

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича

Лаборатория клеточной биологии

Московская гимназия на Юго-Западе №1543 им. Ю.В. Завельского

Сравнение альтернативных способов индукции созревания дендритных клеток в культуре с целью создания противораковых клеточных вакцин

В.К. Плисова

Е.А. Титов

Научный руководитель:

к. б. н. А.Ю. Лупатов

Москва 2025

Введение

Онкологические заболевания — это обширный и разнородный класс системных заболеваний, которые характеризуются неконтролируемым ростом клеток, приводящим к появлению злокачественных новообразований. По данным сайта Our World in Data, злокачественные опухоли являются второй по частоте (после болезней сердечно-сосудистой системы) причиной смерти в экономически развитых странах (<https://ourworldindata.org/grapher/death-rate-by-cause-who-mdb?time=2015..latest>). В современной медицине применяются несколько основных методов лечения онкологических заболеваний: радиотерапия, химиотерапия, хирургическое вмешательство. Для того чтобы клетка стала злокачественной в ней должен накопиться ряд мутаций, в частности в генах, ответственных за контроль пролиферации, включая ограничение пролиферативного потенциала, а также за инвазию в окружающие ткани и устойчивость к апоптозу. В клетках таких новообразований, как правило, присутствуют мутантные антигены, нехарактерные для всех прочих клеток организма, вследствие чего эти антигены могут распознаваться иммунными клетками в качестве чужеродных и тем самым провоцировать иммунный ответ. Это делает возможным применение иммунотерапии в качестве еще одного подхода к лечению рака. В последние годы иммунотерапия получила широкое распространение из-за своей неинвазивности и доказанной эффективности для некоторых конкретных видов и стадий заболевания, поэтому на эту тему проводится множество исследований (Burstein, 2017).

Существуют несколько методов иммунотерапии, среди них: цитокиновая терапия, адоптивный перенос цитотоксических клеток, ингибирование контрольных точек иммунитета, противораковые терапевтические вакцины, в том числе на основе антиген-презентирующих клеток (АПК) (Zhang, Zhang, 2020). Последний метод в отличие от адоптивной иммунотерапии предполагает введение опухолевого антигена в удобной для распознавания иммунной системой форме и, следовательно, является разновидностью вакцинации. Терапевтическими такие вакцины называются, так как их применяют для стимуляции иммунитета уже во время заболевания. Дендритные клетки (ДК) являются специализированными АПК иммунной системы. Помимо экспрессирующегося практически во всех клетках организма главного комплекса гистосовместимости первого класса (МНС-I) ДК экспрессируют молекулы главного комплекса гистосовместимости второго класса (МНС-II). МНС-II позволяют презентировать антигены фагоцитированных патогенов (бактерии, вирусы и др.) CD4+ Т-лимфоцитам и тем самым активировать путь адаптивного иммунного ответа (Yin et al., 2021; Sisirak et al., 2023). Помимо МНС ДК также экспрессируют на своей мембране костимулирующие молекулы, которые необходимы для эффективной активации иммунного ответа, что делает использование ДК в качестве клеточной вакцины перспективным, поскольку тем самым обеспечивается клинически эффективный противоопухолевый иммунитет. Процесс приготовления терапевтической вакцины на основе ДК представлен на рисунке 1.

Одним из основных способов получения ДК *in vitro* является их индуцированная дифференцировка из моноцитов при помощи гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) и интерлейкина-4 (IL-4) (Sander et al., 2017). Результатом такой дифференцировки являются незрелые ДК (iDC), имеющие

пониженную экспрессию костимулирующих молекул и МНС-II. По этой причине незрелые ДК не могут активировать Т-лимфоциты, однако способны к эффективному фагоцитозу и макропиноцитозу. Под действием провоспалительных цитокинов и/или бактериальных продуктов ДК созревают и приобретают способность стимулировать Т-клеточный иммунный ответ (Winzler et al., 1997). Для получения зрелых ДК (mDC) *in vitro* применяются различные «коктейли созревания», способствующие увеличению экспрессии молекул МНС-II и костимулирующих молекул, необходимых для эффективной активации лимфоцитов (CD40, CD80, CD83, CD86) (Larsen et al., 1992; Inaba et al., 1994; Zhou, Tedder, 1995; van Kooten et al., 2000). В клинической практике широкое распространение получил коктейль на основе провоспалительных цитокинов, в состав которого входят TNF- α (фактор некроза опухоли α) и PGE₂ (простагландин E2) (Jonuleit et al., 1997). Однако, несмотря на обнадеживающие результаты исследований на животных моделях, клиническое использование вакцин на основе ДК имело ограниченный успех, что свидетельствует об актуальности оптимизации методики их получения. В этой работе мы оценили эффективность альтернативного способа стимуляции созревания iDC с использованием бактериального липополисахарида (LPS) в сравнении с клиническим «золотым стандартом» (Jonuleit et al., 1997).

Цель работы – сравнить эффективность созревания дендритных клеток *in vitro* под действием фактора некроза опухоли α (TNF α) и простагландина E2 (PGE2) с эффективностью созревания под действием бактериального липополисахарида (LPS).

Для достижения этой цели поставлены следующие задачи:

1. Выделить фракцию моноцитов из периферической крови человека.
2. Дифференцировать в культуре моноциты в незрелые ДК с помощью гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) и интерлейкина 4 (IL-4).
3. Стимулировать созревание ДК с использованием TNF α и PGE2 или LPS.
4. Методом проточной цитофлуориметрии оценить уровень экспрессии маркеров созревания (CD40, CD80, CD83, CD86 и МНС-II) на ДК, стимулированных различными факторами созревания.
5. Оценить способность ДК, стимулированных различными факторами созревания, инициировать пролиферацию аллогенных Т-лимфоцитов.

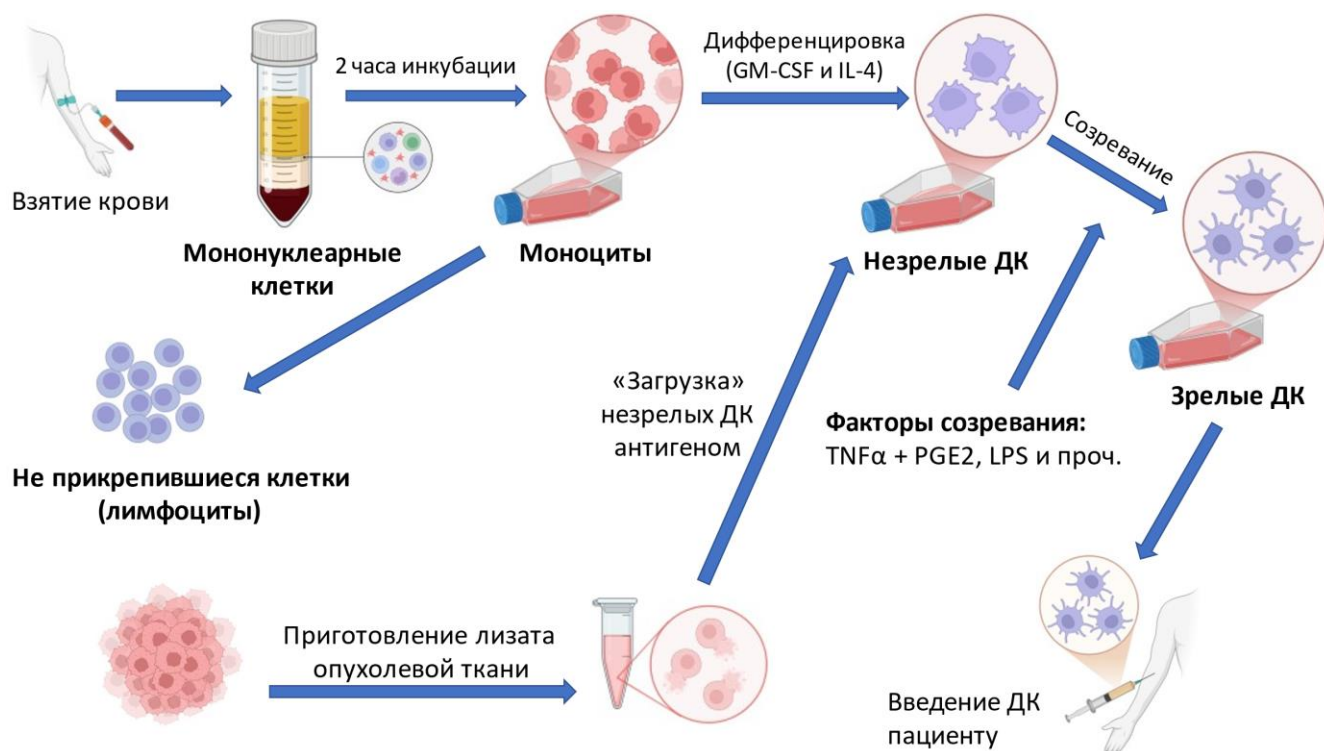


Рис. 1. Процесс изготовления терапевтической клеточной вакцины на основе дендритных клеток. Изображения созданы при помощи программы BioRender.

Обзор литературы

Дендритные клетки – профессиональные антигенпрезентирующие клетки

Дендритные клетки (ДК) — это профессиональные антигенпрезентирующие клетки (АПК), которые присутствуют в небольшом количестве в кровотоке и тканях. Они мигрируют во вторичные лимфоидные органы и генерируют адаптивный иммунный ответ посредством презентации антигена лимфоцитам. Благодаря своей способности индуцировать иммунный ответ на антиген, презентуемый ими в контексте молекул МНС, ДК играют важную роль в противоопухолевом иммунитете.

МНС — семейство генов, играющее важную роль в иммунной системе позвоночных. МНС кодирует гликопротеины на поверхности клеток, чья основная функция — связывание антигенов и презентация их на поверхности клеток для распознавания Т-лимфоцитами (Klein, 1986). Выделяют два основных класса МНС. Молекулы МНС класса I играют важную роль в иммунной защите от внутриклеточных патогенов и опухолевой трансформации. Они экспрессируются на поверхности всех ядерных соматических клеток и, как правило, представляют пептиды синтезированных в клетке белков. Обычно это пептиды собственных белков, к которым у иммунной системы имеется толерантность. Однако в случае попадания в клетку вирусного патогена или появления мутантного белка чужеродные пептиды также будут представлены на поверхности в контексте МНС класса I. Образующийся комплекс может распознаваться антиген-специфическими цитотоксическими Т-лимфоцитами (ЦТЛ). Чтобы стать эффекторными, ЦТЛ и наивные CD8⁺ Т-клетки в большинстве случаев должны быть активированы Т-клетками хелперами. Благодаря презентации собственных белков на МНС иммунная система постоянно отслеживает и

уничтожает не только инфицированные, но и поврежденные или мутантные клетки (Rock et al., 2016).

В отличие от МНС класса I, молекулы МНС класса II экспрессируются в основном на АПК, таких как В-клетки, макрофаги или ДК. В контексте молекул МНС класса II презентуются захваченные посредством фагоцитоза или макропиноцитоза чужеродные антигены, находящиеся вне клетки. Такая презентация способна активировать CD4⁺ Т-клетки хелперы, специфичные к данному антигену.

Будучи профессиональными АПК, ДК способны представлять захваченный ими антиген в контексте МНС не только второго, но и первого класса, что позволяет специфически активировать как хелперные, так и цитотоксические Т-лимфоциты. Такой процесс назван кросс-презентацией. Хотя различные типы АПК могут кросс-презентировать антигены *in vitro*, большинство исследований указывает на то, что ДК являются основными кросс-презентирующими АПК *in vivo*. Более того, известно, что только некоторые подгруппы ДК могут эффективно кросс-презентировать антигены. Вклад различных подтипов ДК в кросс-презентацию варьируется в зависимости от экспериментальных условий (Joffre, 2012).

Существует несколько механизмов работы клеточного иммунитета:

- путь активации антиген-специфических ЦТЛ, которые могут индуцировать апоптоз или некроз соматических клеток, демонстрирующих на поверхности эпитопы чужеродных антигенов;
- путь неспецифической активации макрофагов и НК-клеток, которые разрушают клетки с внутриклеточными патогенами;
- путь стимулирования секреции цитокинов, которые влияют на другие клетки иммунной системы, принимающие участие в адаптивном и врожденном иммунном ответе (Alberts et al., 2008).

ДК способны неспецифически поглощать и процессировать антиген, а затем представлять его антиген-специфическим Т-лимфоцитам, осуществляя тем самым взаимосвязь между врожденным и адаптивным иммунитетом. ДК происходят из гемопоэтических стволовых клеток костного мозга и клеток-предшественниц как миелоидного, так и лимфоидного ряда. В целом, ДК можно классифицировать на миелоидные ДК (mDC); плазмоцитоидные ДК (pDC) и клетки Лангерганса. Каждый подтип отличается по способности к презентации антигенов, миграции и секреции цитокинов (Ярилин, 2010). После поглощения антигена, ДК подвергаются созреванию под действием факторов воспаления и мигрируют в периферические лимфоидные органы (лимфатические узлы), где приобретают возможность активировать Т-лимфоциты (Moon et al., 2025). Миелоидные ДК очень эффективно кросс-презентируют антигены CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеткам и производят большое количество активирующих CD4⁺ Т-клетки цитокинов, в том числе IL-12, а также подают сигналы для генерации резидентных CD8⁺ Т-клеток памяти (Sánchez-Paulete et al., 2017). Способность миелоидных ДК индуцировать ЦТЛ делает их уникальным инструментом для борьбы с раком (Liu et al., 2023).

Плазмоцитоидные ДК — это незрелые клетки, локализованные в основном в кровотоке. В отличие от миелоидных, плазмоцитоидные ДК практически неспособны к фагоцитозу и не поглощают антигены (Balan et al., 2019).

Клетки Лангерганса — эпидермальные ДК миелоидного происхождения. Клетки Лангерганса имеют ряд признаков, отличающих их от всех остальных ДК. В их

цитоплазме присутствуют слоистые включения, называемые гранулами Бирбека, а на поверхности экспрессируется рецептор лангерин (CD208), присутствующий уже на циркулирующих в кровотоке клетках-предшественниках. Уникальная способность клеток Лангерганса — сохранение антигена в иммуногенной форме на протяжении длительного времени (Flohé et al., 1997). После захвата антигена клетки Лангерганса перемещают антигенные пептиды в местные лимфатические узлы через центральные лимфатические сосуды и участвуют в дифференцировке наивных Т-лимфоцитов в Т-хелперы.

Применение ДК в иммунотерапии

В связи с генетической нестабильностью опухолевых клеток в них происходит активное накопление мутаций, а появление несинонимичных мутаций может приводить к образованию неоантигенов, которые обладают повышенной иммуногенностью, поскольку не характерны для нормальных тканей. Они активируют Т-клетки CD4⁺ и CD8⁺, вызывая иммунный ответ, и потенциально могут стать новыми мишенями для иммунотерапии опухолей.

Противоопухолевые вакцины, нацеленные на неоантигены, в основном включают вакцины на основе нуклеиновых кислот, ДК, опухолевых клеток и синтетических длинных пептидов (СДП). Сочетание с терапией, основанной на ингибировании иммунных контрольных точек, или лучевой терапией и химиотерапией может обеспечить лучший терапевтический эффект (Peng et al., 2019). Кроме прямого представления антигена для иммунотерапии имеют значение дополнительные свойства, присущие ДК, включая способности мигрировать между лимфоидными и нелимфоидными тканями и модулировать градиенты цитокинов и хемокинов для контроля воспаления (Perez, 2019).

Первая известная вакцина на основе ДК была создана еще в 1995 году (Mukherji et al., 1995) и с тех пор их число превысило 1000 (Ridgway, 2003). Однако ДК-вакцины до сих пор не получили широкого распространения в качестве иммунотерапии. Основной проблемой является их высокая стоимость при относительно невысокой эффективности. В рамках клинических исследований ДК-вакцины, как правило, применялись на пациентах с онкологическими заболеваниями, для которых традиционная терапия была не эффективна (June, 2018). Очевидно, что использование вакцинации при запущенном опухолевом процессе вряд ли окажется высокоэффективным. Применение ДК-вакцин в качестве вспомогательной терапии, а также для предотвращения рецидивов новообразований исследовалось мало. Таким образом, в вопросе эффективности разработка противоопухолевых ДК-вакцин все еще находится на исследовательском этапе. В будущем можно ожидать следующего этапа разработки и оптимизации ДК-вакцин, когда онкологические пациенты смогут получить лечение на более ранней стадии заболевания (Ridgway, 2003).

Получение *in vitro* ДК, обладающих терапевтическими свойствами

В медицинской и научной практике существует устоявшаяся методика получения ДК для иммунотерапии. Этот метод основан на искусственно индуцированной дифференцировке моноцитов из периферической крови пациента/донора в незрелые миелоидные ДК моноцитарного происхождения (moDC). Самый эффективный способ стимуляции моноцитов описан в работе F. Sallusto и А.

Lanzavecchia 1994 года. В исследовании были сравнены несколько комбинаций цитокинов: GM-CSF, IL-4 и TNF- α по отдельности; GM-CSF + IL-4 и GM-CSF + TNF- α . Согласно полученным результатам наибольшей эффективностью обладает "коктейль" GM-CSF + IL-4. Именно при его использовании наблюдается полная дифференцировка, то есть у клеток пропадают маркер моноцитов CD14 и появляются маркеры ДК: CD1a, CD80, CD86.

Полученные ДК являются незрелыми: они способны к фагоцитозу и накоплению антигенов, однако не обладают способностью успешно презентировать их на своей мембране в контексте МНС II (HLA-DR) и активировать Т-лимфоциты. Чтобы ДК начали экспрессировать также и необходимые для активации костимулирующие молекулы, они должны пройти процесс созревания. Для этого используются различные цитокиновые смеси, позволяющие в лабораторных условиях воссоздать эффект, оказываемый факторами воспаления *in vivo*. Наибольшее распространение для медицинских целей получил коктейль, описанный Н. Jonuleit и соавторами в статье 1997 года, в него входят TNF- α , IL-1 β , IL-6 и PGE₂. Получены результаты, доказывающие преимущество этого сочетания перед прочими вариантами: наилучшая иммуностимулирующая способность полученных ДК, наибольшая концентрация маркеров созревания CD83 на мембране клеток, высокая миграционная активность ДК, способность стимулированных CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов выделять значительное количество INF- γ . Одним из недостатков коктейля, ставшего "золотым клиническим стандартом", является низкая способность зрелых ДК секретировать IL-12, увеличивающий эффективность иммунной стимуляции Т-лимфоцитов (Trinchieri, 2003).

Также среди часто используемых в лабораторной практике методов стимуляции созревания ДК можно выделить воздействие на клетки бактериальным липополисахаридом (LPS). Эффект LPS обусловлен воздействием его на Толл-подобный рецептор 4 (TLR4) ДК в качестве бактериального агента: как будто в среде с незрелыми ДК есть бактерии, *in vivo* вызывающие воспаление и, следовательно, созревание ДК, способных активировать иммунный ответ. В частности исследование, проведенное Claudia Winzler и соавторами в 1997 году экспериментально подтверждает эффективность этого вещества для индукции созревания ДК. В работе было сравнено несколько интерлейкинов (IL-1 β , IL-6), TNF- α , LPS, а также живые бактерии (*S. aureus*, *E. coli*) по их воздействию на культуру ДК, полученных из мышиной селезенки. Среди всех веществ только IL-6 не оказал должного эффекта. Клетки, стимулированные LPS, обладали свойствами зрелых ДК: наличие на мембране маркеров CD86, CD40; активная экспрессия генов МНС-II.

Помимо уже упомянутых костимулирующих мембранных молекул для поляризации Т-лимфоцитов и стимуляции их к выработке INF- γ зрелые ДК должны быть способны секретировать биологически активный IL-12 (Trinchieri, 2003). ДК, созревшие под действием коктейля, описанного в статье Н. Jonuleit и соавторов 1997 года, не обладают такой способностью. Известно, что воздействие на ДК лигандами определенных TLR положительно сказывается на секреции ими IL-12 (Spörri, 2005). На этом факте основан эффект альтернативного "золотому стандарту" коктейля, описанного R.B. Mailliard и соавторами в работе 2004 года: к стандартному коктейлю добавлены интерферон- α (IFN- α) и лиганд TLR3 — полиинозиновая:полицитидиловая кислота (poly I:C), что улучшает способность ДК к секреции IL-12. Однако и этот метод

имеет свои недостатки: экспериментально показана проблематичность сбора полученных с помощью данного коктейля клеток и работы с ними. В связи с этим другой группой исследователей были разработаны несколько новых сочетаний (Zobywalski et al., 2007). В результате проведенных экспериментов наиболее эффективным был признан коктейль, состоящий из TNF- α , IL-1 β , IFN γ , PGE2 и R848 (лиганд к TLR8). При этом из-за ингибиторного потенциала PGE2 в отношении продукции IL-12 (Kalinski et al., 1997) его концентрация была снижена с 1 мкг/мл до 250 нг/мл, однако сохранена на уровне, достаточном для активации экспрессии гена хемокинового рецептора 7 (CCR7) (Scandella et al., 2002) и уменьшения адгезии ДК к пластику. Таким образом полученный коктейль сочетал в себе эффекты золотого стандарта и коктейля R.B. Mailliard и соавторов: полученные ДК имели морфологию зрелых клеток и обладали способностью к продукции заметного количества IL-12.

Материалы и методы

Выделение мононуклеарных клеток из периферической крови

Исследуемые в работе иммунные клетки были выделены из периферической крови 5 здоровых доноров в период с 04.2025 по 06.2025. Все образцы были предварительно проверены на отсутствие гемотрансмиссивных инфекций. Кровь получали в объеме около 50 мл в пакетах для трансфузии с добавлением цитрата натрия в качестве антикоагулянта. Кровь мы разводили с раствором Хенкса («ПанЭко») в соотношении 1:1, также добавляли 20-40 мкл гепарина натрия (5000 МЕ/мл). Разведенную кровь наслаивали на раствор Фиколла комнатной температуры ($\rho=1.077$ г/см³; «ПанЭко») из расчёта 25 мл суспензии на 15 мл раствора. После центрифугирования при ускорении 400g в течение 40 мин. при комнатной температуре (центрифуга «Eppendorf») мононуклеарные клетки выделяли из градиента плотности (сбор проводился на льду). Клетки были дважды отмыты в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS, «ПанЭко») центрифугированием при 300g (8°C, 10 минут). Мононуклеары помещали в среду RPMI 1640 («ПанЭко») с пятипроцентным содержанием ингибированной эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) («HyClone», инаktivация при 56°C в течение 25 минут) в культуральных флаконах площадью 25 см² («SPL Lifesciences») из расчёта 5 млн. клеток на флакон. Флаконы были оставлены в CO₂-инкубаторе («Sanyo») (температура 37°C и концентрация CO₂ — 5%) на 2 часа. По прошествии этого времени среду переносили во флакон площадью 75 см² (культура, обогащенная лимфоцитами) и оставляли в CO₂-инкубаторе для будущих экспериментов. Флаконы с прикрепленными моноцитами дополнительно отмыли при помощи 10 мл раствора Хенкса. К моноцитам добавляли 5 мл среды RPMI 1640 с глутамином («ПанЭко»), буфером HEPES 10 мМ («STEMCELL»), 1 мМ пирувата натрия («STEMCELL»), 24 мкг/мл гентамицина («ПанЭко») и 5% инаktivированной ЭТС.

Индукция дифференцировки и созревания ДК

К моноцитам были добавлены цитокины, индуцирующие их дифференцировку по пути дендритных клеток: GM-CSF (80 нг/мл) и IL-4 (50 нг/мл) («SCI-STORE»). После этого клетки культивировали в CO₂-инкубаторе. На 3-й день повторно добавляли GM-CSF и IL-4 для поддержания их концентрации в среде (по 1 мл среды RPMI 1640 с концентрацией обоих цитокинов 100 нг/мл). Клетки находились в CO₂-инкубаторе еще двое суток для окончательной дифференцировки.

На 5-й день дифференцировки ДК в часть флаконов, помимо GM-CSF и IL-4 добавляли 20 нг/мл TNF- α («Prospec») и 1 мкг/мл PGE2 («Sigma») или 1 мкг/мл LPS («Sigma»). После этого планшеты помещали в CO₂-инкубатор. Фотосъемка культур проводилась при помощи цифровой камеры Nikon D5000 и инвертированного микроскопа с фазовым контрастированием Axiovert 40 CFL («Carl Zeiss»).

Окрашивание клеток антителами

Клетки окрашивали в 50 мкл PBS («ПанЭко») содержащем 2% инактивированной ЭТС. Использовали моноклональные антитела к мембранным маркерам, конъюгированные с флуорохромом («BD biosciences»). Инкубацию проводили при 4°C в течение 30 минут. По прошествии этого времени образцы были дважды отмыты от остатков антител в PBS. Клеточный осадок фиксировали в 100 мкл двухпроцентного параформальдегида («BD biosciences») в темноте на протяжении 15 минут, после чего к каждому образцу добавили еще по 500 мкл PBS.

Подсчет клеток

Для подсчета клеток 5 мкл клеточной суспензии смешивали с 5 мкл красителя трепанового синего («Invitrogen»), окрашивающего мертвые клетки. Полученные 10 мкл загружали в слот для автоматического счетчика клеток Countess II («Invitrogen»). При сомнениях в достоверности результатов клетки считали вручную под микроскопом при помощи счетной камеры с сеткой (камера Горяева).

Сокультивирование

Сокультивирование ДК и лимфоцитов проводили в 24-луночных планшетах («SPL Lifesciences»). В планшет переносили незрелые ДК в количестве 500 тыс. клеток на лунку. В часть лунок вносили LPS или TNF- α и PGE2. На следующие сутки к ним добавляли аллогенные лимфоциты из расчета 1 млн. клеток на лунку и сокультивировали 2-3 суток (в зависимости от эксперимента). Для анализа пролиферативной активности, лимфоциты предварительно окрашивали CFSE («Sigma») в концентрации 1 мкг/мл.

Проточная цитофлуориметрия

Анализ образцов производился при помощи проточного цитофлуориметра-сортера FACS Aria III («BD Biosciences»). Моноциты/ДК и лимфоциты отличали по параметрам прямого и бокового светорассеяния. Анализ флуоресценции антител и проводили в соответствующих каналах (для CFSE использовали канал FITC) в логарифмических координатах. Для анализа клеточного цикла, лимфоциты фиксировали в 200 мкл охлажденного до -20C⁰ этанола (70%). Клетки инкубировали не менее 1 часа в морозильнике при -20C⁰. Затем добавляли 300 мкл PBS. Непосредственно перед цитометрическим анализом клетки отмывали дважды PBS при 500 g и ресуспендировали в 500 мкл PBS. В суспензию добавляли пропидиум иодид (PI, «Sigma») 10 мкг/мл. Анализ флуоресценции PI проводили в канале фикоэритрина (PE) в линейных координатах.

Анализ данных

Анализ и графическую обработку цитометрических данных мы проводили в программе FlowJo, часть гистограмм создана при помощи Excel. Статистические тесты проведены в программе SigmaPlot. Достоверными считались различия при $p \leq 0,05$.

Все манипуляции и анализ полученных данных были проведены нами под контролем научного руководителя. Цитометрический анализ образцов, полученных в

ходе эксперимента по определению клеточного цикла, был осуществлен сотрудниками другого подразделения.

Результаты

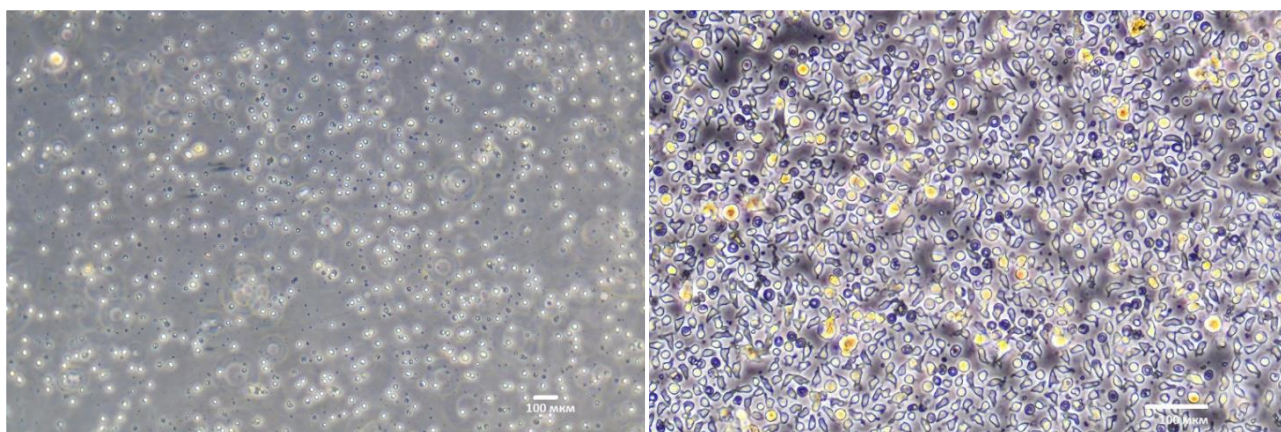
Получение незрелых дендритных клеток

Из градиента донорской крови мы получали фракцию мононуклеарных клеток. Так как к ним относятся не только необходимые нам моноциты, но и лимфоциты, то мы отделяли их от общей клеточной суспензии за счет адгезии моноцитов ко дну культурального флакона (рис. 2А). Далее для получения незрелых ДК (рис. 2В) из моноцитов мы индуцировали их дифференцировку добавлением цитокинов GM-CSF и IL-4 (см. «Материалы и методы»). Добавление цитокинов проводили сразу после отделения лимфоцитов, а также повторно на 3 день. На 5-е сутки культивирования клеток в среде с GM-CSF и IL-4 мы оценивали их дифференцировку по исчезновению на клеточной мембране моноцитарного маркера CD14 и появлению CD1a — маркера незрелых ДК, который появляется на некоторых ДК и выполняет функцию презентации липидных антигенов (Brigl, Brenner, 2004).

Для выявления экспрессии интересующих нас мембранных молекул мы провели цитометрический анализ, предварительно окрасив клетки моноклональными антителами. Были подобраны конъюгированные с антителами флуорохромы с разной эмиссией, чтобы избежать перекрытия по спектру: фикоэритрин (PE) для CD14 и аллофикоцианин (APC) для CD1a. Результаты цитометрического анализа представлены на рис. 3.

Рис. 3А показывает пример первичного анализа клеток по значениям их прямого и бокового светорассеивания, что позволяет с помощью гейтирования* выделить на флуорограмме популяцию моноцитов/ДК, соответствующую этим параметрам. Рисунки 3В, 3С и 3D отражают данные только о клетках из выделенного на рисунке 3А гейта. На флуорограмме 3В представлены неокрашенные антителами клетки (негативный контроль), по параметрам которых были выставлены гейты для рисунков 3С и 3D. Как видно из рисунка 3С, большинство клеток (66,5%), которые были культивированы в отсутствие факторов дифференцировки, сохранили экспрессию CD14 и не имели CD1a, следовательно являлись моноцитами. Напротив, культивируемые в присутствии GM-CSF и IL-4 клетки утрачивали экспрессию CD14 и некоторые из них экспрессировали CD1a на своей поверхности, что подтверждает наличие дифференцированных ДК.

*Гейтирование — способ выделения конкретных субпопуляций клеток по параметрам интенсивности их светорассеяния и флуоресценции при анализе цитофлуорограмм.



A

B

Рис. 2. Фотографии полученных клеточных культур: **A** — моноциты; **B** — незрелые ДК (iDC). Указан мерный отрезок в 100 мкм. Фото сделаны при помощи камеры Nikon D5000 и инвертированного микроскопа с фазовым контрастированием Axiovert 40 CFL («Carl Zeiss»).

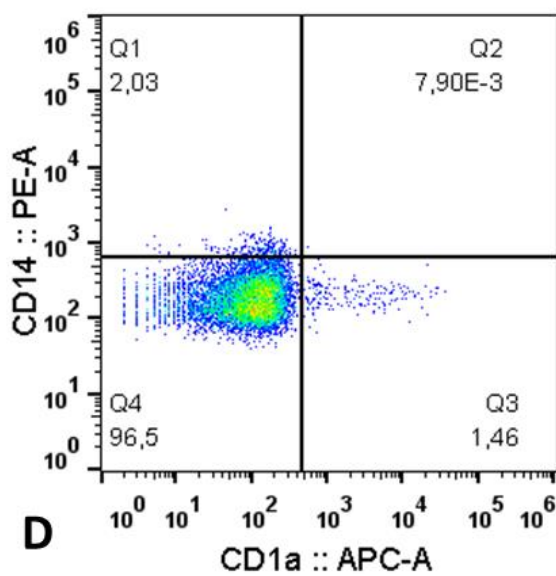
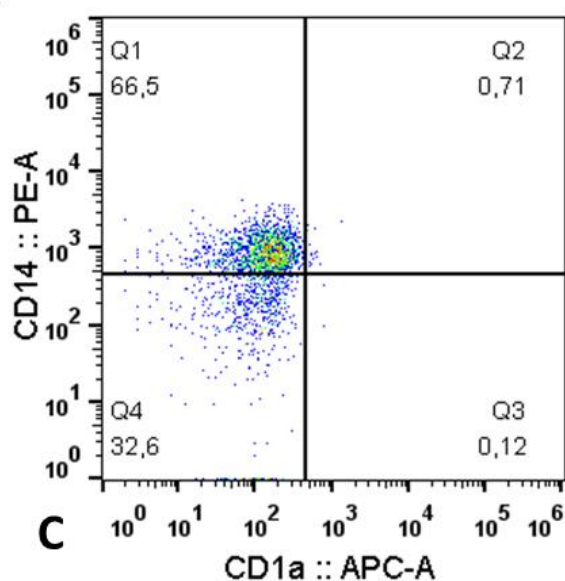
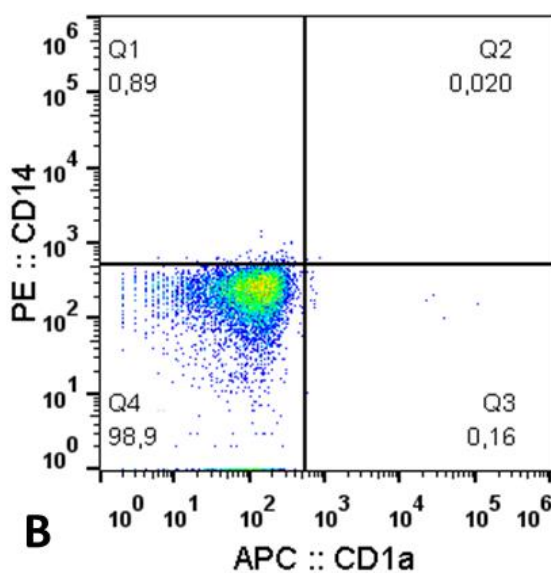
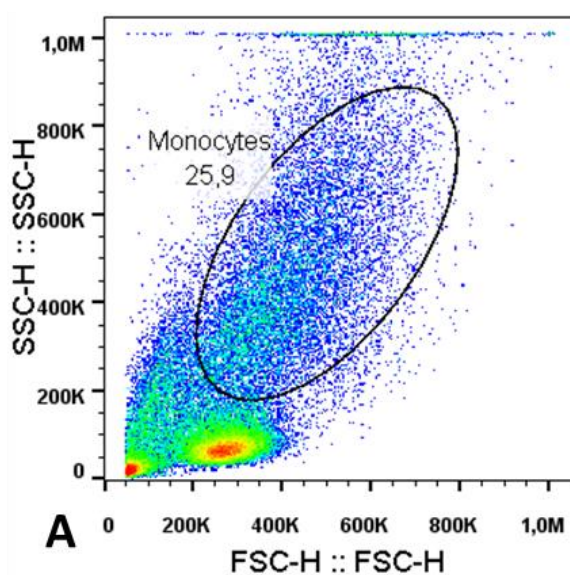


Рис. 3. Результаты цитометрического анализа образцов моноцитов и незрелых ДК, представленные в дот-плотах. По осям отмечена интенсивность флуоресценции в условных единицах. На рис. А шкалы линейные, на рис. В, С и D — логарифмические. Числа внутри гейтов обозначают содержащуюся в них долю от общего числа клеток на рисунке, выраженную в процентах. Цветом обозначена различная плотность скопления клеток со схожими значениями прямого и бокового светорассеяния или флуоресценции (от синего к красному). **А** — гейтирование по прямому и боковому светорассеянию, в овал выделено множество клеток с параметрами, соответствующими морфологии моноцитов и ДК; **В** — негативный контроль (неокрашенные клетки), по интенсивности флуоресценции этого образца выставлены гейты для следующих флуорограмм; **С** — флуорограмма образца моноцитов, после культивирования без факторов дифференцировки; **Д** — флуорограмма образца моноцитов, после культивирования в присутствии GM-CSF и IL-4. Изображения созданы при помощи программы для обработки цитометрических данных FlowJo.

Оценка экспрессии костимулирующих молекул на ДК после индукции их созревания

Для сравнения эффективности созревания ДК при различных условиях, мы использовали сочетание TNF- α и PGE2 (главных компонентов коктейля, описанного Н. Jonuleit и соавторами), а в качестве альтернативы — бактериальный LPS (Winzler et al., 1997). Вещества добавляли к культурам незрелых ДК на 5-й день с начала процесса их индуцированной дифференцировки. На 8 день оценивали созревание ДК (рис. 4). На рисунке 4А представлена культура зрелых ДК, полученных при помощи LPS. Помимо самих ДК и оставшихся после центрифугирования эритроцитов на фото отчетливо видны клетки с макрофагальной морфологией. Исходя из этого факта и отсутствия подобных клеток в культуре ДК, созревших в присутствии TNF- α + PGE2 (рис. 4В), можно предположить, что LPS индуцировал дифференцировку моноцитов, не превратившихся полностью в iDC, по макрофагальному пути. Такое побочное действие можно рассматривать как недостаток LPS в качестве инициатора созревания ДК. Однако на практике выделение ДК из подобной культуры в лабораторных условиях не составляет особого труда, в связи с адгезивными свойствами макрофагов.

Оценку степени зрелости ДК проводили цитометрически по повышению экспрессии HLA-DR и наличию костимулирующих молекул CD40, CD80, CD83, CD86. В сравнении участвовали культуры: iDC, mDC индуцированные LPS и mDC индуцированные TNF- α + PGE2. Перед анализом все культуры были окрашены моноклональными антителами к соответствующим мембранным маркерам. Используемые нами антитела были конъюгированы со следующими флуорохромами: флуоресцеин изотиоцианат (FITC) для CD40, CD80 и CD86; PE для CD83 и APC для HLA-DR. Флуорограммы разных образцов, показывающие экспрессию одного и того же маркера, отмечены цветом и наложены друг на друга для визуального сравнения; результаты цитометрического анализа представлены на рис. 5.

В результате проведенного цитометрического анализа незрелых ДК и двух типов ДК, подвергнутых альтернативной индукции созревания, мы выявили некоторые различия уровня экспрессии отдельных маркеров созревания (рис. 5). Согласно рисунку 5А, на мембране iDC присутствует значительное количество HLA-DR, а у зрелых ДК уровень его экспрессии стал еще больше после пройденного этапа созревания, при этом практически не различается между образцами с LPS и с TNF- α + PGE2. Маркер CD80 появился у зрелых ДК в небольшом количестве, также заметно

почти незначительное превосходство LPS-индуцированных ДК по его экспрессии (рис. 5В). На рисунке 5С, отражающем присутствие CD86, заметна несколько большая разница в уровне экспрессии этого маркера между зрелыми и незрелыми ДК. На фоне прочих маркеров сравнение концентрации CD83 оказалось наиболее показательным, так как у зрелых ДК она заметно выше, чем у незрелых (рис. 5D). Маркер CD40, по данным флуорограммы 5Е, вовсе не экспрессируется у полученных нами ДК.

Согласно результатам анализа, мы успешно индуцировали созревание ДК *in vitro*, эффекты которого мы определили по повышенному уровню экспрессии HLA-DR и появлению маркеров созревания, с преобладанием CD83. Значительных различий в экспрессии маркеров между индуцированными LPS и TNF- α +PGE2 ДК не обнаружено.

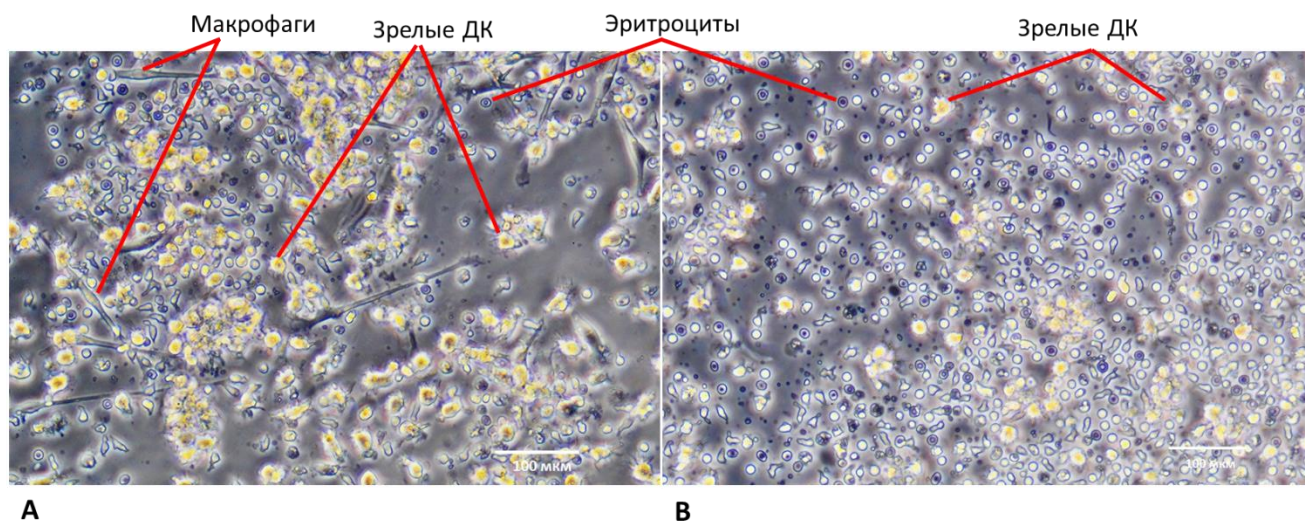


Рис. 4. Фотографии культур ДК после индукции созревания при помощи LPS (**A**) или TNF- α + PGE2 (**B**). Указан мерный отрезок в 100 мкм, а также подписаны основные типы клеток в культуре. Фото сделаны при помощи камеры Nikon D5000 и инвертированного микроскопа с фазовым контрастированием Axiovert 40 CFL («Carl Zeiss»).

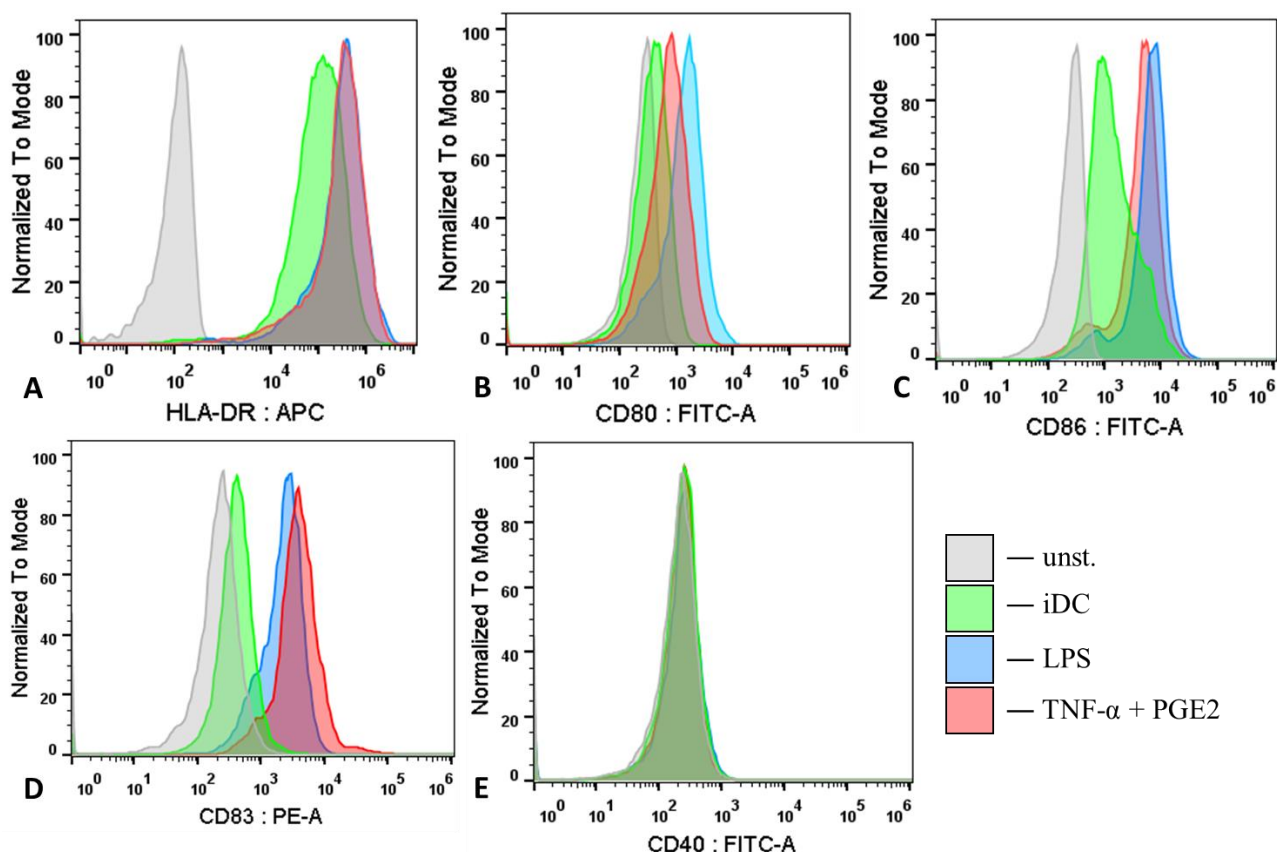


Рис. 5. Результаты цитометрического анализа образцов незрелых ДК (iDC), LPS-стимулированных ДК и TNF- α +PGE2-стимулированных ДК, представленные в гистограммах. По горизонтальной оси отмечена интенсивность флуоресценции в условных единицах, шкала логарифмическая. По вертикальной оси — шкала, отражающая в процентах долю клеток с данной интенсивностью флуоресценции от модального значения для каждого образца. Цветовая индексация соответствует представленным типам клеток (unst. — неокрашенный образец, использованный в качестве контроля для определения аутофлуоресценции клеток в данных каналах). Каждая флуорограмма представляет данные о величине экспрессии одного маркера. **А** — HLA-DR; **В** — CD80, **С** — CD86, **Д** — CD83, **Е** — CD40. Изображения созданы при помощи программы для обработки цитометрических данных FlowJo.

Исследование пролиферативной активности аллогенных лимфоцитов при их сокультивировании с дендритными клетками

В следующих экспериментах мы проводили сокультивирование ДК с аллогенными лимфоцитами, чтобы сравнить способность ДК, созревших в альтернативных условиях, активировать Т-клеточный иммунный ответ. В рамках нашего исследования *in vitro* эту способность мы оценивали через степень пролиферативной активности сокультивированных с данным типом ДК лимфоцитов.

В первом эксперименте мы использовали два 24-луночных планшета. На планшет I (рис. 6А) мы посадили дифференцированные, но незрелые ДК (примерная концентрация — 500 000 клеток в лунку) от двух разных доноров (условно назовем их №1 и №2). В лунки рядов В и С мы добавляли факторы созревания: TNF- α + PGE2 (ряд В) или LPS (ряд С). При этом в лунках ряда А ДК были оставлены незрелыми для сравнения их активности со зрелыми.

Спустя сутки к ДК в лунки А1, В1, С1 и А4, В4, С4 (рис. 6А) мы перекрестно добавили аллогенные лимфоциты тех же доноров (лимфоциты №1 к ДК №2 и наоборот), в оставшиеся лунки рядов А, В и С поместили лимфоциты от донора №3 (ДК этого донора мы не использовали в эксперименте). Концентрация лимфоцитов — 1 000 000 клеток на лунку. Перед добавлением лимфоциты были окрашены CFSE. Этот краситель в норме не флуоресцирует, но при добавлении к культуре клеток он свободно проникает внутрь через мембрану и при взаимодействии с эстеразами в цитоплазме превращается в флуорохром. При делении количество красителя в каждой клетке уменьшается, следовательно по изменению его концентрации можно определить пролиферативную активность культуры. Помимо окрашенных клеток в две лунки планшета I мы посадили лимфоциты без CFSE для определения уровня аутофлуорисценции.

Планшет II мы использовали, чтобы исключить влияние самих факторов созревания на пролиферацию лимфоцитов. Для этого лимфоциты от тех же трех доноров мы окрасили CFSE и перенесли на планшет II в тот же день, что и на планшет I, и в той же концентрации (рис. 6В). В 6 лунок (по две в каждой группе клеток) мы добавили LPS, к другим 6 — TNF- α и PGE2. Концентрация веществ была такой же, как и при созревании ДК (чтобы точно воссоздать условия культуральной среды). Также для сравнения еще в 6 лунок мы добавили фитогемагглютинин (PHA), который индуцирует пролиферацию лимфоцитов, а в оставшиеся 6 не добавляли ничего, в качестве негативного контроля. После 3 суток культивирования клеток в CO₂-инкубаторе мы провели цитометрический анализ образцов. За счет лунок с повторами в этом эксперименте мы получили данные, которые можно статистически обработать. Гистограммы со средними значениями выборок представлены на рисунке 7. На рисунках 8 и 9 представлены результаты одного из повторов в качестве примера графической обработки.

Исходя из данных рисунков 7В и 8, можно предположить, что зрелые ДК стимулируют пролиферацию аллогенных лимфоцитов эффективнее чем незрелые. Если при сокультивировании с незрелыми ДК пролиферировало 16,6% клеток (рис. 7В), то при использовании ДК, прошедших этап созревания, — в среднем 28,5% и количество пролиферирующих клеток доходило до 42,3% (рис. 8С). Однако при статистическом сравнении (критерий Стьюдента) достоверное различие между зрелыми и незрелыми ДК обнаружено только для LPS ($p=0,05$), тогда как для TNF- α +PGE2 различие было недостоверным ($p=0,07$). Это, скорее всего, связано со слишком маленькой выборкой, включающей в себе только 3 биологических повтора. Процент пролиферирующих лимфоцитов между лунками существенно разнился, что во многом связано с индивидуальными особенностями биологического материала, использованного в работе. Следует отметить, что максимальная разница между образцами с LPS- и TNF- α +PGE2-стимулированными ДК была выявлена в одном из повторов (рис. 8В, С) и составила незначительные 3,3% (39% и 42,3% соответственно). Такие различия ожидаемо оказались статистически недостоверными (критерий Стьюдента, $p=0,95$).

Как видно на рисунках 7А и 9А, лимфоциты, индуцированные PHA, имели высокую пролиферативную активность (63,9% от общего числа клеток совершили одно и более делений). При этом добавление в среду LPS или TNF- α и PGE2 (рис. 7А, 9С и 9D) практически никак не стимулировало пролиферацию лимфоцитов и они ничем не отличались от не стимулированных клеток (рис. 7А и 9В). При сравнении

выборок с помощью статистического теста (критерий Краскела — Уоллиса) мы также не обнаружили достоверных различий ($p=0,356$). Благодаря этому контролю мы исключили вероятность того, что при сокультивировании активировать Т-клетки могли сами индуцирующие созревание факторы.

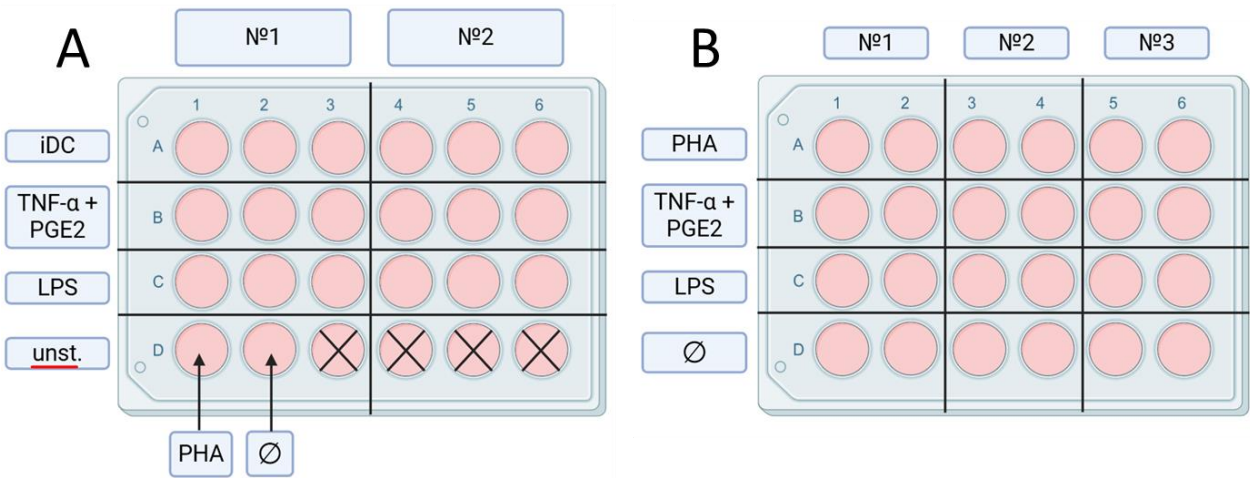


Рис. 6. Схема 24-луночных планшетов, использованных в эксперименте с окрашиванием лимфоцитов CFSE. Над планшетами подписаны условные номера доноров, из крови которых были выделены клетки, слева от планшетов — типы клеток/добавленные в среду вещества. Крестиками обозначены пустые лунки. **А** — планшет I со схемой рассадки ДК при сокультивировании, также отмечены лунки с неокрашенным контролем лимфоцитов; **В** — планшет II со схемой рассадки лимфоцитов для сравнения эффекта от присутствующих в среде веществ. Изображения созданы при помощи программы BioRender.

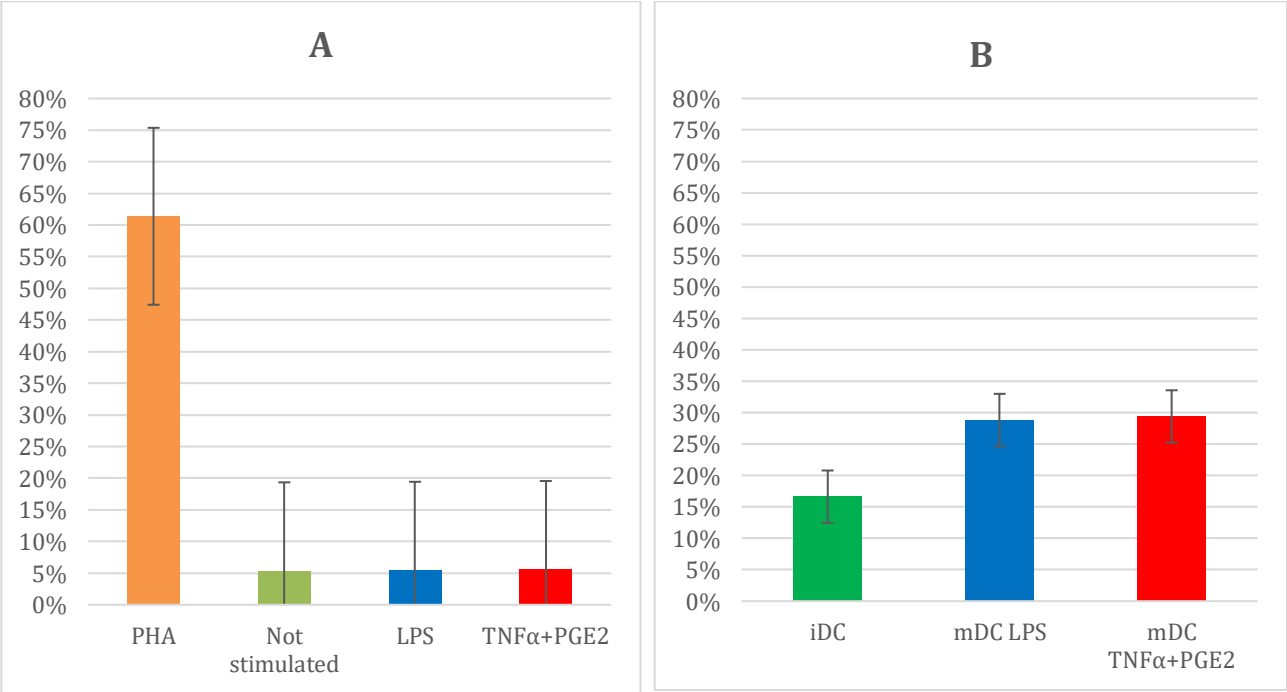


Рис. 7. Гистограммы, отражающие средние значения внутри выборок. По вертикальной оси отмечен процент пролиферирующих лимфоцитов. **А** — лимфоциты отдельно; **В** — лимфоциты после сокультивирования с ДК. Также для каждого столбца указана стандартная погрешность. Изображения созданы при помощи программы Excel.

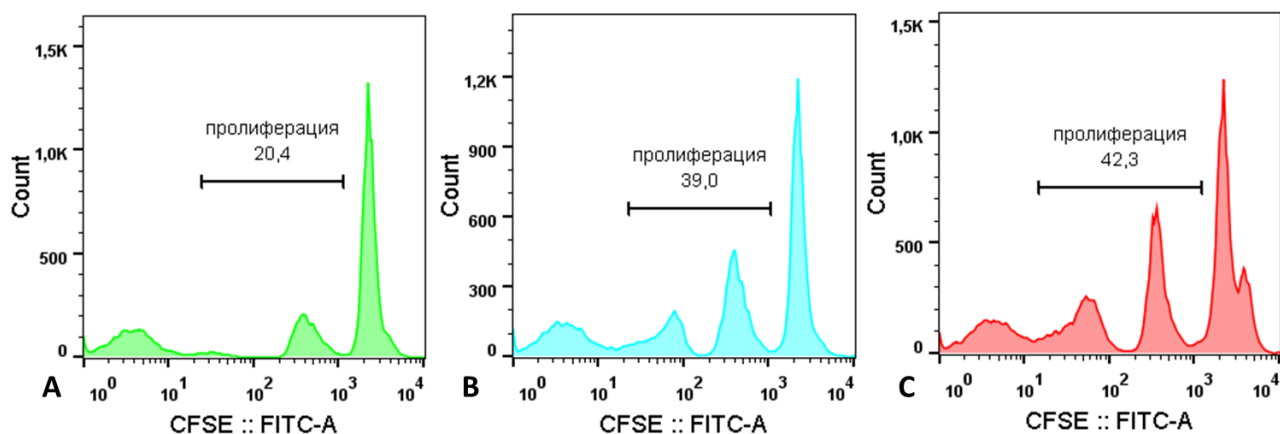


Рис. 8. Пример цитометрического анализа лимфоцитов при сокультивировании с ДК, представленный в гистограммах. По горизонтальной оси отмечена интенсивность флуоресценции в условных единицах. По вертикальной оси — количество клеток. Гейты на гистограммах выставлены в соответствии с границей пиков максимальной флуоресценции справа и аутофлуоресценции слева, число в гейте означает долю пролиферирующих клеток в процентах. **А** — сокультивирование с незрелыми ДК; **В** — сокультивирование с LPS-индуцированными зрелыми ДК; **С** — сокультивирование с TNF- α +PGE2-индуцированными зрелыми ДК. Изображения созданы при помощи программы для обработки цитометрических данных FlowJo.

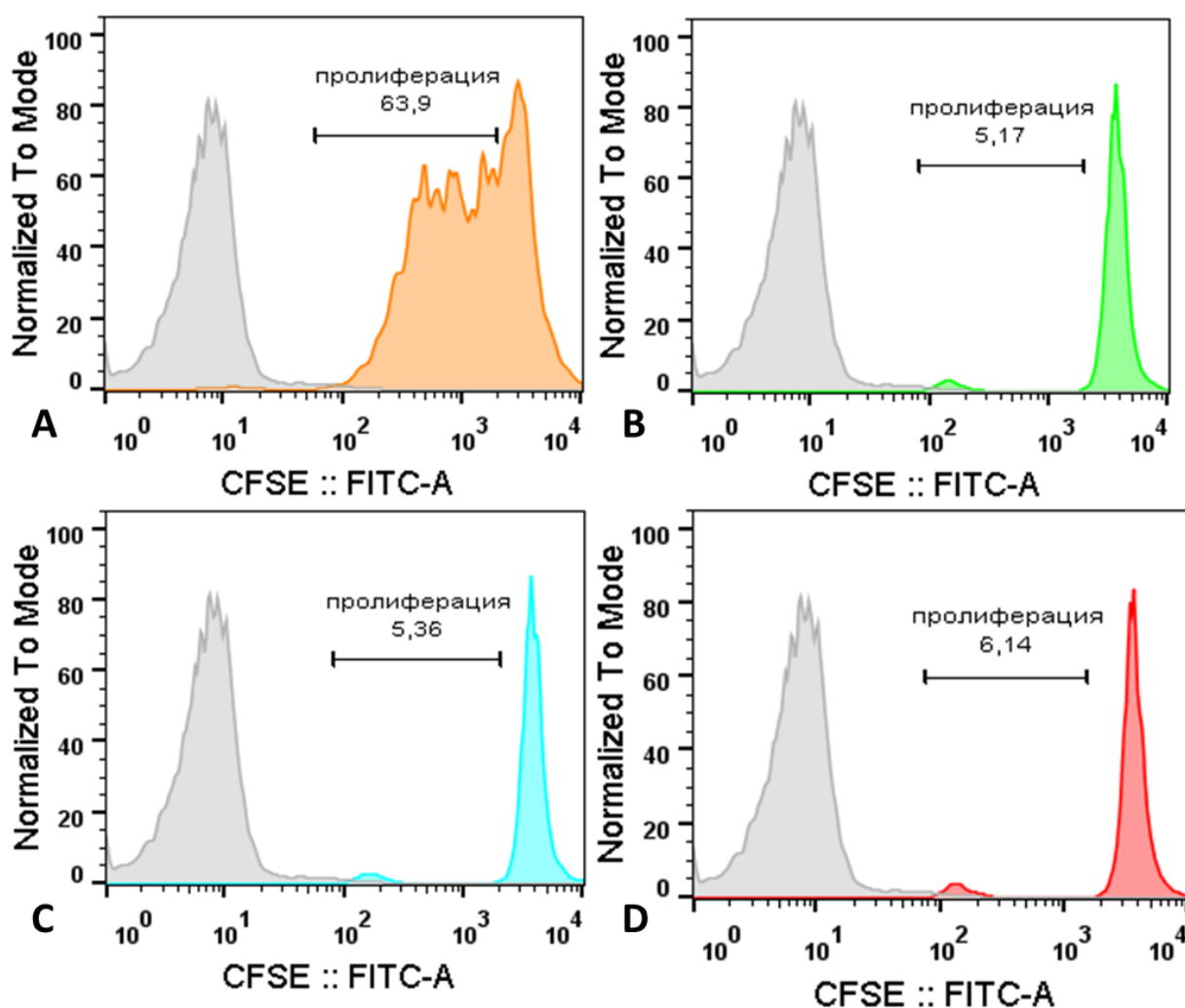


Рис. 9. Пример цитометрического анализа образцов лимфоцитов без сокультивирования с ДК, представленные в гистограммах. По горизонтальной оси отмечена интенсивность флуоресценции в условных единицах. По вертикальной оси — шкала, отражающая в процентах долю клеток с данной интенсивностью флуоресценции от модального значения для каждого образца. На каждую флуорограмму наложена гистограмма аутофлуоресценции неокрашенного контроля (серого цвета). Нормализованные значения представлены в связи с тем, что у экспериментального и контрольного образцов было проанализировано различное количество событий. Гейты на гистограммах выставлены в соответствии с границей пиков максимальной флуоресценции, соответствующей неделящимся клеткам и аутофлуоресценции, число в гейте означает долю пролиферирующих клеток в процентах. **A** — лимфоциты, стимулированные РНА; **B** — лимфоциты без стимуляции; **C** — лимфоциты с LPS в среде; **D** — лимфоциты с TNF- α и PGE2 в среде. Изображения созданы при помощи программы для обработки цитометрических данных FlowJo.

Исследование распределения лимфоцитов по стадиям клеточного цикла при их сокультивировании с дендритными клетками

Помимо оценки пролиферативной активности по окрашиванию CFSE мы определяли фазу клеточного цикла, на которой находились лимфоциты. Для этого мы поставили дополнительный эксперимент по сокультивированию ДК и лимфоцитов. Мы сажали ДК на один 24-луночный планшет (как на рисунке 5А) и добавляли лимфоциты через сутки созревания, однако само сокультивирование длилось меньше

на одни сутки (2 дня вместо 3 при окрашивании CFSE). По прошествии 2-х суток сокультивирования собирали клетки, фиксировали их при помощи этанола и окрашивали PI. Этот флуорохром окрашивает ДНК, и по интенсивности его флуоресценции можно определить фазу клеточного цикла: если клетка находится в G2 фазе, то количество красителя в ней будет вдвое больше, чем в клетке, находящейся в G1 фазе (в S фазе значение будет промежуточным). Поэтому при интерпретации результатов, полученных при проточной цитофлуорометрии образцов, мы использовали линейную шкалу интенсивности флуоресценции. К сожалению, несмотря на наличие нескольких лунок

На рисунке 10 представлены результаты цитометрического анализа клеток. При сокультивировании с незрелыми ДК лишь 14,7% лимфоцитов находилось в G2/S фазе (рис. 10А). Как видно из рисунков 10В и 10С, сокультивирование со зрелыми ДК увеличивало долю лимфоцитов в G2/S фазе в среднем на 8,1%. Между собой два образца, сокультивированные с LPS- или TNF- α +PGE2-стимулированными ДК, различаются на 5,4% (25,5% и 20,1% соответственно).

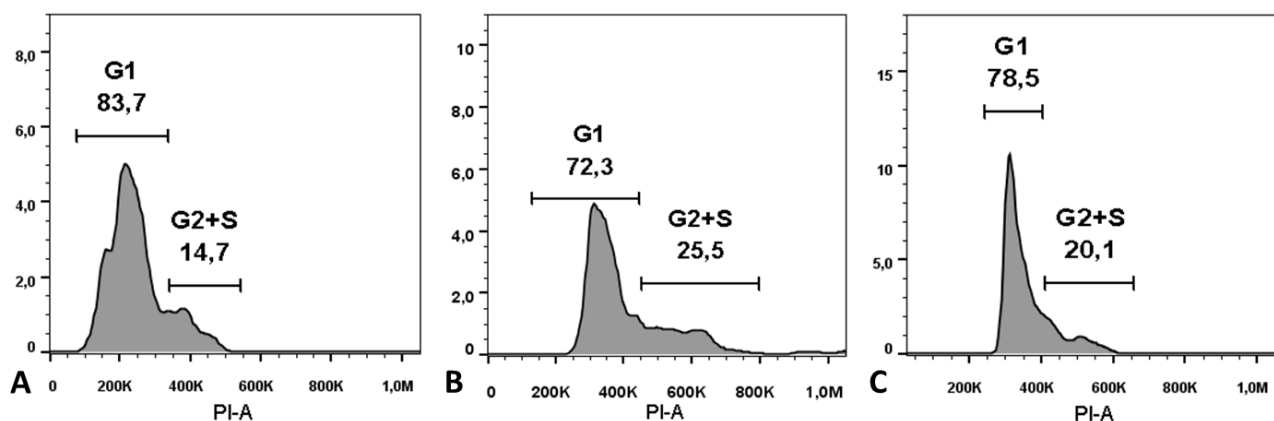


Рис. 10. Результаты цитометрического анализа лимфоцитов при сокультивировании с ДК, представленные в гистограммах. По горизонтальной оси отмечена интенсивность флуоресценции в условных единицах, шкала линейная. По вертикальной оси — количество клеток в тысячах. Числа в гейтах означают долю клеток, находящихся на определенной стадии клеточного цикла, выраженную в процентах. **А** — сокультивирование с незрелыми ДК; **В** — сокультивирование с LPS-стимулированными зрелыми ДК; **С** — сокультивирование с TNF- α +PGE2-стимулированными зрелыми ДК.

Таким образом, результаты нашего исследования доказывают возможность эффективного созревания ДК как под действием TNF- α + PGE2, что согласуется с выводом Н. Jonuleit с соавторами (Jonuleit et al., 1997), так и под действием LPS, подтверждая данные, полученные С. Winzler с соавторами (Winzler et al., 1997).

Обсуждение

Интерпретация результатов, полученных при сравнении эффективности созревания ДК, стимулированных различными коктейлями

В процессе созревания незрелые ДК приобретают свойства, необходимые при иммунотерапии онкологических заболеваний (способность к активной антиген-презентации и, в частности, к кросс-презентации). Именно после этого у них

повышается экспрессия HLA-DR (одного из белков МНС-II) и появляются мембранные молекулы – маркеры созревания: CD40, CD80, CD83, CD86 (Larsen et al., 1992; Inaba et al., 1994; Zhou, Tedder, 1995). Для индукции этого процесса *in vitro* мы использовали два различных варианта условий, так называемых «коктейлей созревания», уже описанных в научной литературе на эту тему. Нашей целью было сравнение эффективности этих коктейлей, состоящих из веществ, имитирующих воспалительную среду *in vivo*. Одно из использованных нами сочетаний — TNF- α и PGE2, основных компонентов коктейля, признанного «золотым клиническим стандартом» (Jonuleit et al., 1997). Для сравнения мы выбрали альтернативный способ индукции созревания в присутствии бактериального LPS.

Ранее мы уже неоднократно упоминали определенные маркеры зрелости ДК, а именно: HLA-DR, CD80, CD86, CD83 и CD40. HLA-DR – это рецептор клеточной поверхности МНС класса II. Поскольку главная функция HLA-DR заключается в презентации антигенов с целью индукции иммунного ответа, этот белок обнаруживается в АПК (макрофаги, В-клетки, ДК и проч.). Повышенная концентрация этого рецептора на мембране возникает в ответ на стимуляцию и позволяет утверждать, что клетка способна к презентации антигенов.

Маркеры CD80 (B7-1) и CD86 (B7-2), относящиеся к одному семейству мембранных белков B7, взаимодействуют с одинаковыми рецепторами на поверхности Т-клеток и играют ключевую роль в их активации. CD80, как и CD86 обнаружен на активированных АПК, в частности на ДК, будучи при этом маркером их созревания. Установлено, что у CD80 и CD86 25 % общих аминокислотных последовательностей, но при этом CD80 имеет большее химическое сродство к CD28, а CD86 экспрессируется обильнее и быстрее (Sansom, 2000). Наши данные подтверждают это: концентрация CD86 больше CD80 и различия между зрелыми и незрелыми ДК по его экспрессии значительнее (рис. 5В, С).

Еще один важный маркер созревания ДК — CD83. Хотя конкретные функции CD83 на дендритных клетках до сих пор остаются до конца неясными, известно, что он играет определенную роль в модуляции антиген-презентации и генерации CD4⁺ Т-клеток. В работе Weiping Cao с соавторами 2005 года сравнение поверхностной экспрессии CD83 с CD40, CD80 и CD86 во время индуцированного LPS созревания ДК показало, что концентрация CD83 на мембране росла заметно быстрее остальных маркеров. Авторы статьи объясняют такую особенность тем, что незрелые ДК (а также моноциты и макрофаги), не будучи активированными, синтезируют CD83 и накапливают в перинуклеарном пространстве (существенную роль в этом процессе играет стимуляция ДК при помощи IL-4 в течение их дифференцировки из моноцитов). Таким образом при созревании этот маркер встраивается в мембрану гораздо быстрее, чем если бы его синтез начался только после активации ДК. Результаты нашего исследования частично согласуются с этими данными, так как уровень экспрессии CD83 на зрелых ДК был больше CD80 и CD40, однако примерно на одном уровне с CD86 (рис. 5).

CD40 — трансмембранный белок, экспрессирующийся на АПК, его связывание с CD40L на CD4⁺ Т-клетках активирует АПК и вызывает ряд последующих эффектов. Взаимодействия CD40/CD40L провоцируют противоопухолевый иммунный ответ за счет регуляции молекул МНС, экспрессии провоспалительных факторов, костимуляции CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток. В соответствии с его широкой экспрессией на

фибробластах, эндотелиальных и эпителиальных клетках CD40 также экспрессируется на широком спектре опухолевых клеток (van Kooten et al., 2000). На полученных нами ДК мы не смогли обнаружить этого маркера, однако его отсутствие может и не сказаться негативно на иммуностимулирующих свойствах ДК в составе противоопухолевой вакцины, поскольку CD40 участвует в активации гуморального иммунитета, включая секрецию антител и переключение классов иммуноглобулинов (Clark, 2014), что может оказать негативное влияние на противоопухолевый иммунитет за счет выработки блокирующих опухолевые эпитопы антител и негативной регуляции клеточной цитотоксичности.

Заключение

В процессе нашей работы с использованием методов культуры клеток и проточной цитометрии было проведено сравнение эффективности созревания ДК *in vitro* под действием TNF α и PGE2 с эффективностью созревания под действием бактериального LPS. В ходе исследования мы не обнаружили существенных различий, между ДК, подвергнутыми альтернативным способам индукции созревания, по признаку экспрессии костимулирующих молекул, необходимых для развития противоопухолевого иммунного ответа, а также по способности ДК стимулировать пролиферацию лимфоцитов. При этом были обнаружены признаки того, что использование LPS в качестве индуктора созревания ДК может способствовать дифференцировке в направлении макрофагов. По результатам проделанной работы могут быть сформулированы следующие выводы.

1. Добавление в культуру незрелых ДК TNF- α и PGE2, равно как и бактериального LPS, приводит к созреванию, которое выражается в повышении экспрессии молекул МНС класса II (HLA-DR) и костимулирующих молекул CD80, CD83, CD86, а также, скорее всего, в увеличении способности ДК стимулировать пролиферацию аллогенных лимфоцитов.

2. Не было выявлено достоверных различий в способности TNF- α +PGE2 и бактериального LPS стимулировать экспрессию HLA-DR, костимулирующих молекул CD80, CD83, CD86 и пролиферацию аллогенных лимфоцитов.

3. Ни TNF- α +PGE2 ни бактериальный LPS не стимулировали экспрессию CD40 на ДК.

4. Имеются морфологические признаки способности бактериального LPS стимулировать дифференцировку в макрофаги даже в присутствии в среде GM-CSF и IL-4, являющихся индукторами дифференцировки в ДК.

Несмотря на то, что не было обнаружено существенных различий между «классическим коктейлем» и LPS в их способности стимулировать созревание ДК, рано делать вывод о том, что LPS может быть использован в качестве альтернативного индуктора созревания при создании противоопухолевых ДК-вакцин. Высокая экспрессия HLA-DR на фоне костимулирующих молекул и способность стимулировать пролиферацию лимфоцитов являются не единственными признаками, обеспечивающими эффективность вакцинации. Такие признаки, как профиль секретируемых цитокинов, способность мигрировать в лимфоидные органы и др. могут оказаться критическими. В связи с этим, следует заключить, что возможность использования бактериального LPS в качестве альтернативного фактора,

стимулирующего созревание ДК для их использования в качестве клеточных вакцин, требуется исследовать дальше, более подробно и с большими выборками.

Список сокращений

APC — Allophycocyanin (Аллофикоцианин)
CD — Cluster of differentiation (Кластер дифференцировки)
CFSE — Carboxyfluorescein succinimidyl ester (Сукцинимидиловый эфир карбоксифлуоресцеина)
DCs — Dendritic cells (Дендритные клетки)
FITC — Fluorescein isothiocyanate (Флуоресцеина изотиоцианат)
GM-CSF — Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор)
HLA — Human Leukocyte Antigen (Человеческий лейкоцитарный антиген)
iDC — immature DC (Незрелые ДК)
IL — Interleukin (Интерлейкин)
INF — Interferon (Интерферон)
LPS — Lipopolysaccharid (Липополисахарид)
mDC — Mature /myeloid DC (Зрелые/миелоидные ДК)
MHC — Major Histocompatibility Complex (Главный комплекс гистосовместимости)
moDC — Monocyte derived DC (Моноцитарные ДК)
NK — Natural Killer cells (Натуральные киллеры)
PBS — Phosphate Buffered Saline (Фосфатно-солевой буфер)
pDC — Plasmacytoid DC (Плазмоцитарные ДК)
PE — Phycoerythrin (Фикоэритрин)
PGE2 — Prostaglandin E2 (Простагландин E2)
PHA — Phytohemagglutinin (Фитогемагглютинин)
PI — Propidium Iodide (Пропидиум йодид)
TLR — Toll-like Receptors (Toll-подобные рецепторы)
TNF — Tumor Necrosis Factor (Фактор некроза опухоли)
poly I:C — Polyinosinic:polycytidylic acid (полиинозиновая:полицитидиловая кислота)
АПК — антигенпрезентирующая клетка
СДП — синтетические длинные пептиды
ЦТЛ — цитотоксические Т-лимфоциты
ЭТС — эмбриональная телячья сыворотка

Благодарности

Мы благодарим ведущего научного сотрудника Лупатова А.Ю. за курирование нашей исследовательской работы, руководство НИИ ИБМХ В.Н. Ореховича, в особенности директора Пономаренко Е.А. и заведующего лабораторией Ярыгина К.Н. за представленную возможность и созданные условия для прохождения лабораторной практики. Мы также благодарим ведущего научного сотрудника Холоденко И.В. за

ценные замечания к работе и лаборанта-исследователя Покусаеву И.А. за методическую помощь.

Отдельно благодарим Глаголева С.М. и кафедру биологии Московской гимназии на Юго-Западе №1543 им. Ю.В. Завельского за организацию лабораторной практики, Глаголеву Н.С. за рецензирование нашей работы и Руденко Г.К. за рекомендацию ресурсов для графического представления данных.

Список литературы

1. Ярилин А. А. Иммунология. Москва, ГЭОТАР-Медиа, 2010. 752 с.
2. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. New York, Garland Science, 2008. 1392 p.
3. Balan S., Saxena M., Bhardwaj N. Dendritic cell subsets and locations. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2019; 348: 1–68
DOI: 10.1016/bs.ircmb.2019.07.004
4. Brigl M., Brenner M.B. CD1: antigen presentation and T cell function. *Annu. Rev. Immunol.*, 2004; 22 (1): 817–890
DOI: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104608
5. Burstein H.J., Krilov L., Aragon-Ching J.B., Baxter N.N., Chiorean E.G., Chow W.A., De Groot J.F., Devine S.M., DuBois S.G., El-Deiry W.S., Epstein A.S., Heymach J., Jones J.A., Mayer D.K., Miksad R.A., Pennell N.A., Sabel M.S., Schilsky R.L., Schuchter L.M., Tung N., Winkfield K.M., Wirth L.J., Dizon D.S. *Clinical Cancer Advances 2017: Annual Report on Progress Against Cancer from the American Society of Clinical Oncology*. *J Clin Oncol*. 2017; 35 (12): 1341–1367
DOI: 10.1200/JCO.2012.47.1938
6. Cao W., Lee S.H., Lu J. CD83 is preformed inside monocytes, macrophages and dendritic cells, but it is only stably expressed on activated dendritic cells. *Biochem J*, 2005; 385 (1): 85–93
DOI: 10.1042/BJ20040741
7. Clark E.A. A Short History of the B-Cell-Associated Surface Molecule CD40. *Frontiers in Immunology*, 2014; 5: 472
DOI: 10.3389/fimmu.2014.00472
8. Flohé S., Lang T., Moll H. Synthesis, stability, and subcellular distribution of major histocompatibility complex class II molecules in Langerhans cells infected with *Leishmania major*. *Infect Immun.*, 1997; 65 (8): 3444–3450
DOI: 10.1128/iai.65.8.3444-3450.1997

- 9.** Inaba K., Witmer-Pack M., Inaba M., Hathcock K.S., Sakuta H., Azuma M., Yagita H., Okumura K., Linsley P.S., Ikehara S., Muramatsu S., Hodes R.J., Steinman R.M. The tissue distribution of the B7–2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro. *J. Exp. Med.*, 1994; 180 (5): 1849–1860
DOI: 10.1084/jem.180.5.1849
- 10.** Joffre O.P., Segura E., Savina A., Amigorena S. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat Rev Immunol.*, 2012; 12 (8): 557–569
DOI: 10.1038/nri3254
- 11.** Jonuleit H., Kuhn U., Muller G., Steinbrink K., Paragnik L., Schmitt E., Knop J., Enk A.H. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur. J. Immunol.*, 1997; 27: 3135–3142
DOI: 10.1002/eji.1830271209
- 12.** June C.H., Sadelain M. Chimeric antigen receptor therapy. *New Engl. J. Med.*, 2018; 379 (1): 64–73
DOI: 10.1056/nejmra1706169
- 13.** Kalinski P., Hilken C.M., Snijders A., Snijdwint F.G., Kapsenberg M.L. IL-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E2, promote type 2 cytokine production in maturing human naive T helper cells. *J Immunol.*, 1997; 159 (1): 28–35
DOI: 10.4049/jimmunol.159.1.28
- 14.** Klein J. Natural History of the Major Histocompatibility Complex. New York, Wiley & Son, 1986. 775 p.
- 15.** Liu P., Zhao L., Kroemer G., Kepp O. Conventional type 1 dendritic cells (cDC1) in cancer immunity. *Biol Direct.* 2023; 18 (1): 71
DOI: 10.1186/s13062-023-00430-5
- 16.** Larsen C.P., Ritchie S.C., Pearson T.C., Linsley P.S., Lowry R.P. Functional expression of the costimulatory molecule, B7/BB1, on murine dendritic cell populations. *J. Exp. Med.*, 1992; 176 (4): 1215–1220
DOI: 10.1084/jem.176.4.1215
- 17.** Mailliard R.B., Wankowicz-Kalinska A., Cai Q., Wesa A., Hilken C.M., Kapsenberg M.L., Kirkwood J.M., Storkus W.J., Kalinski P. α -Type-1 Polarized Dendritic Cells: A Novel Immunization Tool with Optimized CTL-inducing Activity. *Cancer Res.*, 2004; 64 (17): 5934–5937
DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1261

- 18.** Moon C.Y., Belabed M., Park M.D., Mattiuz R., Puleston D., Merad M. Dendritic cell maturation in cancer. *Nat Rev Cancer.*, 2025; 25 (4): 225–248
DOI: 10.1038/s41568-024-00787-3
- 19.** Mukherji B., Chakraborty N.G., Yamasaki S., Okina T., Yamase H., Sporn J.R., Kurtzman M.T., Ergin M.T., Ozols J., Meehan J., Mauri F. Induction of antigen-specific cytolytic T cells in situ in human melanoma by immunization with synthetic peptide-pulsed autologous antigen pre-presenting cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995; 92 (17): 8078–8082
DOI: 10.1073/pnas.92.17.8078
- 20.** Peng M., Mo Y., Wang Y., Wu P., Zhang Y., Xiong F., Guo C., Wu X., Li Y., Li X., Li G., Xiong W., Zeng Z. Neoantigen vaccine: an emerging tumor immunotherapy. *Mol Cancer.*, 2019; 18 (1): 128
DOI: 10.1186/s12943-019-1055-6
- 21.** Perez C.R., De Palma M. Engineering dendritic cell vaccines to improve cancer immunotherapy. *Nat Commun.*, 2019; 10 (1): 5408
DOI: 10.1038/s41467-019-13368-y
- 22.** Ridgway D. The first 1000 dendritic cell vaccinees. *Cancer Invest.*, 2003; 2 (6): 873–886
DOI: 10.1081/cnv-120025091
- 23.** Rock K.L., Reits E., Neefjes J. Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules. *Trends Immunol.*, 2016; 37 (11): 724–737
DOI: 10.1016/j.it.2016.08.010
- 24.** Sallusto F., Lanzavecchia A. 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 α . *J Exp Med.*, 1994; 179 (4): 1109–1118
DOI: 10.1084/jem.179.4.1109
- 25.** Sánchez-Paulete A.R., Teijeira A., Cueto F.J., Garasa S., Pérez-Gracia J.L., Sánchez-Arráez A., Sancho D., Melero I. Antigen cross-presentation and T-cell cross-priming in cancer immunology and immunotherapy. *Ann Oncol.*, 2017; 28 (12): xii44–xii55
DOI: 10.1093/annonc/mdx237
- 26.** Sander J., Schmidt S.V., Cirovic B., McGovern N., Papantonopoulou O., et al. Cellular differentiation of human monocytes is regulated by time-dependent interleukin-4 signaling and the transcriptional regulator NCOR2. *Immunity*, 2017; 47 (6): 1051–1066
DOI: 10.1016/j.immuni.2017.11.024

- 27.** Sansom D.M. CD28, CTLA-4 and their ligands: who does what and to whom? *Immunology*, 2000; 101 (2): 169–177
DOI: 10.1046/j.1365-2567.2000.00121.x.
- 28.** Scandella E., Men Y., Gillessen S., Förster R., Groettrup M. Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*, 2002; 100 (4): 1354–1361
DOI: 10.1182/blood-2001-11-0017
- 29.** Sisirak V. (ed.) *Dendritic Cells: Methods and Protocols*. New York, Humana Press, 2023. 384 p.
- 30.** Sommer S. The importance of immune gene variability (MHC) in evolutionary ecology and conservation. *Front Zool.*, 2005; 2 (1): 16
DOI: 10.1186/1742-9994-2-16
- 31.** Spörri R., Reis e Sousa C. Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4+ T cell populations lacking helper function. *Nat Immunol.*, 2005; 6 (2): 163–170
DOI: 10.1038/ni1162
- 32.** Tang-Huau T.L., Segura E. Human in vivo-differentiated monocyte-derived dendritic cells. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2018; 86: 44–49
DOI: 10.1016/j.semcdb.2018.02.018
- 33.** Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*, 2003; 3 (2): 133–146
DOI: 10.1038/nri1001
- 34.** Winzler C., Rovere P., Rescigno M., Granucci F., Penna G. et al. Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J. Exp. Med.*, 1997; 185 (2): 317–328
DOI: 10.1084/jem.185.2.317
- 35.** Yin X., Chen S., Eisenbarth S. C. Dendritic Cell Regulation of T Helper Cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 2021; 39 (1): 759–790
DOI: 10.1146/annurev-immunol-101819-025146
- 36.** Zhang Y., Zhang Z. The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications. *Cell Mol Immunol.*, 2020; 17 (8): 807–821
DOI: 10.1038/s41423-020-0488-6
- 37.** Zhou L.J., Tedder T.F. Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol.*, 1995; 154 (8): 3821–3835
DOI: 10.4049/jimmunol.154.8.3821

38. Zobywalski A., Javorovic M., Frankenberger B., Pohla H., Kremmer E., Bigalke I., Schendel D.J. Generation of clinical grade dendritic cells with capacity to produce biologically active IL-12p70. *J. Transl. Med.*, 2007; 5 (18): 18–34
DOI: 10.1186/1479-5876-5-18