервов и/или стволов плечевого сплетения;

применение во время оперативного вмешательства при обширных поражениях плечевого сплетения с наличием различных типов повреждений (компрессии без нарушения целостности, локального нарушения целостности, пре-, постганглионарного повреждения на большом протяжении) сочетаний соответствующих методов операций на разных уровнях плечевого сплетения;

применение мышечной и сухожильно-мышечной транспозиций для восстановления активного сгибания предплечья или разгибания кисти и пальцев в поздние сроки после травмы и в случаях неэффективности оперативных вмешательств на структурах плечевого сплетения;

установление приоритетов выполнения транспозиции широчайшей мышцы спины перед большой грудной мышцей, большой грудной мышцей – перед транспозицией трехглавой мышцы плеча, показаний применения транспозиции трапециевидной мышцы при тотальном поражении плечевого сплетения или денервации широчайшей мышцы спины, большой грудной мышцы и трехглавой мышцы плеча;

применение при сочетании паралича двуглавой мышцы плеча и разгибателей кисти и пальцев комбинации методов транспозиции широчайшей мышцы спины или большой грудной мышцы и сухожильно-мышечной транспозиции;

установление целесообразности выполнения транспозиции широчайшей мышцы спины или большой грудной мышцы при избирательном нарушении функции сгибания предплечья в сроки до 12 месяцев после травмы, как альтернативы методам невротизации в случае сохранности грудно-спинного нерва или передних грудных нервов;

установление оптимальных сроков для выполнения локальных (до 6 месяцев) и реконструктивных (до 9 месяцев после травмы) операций на структурах плечевого сплетения при соблюдении общих показаний к выполнению операций на структурах плечевого сплетения в сроки до 12 месяцев, мышечной и сухожильно-мышечной транспозиций – после 12 месяцев с момента травмы.

Применение алгоритма хирургического лечения с использованием усовершенствованных методов оперативных вмешательств на структурах ПС и операций мышечной и сухожильно-мышечной транспозиций позволило повысить эффективность хирургического лечения последствий травматического повреждения ПС с 65,0 до 84,7 %, $p < 0,05$.

Табл. 1. Ил. 2. Библиогр. – 25 назв.

УДК 616:612.017.1

Гончаров А. Е., Титов Л. П., Романова И. В., Скрягин А. Е., Солодовникова В. В., Шпаковская Н. С., Скрягина Е. М. **Оптимизация метода получения дендритных клеток из гемопоэтических стволовых клеток костного мозга для иммунотерапии пациентов с туберкулезом** // Докл. НАН Беларуси. 2012. Т. 56, № 4. С. 94–102.

В результате проведения исследований для генерации дендритных клеток подобрана оптимальная комбинация цитокинов, включающая ГМ-КСФ, ИЛ-4 и ФНО- α . Дендритные клетки, полученные из гемопоэтических стволовых клеток, имели типичный иммунофенотип и морфологию. Для праймирования дендритных клеток подобраны иммуногенные пептиды антигенов, специфичных для микобактерий туберкулеза с широкой и множественной лекарственной устойчивостью. Установлено, что праймированные ДК индуцировали активацию и пролиферацию *in vitro* клонов антигенспецифических Т-лимфоцитов. Разработанный метод получения ДК для лечения мультирезистентного туберкулеза может быть использован в клинической практике.

Табл. 2. Ил. 5. Библиогр. – 14 назв.

УДК 621.762

Дьячкова Л. Н., Леонов А. Н., Витязь П. А., Дечко М. М. **Закономерности высокотемпературной инфильтрации при получении антифрикционных материалов системы железо–медь** // Докл. НАН Беларуси. 2012. Т. 56, № 4. С. 103–110.

Проведены теоретические и экспериментальные исследования параметрически нестационарной высокотемпературной инфильтрации при получении антифрикционных материалов системы железо–медь. Предложено нелинейное дифференциальное уравнение второго порядка, описывающее процесс параметрически нестационарной высокотемпературной инфильтрации расплава металла в пористом порошковом каркасе, в котором учтены все силы, определяющие кинетику инфильтрации. Концептуальная новизна работы заключается в том, что при описании высокотемпературной инфильтрации введена релаксационная зависимость параметров каркаса и инфильтрата от времени, что обусловлено взаимодействием меди с железом в процессе инфильтрации. Изучены экспериментальные зависимости высоты подъема фронта инфильтрата различного