

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой


подпись

Е. И. Шишацкая

« 28 »


июня 2016 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

Особенности состояния внутриклеточного метаболизма при
дифференцировке моноцитов в дендритные клетки


Руководитель

 28.06.16
подпись, дата

профессор, д.м.н.
должность, ученая степень

А. А. Савченко

Выпускник

 28.06.16
подпись, дата

С. А. Пятина

Красноярск 2016

Содержание

Введение	3
1 Обзор литературы	4
1.1 Почечноклеточный рак	4
1.1.1 Этиология ПКР	4
1.1.2 Подтипы ПКР	6
1.1.3 Диагностика и классификация стадирования	6
1.1.4 Лечение ПКР	8
1.2 Моноциты и макрофаги.....	9
1.2.1 Общие сведения о моноцитах и макрофагах	9
1.2.2 Функции моноцитов и макрофагов	11
1.2.3 Популяции моноцитов	12
1.3 Дендритные клетки.....	13
1.2.1 История открытия	14
1.2.2 Субпопуляции ДК	14
1.2.3 Дифференцировка и созревание ДК	16
1.2.4 Применение ДК в клинической практике	16
1.3 НАД(Ф)Н - зависимые дегидрогеназы	17
1.3.1 Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа	18
1.3.2 Глицерол-3-фосфатдегидрогеназа	18
1.3.3 Лактатдегидрогеназа	18
1.3.4 НАД и НАДФ зависимые малатдегидрогеназы	19
1.3.5 НАД и НАДФ зависимые изоцитратдегидрогеназы	20
1.3.6 НАД и НАДФ зависимая глутаматдегидрогеназа	20
2 Материалы и методы.....	21
2.1 Объект исследования.....	21
2.2 Методы исследования	21
2.2.1 Выделение моноцитов	21
2.2.2 Выращивание ДК	22
2.2.3 Билюминесцентное определение активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ моноцитов	23
2.2.4 Статистические методы исследования	26
3 Результаты и обсуждения	27
Список сокращений.....	28
Список использованных источников.....	29

Введение

В настоящее время особый интерес вызывает изучение моноцитарно-макрофагальной системы при таком заболевании как почечно-клеточный рак (ПКР). Моноциты, эмигрировавшие в ткани, дифференцируются в макрофаги и дендритные клетки (ДК), которые в свою очередь участвуют в противоопухолевом иммунитете, действуя на опухолевые клетки, вырабатывая активные формы кислорода (АФК) и активируя клеточный иммунитет [19].

Оксидоредуктазы относятся к наиболее информативным показателям внутриклеточного метаболизма. Это связано с тем, что они принимают активное участие в биоэнергетических процессах. Кроме того, оксидоредуктазы, участвуя в направленной координации сопряженных метаболических потоков, в значительной степени обуславливают адаптивные изменения внутриклеточного обмена веществ [15].

Из всего вышеперечисленного можно сделать вывод о важности изучения активности различных оксидоредуктаз в клетках иммунной системы при таком заболевании как почечно-клеточный рак.

Целью моей работы является изучение изменений внутриклеточного метаболизма при дифференцировке моноцитов в дендритные клетки у больных почечно-клеточным раком.

На основании поставленной цели были определены следующие задачи:

1. Обзор существующей информации по данной теме.
2. Осуществить выделение моноцитов периферической крови и генерирование ДК.
3. Определить активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ моноцитов и дендритных клеток в норме и у больных почечно-клеточным раком.
4. Сделать выводы об изменениях внутриклеточного метаболизма на основе данных об активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ моноцитов и дендритных клеток.

1 Обзор литературы

1.1 Почечноклеточный рак

Почечно-клеточный рак — общепринятый в настоящее время термин для обозначения рака, который развился из эпителия почечных канальцев или же собирательной системы почки.

На почечно-клеточный рак приходится 2-3% всех раковых опухолей [11]. Каждый год во всем мире диагностируется более 270 тысяч новых случаев ПКР, а так же регистрируется более 116 тысяч случаев смерти, обусловленных данным заболеванием [8]. В Российской Федерации на рак почки приходится 3,7% всех неоплазий. Он входит в 10 основных локализаций в структуре онкологической заболеваемости. Согласно динамике прироста заболеваемости за минувшее десятилетие ПКР занимает 2-е место, уступая лидирующие позиции только лишь злокачественным новообразованиям головного мозга и прочих отделов нервной системы. Стандартизированный показатель заболеваемости раком почки в Сибирском Федеральном округе составляет $10,63 \pm 0,21$ на 100 тысяч населения [10].

1.1.1 Этиология ПКР

ПКР считается мультифакторальным заболеванием. В литературе всего мира представлено приблизительно сто факторов развития данного злокачественного новообразования. Однако, невзирая на такое большое количество факторов риска в соответствии с принципами доказательной медицины, всего лишь три фактора получили подтверждение в крупных нерандомизированных отлично спланированных контролируемых исследованиях — курение, ожирение и гипертония. Данные факторы характеризуют не только риск развития ПКР, но и многих других

онкологических заболеваний, и являются в наибольшей степени предотвратимыми с помощью мер первичной и вторичной профилактики [30].

Курение один из доказанных международным агентством исследования рака фактор развития ПКР [24]. Угроза формирования данного злокачественного новообразования увеличивается в зависимости от количества выкуриваемых в день сигарет. Люди, которые выкуривают больше чем 20 сигарет в день, увеличивают риск развития у себя ПКР на 60-100% в сравнении с никогда не курившими людьми. Риск развития ПКР становится меньше уже после 10 лет отказа от курения [29].

Существует взаимосвязь увеличения индекса массы тела с риском развития ПКР. Этот риск наиболее выражен у женской части населения, чем у мужской. Зависит от степени ожирения. Механизм воздействия данного фактора связан с развитием инсулинорезистентности тканей, хронической гипоксией и компенсаторной гиперинсулинемией, изменением эндокринного статуса с гиперпродукцией эстрогенов, адипокинов, факторов роста, изменением иммунного ответа и метаболизма холестерина, повышенным уровнем окислительного стресса и перекисного окисления липидов [33].

Биологический механизм связи гипертонии с развитием рака почки до конца не изучен, но вероятнее всего связан с перекисным окислением липидов, хронической почечной гипоксией и формированием свободных радикалов [27].

Помимо факторов связанных с образом жизни, выделяют генетические факторы. 4% всех случаев ПКР являются наследственными. Наличие в семейном анамнезе рака щитовидной железы, рака простаты, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака мочевого пузыря так же связано с увеличением риска данного заболевания. Частота заболеваемости у мужчин в 1,5 раза выше, чем у женщин, и пик заболеваемости приходится на возрастной промежуток 60-70 лет [36].

Роль диеты и контакта с канцерогенами в развитии почечно-клеточного рака не доказана. Незначительное потребление алкоголя по неизвестным пока причинам может иметь профилактическое воздействие. [20].

1.1.2 Подтипы ПКР

Согласно классификации Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) выделяют 3 основных гистологических подтипа ПКР: обыкновенный (светлоклеточный) – 80–90%, папиллярный – 10–15% и хромофобный – 4–5% случаев. Как показывают результаты однофакторного анализа, имеет место тенденция к получению более благоприятного прогноза у пациентов с хромофобным раком по сравнению с таковым у больных папиллярным или обычным (светлоклеточным) ПКР [1].

1.1.3 Диагностика и классификация стадирования

Более 50% случаев ПКР выявляются случайно. Бессимптомные ПКР обычно меньше и более низкой стадии, чем симптомный ПКР. Большинство ПКР остаются бессимптомными и непальпируемыми вплоть до последней стадии своего естественного протекания. Классическая триада: макроскопическая гематурия, боль в боку и пальпируемое абдоминальное опухолевидное образование сейчас встречаются крайне редко (6-10%). Клиническими симптомами являются макроскопическая гематурия, пальпируемое опухолевидное образование или билатеральный отёк нижних конечностей. Эти проявления должны послужить сигналом к началу радиологических исследований. Паранеопластические симптомы (такие, как гипертензия, гипертермия, потеря веса, нейромиопатия, полицитемия, анемия, высокая скорость оседания эритроцитов, амилоидоз и нарушенная функция печени) встречаются приблизительно у 20-30% пациентов с ПКР. Данные симптомы распознают у 20-30% пациентов на фоне метастатической опухоли [11].

Для определения стадии ПКР рекомендуется использовать TNM - классификация 2002 года Международного Противоракового союза (UICC).

Классификация TNM-стадирования 2002 года:

1 T первичная опухоль:

1.1 TX Недостаточно данных для оценки первичной опухоли;

1.2 T0 Первичная опухоль не определяется;

1.3 T1 Опухоль ≤ 7 см в месте наибольшего измерения, ограниченная почкой:

1.3.1 T1a Опухоль ≤ 4 см в месте наибольшего измерения, ограниченная почкой;

1.3.2 T1b Опухоль >4 см, но ≤ 7 см в наибольшем измерении.

1.4 T2 Опухоль > 7 см в наибольшем измерении, ограниченная почкой;

1.5 T3 Опухоль распространяется на крупные вены или прямо инвазирует надпочечник или околопочечные ткани, но в пределах фасции Герота:

1.5.1 T3a Опухоль напрямую инвазирует надпочечник или периферические ткани; не выходя за фасцию Герота;

1.5.2 T3b Массивное распространение опухоли в почечную вену(-ы) или её сегментарные ветви, или полую вену ниже диафрагмы;

1.5.3 T3c Массивное распространение опухоли на полую вену или её стенку выше диафрагмы;

1.6 T4 Опухоль распространяется за пределы фасции Герота.

2 N регионарные лимфатические узлы:

2.1 NX Недостаточно данных для оценки регионарных лимфатических узлов;

2.2 N0 Нет признаков поражения метастазами регионарных лимфатических узлов;

2.3 N1 Имеются метастазы в одном регионарном лимфатическом узле;

2.4 N2 Множественные метастазы в регионарных лимфатических узлах;

3 M отдаленные метастазы:

3.1 MX Отдаленные метастазы не могут быть оценены;

3.2 M0 Нет отдаленных метастазов;

3.3 M1 Отдаленные метастазы [11].

Лабораторная диагностика ПКР заключается в исследовании следующих лабораторных тестов:

- Общий анализ мочи – микрогематурия;
- Биохимический анализ крови - уровень креатинина, щелочной фосфатазы, лактатдегидрогеназы (ЛДГ), сывороточный уровень кальция, альбумина, скорость клубочковой фильтрации;
- Коагулограмма;
- Общий анализ крови – уровень гемоглобина, скорость оседания эритроцитов, подсчет лейкоцитарной формулы, тромбоцитов [1].

Провоспалительные цитокины могут способствовать прогрессии опухоли, а растворимые факторы (простагландин E₂, аденозинтрансформирующий фактор роста β и др.), продуцируемые клетками опухоли в ответ, вызывают перепрограммирование клеток иммунной системы. Свидетельством данного процесса при опухолевом образовании является тот факт, что под влиянием онкогенной программы миелоидная линия клеток глобально изменена, как интегрированная система: от патологически активированных ее незрелых предшественников до ее терминально дифференцированных клеток. Если при острых инфекциях, стрессе и травме миелопоэз характеризуется быстрой дифференциацией клеток, то при раке отмечается их дефектная дифференциация, приводящая к иммуносупрессивному фенотипу [40].

1.1.4 Лечение ПКР

На сегодняшний день основным наиболее эффективным методом лечения больных раком почки остается оперативное вмешательство (нефрэктомия, резекция почки) [2]. За последние годы значительно поменялся характер операций как при локализованном, так и при диссеминированном раке почки. Возросла доля органосохраняющих операций, которые стали применяться не только по абсолютным показаниям (двусторонние опухоли,

опухоль единственной почки), а наиболее часто по избирательным и относительным показаниям. Отдельные результаты органосохраняющих операций на ранних стадиях ПКР достигают 95–100 %, превосходя результаты органосохраняющих. При диссеминированном раке все чаще выбирается агрессивная хирургическая тактика, целью которой является устранение как первичной опухоли, так и отдаленных метастазов. Нефрэктомия и резекция почки в наше время могут быть выполнены как с использованием классических хирургических доступов, так и лапароскопически. Одним из дополнительных методов лечения ПКР является иммунотерапия [21].

Выделяют определенные иммунотерапевтические подходы:

- Специфическая иммунотерапия (вакциноterapia, использование дендритных клеток) и генная терапия;
- Неспецифическая иммунотерапия с использованием цитокинов (интерфероны и интерлейкины) и других модификаторов биологических реакций;
- Адаптивная клеточная иммунотерапия с применением аутолимфоцитов, лимфокин-активированных киллеров, опухолефильтрующих лимфоцитов;
- Трансплантация стволовых клеток [12].

1.2 Моноциты и макрофаги

1.2.1 Общие сведения о моноцитах и макрофагах

Моноциты и макрофаги являются стадиями развития миелоидных клеток и образуют моноклеарную фагоцитирующую систему [19].

Моноцит – это находящаяся в периферической крови клетка, в то время как макрофаг – клетка, мигрировавшая в ткань. Превращение моноцита в макрофаг осуществляется под влиянием тканевого микроокружения и может рассматриваться как дифференцировка клеток. Моноциты представляют

довольно крупные клетки диаметром 9—15 мкм с ядром бобовидной формы и тонкой структурой хроматина. Макрофаги крупнее, чем моноциты, их диаметр составляет 20—25 мкм, и они имеют распластанную форму [19].

Основным маркером моноцитов и макрофагов является молекула CD 14. К группе мембранных молекул, которые распознают паттерны, можно отнести и молекулу CD13 (аминопептидаза N), характерную для моноцитов, но не характерную для макрофагов. Для данных клеток свойственна также экспрессия лектиновых рецепторов врожденного иммунитета. Они распознают свободные D-гликозильные остатки глюкозы, маннозы, галактозы, N-ацетилглюкозамина, N-ацетилгалактозамина. На аутологичных клетках организма такие остатки закрыты остатками сиаловой кислоты и располагаются в основном на старых клетках, которые в ближайшее время должны подвергнуться клеточной гибели. Бактерии, грибы и простейшие несут на своей поверхности гликоконъюгаты с открытыми гликозильными остатками, которые распознаются лектиновыми рецепторами макрофагов, что существенно облегчает фагоцитоз патогенов. В результате распознавания происходит эндоцитоз, который включает в себя пиноцитоз и фагоцитоз, образующихся комплексов [19].

Следующая группа рецепторов, с большим разнообразием представленных на моноцитах/макрофагах, — Fc-рецепторы. Это молекулы, распознающие Fc-участок молекул иммуноглобулинов, обычно в связанном с антигеном состоянии. Данные рецепторы обеспечивают узнавание молекул иммуноглобулинов связанных с антигеном и облегчают фагоцитоз и разрушение моноцитами и макрофагами опсонизированных антителами клеток (в том числе патогенных). Параллельно происходит активация фагоцитов [19].

Моноциты и макрофаги секретируют цитокины, метаболиты арахидоновой кислоты, гормоны (адренкортикотропный и соматотропный гормоны, β -эндорфин и др.), протеогликаны, катионные белки, компоненты комплемента, белки межклеточного матрикса. Некоторые из них моноциты и макрофаги секретируют спонтанно, но активация обычно усиливает их

выработку. Выполнение макрофагами определенных функций: поставки ряда гуморальных факторов врожденного иммунитета, иммунорегуляторной роли, а также участие в формировании межклеточного матрикса и обмене липидов, связано с секреторной активностью этих клеток. Главной особенностью моноцитов и макрофагов является быстрая реакция на действие стимулирующих молекул, реализуемая обычно в пределах 1 часа после контакта с молекулой. Однако в этой функции макрофаги значительно уступают нейтрофилам [19].

1.2.2 Функции моноцитов и макрофагов

В связи со значительными различиями свойств моноцитов/макрофагов и нейтрофилов физиологическая значимость этих клеток почти никак не перекрывается, невзирая на то, что основная функция тех и других — фагоцитоз. Нейтрофилы ответственны за ранний этап защиты, который осуществляется с помощью фагоцитоза и проходит интенсивно, но кратковременно. Моноциты и макрофаги, кроме фагоцитоза, который реализуется наименее усиленно и наиболее долго, осуществляют прочие многочисленные функции, в том числе опосредованные секреторируемыми ими гуморальными продуктами [19].

Секреторная функция моноцитов и макрофагов осуществляется в основном по классическому механизму, который зависит от аппарата Гольджи, а дегрануляция, выброс содержимого лизосом и фаголизосом, играет незначительную роль. Эти две формы секреторного процесса отличаются в зависимости от наличия интактных микротрубочек — разрушение микротрубочек колхицином нарушает процесс дегрануляции и может даже усилить аппарат Гольджи - зависимую секрецию. Дегрануляцией осуществляется выброс производных оксида азота, продуктов окислительного взрыва, кислых гидролаз и других лизосомальных ферментов. Эти факторы обуславливают внеклеточный цитолиз и переваривание не только клеток, но и

их компонентов, то есть эффекторные функции врожденного иммунитета, тогда как продукты классического секреторного процесса в большей степени участвуют в регуляции воспаления и реакций врожденного иммунитета [19].

1.2.3 Популяции моноцитов

В настоящее время известно, что популяция моноцитов неоднородна. По уровню поверхностной экспрессии корцепторалигопололисахарида CD14 и CD16 принято выделять три субпопуляции моноцитов: $CD14^+CD16^-$, $CD14^+CD16^+$ и $CD14^{low}CD16^+$, которые выполняют в организме различные функции. Моноциты $CD14^+CD16^+$ называются провоспалительными. Они обладают ограниченной способностью к респираторному взрыву и фагоцитозу, однако активно продуцируют провоспалительные цитокины ($TNF\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$). Наиболее многочисленная субпопуляция $CD14^+CD16^-$ составляет 90–95 % всех моноцитов крови, характеризуется активной продукцией хемокинов ($IL-8$, $CCL2$, $CCL3$), выраженной фагоцитарной и противомикробной активностью, но в отличие от $CD14^+CD16^+$ для $CD14^+CD16^-$ клеток характерен низкий синтез провоспалительных цитокинов. Моноциты с фенотипом $CD14^{low}CD16^+$ обладают повышенной тропностью к эндотелию и высокой миграционной активностью. В ответ на стимуляцию эти клетки демонстрируют низкую фагоцитарную и противомикробную активность, слабый синтез провоспалительных цитокинов, однако конститутивно продуцируют $IL-1RA$, и в этой связи профиль $CD14^{low}CD16^+$ моноцитов иногда называют противовоспалительным [26].

В литературных источниках встречаются данные о наличии у моноцитов и макрофагов киллинговой способности в отношении опухолевых клеток, а также о наличии у них свойства поддерживать опухолевый рост. В этом процессе участвуют резидентные $CD16^+$, в частности $CD14^{low}CD16^+$ моноциты. Они продуцируют биологически активную форму гормона кортизола –

тетрагидрокортизол, который стимулирует деление опухолевых клеток, ангиогенез и вызывает иммуносупрессию [13].

Выделяют две основные разновидности макрофагов — резидентные и воспалительные. Резидентные макрофаги возникают в результате спонтанной (плановой) миграции моноцитов из кровотока в ткани, не связанной с воспалением. Воспалительные макрофаги образуются в процессе экстренной миграции в очаги воспаления. Воспалительные макрофаги обладают высокой фагоцитарной и бактерицидной активностью, выделяют ряд цитокинов и других гуморальных веществ, важных для формирования воспаления и реализации иммунной защиты. Эти свойства позволяют воспалительным макрофагам играть роль эффекторных клеток воспаления и врожденного иммунитета. Резидентные макрофаги выполняют преимущественно гомеостатические и регуляторные функции, участвуя в разрушении старых клеток и регуляции иммунных и воспалительных процессов, а также выступают в роли антигенпрезентирующих клеток. Резидентные макрофаги обладают более длительным сроком жизни (годы по сравнению с неделями для воспалительных макрофагов) [19].

1.3 Дендритные клетки

Дендритными клетками можно назвать гетерогенную популяцию антигенпрезентирующих клеток костномозгового происхождения, которые обладают следующими характеристиками:

- отростчатая, древоподобная морфология в тканях и наличие псевдоподий и ворсинок в циркулирующей крови и культуре клеток;
- высокая экспрессия зрелыми клетками молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС) не только I, но и II класса в сочетании с костимулирующими молекулами (CD80, CD86);

– способность захватывать (путём пиноцитоза и, в меньшей степени, фагоцитоза) и обрабатывать антиген с последующим его представлением Т-лимфоцитам, что вызывает активацию последних [9, 13].

1.2.1 История открытия

Дендритные клетки впервые были описаны Паулем Лангергансом в 1868 году. Он обнаружил беспигментные дендриты или звездчатые тела, которые в настоящее время носят его имя [34]. А в 1973 году Штайнман и Кон обнаружили клетки, внешне напоминающие короткие отростки нейронов (дендриты) в селезенке мыши и впервые применили термин «дендритная клетка» [3, 39].

Большой интерес к изучению ДК вызван их уникальными способностями к контролю активации и пролиферации других клеток иммунной системы, захвату и презентации антигенных структур, подобно уже известным антигенпрезентирующим клеткам: моноцитам, макрофагам и В-лимфоцитам. В дальнейшем были получены первые доказательства того, что именно ДК играют важнейшую роль в реакциях отторжения трансплантата и в регуляции как врожденного, так и приобретенного иммунного ответа [28].

1.2.2 Субпопуляции ДК

ДК человека представляют собой гетерогенную популяцию профессиональных антигенпрезентирующих клеток (АПК). На различных стадиях дифференцировки и созревания, характерные фенотипы ДК могут быть обнаружены в различных частях организма. А именно в периферической крови, в коже (дермальные ДК), в эпидермисе (клетки Лангерганса), в большинстве внутренних органов, например, в слизистых оболочках, выстилающих ротовую полость, кишечный тракт и дыхательные пути, в интерстициальной ткани печени, почек, сердца (интерстициальные ДК), в лимфоидной ткани

периферических лимфатических узлах, вилочковой железе, селезенке [31]. Выделяют две субпопуляции ДК, имеющих различные функциональные особенности, фенотипы и особенности развития: плазмацитоидные и миелоидные ДК [37]. Все ДК человека имеют костномозговое происхождение из общей гемопоэтической стволовой клетки и являются лейкоцитами [32].

Миелоидные ДК могут дифференцироваться из общего предшественника миелоидных клеток и из более зрелых форм (моноциты). Миелоидные ДК представляют из себя основную популяцию ДК, они наиболее эффективно и моментально представляют антигены клеткам иммунной системы. Однако эта популяция не однородна, выделяют несколько субпопуляций, которые имеют различный фенотип [5,7].

Плазмацитоидные ДК имеют существенные отличия от миелоидных, а именно поверхностный фенотип и функционирование. Они менее эффективно представляют антиген, но способны вырабатывать огромные количества интерферонов, особенно в первые сутки после контакта с вирусными антигенами. По своей морфологии миелоидные ДК очень похожи на плазматические клетки и секреторные лимфоциты. Начальные этапы созревания ДК в основном проходят в костном мозге, однако этот процесс возможен и за его пределами, в частности, из тимоцитов на самом раннем этапе их созревания в тимусе [4, 5, 7, 18, 25].

Предшественником миелоидной ДК при определенных условиях *in vitro* может стать CD34+ гемопоэтическая стволовая клетка, которая выделена из периферической крови, пуповиной крови или вещества костного мозга [22] и моноцит периферической крови [38].

Когда ДК занимают своё место в тканях, они приобретают устойчивую совокупность свойств и признаков, по которой их можно распознать. Для каждой из субпопуляций имеется свой фенотип, в нём присутствуют общие для всех ДК элементы и особенные молекулы, отражающие особенности развития и функционирования каждой определенной субпопуляции. Выделяют следующие

субпопуляции ДК: CD11c⁺CD4^{+/-}CD8⁻CD205^{+/-}, CD11c⁺CD4⁻CD8^{hi}CD205^{hi} [23, 35].

1.2.3 Дифференцировка и созревание ДК

Процессы дифференцировки и созревания ДК связаны с определенным местоположением этих клеток в организме. ДК считаются профессиональными клетками мигрантами, которые способны к смене местоположения в течение жизненного цикла. Предшественники ДК мигрируют из периферической крови в нелимфоидные ткани. Там они интенсивно захватывают различные антигены и принимают сигналы опасности от микроокружения. Затем еще незрелые ДК по афферентным лимфатическим путям или через кровь мигрируют в регионарные лимфатические узлы или селезенку. В процессе миграции происходит окончательное созревание ДК и формируется их способность представлять антигенные участки другим иммунокомпетентным клеткам [28].

На ранних стадиях развития инфекционного заболевания ДК распознают патоген - ассоциированные молекулярные паттерны и различные сигналы опасности, что приводит к формированию уникального фенотипа зрелых ДК и предопределяет дальнейшее развитие иммунного ответа. Функциональная активность конкретной субпопуляции ДК напрямую зависит от того, в каких условиях и под действием каких сигналов микроокружения происходило развитие этой субпопуляции. Зрелые ДК посредством прямого межклеточного взаимодействия с другими клетками иммунной системы играют ведущую роль в активации и регуляции адаптивного иммунного ответа [18].

1.2.4 Применение ДК в клинической практике

Исходя из исключительной роли ДК в инициации высокоспецифичного иммунного ответа, они имеют довольно много вариантов применения в клинической практике.

Наиболее ярким примером применения ДК можно назвать использование ДК-вакцин при онкологических заболеваниях. Уже накоплено достаточно много данных по применению ДК-вакцин при различных онкологических заболеваниях, позволяющих судить об эффективности её применения. Количество подобных исследований увеличивается с каждым годом, исследователи применяют различные методы получения, активации, нагрузки опухолевыми антигенами и введения вакцины, пытаясь увеличить её эффективность. Нагруженные опухолевыми антигенами ДК способны увеличивать количество и активность цитотоксических Т-лимфоцитов и НК-клеток, отвечающих на опухолевые клетки и, следовательно, увеличивающих продолжительность жизни онкологических больных и их уровень жизни. Но ДК-вакцины не могут полностью заменить классические варианты лечения у пациентов (резекция опухоли, химиотерапия и радиолучевая терапия) [3, 4, 22].

ДК вакцины показали свою эффективность и при затяжных и рецидивирующих инфекционных заболеваниях [22].

Так как ДК способны вызывать иммунологическую толерантность, их возможно использовать при аутоиммунных и гиперреактивных состояниях. Специфическое цитокиновое воздействие на стадии созревания ДК способно перевести их в субпопуляцию, подавляющую активность аутореактивных клонов. При увеличивающемся количестве людей, страдающих аллергическими заболеваниями, это свойство ДК становится всё востребованней [22].

1.3 НАД(Ф)Н - зависимые дегидрогеназы

НАД(Ф)Н - зависимые дегидрогеназы – ферменты, принадлежащие к классу оксидоредуктаз, которые в качестве кофермента используют никотинамидадениндинуклеотид (НАД) и никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ). Существует два вида подобных дегидрогеназ: аэробные и анаэробные. Аэробные дегидрогеназы или оксидазы катализируют перенос протонов (электронов) непосредственно на

кислород. Анаэробные дегидрогеназы ускоряют перенос протонов (электронов) на промежуточный субстрат, но не на кислород [15].

1.3.1 Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа

Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г6ФДГ, КФ 1.1.1.49) осуществляет дегидрирование глюкозо-6-фосфата и кофермента НАДФ. Этот фермент катализирует иницирующую и ключевую реакцию пентозофосфатного цикла.

У человека активность пентозофосфатного цикла относительно высока в активированных клетках иммунной системы, надпочечниках, печени, молочной железе в период лактации и в эмбриональной ткани. Пентозофосфатный цикл имеет огромное значение для системы внутриклеточного метаболизма. Он поставляет НАДФН для реакций биосинтеза холестерина, жирных кислот и др. Почти на 50% покрывается потребность клеток в НАДФН за счет пентозофосфатного цикла. Кроме того, продуктами пентозофосфатного цикла являются различные пентозофосфаты, необходимые для реакций синтеза некоторых коферментов и нуклеиновых кислот [15].

1.3.2 Глицерол-3-фосфатдегидрогеназа

Глицерол-3-фосфатдегидрогеназа (ГЗФДГ, КФ 1.1.1.8) осуществляет обратимое окисление глицеро-3-фосфата в диоксиацетонфосфат. Фермент занимает центральное положение в реакциях липидного обмена и участвует в работе α -глицерофосфатного водородного шунта, с помощью которого электроны НАДН, синтезированного в цитоплазме, способны включаться в митохондриальную дыхательную цепь [15].

1.3.3 Лактатдегидрогеназа

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ, КФ 1.1.1.27) фермент гликолиза, который

обратимо катализирует окисление лактата в пируват и использует в качестве кофермента НАД. Данный фермент занимает центральное положение в регуляции цитоплазматического уровня НАД/НАДН. Анаэробная реакция ЛДГ заключается в том, что в случае избытка НАДН в цитоплазме ЛДГ восстанавливает пировиноградную кислоту до лактата, который затем удаляется из клетки. В то же время, при усилении аэробных процессов ЛДГ может окислять лактат до пирувата с образованием НАДН (аэробная реакция ЛДГ). В этом случае пируват, который образовался при окислении лактата, поступает на реакции цикла трикарбоновых кислот через пируватдегидрогеназный комплекс [15].

1.3.4 НАД и НАДФ зависимые малатдегидрогеназы

НАД - зависимая малатдегидрогеназа (МДГ, КФ 1.1.1.37) – фермент, который катализирует обратимое окисление малата в оксалоацетат. Данная оксидоредуктаза локализуется в митохондриях (ЦТК) и в цитоплазме. В митохондриях уровень соотношения НАДН/НАД относительно велик, в результате чего внутримитохондриальный оксалоацетат восстанавливается в малат, который легко выходит из митохондрий. В цитоплазме уровень отношения НАДН/НАД мал, что приводит к окислению малата при участии цитоплазматической НАД - зависимой МДГ. МДГ принимает участие в реакциях азотного обмена. Одним из ключевых интермедиатов азотного обмена является аспартат, который синтезируется в результате трех сопряженных реакций. Кроме того, МДГ принимает участие в работе малат-аспартатного водородного шунта митохондрий [15].

Малик-фермент (НАДФ-МДГ) является наиболее существенным в системе липидного анаболизма, и через восстановление НАДФ принимает участие в реакциях катаболизма ксенобиотиков и осуществляет шунтирование медленных реакций ЦТК [16].

1.3.5 НАД и НАДФ зависимые изоцитратдегидрогеназы

В клетках существует два типа изоцитратдегидрогеназ. НАД-зависимая изоцитратдегидрогеназа (НАДИЦДГ, КФ 1.1.1.41) находится только в митохондриях, а НАДФ-зависимая изоцитратдегидрогеназа (НАДФИЦДГ, КФ 1.1.1.42) есть как в митохондриях, так и в цитоплазме. НАДИЦДГ осуществляет третью реакцию в цикле трикарбоновых кислот, которая, является лимитирующей [15].

1.3.6 НАД и НАДФ зависимая глутаматдегидрогеназа

Глутаматдегидрогеназа (ГДГ) осуществляет окислительное дезаминирование L-глутаминовой кислоты. В качестве кофермента глутаматдегидрогеназа использует НАД (КФ 1.4.1.2) или НАДФ (КФ 1.4.1.4). Реакция включает анаэробную фазу дегидрирования глутаминовой кислоты с образованием промежуточного продукта – иминоглутаровой кислоты, после чего осуществляется спонтанный гидролиз с образованием аммиака и α -кетоглутаровой кислоты. Данные реакции являются обратимыми [15].

2 Материалы и методы

2.1 Объект исследования

На базе КГБУЗ «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер имени А.И. Крыжановского» обследованы больные ПКР (T1-3N0-2M0-1, преимущественно светлоклеточный тип) в возрасте 40-55 лет до хирургического лечения (n=81). Диагноз ПКР у всех больных верифицирован гистологически. В качестве контрольной группы было обследовано 40 практически здоровых людей аналогичного возрастного диапазона.

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

2.2 Методы исследования

2.2.1 Выделение моноцитов

Цельную гепаринизированную кровь ставили на 30 мин в термостат (37°C), для получения лейкоцвеси. Затем лейкоцвесь наслаивали на градиент плотности фиколл-урографина ($\rho=1,077$ г/см³) и центрифугировали при 400g 40мин. Кольцо моноклеарной фракции отбирали и дважды отмывали от фиколла путем центрифугирования в фосфатно-солевом буфере (PBS) при 400g 5мин. Отмытые клетки моноклеарной фракции подсчитывали с использованием трипанового синего для определения количества жизнеспособных клеток. Далее клетки разводили в среде RPMI-1640 с глутаматом до концентрации 5 млн./мл. заливали в культуральный флакон (на

25 см²)с вентилируемой пробкой(greinerbio-one, Германия) и инкубировали в СО² инкубаторе(Sanyo, Япония) 70мин. После чего надосадочную жидкость с не прикрепившимися клетками сливали, прикрепившиеся клетки (моноциты), отделяли от пластика инкубацией с раствором Версена в течение 20мин. при температуре 4°С. Далее клетки отмывали от раствора Версена путем центрифугирования в среде RPMI-1640 с добавлением 100-200 мкл сыворотки. Отмытые клетки подчитывали с использованием трипанового синего для определения количества жизнеспособных клеток и разводили до концентрации 1млн./мл.

2.2.2 Выращивание ДК

Для выращивания ДК необходимы моноциты в концентрации 1,5 – 2 млн./мл. К клеткам добавляли полную среду RPMI-1640, содержащую 10 % аутологичной сыворотки и провоспалительные цитокины — ГМ-КСФ (100 нг/мл) и ИФ- α (1000ед/мл). Для получения незрелых ДК клетки культивировали 5 суток со сменой $\frac{1}{2}$ объема полной среды и цитокинов на 3 день культивирования. Для получения зрелых ДК на 5 день культивирования добавляли коктейль провоспалительных цитокинов, стимулирующих созревание ДК: TNF- α (20 нг/мл) и лизат опухолевого материала. Культивировали 2 дня.

ДК собирают пастеровской пипеткой, незначительную часть прикрепившихся клеток снимают скрепером, отмывают двукратным центрифугированием в 10 мл 0,9% изотонического раствора NaCl, содержащего альбумин человека (конечная концентрация 2%), при 1000 об/мин в течение 10мин.

Полученные клетки помещают в стерильные стеклянные флаконы, замораживают и хранят в низкотемпературном холодильнике (Т=-84°С).

2.2.3 Билюминесцентное определение активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ моноцитов

Билюминесцентное определение активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ проводится согласно ранее разработанным методикам. Для проведения данной методики суспензии выделенных моноцитов и зрелых и незрелых ДК, содержащие клетки в концентрации 1 млн/мл, после единоразового замораживания - размораживания дополнительно разрушали посредством осмотического лизиса с добавлением дистиллированной воды в соотношении 1:5 по объему и 1,0-2,0 миллимоль (мМ) дитиотреитола. Далее проводили непосредственное определение активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ. Для этого в 150 мкл инкубационной пробы, которая содержала соответствующий субстрат и кофактор, вносили 50 мкл суспензии лизированных моноцитов и ДК. Определенные значения концентраций субстратов и кофакторов, а также кислотность среды для определяемых ферментов представлены в Таблице 1. Следует выделить, что в инкубационную пробу для определения активности НАДФИЦДГ и НАДИЦДГ дополнительно добавляли АДФ в концентрациях 2,15 и 1,3 мМ соответственно. В среду инкубации для определения активности НАДНГДГ и НАДФНГДГ дополнительно вносили NH_4Cl в концентрации 5,0 мМ, а для определения активности ГР – ЭДТА в концентрации 0,5 мМ.

После инкубации изучаемых проб при 37°C в течение 30 минут (для ферментативных реакций с восстановлением НАД(Ф)+) и 5 минут (для реакций с окислением НАД(Ф)Н) к 200 мкл инкубационной смеси добавляли 50 мкл флавинмоноклеотида (ФМН) в концентрации $1,5 \cdot 10^{-5} \text{M}$, 50 мкл 0,0005% миристинового альдегида и 10 мкл ферментативной системы НАД(Ф)Н : ФМН оксидоредуктаза - люцифераза (все реактивы билюминесцентной системы разведены в 0,1 М K^+ , Na^+ - фосфатном буфере с pH 7,0). Уже после смешивания билюминесцентных реактивов и инкубационной пробы с

помощью билюминометра “БЛМ-8803” (сконструирован в СКТБ “Наука”, г. Красноярск) производили измерение свечения.

Таблица 1 – Концентрация субстратов, кофакторов и показатели рН среды для определения активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в дендритных клетках билюминесцентным методом

Фермент	Субстрат, мМ	Кофактор, мМ	рН буфера
Г6ФДГ	Г6Ф – 1,5	НАДФ – 0,025	9,8
Г3ФДГ	Г3Ф – 0,5	НАД – 0,35	9,8
ЛДГ	Лактат – 2,0	НАД – 0,50	9,0
МДГ	Малат – 2,0	НАД – 2,50	9,8
НАДФМДГ	Малат – 7,5	НАДФ – 0,375	9,8
НАДФГДГ	Глутамат – 0,5	НАДФ – 1,65	9,8
НАДГДГ	Глутамат – 8,7	НАД – 8,10	9,8
НАДИЦДГ	Изоцитрат – 5,0	НАД – 5,0	7,8
НАДФИЦДГ	Изоцитрат – 1,375	НАДФ – 0,075	7,4
НАДНЛДГ	Пируват – 0,25	НАДН – 0,005	7,0
НАДНМДГ	Оксалоацетат – 0,5	НАДН – 0,005	7,0
ГР	GSH – 0,5	НАДФН – 0,0025	7,4
НАДФНГДГ	Оксоглутарат – 100	НАДФН – 0,0025	7,4
НАДНГДГ	Оксоглутарат – 100	НАДН – 0,0025	7,0

Примечание: среды с рН 9,0 и 9,8 готовили на Трис-НСl буфере; с рН 7,0, 7,4 и 7,8 – на К⁺,Na⁺-фосфатном буфере.

Ферментативная система НАД(Ф)Н: ФМН оксидоредуктаза - люцифераза изготовлена из очищенных методами ионообменной хроматографии и гельфильтрации люциферазы из *Photobacterium leiognathi* и оксидоредуктазы из *Vibrio fischeri* в Институте биофизики СО РАН г.Красноярска [17].

Принимая во внимание, что в клетках уже имеется некоторое количество субстратов для протекания различных метаболических процессов, в том числе и

катализируемых изучаемыми ферментами, нами определялись показатели, условно названные “субстратный фон ферментов”.

Определение производили в тех же условиях, что и для вышеперечисленных дегидрогеназ, но в инкубационную смесь вместо соответствующего субстрата вносили буфер. В результате измерения свечения на биолюминометре получали относительные значения активности исследуемых ферментов. Чтобы получить абсолютные значения активности необходимо построить график зависимости интенсивности биолюминесценции от концентрации НАД(Ф)Н (калибровочный график). Для этого 200 мкл стандартного раствора НАД(Ф)Н в диапазоне 10^{-9} – 10^{-4} М вносили в кювету биолюминометра, содержащую биолюминесцентные реактивы в концентрациях указанных ранее, после этого производилось измерение интенсивности биолюминесценции. В связи с широким диапазоном рН буферов, используемых для определения дегидрогеназной активности, а также рН - зависимостью биолюминесценции ферментативной системы [17], калибровочные графики строились для каждого рН буфера.

Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ рассчитывали по формуле:

$$A = \frac{\Delta[C] \times V \times 10^6}{T}$$

где $\Delta[C]$ – разница концентраций НАД(Ф)Н в пробах “фермент” и “фон фермента”;

V – объем пробы в миллилитрах;

T – время инкубации.

Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ выражали в ферментативных единицах на 10^4 клеток, где 1 Е=1 мкмоль/мин [6]. В связи с большим количеством вариантов рН буферов, которые используются для определения активности исследуемых дегидрогеназ моноцитов, зрелых и незрелых ДК, а также зависимостью биолюминесценции ферментативной

системы от рН буфера калибровочные графики строились для всех рН растворов. Пример подобной зависимости представлен на рисунке 1.

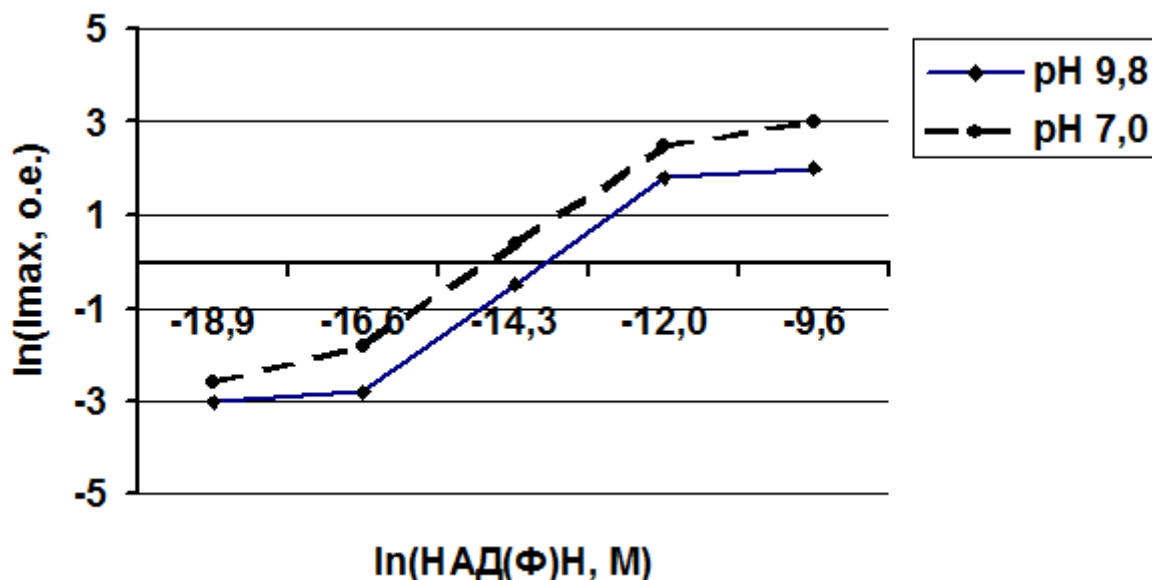


Рисунок 1 – Интенсивность билюминесценции НАД(Φ)Н: ФМНоксидоредуктазы - люциферазы в зависимости от концентрации НАД(Φ)Н и рН буфера.

2.2.4 Статистические методы исследования

По результатам проведенного исследования в программе MS Excel 2010 была сформирована база данных, на основе которой с помощью пакета прикладных программ и Statistica 8,0 производился статистический анализ. Выборку описывали с помощью подсчета медианы и интерквартильного размаха в виде 25 и 75 перцентилей (C_{25} и C_{75}). Достоверность различий между показателями контрольной и опытной групп в пределах одного вида клеток оценивали по непараметрическому критерию Mann - Whitney. Достоверность различий в динамике дифференцировке моноцитов в ДК у больных ПКР определяли по критерию Wilcoxon.

3 Результаты и обсуждения

Из текста ВКР изъяты результаты интеллектуальной деятельности, которые имеют потенциальную коммерческую научную ценность в силу неизвестности их третьим лицам.

Список сокращений

ПКР – почечноклеточный рак

ДК – дендритные клетки

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

АФК – активные формы кислорода

НАД – никотинамидадениндинуклеотид

НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат

ЛДГ – лактатдегидрогеназа

ГБРДГ – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа

ГЗФДГ – глицерол-3-фосфатдегидрогеназа

МДГ – малатдегидрогеназа

НАД-МДГ – НАД зависимая малатдегидрогеназа

НАДФ-МДГ – НАДФ зависимая малатдегидрогеназа

НАДИЦДГ – НАД-зависимая изоцитратдегидрогеназа

НАДФИЦДГ – НАДФ-зависимая изоцитратдегидрогеназа

ЦТК – цикл трикарбоновых кислот

ГДГ – глутаматдегидрогеназа

Список использованных источников

1. Алексеев, Б. Я. Клинические рекомендации по диагностике и лечению больных раком почки / Б. Я. Алексеев [и др.]. – М.: Издательство РАМН 2014. – 38 с.
2. Аляев, Ю. Г. Выбор диагностической и лечебной тактики при опухоли почки / Ю. Г. Аляев, А. А. Крапивин. – Тверь : Триада, 2005. – 237 с.
3. Ахматова, Н. К. Врождённый иммунитет: противоопухолевый и противоионфекционный / Н. К. Ахматова, М. В. Киселевский. – М.: Практическая медицина, 2008. – 256 с.
4. Бажанов, С. П. Применение специфической противоопухолевой вакцины на основе аутологичных дендритных клеток в комплексном лечении больных со злокачественными полушарными глиомами / С. П. Бажанов, [и др.]. // Бюллетень сибирской медицины. – 2008. – № 5. – С. 46–50.
5. Балдуева, И. А. Противоопухолевые вакцины / И. А. Балдуева // Практическая онкология. – 2003. – Т. 4, № 3. – С. 157 – 166.
6. Березов, Т.Т. Биологическая химия : учебник / Т. Т Березов, Б. Ф. Коровкин. – М. : Медицина, 1998. – 704 с.
7. Дыгай, А. М. Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор. Фармакологические аспекты : монография / А. М. Дыгай, В. В. Жданов. – М.: Издательство РАМН, 2010. – 138 с.
8. Зуков, Р. А. Анализ факторов риска развития почечно-клеточного рака / Р. А Зуков, В. В. Козлов, А. В. Шульмин // Сибирское медицинское обозрение. – 2014. – №4. – С. 65–68.
9. Исайкина, Я. И. Генерирование дендритных клеток *in vitro* из моноцитов и CD34+ гемопоэтических предшественников продукта лейкофереза пациентов со злокачественными новообразованиями / Я. И. Исайкина, [и др.]. // Онкологический журнал. – 2011. – Т. 4, № 4. – С. 40–46.
10. Каприн, А. Д. Злокачественные новообразования в России в 2012 году (заболеваемость и смертность) / А. Д. Каприн, В. В. Старинский, Г. В.

Петрова. – М. : ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздрава России. – 2014. – 250 с.

11. Льюнгберг, Б. Рекомендации по диагностике и лечению почечно-клеточного рака / Б. Льюнгберг // Почечноклеточный рак. - 2009. - №3. - С. 46-58.

12. Матвеев, Б. П Клиническая онкоурология : монография / Б. П. Матвеев. – М. : АБВ - Пресс, 2011. – С. 11-226.

13. Панин, Л. Е. Роль резидентных макрофагов в механизме клеточной пролиферации и опухолевого роста / Л. Е. Панин // Бюллетень сибирской медицины. – 2008. – Приложение 3. – С. 5–11.

14. Пинаев, Г. П. Методы культивирования клеток : сборник / Г. П. Пинаев, М. С. Боданова. – Санкт-Петербург : Изд-во Политехн. ун-та, 2008. – 278 с.

15. Савченко, А. А. Основы клинической иммунометаболомики: учебник/ А. А. Савченко, А. Г. Борисов – Новосибирск: Наука, 2012. – 25-35 с.

16. Савченко, А. А. Иммунометаболические нарушения при распространенном гнойном перитоните: учебник / А. А. Савченко, Д. Э. Здзитовецкий, А. Г. Борисов. – Новосибирск: Наука, 2013. – 80 с.

17. Тюлькова, Н. А. НАД(Ф)-Н-реагент для биолюминесцентного анализа / Н.А.Тюлькова, Э.В. Антонова – Красноярск : ИБФ, 1991. – 17с.

18. Цветков, В. В. Биология дендритных клеток / В. В. Цветков, Т. В. Сологуб, И. И. Токин // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. – 2014. – №3. – С. 69.

19. Ярилин, А. А. Иммунология: учебник / А. А. Ярилин. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 63-71, с.

20. Ljungberg, В. Рекомендации европейской ассоциации урологов. / Ljungberg В. [et al.]. // Почечно-клеточный рак. – 2014. – №17 – С. 1218–1233.

21. Voccardo, F. Interleukin-2, interferon-alpha and interleukin-2 plus interferon-alpha in renal cell carcinoma. A randomized phase II trial. / Voccardo F., Rubagotti A., Canobbio L. // Tumori. – 1998. – Vol. 84. – P. 534–39.

22. Caux, C. GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells / C. Caux, [et al.]. // Nature. – 1992. – Vol. 360. – P. 258.
23. Cheng, P. Regulation of dendritic cell differentiation and function by Notch and Wnt pathways / P. Cheng, [et al.] // Immunological Reviews. – 2010. – Vol. 234. – P. 105–119.
24. Cogliano, V.J. Preventable exposures associated with human cancers / V.J. Cogliano, [et al.]. // JNCI. – 2011. – Vol. 103. – P. 1827-1839.
25. Coquerelle, C. DC subsets in positive and negative regulation of immunity / C. Coquerelle, M. Moser // Immunological Reviews. – 2010. – Vol. 234. – P. 317–334.
26. Cros, J. Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors / J. Cros, [et al.] // Immunity. – 2010. – Vol.33, № 3. – P. 375–386.
27. Gago-Dominguez, M. Lipid peroxidation: a novel and unifying concept of the etiology of renal cell carcinoma (United States) / M. Gago- Dominguez, [et al.]. // Cancer Causes Control. – 2002. – Vol. 13, № 3. – P. 287-293.
28. Hart, D.N. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response / D.N. Hart. // Blood. – 1997. – Vol. 90. – P. 3245-3287.
29. Hunt, J.D. Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: meta analysis of 24 studies / J.D. Hunt, [et al.]. // Int. J. Cancer. – 2005. – Vol. 114. – P. 101-108.
30. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans [Electronic resource]. – Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2011. – URL: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/PDFs/index.php>.
31. Katsuaki, S. Dendritic Cells-Nature and Classification / S. Katsuaki, F. Shigeharu // Allergology International. – 2007. – Vol. 56. – P. 183-191.
32. Katz, S.I. Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow / S. I. Katz, K. Tamaki, D. H. Sachs // Nature. – 1979. – Vol. 282. – P. 324-326.

33. Klinghoffer, Z. Obesity and renal cell carcinoma: epidemiology, underlying mechanisms and management considerations / Z. Klinghoffer, [et al.]. // *Expert Rev. Anticancer Ther.* – 2009. – Vol. 9. – P. 975-987.
34. Langerhans, P. Ueber die Nerven der menschlichen Haut / P. Langerhans // *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie, und für Klinische Medizin.* – Berlin, 1868. – Vol. 44. – P. 325-337.
35. Ling-ling, T. Phenotypic and functional characteristics of dendritic cells derived from human peripheral blood monocytes / T. Ling-ling, [et al.]. // *Journal of Zhejiang University SCIENCE.* – 2005. – Vol. 6(12). – P. 1176–1181.
36. Liu, H. Familial renal cell carcinoma from the Swedish Family-Cancer Database / H. Liu, J. Sundquist, K. Hemminki. // *Eur. Urol.* – 2011. – Vol. 60. – P. 987-993
37. O’Doherty, U. Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature / U. O’Doherty [et al.] // *J. Immunol.* – 1994. – Vol. 82. – P. 487-493.
38. Sallusto, F. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/ macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor / F. Sallusto, A. Lanzavecchia // *J. Exp. Med.* – 1994. – Vol. 179. – P. 1109-1118.
39. Steinman, R.M. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice / R.M. Steinman, Z.A. Cohn // *J. Exp. Med.* – 1973. – Vol. 137. - P. 1142-1162.
40. Whiteside, T.L. Immune responses to malignancies. / T.L. Whiteside // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2010. – Vol. 125. – P. 83—272.