

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТАХ СТИМУЛЯЦИИ СОЗРЕВАНИЯ

Фадеев Ф.А., Александрова А.Д., Могиленских А.С.

ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», г. Екатеринбург, Россия

Резюме. Дендритные клетки, полученные из моноцитов периферической крови, могут использоваться для клеточной иммунотерапии онкологических заболеваний. Чаще всего для иммунотерапии используют зрелые ДК, сенсibilизированные опухолеассоциированными антигенами. Функциональная активность ДК при иммунотерапии во многом определяется их иммунофенотипом и секреторным профилем, формирующимися после созревания. Целью данной работы являлась оценка фенотипических свойств ДК при стимуляции созревания различными способами.

Стимуляция созревания ДК осуществлялась с использованием провоспалительных цитокинов и их смесей, а также лигандов дендритноклеточных TLRs. Для стимуляции были использованы: TNF, poly I:C, LPS, цитокиновый коктейль (TNF + IL-1 + IL-6 + PGE2), коктейль в смеси с poly I:C, а также лизат клеток меланомы. Через 48 часов после стимуляции созревания оценивали уровень экспрессии ДК-рецепторов, принимающих участие во взаимодействии с Т-лимфоцитами, используя метод проточной цитофлуориметрии. Также оценивали секрецию клетками IL-12 (активатора Т-клеточного иммунного ответа) и IL-10 (ингибитора Т-клеточного иммунного ответа) с помощью ИФА.

Нами было показано, что ДК, полученные после стимуляции цитокиновым коктейлем, демонстрируют наиболее высокий уровень экспрессии рецепторов, необходимых для взаимодействия с Т-лимфоцитами и активации клеточного звена иммунитета: антигенпрезентирующих (HLA-DR), костимулирующих (CD83, CD40, CD86) и рецепторов, контролирующих миграцию ДК в лимфоузлы (CCR7). Кроме того, стимулированные с помощью коктейля ДК активно секретируют как IL-12, так и IL-10. Эффект от применения TNF и poly I:C был умеренным: экспрессия большинства рецепторов была существенно ниже, чем при использовании коктейля; достоверных отличий от контроля (без стимуляции созревания) по уровню секреции IL-12 выявлено не было. LPS и лизат клеток меланомы практически не оказали влияния как на иммунофенотип, так и на секреторный профиль ДК. Добавление к цитокиновому коктейлю poly I:C практически не оказало влияния на рецепторный пейзаж ДК, но привело к значительному увеличению секреции как провоспалительного IL-12, так и противовоспалительного IL-10.

Полученный результат позволяет предварительно рассматривать смесь цитокинового коктейля с poly I:C как наиболее эффективное средство для стимуляции созревания ДК. В то же время требуются

Адрес для переписки:

Фадеев Федор Алексеевич
ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»
620026, Россия, г. Екатеринбург,
ул. Карла Маркса, 22а.
Тел.: 8 (912) 618-24-97.
Факс: 8 (343) 355-62-40.
E-mail: fdf79@mail.ru

Address for correspondence:

Fedor A. Fadeyev
Institute of Medical Cell Technologies
22a Carl Marx St
Ekaterinburg
620026 Russian Federation
Phone: +7 (912) 618-24-97.
Fax: +7 (343) 355-62-40.
E-mail: fdf79@mail.ru

Образец цитирования:

Ф.А. Фадеев, А.Д. Александрова, А.С. Могиленских
«Фенотипические свойства дендритных клеток при различных вариантах стимуляции созревания»
// Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 2.
С. 253–262. doi: 10.15789/1563-0625-PFO-2875
© Фадеев Ф.А. и соавт., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

F.A. Fadeyev, A.D. Aleksandrova, A.S. Mogilenskikh
“Phenotypic features of dendritic cells when using different modes of their stimulated maturation”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2024, Vol. 26, no. 2, pp. 253–262.
doi: 10.15789/1563-0625-PFO-2875
© Fadeyev F.A. et al., 2024
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-PFO-2875

дальнейшие эксперименты по сравнению функциональной активности ДК, полученных с использованием разных способов стимуляции созревания.

Ключевые слова: дендритные клетки моноцитарного происхождения, стимуляция созревания, рецепторы, цитокины, иммунофенотипирование, секреторный профиль

PHENOTYPIC FEATURES OF DENDRITIC CELLS WHEN USING DIFFERENT MODES OF THEIR STIMULATED MATURATION

Fadeyev F.A., Aleksandrova A.D., Mogilenskikh A.S.

Institute of Medical Cell Technologies, Ekaterinburg, Russian Federation

Abstract. Monocyte-derived dendritic cells (DCs) can be used for cell immunotherapy of cancer. In most cases, mature DCs, loaded with tumor-associated antigens, are used for immune therapy. The functionality of DCs for immunotherapy substantially depends on their immunophenotype and secretory profile, which are established after DCs maturation. The purpose of this research was to explore the phenotype of DCs after using various approaches for stimulation of their maturation.

Maturation of DCs was stimulated by pro-inflammatory cytokines and their mixtures, or by ligands to the TLRs of DCs. DCs were stimulated by the following means: TNF; poly I:C; LPS; cytokine cocktail (TNF + IL-1 + IL-6 + PGE₂); the cocktail mixed with poly I:C; and melanoma cells lysate. Forty-eight hours after stimulation, the expression of DCs' receptors involved into their interaction with T cells, was evaluated by flow cytometry. Moreover, the secretion of IL-12 (activator of T cell response) and IL-10 (inhibitor of T cell response) was estimated by ELISA technique.

We have shown that, following stimulation with cytokine cocktail, the DCs exhibit highest expression of receptors, which are necessary for interaction with T cells and for activation of T cell mediated immune response, i.e., antigen-presenting receptors (HLA-DR), co-stimulatory receptors (CD83, CD40, CD86), and receptors controlling the migration of DCs to lymph nodes (CCR7). Moreover, the cocktail-stimulated DCs intensively secrete both IL-12 and IL-10. The stimulatory effect of TNF and poly I:C proved to be moderate: the expression of most receptors was significantly lower than after using the cocktail; no significant differences from control (in absence of induced maturation) in IL-12 secretion were detected. LPS and melanoma cell lysate did not affect both expression of receptors and secretory profile of DCs. Addition of poly I:C to the cytokine cocktail did not affect the receptor expression, but significantly increased the secretion of both pro-inflammatory IL-12 and anti-inflammatory IL-10.

The results of experiments demonstrate that the mixture of cytokine cocktail and poly I:C seems to be the most effective tool for stimulation of DCs maturation. However, further experiments are required to compare the functionality of DCs when using different tools for induced DC maturation.

Keywords: dendritic cells of monocytic origin, induced maturation, receptors, cytokines, immunophenotyping, secretion profile

Введение

Одним из современных направлений в терапии онкологических заболеваний является иммунотерапия. Данное направление предполагает искусственную стимуляцию иммунных механизмов защиты против опухолевых клеток и включает в себя, в частности, клеточную терапию с использованием клеток, участвующих в развитии противоопухолевого иммунного ответа.

Ключевую роль в инициации и развитии адаптивного противоопухолевого иммунного ответа играют дендритные клетки (ДК). Эти клетки выполняют функцию антигенпрезентирующих клеток, которые представляют эпитопы опухолеассоциированных антигенов Т-лимфоцитам и иницируют их дальнейшую пролиферацию и дифференцировку. Кроме того, ДК во многом

определяют направление дифференцировки наивных Т-лимфоцитов.

В то же время ДК сами по себе не обладают наборами рецепторов, способными напрямую распознавать опухолеассоциированные антигены, что в значительной мере затрудняет инициацию Т-зависимого противоопухолевого иммунного ответа. Помимо этого, сами опухолевые клетки обладают иммуносупрессивной активностью, вследствие чего противоопухолевая активность иммунной системы остается зачастую недостаточной для предотвращения дальнейшего их роста [6].

Способность дендритных клеток инициировать иммунный ответ и презентировать антигены Т-клеткам позволяет рассматривать их в качестве перспективного средства для терапии онкологических заболеваний посредством акти-

вазии Т-звена иммунитета, хотя их медицинское применение носит пока, в основном, характер клинических испытаний. Дендритноклеточные вакцины использовали для лечения меланомы [3, 16], глиобластомы [13], рака предстательной железы [29], молочной железы [1, 20].

В большинстве случаев в терапевтических целях используют полученные *in vitro* аутогенные дендритные клетки. Эти клетки сенсибилизируются опухолеассоциированными антигенами и, кроме того, подвергаются дополнительному воздействию для стимуляции созревания. В ходе созревания ДК приобретают способность к презентации антигенов и к активации Т-клеток. Полученные зрелые ДК после введения пациенту должны мигрировать в лимфоузлы, презентировать наивным CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитам эпитопы опухолеассоциированных антигенов и стимулировать их пролиферацию и дифференцировку в обладающие противоопухолевой активностью Т-хелперы-1 и цитотоксические Т-лимфоциты соответственно [7, 25]. В то же время клинические испытания демонстрируют, как правило, ограниченную эффективность дендритноклеточной терапии [17, 32]. Причинами низкой эффективности ДК вакцин могут являться как иммуносупрессорный эффект опухолевых клеток и снижение уровня экспрессии ими опухолеассоциированных антигенов, так и ограниченная функциональная активность самих введенных пациенту дендритных клеток и, в частности, низкий уровень их миграции в периферические лимфоузлы для последующего контакта с Т-клетками [30].

Очевидным способом повышения функциональной активности ДК может являться подбор способа стимуляции их созревания, обеспечивающий максимальный уровень экспрессии рецепторов, участвующих во взаимодействии с Т-клетками, а также секреции ДК цитокинов, влияющих на дифференцировку Т-лимфоцитов.

В данной работе нами было проанализировано влияние состава смесей, применяемых для стимуляции созревания ДК, на экспрессию ими антигенпрезентирующих и костимулирующих рецепторов, а также на их секреторную активность. В качестве факторов стимуляции созревания ДК эти смеси содержали провоспалительные цитокины и лиганды для паттерн-распознающих рецепторов (PRR).

Материалы и методы

Получение незрелых дендритных клеток

В работе использовали периферическую кровь здоровых доноров в возрасте 23–43 лет после получения от них информированного согласия. ДК получали из моноцитов крови путем их цитокиновой стимуляции, согласно модифицированной

методике [2]. Взятую из вены периферическую кровь в объеме 70 мл смешивали с равным объемом раствора Дюльбекко (DPBS) без кальция и магния. Из полученной смеси выделяли фракцию мононуклеарных клеток с помощью раствора для сепарации клеток Lympholyte-H (Cedarlane, Канада). Кровь смешанную с DPBS, наслаивали на раствор для сепарации клеток и центрифугировали при 800 g в течение 20 мин., после чего на границе раздела фаз собирали кольцо из мононуклеарных клеток. Собранную мононуклеарную фракцию отмывали дважды раствором Эрла, ресуспендировали в 30 мл среды RPMI-1640 («ПанЭко», Россия) и переносили в культуральный флакон T175 (Nunc, Дания). Флакон инкубировали в течение 2 часов в CO₂-инкубаторе. В течение этого времени происходила адгезия моноцитов на пластике флакона. По завершении инкубации флакон отмывали от неадгезировавшихся клеток (преимущественно лимфоцитов); адгезировавшиеся на пластике моноциты оставались во флаконе.

После отмывки во флакон с моноцитами вносили ростовую среду с AIM-V (Gibco, Thermo Fisher Scientific, США) с добавлением цитокинов: гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF, 72 нг/мл) и интерлейкина-4 (IL-4, 30 нг/мл) (SCI-STORE, Россия) для стимуляции дифференцировки клеток. Клетки культивировали в CO₂-инкубаторе (37 °C, 5% CO₂) на протяжении 6 суток. На 2-е и 4-е сутки в среду дополнительно вносили цитокины в тех же концентрациях.

Стимуляция созревания ДК

Из флакона с полученными незрелыми ДК удаляли ростовую среду. Клетки инкубировали в течение 15 мин. в TrypLE (Thermo Fisher Scientific, США), после чего дополнительно снимали неоткрепившиеся клетки скребком. ДК отмывали от остатков TrypLE, ресуспендировали в свежей ростовой среде того же состава и рассевали их в лунки 12-луночных планшетов (Eppendorf, Германия) с плотностью посева 200 тыс. клеток/см². После этого в лунки планшетов вносили смеси для созревания ДК следующего состава:

- фактор некроза опухоли α (TNF α , итоговая концентрация в среде 20 нг/мл) (ProSpec, Израиль);
- полиинозиновая/полицитидиловая кислота (poly I:C, 25 мкг/мл) (InvivoGen, США);
- липополисахарид (LPS, 1 мкг/мл) (Thermo Fisher Scientific, США);
- «коктейль» из TNF α (20 нг/мл) + IL-1 (10 нг/мл) (ProSpec, Израиль) + IL-6 (20 нг/мл) (SCI-STORE, Россия) + простагландин E2 (PGE2, 1 мкг/мл) (Santa Cruz Biotechnology, США);
- «коктейль», смешанный с poly I:C (концентрации компонентов — те же);
- лизат опухолевых клеток (из расчета 1 лизированная опухолевая клетка на 1 ДК).

Планшеты с ДК со смесями для стимуляции созревания инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 48 часов. По завершении инкубации ростовую среду с неадгезированными клетками переносили в пробирки и центрифугировали при 1200 об/мин в течение 10 мин., после чего надосадочную жидкость переносили в отдельные пробирки и замораживали для ИФА. Параллельно адгезированные на дне лунок планшета ДК инкубировали с TrypLE в течение 15 мин., после чего клетки снимали пластика с помощью скребка и переносили их в пробирки с неадгезированными клетками из тех же лунок. Экспрессию рецепторов полученными ДК определяли методом проточной цитофлуориметрии.

Подсчет количества клеток осуществляли с использованием счетчика клеток TC20 (Bio-Rad, США).

Получение лизата опухолевых клеток

Для получения лизата опухолевых клеток использовали линию клеток меланомы кожи SK-mel-2. Клетки выращивали в среде DMEM + F-12 («ПанЭко», Россия) с добавлением 10%-ной фетальной телячьей сыворотки (FBS) (Biosera, Франция). После формирования 80%-ного монослоя клетки снимали с пластика раствором 0,25%-ным раствором трипсина с ЭДТА («ПанЭко», Россия), фермент подвергали нейтрализации раствором Эрла с 10% FBS. Клетки в суспензии осаждали центрифугированием и, после удаления надосадочной жидкости, лизировали их 5-кратным замораживанием в жидком азоте — оттаиванием.

Проточная цитофлуориметрия

Клетки отмывали фосфатным буфером (PBS) от остатков среды и окрашивали их красителем Zombie Aqua (BioLegend, США) для дифференцировки живых и мертвых клеток. После отмывки от красителя к клеткам добавляли антитела с флуоресцентными метками к соответствующим

рецепторам. Все операции выполняли в соответствии с инструкциями производителей. В работе использовали антитела анти-CD86-PC5.5, анти-CD40-PC7, анти-CD14-APC, анти-CD11c-APC-Cy7, анти-HLA-DR-PB, анти-CCR7-PE, анти-CD83-PC5.5, анти-CD1a-PC7 (все антитела производства BioLegend). Цитометрию проводили на проточном цитофлуориметре Navios 10 (Beckman Coulter, США).

Иммуноферментный анализ (ИФА)

Концентрацию цитокинов (IL-12 и IL-10) в супернатанте оценивали методом ИФА с использованием тест-систем ELISA MAX[™] Deluxe Set Human IL-12 (p70) (кат. номер 431704, BioLegend, США) и Интерлейкин-10-ИФА-БЕСТ (кат. номер А-8774, АО «Вектор-Бест», Россия) в соответствии с инструкциями производителей.

Статистика

Все эксперименты выполнены в 4 повторях, по 3-4 технических дубля для каждого повтора. Для всех повторов использовали МНК, полученные от разных доноров. Для оценки достоверности различий при проведении множественных сравнений с контрольной группой применяли критерий Данетта, для проведения парных множественных сравнений — односторонний тест ANOVA. Для проверки нормальности распределения использовали критерий Колмогорова—Смирнова. Уровнем статистической достоверности различий считали $p < 0,05$.

Результаты

Для получения ДК использовали моноциты, выделенные из крови 4 доноров. После 6 суток дифференцировки в среде с GM-CSF и IL-4 клетки приобретали характерную для незрелых ДК отростчатую форму, оставаясь при этом, большей частью, адгезированными на пластике (рис. 1А). При этом отмечалось практически полное пре-

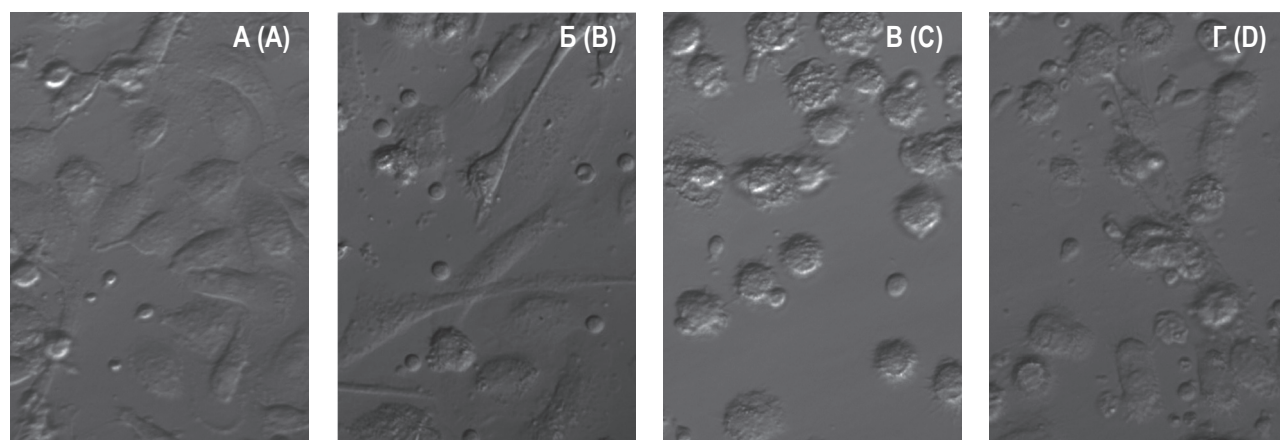


Рисунок 1. Дендритные клетки после стимуляции созревания (репрезентативные изображения)

Примечание. А – контроль без стимуляции. Б – TNF. В – коктейль. Г – poly I:C. Световая микроскопия, увеличение 400х.

Figure 1. Dendritic cells after stimulation of maturation (representative images)

Note. A, control without stimulation. B, TNF. C, cocktail. D, poly I:C. Light microscopy, magnification 400x.

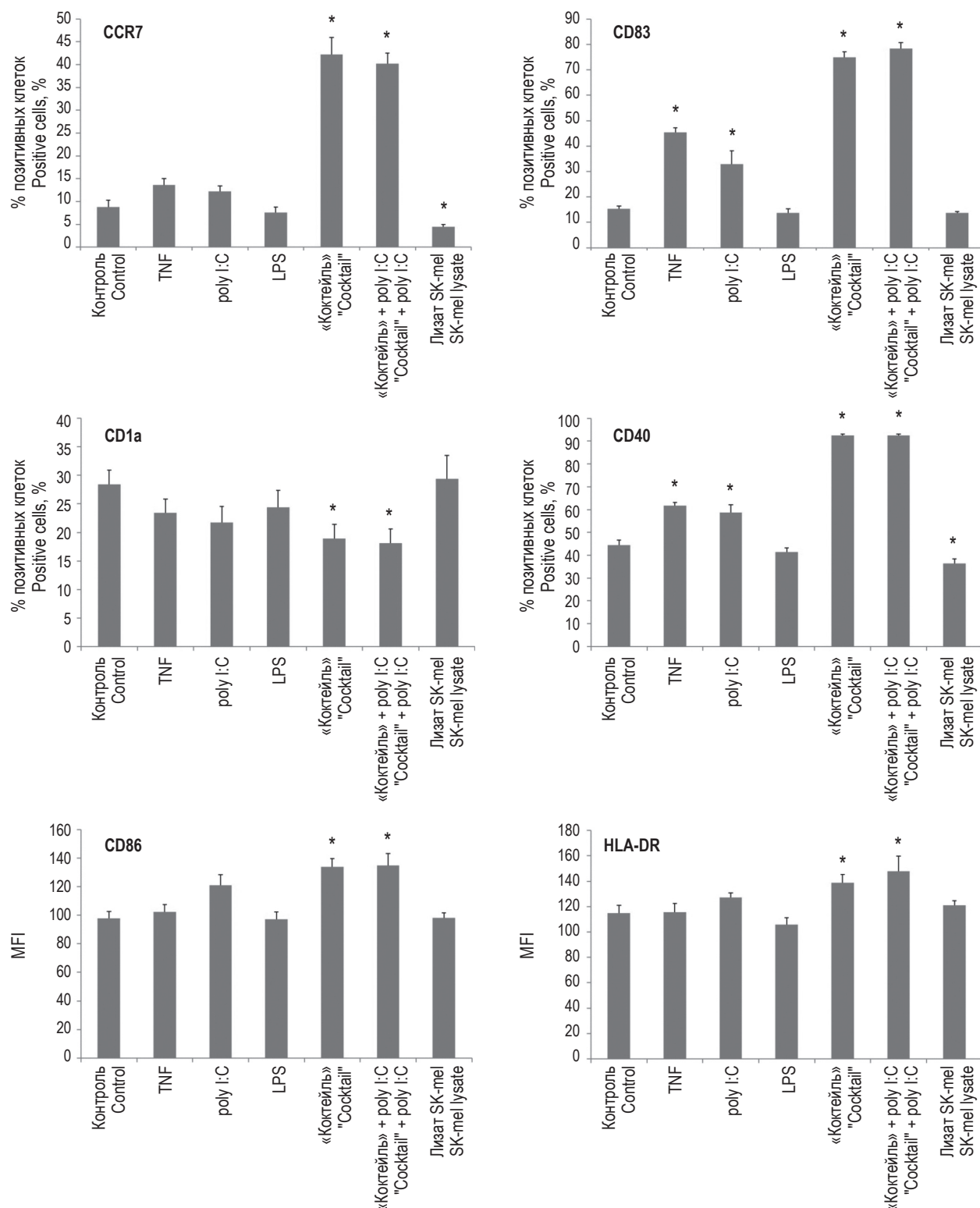


Рисунок 3. Экспрессия ДК рецепторов CCR7, CD83, CD1a, CD40, CD86, HLA-DR после стимуляции созревания

Примечание. Для CD86 и HLA-DR на гистограммах отображены значения MFI, для остальных – процент экспрессирующих рецептор клеток. Данные представлены в виде $X \pm m$, где X – среднее значение, m – стандартная ошибка среднего.

Статистически достоверные отличия от контроля отмечены звездочками.

Figure 3. Expression of CCR7, CD83, CD1a, CD40, CD86, HLA-DR receptors by DCs after stimulation of maturation

Note. On CD86 and HLA-DR bar graphs the MFI was shown, on other graphs the percentage of receptor-expressing cells was demonstrated.

The data were presented in the form $X \pm m$, where m was the standard error of the arithmetic average X . Statistically significant differences from control are signified by asterisks.

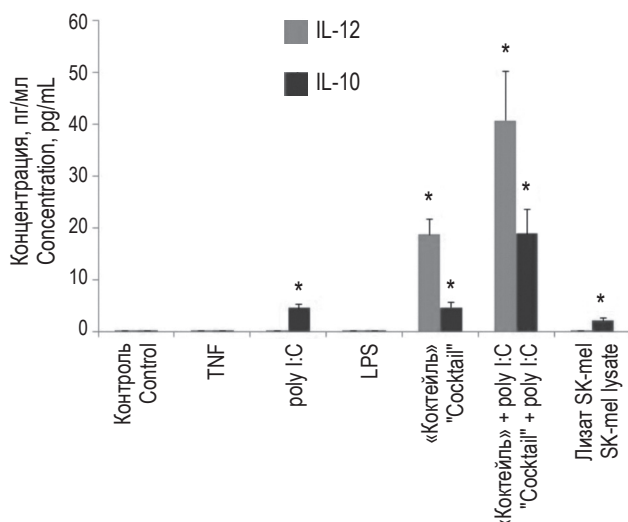


Рисунок 4. Секретция IL-12 (светлые столбцы) и IL-10 (темные столбцы) дендритными клетками

Примечание. Статистически достоверные отличия от контроля отмечены звездочками.

Figure 4. Secretion of IL-12 (light bars) and IL-10 (dark bars) by dendritic cells

Note. Statistically significant differences from control are signified by asterisks.

крашение экспрессии клетками рецептора CD14 (практически до фонового уровня) в сочетании с очень значительным повышением экспрессии CD11c.

Полученные в результате дифференцировки моноцитов незрелые ДК подвергали воздействию различных смесей для стимуляции созревания. После двух суток инкубации оценивали иммунофенотип полученных клеток, а также уровень секреции ими IL-12 и IL-10. Использование всех смесей для созревания сопровождалось характерными для зрелых клеток изменениями морфологии: увеличением числа псевдоподий и откреплением большей части клеточной популяции от пластика [10, 15], хотя, в целом, при использовании коктейля доля открепившихся была визуально выше, чем при использовании других факторов дифференцировки (рис. 1Б, В, Г).

Имунофенотип полученных ДК анализировали методом проточной цитофлуориметрии. Гейтирование ДК проводили по схеме, представленной на рисунке 2 (см. 3-ю стр. обложки). ДК идентифицировали как CD11c⁺ клетки, оставшиеся после предварительного гейтирования по параметрам прямого и бокового светорассеяния и исключения нежизнеспособных клеток и дуплетов. Выделенные в результате гейтирования клетки имели высокий уровень экспрессии характерных для ДК рецепторов CD86, CD40 и HLA-DR [5, 22], при этом доля клеток с CD14⁺ иммунофенотипом во всех случаях составила менее 1% анализируемой популяции.

Результаты оценки иммунофенотипа полученных ДК представлены на рисунке 3. Уровень экспрессии HLA-DR и CD86 оценивали в единицах флуоресценции (MFI), так как эти рецепторы присутствовали на поверхности > 90% клеток при всех способах стимуляции созревания (включая контроль). По остальным рецепторам представлена доля экспрессирующих их клеток. Наиболее высокие уровни экспрессии рецепторов, в целом, отмечены при использовании коктейля, а также коктейля в смеси с poly I:C. В то же время при использовании LPS или лизата не наблюдается достоверного увеличения этих показателей по сравнению с клетками без стимуляции.

Данные о секреции ДК IL-12 и IL-10 по результатам ИФА представлены на рисунке 4. Секреция IL-12 превышает фоновый уровень лишь при использовании цитокинового коктейля (в том числе с poly I:C). При этом наибольшая концентрация IL-10 также отмечалась в средах, где использовался коктейль.

Обсуждение

Для проведения дендритноклеточной терапии используют дендритные клетки, выделяемые из периферической крови, или получают их путем дифференцировки из моноцитов. Чаще всего применяется второй способ, так как количество конвенциональных ДК в крови относительно невелико по сравнению с содержанием в ней моноцитов [19]. Для получения ДК нами был использован классический способ дифференцировки моноцитов в незрелые ДК путем культивирования в среде с добавлением GM-CSF и IL-4. Дифференцировка моноцитов в незрелые ДК подтверждалась как характерными морфологическими изменениями клеток, так и изменением их иммунофенотипа: повышением уровня экспрессии CD86, CD40 и CD11c в сочетании с прекращением экспрессии клетками маркера моноцитов CD14.

Результативность дендритноклеточной терапии во многом зависит от иммунофенотипа ДК, а также от их секреторного профиля, формирующихся после созревания клеток. В целом, стимуляция созревания незрелых ДК сводится к 2 основным способам: (1) воздействие провоспалительных цитокинов и (2) использование лигандов для патоген-распознающих рецепторов (PRR), а также их смесей [9]. В данной работе нами была оценена стимулирующая активность TNFα и цитокинового «коктейля» из TNFα, IL-1, IL-6 с добавлением PGE2 [23]. Также были использованы лиганды PRR: poly I:C, имитирующий вирусную 2-цепочечную РНК (лиганд TLR3), LPS (лиганд TLR4) и, кроме того, лизированные клетки меланомы как источник DAMP (danger-associated

molecular patterns, «молекулярные образы, ассоциированные с опасностью»), которые также являются триггерами для созревания ДК [14].

Эффективность стимуляции созревания ДК оценивали по уровню экспрессии ими рецепторов, обеспечивающих взаимодействие с Т-клетками: антигенпрезентирующих (HLA-DR, CD1a), костимулирующих (CD86, CD83, CD40) и рецепторов, контролирующих миграцию ДК в лимфоузлы (CCR7). Созревание ДК должно сопровождаться повышением уровня экспрессии большинства из этих рецепторов. Также оценивался уровень секреции ДК цитокинов: IL-12, активирующего Т-звено иммунитета и оказывающего влияние на дифференцировку наивных CD4⁺ клеток в Th1 и IL-10, напротив, подавляющего секрецию IL-12 и ингибирующего активность Т-хелперов 1 [12].

Эффект от LPS на созревание ДК выявлен не был: достоверных различий с контролем не было выявлено ни по одному из исследованных параметров экспрессии клетками рецепторов или секреции цитокинов. Примечательно, что LPS довольно часто используется как фактор стимуляции созревания ДК [4, 9]. При этом в работе Fučíková и соавт., 2011, также отмечено слабое влияние LPS на созревание ДК при культивировании клеток в бессывороточной среде [18]. Взаимодействие LPS с TLR4 должно активировать ряд транскрипционных факторов (в том числе NF-κB), инициирующих созревание ДК [28]. В то же время стимуляция с помощью LPS приводит к активации экспрессии генов DUSP-1 и TNFAIP3. Эти гены подавляют активность NF-κB, формируя механизм саморегулирования стимулирующего эффекта LPS [9]. Не исключено, что данный феномен объясняет отсутствие видимого эффекта от применения LPS в экспериментах.

Лизат клеток меланомы также не проявил стимулирующей активности в отношении ДК. Напротив, уровень экспрессии CD40 и CCR7 был ниже, чем в контроле, что является признаком подавления созревания клеток. Данный результат вполне ожидаем, так как опухолевые клетки могут содержать иммуносупрессивные факторы, хотя есть сведения об успешной стимуляции созревания ДК с помощью смеси нескольких линий клеток меланомы, подвергшихся апоптозу/некрозу [31].

Рецептор CD83 считается одним из значимых маркеров созревания ДК и, по-видимому, оказывает существенное влияние на антигенпрезентирующие функции за счет регуляции сортировки комплексов пептид-МНС II в эндосомах [21]. Статистически достоверное увеличение доли клеток, экспрессирующих CD83, по сравнению с

контролем, отмечено при использовании TNFα, «коктейля», poly I:C и «коктейля» + poly I:C. Наименее высокий процент CD83⁺ клеток отмечается при использовании «коктейля» и «коктейля» + poly I:C, при использовании только TNFα или только poly I:C этот показатель был достоверно ниже (рис. 3).

Хемокиновый рецептор CCR7 играет ключевую роль в привлечении зрелых ДК в лимфоузлы [8] и поэтому может рассматриваться как один из значимых параметров, определяющих функциональную активность ДК. Доля CCR7⁺ клеток достоверно отличалась от контрольной только после стимуляции «коктейлем» и «коктейлем» + poly I:C, что, очевидно, объясняется, эффектом от набора провоспалительных цитокинов в сочетании с PGE2, стимулирующим созревание ДК и усиливающим экспрессию ими CCR7 [27]. При использовании только TNFα или poly I:C достоверных отличий от контроля не отмечалось (рис. 3).

Максимальный уровень экспрессии рецепторов CD86, CD40 и HLA-DR также отмечен при использовании «коктейля» и смеси «коктейль» + poly I:C (рис. 3).

Секреция IL-12, превышающая пороговый уровень, была выявлена лишь при использовании цитокинового коктейля, что вполне ожидаемо, так как содержащиеся в коктейле цитокины TNFα, IL-1 активируют транскрипционный фактор NF-κB, что, в свою очередь, приводит к усилению секреции IL-12 [24]. При этом использование только TNFα оказалось не достаточным для стимуляции продукции IL-12. Аналогичный результат наблюдался при использовании poly I:C, несмотря на возможность активации NF-κB и IRF3 за счет лиганд-рецепторного взаимодействия с TLR3 [33]. В то же время сочетание коктейля и poly I:C дало синергетический эффект и привело к почти двукратному увеличению количества секретируемого цитокина.

При этом схожий эффект наблюдался и в отношении толерогенного IL-10: совместная стимуляция ДК коктейлем и poly I:C сопровождалась достоверно более высоким уровнем секреции данного цитокина, чем при использовании каждого компонента по отдельности. Вероятно, в данном случае наблюдалась совместная активация синтеза IL-10, опосредованная лиганд-рецепторным взаимодействием TLR3 и воздействием PGE2 из состава коктейля [26].

Интересно отметить, что, по данным Cernadas и соавт. (2009), CD1a⁺ ДК имеют значительно более высокий уровень секреции IL-12, чем CD1a⁻ клетки [11]. При этом стимуляция созревания ДК не приводила к повышению уровня

экспрессии CD1a. Напротив, при использовании коктейля и коктейля + poly I:C доля CD1a⁺ клеток была ниже, чем при использовании других способов стимуляции и в контроле, несмотря на относительно высокий уровень секреции IL-12 (рис. 3).

В целом, наибольшую эффективность в стимуляции созревания ДК продемонстрировал коктейль, что, очевидно, обеспечивалось сочетанным действием провоспалительных цитокинов и PGE2. Данный вывод также подтверждается наиболее высоким уровнем активации Т-клеток при совместном культивировании со зрелыми ДК после стимуляции коктейлем (данные не представлены). Стимулирующий эффект от применения poly I:C был существенно ниже и, кроме того, сопровождался секрецией IL-10. В то же время добавление poly I:C к коктейлю привело к существенному росту уровня секреции ДК как IL-12, так и IL-10, но не оказало влияния на экспрессию клеточных рецепторов.

Заключение

По результатам проведенного исследования наибольшую эффективность в стимуляции созревания ДК продемонстрировал цитокиновый коктейль, а также коктейль в смеси с poly I:C. Прошедшие созревание под воздействием коктейля ДК демонстрировали максимальный уровень экспрессии рецепторов, связанных с их иммуностимулирующей функцией, а также высокую концентрацию секретируемого IL-12. Примечательно, что добавление poly I:C к коктейлю практически не оказывало влияния на иммунофенотип ДК, но приводило к кратному увеличению секреции как IL-12, являющегося одним из значимых активаторов Т-клеточного звена иммунитета, так и IL-10, ингибирующего иммунный ответ. Тем не менее использование смеси коктейля с poly I:C может рассматриваться как один из способов, повышающих эффективность стимуляции созревания ДК, культивируемых *in vitro*.

Список литературы / References

1. Балдуева И.А., Семиглазов В.Ф., Пипиа Н.П., Нехаева Т.Л., Данилова А.Б., Авдонкина Н.А., Новик А.В., Проценко С.А., Семиглазова Т.Ю., Карицкий А.П., Беляев А.М. Разработка способа иммунотерапии у больных раком молочной железы с истощенными возможностями стандартного лечения // Российский биотерапевтический журнал, 2018. Т. 17 (S). С. 5-6. [Baldueva I.A., Semiglazov V.F., Pipia N.P., Nehaeva T.L., Danilova A.B., Avdonkina N.A., Novik A.V., Protsenko S.A., Semiglazova T.Yu., Karitsky A.P., Belyaev A.M. Development of a method of immunotherapy in breast cancer patients with exhausted capabilities standard treatment. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy*, 2018, Vol. 17 (S), pp. 5-6. (In Russ.)]
2. Нехаева Т.Л. Оптимизация аутологичных дендритно-клеточных вакцин для лечения больных злокачественными новообразованиями // Сибирский онкологический журнал, 2013. Т. 3, № 57. С. 52-56. [Nehaeva T.L. Autologous dendritic cell vaccine optimization for therapy of patients with disseminated malignant neoplasms. *Sibirskiy onkologicheskii zhurnal = Siberian Journal of Oncology*, 2013, Vol. 3, no. 57, pp. 52-56. (In Russ.)]
3. Новик А.В., Проценко С.А., Анохина Е.М., Семенова А.И., Нехаева Т.Л., Телетаева Г.М., Данилова А.Б., Латипова Д.Х., Пипиа Н.П., Авдонкина Н.А., Зозуля А.Ю., Оганесян А.П., Балдуева И.А. Тридцатилетний опыт лекарственного лечения меланомы в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова: важные уроки для будущих исследований // Эффективная фармакотерапия, 2020. Т. 16, № 18. С. 20-29. [Novik A.V., Protsenko S.A., Anokhina Ye.M., Semyonova A.I., Nekhayeva T.L., Teletayeva G.M., Danilova A.B., Latipova, D.Kh. Pipia N.P., Avdonkina N.A., Zozulya A.Yu., Oganessian A.P., Baldueva I.A. Thirty years experience of melanoma therapy in N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology: important experience for future research. *Effektivnaya farmakoterapiya = Effective Pharmacotherapy*, 2020, Vol. 16, no. 18, pp. 20-29. (In Russ.)]
4. Arya S., Wiatrek-Moumoulidis D., Synowsky S.A., Shirran S.L., Botting C.H., Powis S.J., Stewart A.J. Quantitative proteomic changes in LPS-activated monocyte-derived dendritic cells: A SWATH-MS study. *Sci. Rep.*, 2019, Vol. 9, no. 1, 4343. doi: 10.1038/s41598-019-40773-6.
5. Bellanger A.-P., Pallandre J.-R., Borg C., Loeffert S., Gbaguidi-Haore H., Millon L. Human monocyte-derived dendritic cells exposed to microorganisms involved in hypersensitivity pneumonitis induce a Th1-polarized immune response. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2013, Vol. 20, no. 8, pp. 1133-1142.
6. Bol K.F., Schreibelt G., Gerritsen W.R., de Vries I.J.M., Figdor C.G. Dendritic cell-based immunotherapy: state of the art and beyond. *Clin. Cancer Res.*, 2016, Vol. 22, no. 8, pp. 1897-1906.
7. Bol K.F., Schreibelt G., Rabold K., Wculek S.K., Schwarze J.K., Dzionek A., Teijeira A., Kandalaft L.E., Romero P., Coukos G., Neyns B., Sancho D., Melero I., de Vries I.J.M. The clinical application of cancer immunotherapy based on naturally circulating dendritic cells. *J. Immunother. Cancer*, 2019, Vol. 7, no. 1, 109. doi: 10.1186/s40425-019-0580-6.

8. Brandum E.P., Jørgensen A.S., Rosenkilde M.M., Hjortø G.M. Dendritic cells and CCR7 expression: an important factor for autoimmune diseases, chronic inflammation, and cancer. *Int J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 15, 8340. doi: 10.3390/ijms22158340.
9. Castiello L., Sabatino M., Jin P., Clayberger C., Marincola F.M., Krensky A.M., Stroncek D.F. Monocyte-derived DC maturation strategies and related pathways: A transcriptional view. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2011, Vol. 60, no 4, pp. 457-466.
10. Cechim G., Chies J.A.B. *In vitro* generation of human monocyte-derived dendritic cells methodological aspects in a comprehensive review. *An. Acad. Bras. Ciênc.*, 2019, Vol. 91, no. 4, e20190310. doi: 10.1590/0001-3765201920190310.
11. Cernadas M., Lu J., Watts G., Brenner M.B. CD1a expression defines an interleukin-12 producing population of human dendritic cells. *Clin. Exp. Immunol.*, 2009, Vol. 155, no. 3, pp. 523-533.
12. Couper K.N., Blount D.G., Riley E.M. IL-10: The master regulator of immunity to infection. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 180, no. 9, pp. 5771-5777.
13. Datsi A., Sorg R.V. Dendritic Cell vaccination of glioblastoma: road to success or dead end. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 770390. doi: 10.3389/fimmu.2021.770390.
14. De Winde C.M., Munday C., Acton S.E. Molecular mechanisms of dendritic cell migration in immunity and cancer. *Med. Microbiol. Immunol.*, 2020, Vol. 209, no 4, pp. 515-529.
15. Delirezh N., Majedi L., Asri Rezaei S., Ranjkeshzadeh H. Generation of mature monocyte-derived dendritic cells in the presence of heparin and monocyte conditioned medium: Phenotypic and functional comparison. *Iran. Biomed. J.*, 2011, Vol. 15, no. 3, pp. 79-84.
16. Dillman R.O., Nistor G.I., Cornforth A.N. Dendritic cell vaccines for melanoma: Past, present and future. *Melanoma Manag.*, 2016, Vol. 3, no. 4, pp. 273-289.
17. Filin I.Y., Kitaeva K.V., Rutland C.S., Rizvanov A.A., Solovyeva V.V. Recent advances in experimental dendritic cell vaccines for cancer. *Front. Oncol.*, 2021, Vol. 11, 730824. doi: 10.3389/fonc.2021.730824.
18. Fučíková J., Rožková D., Ulčová H., Budinský V., Sochorová K., Pokorná K., Bartůňková J., Špišek R. Poly I: C-activated dendritic cells that were generated in CellGro for use in cancer immunotherapy trials. *J. Transl. Med.*, 2011, Vol. 9, no. 1, 223. doi: 10.1186/1479-5876-9-223.
19. Gardner A., de Mingo Pulido Á., Ruffell B. Dendritic cells and their role in immunotherapy. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 924. doi: 10.3389/fimmu.2020.00924.
20. Gelao L., Criscitiello C., Esposito A., Laurentiis M.D., Fumagalli L., Locatelli M.A., Minchella I., Santangelo M., Placido S.D., Goldhirsch A., Curigliano G. Dendritic cell-based vaccines: Clinical applications in breast cancer. *Immunotherapy*, 2014, Vol. 6, no. 3, pp. 349-360.
21. Grosche L., Knippertz I., König C., Royzman D., Wild A.B., Zinser E., Sticht H., Muller Y.A., Steinkasserer, A., Lechmann, M. The CD83 Molecule – An Important Immune Checkpoint. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 721. doi: 10.3389/fimmu.2020.00721.
22. Jin P., Han T.H., Ren J., Saunders S., Wang E., Marincola F.M., Stroncek D.F. Molecular signatures of maturing dendritic cells: Implications for testing the quality of dendritic cell therapies. *J. Transl. Med.*, 2010, Vol. 8, no. 1, 4. doi: 10.1186/1479-5876-8-4.
23. Krause P., Singer E., Darley P.I., Klebensberger J., Groettrup M., Legler D.F. Prostaglandin E2 is a key factor for monocyte-derived dendritic cell maturation: Enhanced T cell stimulatory capacity despite IDO. *J. Leukoc. Biol.*, 2007, Vol. 82, no. 5, pp. 1106-1114.
24. Liu T., Zhang L., Joo D., Sun S.-C. NF-κB signaling in inflammation. *Signal Transduct. Target. Ther.*, 2017, Vol. 2, no. 1, 17023. doi: 10.1038/sigtrans.2017.23.
25. Locy H., Melhaoui S., Maenhout S.K., Thielemans K. Dendritic cells: the tools for cancer treatment. From: dendritic cells. Ed. Chapoval S.P., InTech, 2018. 138 p.
26. Ma X., Yan W., Zheng H., Du Q., Zhang L., Ban Y., Li N., Wei F. Regulation of IL-10 and IL-12 production and function in macrophages and dendritic cells. *F1000Res.*, 2015, Vol. 4, F1000 Faculty Rev-1465. doi: 10.12688/f1000research.7010.1.
27. Muthuswamy R., Mueller-Berghaus J., Haberkorn U., Reinhart T.A., Schadendorf D., Kalinski P. PGE2 transiently enhances DC expression of CCR7 but inhibits the ability of DCs to produce CCL19 and attract naive T cells. *Blood*, 2010, Vol. 116, no. 9, pp. 1454-1459.
28. Nakahara T. Role of c-Jun N-terminal kinase on lipopolysaccharide induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Int. Immunol.*, 2004, Vol. 16, no. 12, pp. 1701-1709.
29. Sutherland S.I.M., Ju X., Horvath L.G., Clark G.J. Moving on from sipuleucel-t: new dendritic cell vaccine strategies for prostate cancer. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 641307. doi: 10.3389/fimmu.2021.641307.

30. van Gulijk M., Dammeijer F., Aerts J.G.J.V., Vroman H. Combination strategies to optimize efficacy of dendritic cell-based immunotherapy. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 2759. doi: 10.3389/fimmu.2018.02759.
31. von Euw E.M., Barrio M.M., Furman D., Bianchini M., Levy E. M., Yee C., Li Y., Wainstok R., Mordoh J. Monocyte-derived dendritic cells loaded with a mixture of apoptotic/necrotic melanoma cells efficiently cross-present gp100 and MART-1 antigens to specific CD8⁺ T lymphocytes. *J. Transl. Med.*, 2007, Vol. 5, no. 1, 19. doi: 10.1186/1479-5876-5-19.
32. Wimmers F., Schreibelt G., Sköld A.E., Figdor C.G., de Vries I.J.M. Paradigm shift in dendritic cell-based immunotherapy: From *in vitro* Generated Monocyte-Derived DCs to Naturally Circulating DC Subsets. *Front. Immunol.*, 2014, Vol. 5, 165. doi: 10.3389/fimmu.2014.00165.
33. Zhang S.-Y., Herman M., Ciancanelli M. J., Pérez De Diego R., Sancho-Shimizu V., Abel L., Casanova J.-L. TLR3 immunity to infection in mice and humans. *Curr. Opin. Immunol.*, 2013, Vol. 25, no. 1, pp. 19-33.

Авторы:

Фадеев Ф.А. — к.б.н., доцент, заведующий лабораторией, ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», г. Екатеринбург, Россия
Александрова А.Д. — младший научный сотрудник ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», г. Екатеринбург, Россия
Могиленских А.С. — научный сотрудник ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», г. Екатеринбург, Россия

Authors:

Fadeyev F.A., PhD (Biology), Associate Professor, Chief of Laboratory, Institute of Medical Cell Technologies, Ekaterinburg, Russian Federation
Aleksandrova A.D., Junior Research Associate, Institute of Medical Cell Technologies, Ekaterinburg, Russian Federation
Mogilenskikh A.S., Research Associate, Institute of Medical Cell Technologies, Ekaterinburg, Russian Federation

Поступила 26.05.2023
Отправлена на доработку 30.06.2023
Принята к печати 04.10.2023

Received 26.05.2023
Revision received 30.06.2023
Accepted 04.10.2023