

СУЧАСНІ МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ІМУННИХ ДЕНДРИТНИХ КЛІТИН ІЗ ПРОТИПУХЛИННИМ ПОТЕНЦІАЛОМ

А.М. Гольцев^{1,2}, М.О. Бондарович^{1*}, Ю.О. Гаєвська¹, Т.Г. Дубрава¹, Н.М. Бабенко¹, М.В. Останков¹

¹Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, Україна

²Міжвідомчий науковий центр кріобіології і кріомедицини НАН, АМН та МОЗ України, Харків, Україна

*Corresponding authors: nikolay.bondarovich@gmail.com

Received 29 November 2023; Accepted 8 February 2024

Дендритні клітини (ДК) ініціюють і формують як вроджені, так і адаптивні імунні відповіді. Вони спеціалізуються на представленні антигена найвним Т-клітинам, тим самим керують імунними відповідями Т-клітин і відіграють важливу роль у підтримці протипухлинного імунітету. В організмі людини і тварин ці клітини містяться в невеликій кількості, з чим пов'язані деякі труднощі при їх отриманні. Саме тому актуальним є питання отримання ДК із протипухлинними властивостями в умовах *in vitro* з клітин-попередників для подальшого використання в клінічній практиці або експерименті. Робота присвячена узагальненню досліджень щодо отримання імунних ДК із клітин-попередників для застосування в протипухлинній терапії. Аналіз літературних джерел показав, що як клітини-попередники імунних ДК можуть виступати моноцити периферичної крові, мононуклеари кісткового мозку, кордової крові. Протоколи, які використовуються для отримання незрілих ДК із клітин-попередників, передбачають додавання в культуру різних комбінацій цитокінів, включаючи гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулювальний фактор, інтерлейкін-4 тощо. Широке розмаїття цитокінів і умов, здатних впливати на диференціацію та функціональну активність ДК, обумовлює надзвичайну їх гетерогенність за фенотиповими і функціональними характеристиками. Як джерела пухлинного антигена для виробництва вакцини на основі ДК використовують пухлинні лізати, окремі пухлинні білки, пептиди, пухлинні клітини в стані імуногенного апоптозу. В статті розглянуті як окремі етапи отримання імунних ДК, індукція формування з клітин-попередників незрілих ДК, подальше їх дозрівання, кріоконсервування цих клітин. Глибоке розуміння параметрів отримання імунних ДК має вирішальне значення для створення вакцин на основі ДК із максимальним про- явом ними протипухлинних властивостей.

Ключові слова: дендритні клітини; антигени; протипухлинні властивості; цитокіни; кріоконсервування.

Вступ

Онкологічні захворювання на сьогодні є однією з найбільш актуальних і невирішених медичних проблем людства. Злоякісні пухлини виникають у жителів усіх континентів і країн, багатих і бідних, чоловіків і жінок. На жаль, перспективи їх лікування поки що невтішні. Якщо темпи захворюваності зростатимуть і надалі, то до 2030 р. кількість осіб, що вперше захворіли на рак, сягне 27 млн, а помруть від раку 17 млн пересічних громадян, носіями цієї патології стануть 75 млн жителів планети [1].

З огляду на це пошук нових можливостей лікування хворих на злоякісні пухлини є актуальним завданням сучасної онкології. Високий рівень смертності, недостатня ефективність сучасних протипухлинних препаратів викликають необхідність удосконалення методів лікування онкологічних захворювань. Прорив у розумінні молекулярно-генетичних та імунобіологічних ме-

ханізмів розвитку злоякісних пухлин є бустером подальшого розвитку фундаментальних і клінічних досліджень в онкології. Суттєва роль у цьому відводиться дендритним клітинам (ДК). Дійсно, ДК стають об'єктом широкого кола досліджень, метою яких є створення вакцин, здатних підсилювати імунну відповідь організму онкохворих на пухлинні антигени.

Дендритні клітини є клітинами з надшироким профілем функціональної здатності, але насамперед вони розглядаються як професійні антигенпрезентуючі клітини, головною функцією яких є захоплення антигена, його процесинг і представлення Т-лімфоцитам для ініціації імунної відповіді [2]. Здатність ДК активувати CD4⁺ Т-хелперні та CD8⁺ цитотоксичні Т-лімфоцити (ЦТЛ), визначаючи таким чином характер і спрямованість імунних реакцій, привертає все більшу увагу при створенні протипухлинних вакцин, здатних специфічно діяти на певні типи пухлин [3].

Застосування вакцин проти раку є методом активного “навчання” імунної системи онкохворих генерувати ефекторні імункомпетентні клітини, що здатні знищувати пухлинні клітини. Персоніфікована вакцина проти раку має бути націлена на численні специфічні для пацієнта пухлинні антигени та мати мінімальні побічні ефекти, не викликаючи пошкодження здорових тканин. При цьому вона повинна забезпечувати збереження імунної пам’яті на ці антигени якомога довше [4]

Першим, схваленим у 2010 р. управлінням з нагляду за якістю харчових продуктів і лікарських засобів США (FDA – Food and Drug Administration) імунотерапевтичним препаратом на основі аутологічних імунних ДК став Sipuleuce T (Provenge®). Як імуностимулювальний пухлинний антиген у цій вакцині була використана простатична кисла фосфатаза (ПКФ), яку з’єднують із гранулоцитарно-макрофагальним колоніестимулювальним фактором (ГМ-КСФ) для отримання гібридного білка. Таким комплексним білком ПКФ-ГМ-КСФ навантажують аутологічні незрілі ДК, що отримані з мононуклеарів периферичної крові. Цей препарат продемонстрував відсутність токсичних ефектів поряд із проявом протипухлинного та імунотерапевтичного ефектів і може розглядатися як терапевтичний підхід до лікування раку простати [5]. Препарат Sipuleuce T наразі тестується в клінічних випробуваннях у поєднанні з іншими протипухлинними методами лікування (NCT01804465, NCT02463799, NCT01881867).

На сьогодні на сайті [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov) зареєстровано понад 500 клінічних випробувань вакцин на основі імунних ДК проти різних видів

раку (станом на 10 березня 2024 р.). Однак, як свідчать численні клінічні випробування, вакцини на основі ДК поки що мають низьку ефективність при лікуванні солідних пухлин і гематологічних онкозахворювань [6]. Проте ці вакцини можуть стати інструментом, спрямованим на індукцію розвитку специфічної протипухлинної Т-клітинної відповіді в поєднанні з іншими методами протипухлинної терапії [7, 8]. Багато в чому успіх лікування онкозахворювань із використанням ДК залежить як від біологічних характеристик пухлини, так і від вихідного імунного статусу пацієнта [9]. І все ж, за всіх перелічених умов, важливу значимість для успішної імунотерапії онкозахворювань має спосіб отримання вакцини. Велика кількість робіт при цьому присвячена отриманню саме зрілих імунних ДК. Однак результати цих робіт недостатньо узагальнені та проаналізовані.

Отже, метою цієї статті є узагальнення і систематизація результатів досліджень, присвячених розробці різних протоколів отримання імунних ДК для подальшого використання в онкологічній практиці.

Отримання клітин-попередників, із яких формуються дендритні клітини

Як джерела попередників ДК при приготуванні протипухлинних вакцин зазвичай використовують клітини кісткового мозку (КМ) (переважно у дослідженнях із використанням мишачих штамів експериментальних моделей пухлинного росту) і моноцити периферичної та кордової крові (у клінічних дослідженнях) [10–12] (рисунок).

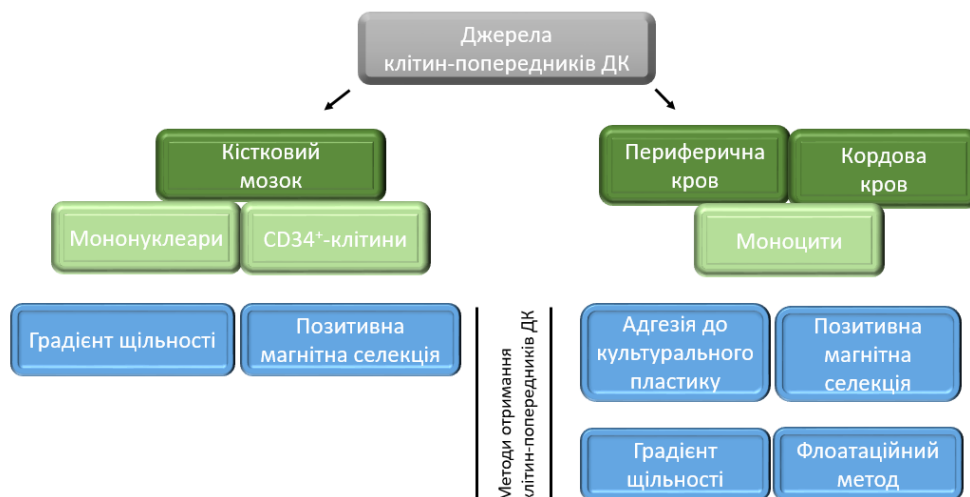


Рисунок: Отримання клітин-попередників імунних дендритних клітин (ДК) для приготування протипухлинних вакцин

Для отримання моноцитів із периферичної крові використовують кілька підходів: виділення клітин, що мають підвищену адгезію до поверхні культурального пластику завдяки експресії на їхній поверхні бета-інтегринів (CD18, CD11c) [13, 14], позитивну магнітну селекцію клітин, що експресують рецептор CD14 [11, 15], центрифугування в градієнті щільності [16, 17] та флотаційні методи [18, 19].

Моноцити є єдиними циркулюючими клітинами крові, які на високому рівні експресують CD14-молекули на клітинній мембрані [20]. Кон'юговані з магнітною частинкою антитіла до цієї молекули використовують для виділення моноцитів методом позитивної імуномагнітної селекції [21]. Однак цей метод може негативно впливати на ступінь експресії поверхневих маркерів і функцію клітин, що підтверджено J. Bhattacharjee зі співавт. [22]. Автори показали, що виділення CD14⁺-клітин за методом позитивної сепарації призводить до зміни їхньої функції та проліферативної активності порівняно з моноцитами, виділеними за методом негативної імуномагнітної сепарації. Для виділення моноцитів із крові використовують також градієнти щільності, що готують на основі перколу (Sigma-Aldrich Inc), фіколу (Pharmacia), верографіну (Spofa) [23]. Що стосується виділення моноцитів шляхом адгезії до пластику, то цей підхід хоча і широко використовується для збагачення цих клітин, але не є специфічним і підходить лише для проведення лабораторних аналізів, де чистота фракції моноцитів не є основною метою [24]. Показано, що зі 100 мл крові методом адгезії на пластику можна виділити приблизно 9 млн клітин, з яких моноцитами є 80 % [25]. Метод флотації дає змогу отримати більшою мірою збагачену моноцитами суспензію, ніж стандартна адгезія, однак "відкритість" системи різко підвищує ризик контамінації матеріалу [19].

Узагальнені дані А.М. Dohnal і співавт. [26] свідчать, що спосіб виділення більшою мірою визначає кількість одержаних клітин і питомий вміст моноцитів. У той же час статистично значущих відмінностей у фенотипі та функціональній активності ДК, отриманих із моноцитів, що виділені різними способами, виявлено не було. Однак у більш пізніх дослідженнях N. Delirezh і співавт. [27] було показано, що виділення моноцитів методами адгезії до пластику або позитивної магнітної сепарації обумовлює отримання ДК із різною фагоцитарною активністю.

Як клітини-попередники ДК також використовують CD34⁺ гемопоетичні стовбурові клітини (ГСК), які отримують із КМ, периферичної або кордової крові [28–30]. Слід зазначити, що ДК, отримані з CD34⁺-ГСК, стимулюють ЦТЛ більшою мірою, ніж ДК, генеровані з моноцитів периферичної крові [30]. У клінічній практиці ГСК використовуються для отримання імунних ДК доволі рідко, що обумовлено низькою концентрацією CD34⁺-ГСК (не більше 0,1 % від мононуклеарів периферичної крові) та занадто довгим періодом отримання з них ДК [31].

Іншим джерелом отримання ДК може бути периферична кров людини [32]. Пацієнтам напередодні цієї процедури вводять гемопоетичні фактори росту, наприклад FMS-подібний тирозин ліганд кінази 3 (Flt3L – FMS-like tyrosine kinase-3 ligand) або гранулоцитарний колонієстимулювальний фактор (Г-КСФ) [32]. В умовах експерименту [33] незрілі ДК формуються в селезінці тварин після введення мишам клітин меланоми B16, які експресують Flt3L. Фактор росту Flt3L діє на мультипотентні клітини-попередники, що експресують Flt3-рецептор, і клітини-попередники лімфоїдного ряду. Основним ефектом осі Flt3/Flt3L, виявленим при характеристиці мишей із дефіцитом цих генів, є генерація незрілих ДК [34]. P. Santa та співавт. [33] здійснювали виділення таких ДК із суспензії селезінки методом магнітної сепарації. Після відповідної обробки коктейлями дозрівання та пухлинними антигенами з них можна отримати зрілі імунні ДК із протипухлинною активністю. В роботі [35] накопичення в селезінці мишей субпопуляції незрілих ДК здійснювали через трикратні щоденні ін'єкції ГМ-КСФ. Отримані таким чином ДК відрізнялися від класичних незрілих ДК (міелоїдних) більш високим рівнем експресії CD115 (рецептор до макрофагального колонієстимулювального фактора (М-КСФ)) і CD301b (макрофагальний галактоза N-ацетил-галактозамін специфічний лектин 1). До того ж такі ДК мали більш виражену здатність презентувати антигени й стимулювати проліферацію CD4⁺-Т-клітин. За даними [36], ДК що експресують CD301b⁺-структури, здатні продукувати інтерлейкін (ІЛ)-6, необхідний для диференціації наївних Т-клітин у Т-хелпери 17-го типу, які проявляють протипухлинну активність. У той же час автори [37] відзначають, що субпопуляція ДК із такими ознаками здатна викликати поляризацію наївних Т-клітин у субпопуляцію Т-хелперних лім-

фоцитів 2-го типу, які мають неоднозначну дію відносно клітин протипухлинного захисту. Тобто можна зробити припущення, що після відповідної стимуляції прозапальними цитокінами і навантаження пухлинними антигенами така субпопуляція ДК буде здатна виявляти протипухлинну активність.

Основна перевага використання незрілих ДК, отриманих із організму донора, для одержання протипухлинних вакцин порівняно з клітинами-попередниками ДК полягає в тому, що короткочасна їх експозиція *ex vivo* (<24 год) необхідна для активації та навантаження пухлинними антигенами [38]. Однак кількість отриманих у такий спосіб імунних ДК значно нижча, ніж при отриманні з клітин-попередників [39].

Підбиваючи підсумок, можна сказати, що ці дослідження є основою для збільшення масштабів генерації повноцінних імунних ДК. У той же час необхідні подальша оптимізація цих протоколів, а також додаткова фенотипова та функціональна характеристика клітин-попередників для більш глибоко розуміння їхніх потенціальних можливостей у формуванні імунних ДК.

Значення складу середовища для отримання незрілих дендритних клітин і їх дозрівання *in vitro*

Структурно-функціональні характеристики сформованих *in vitro* незрілих ДК із клітин-попередників залежать як від методів культивування, так і від комбінації сполук-стимулів, що додаються до середовища культивування.

У 90-х роках минулого сторіччя вперше було повідомлено про можливість отримання мієлоїдних ДК із моноцитів периферичної крові культивуванням їх із ГМ-КСФ та ІЛ-4 [40]. Цей метод у подальшому іменувався як класичний метод культивування і до теперішнього часу широко використовується при проведенні клінічних випробувань ДК [31]. Для отримання незрілих ДК із моноцитів периферичної крові в культурі використовують ГМ-КСФ у концентрації 50 нг/мл та ІЛ-4 у концентрації 30 нг/мл [40]. ГМ-КСФ підтримує проліферацію та життєздатність мієлоїдних клітин-попередників, стимулює їх диференціювання в гранулоцити та макрофаги. ІЛ-4 блокує розвиток макрофагів через активацію сигнального шляху Янус тирозинкіназа/сигнальні трансдуктори й активатори транскрипції (JAK3/STAT6 – Janus kinase 3/Signal Transducer and Activator of Transcription 6) [41].

У поєднанні ГМ-КСФ та ІЛ-4 активують у моноцитах формування фактор некрозу пухлини-альфа конвертуючого ферменту (TACE – tumor necrosis factor-alpha converting enzyme), викликаючи шедінг ектодомену рецептора до М-КСФ, що унеможливорює формування макрофагів із моноцитів [42]. T.Q. Chometon і співавт. [23] довели значимість концентрації компонентів, що використовуються при культивуванні моноцитів, для отримання ДК. Так, показано, що ГМ-КСФ і ІЛ-4 у концентрації 30 і 15 нг/мл відповідно були більш ефективними для формування ДК, ніж при додаванні цих цитокінів у культуру клітин у концентрації 20 і 10 нг/мл відповідно. В деяких дослідженнях, незважаючи на використання вказаних цитокінів у низькій концентрації при отриманні незрілих ДК із мононуклеарів КМ, були отримані непогані результати. Так, диференціація мононуклеарів КМ мишей у незрілі ДК за наявності ГМ-КСФ (20 нг/мл) та ІЛ-4 (5 нг/мл) супроводжується майже повною втратою CD14-антигена, зниженням рівня експресії костимуляторних молекул CD80, CD86 і зростанням специфічного для цих клітин маркера – CD11b молекули [43]. S. Wang і співавт. показали [44], що культивування мононуклеарів КМ шурів із ГМ-КСФ (5 нг/мл) та ІЛ-4 (5 нг/мл) призводило до появи незрілих ДК із фенотипом МНСII⁺, CD80/CD86⁺. Указані зміни в клітинах по суті є наслідками їх перебудови на генетичному рівні. В клітинах, отриманих після культивування моноцитів периферичної крові з ГМ-КСФ та ІЛ-4, спостерігаються суттєві зміни в експресії мікроРНК, що відповідають за функціональну активність ДК [45].

Для диференціювання моноцитів у незрілі ДК поряд із ГМ-КСФ/ІЛ-4 можуть бути використані також прозапальні цитокіни, а саме інтерферон-бета (ІФН-бета), фактор некрозу пухлини-альфа (ФНП-альфа), М-КСФ, ІЛ-6 або ІЛ-15 [31]. ДК, отримані з використанням цих медіаторів, відрізняються як за фенотипом, так і за функціональним потенціалом від ДК, отриманих за класичним методом. Так, додавання дуже низької концентрації ІЛ-6 (1,4 нг/мл) та М-КСФ (3 нг/мл) до культурального середовища з моноцитами продемонструвало синергічний ефект із ГМ-КСФ та ІЛ-4 для генерації більшої кількості та більш повнофункціональних ДК порівняно з додаванням лише ГМ-КСФ та ІЛ-4 у безсировоткових умовах [12]. Культивування *in vitro* CD14⁺ моноцитів у середовищі, що містить ГМ-КСФ, ІЛ-4, а також ІФН-бета протя-

гом 48 год приводило до формування незрілих ДК, які при подальшому додаванні факторів дозрівання (ІЛ-1бета (10 нг/мл) та поліінозин:поліцитидилової кислоти (polyinosinic-polycytidylic acid – Poly(I:C)) (20 мкг/мл)) формували зрілі ДК із високою здатністю до перехресної презентації (G4B-DC) [31]. Водночас ці ДК експресували високі рівні CD11c, CD86 і HLA-DR і мали збільшену продукцію запального ФНП-альфа. Порівняно зі зрілими ДК, що отримані класичним методом (додавання в культуру ГМ-КСФ та ІЛ-4 із подальшим введенням у культуру факторів дозрівання), G4B-DC продемонстрували більш високу здатність стимулювати проліферацію наївних CD4⁺ і CD8⁺ Т-клітин і вироблення ІФН-гамма.

Заміна ІЛ-4 на ІФН-альфа (у складі коктейлю ІЛ-4/ГМ-КСФ) призводить до швидкого збільшення експресії молекул МНС класу II, ко-стимуляторних молекул CD80 і CD86, а також маркерів дозрівання CD40 і CD83 [46]. Незважаючи на високий рівень експресії молекул CD80, CD86 і CD83, стимульовані ГМ-КСФ/ІФН-альфа клітини (ІФН-альфа-ДК) зберігають здатність до ендоцитозу і фагоцитозу [46]. Більше того, ІФН-альфа-ДК мають здатність продукувати високі рівні ІЛ-12, тоді як ІЛ-4-ДК продукують цей цитокін у концентрації, близькій до мінімальної межі виявлення [47]. Імунні ДК, отримані з моноцитів за наявності ГМ-КСФ/ІФН-альфа та подальшого додавання у культуральне середовище факторів дозрівання, активують Т-клітинну відповідь ефективніше, ніж ДК, отримані за допомогою ГМ-КСФ/ІЛ-4 і факторів дозрівання [48]. Слід зазначити, що зрілі ДК, отримані з моноцитів, що культивувалися з додаванням ГМ-КСФ/ІФН-альфа та подальшим введенням у культуру факторів дозрівання, індукують поляризацію Т-клітин тільки Т-хелперів 1-го типу [49]. У той же час є припущення, що в умовах *in vivo* міграція введених ДК є важливою для доставки антигена до лімфатичного вузла. Введені ДК лише частково сприяють праймінгу Т-хелперів 0-го типу і не можуть зумовлювати формування Т-хелперів 1-го типу. При цьому резидентні ДК ХСР1⁺ у лімфатичних вузлах сприймають інформацію від введених ДК і запускають поляризацію Т-лімфоцитів у бік Т-хелперів 1-го типу, вивільняючи ІЛ-12 [50].

ФНП-альфа подібно до ІЛ-4 здатен блокувати диференціювання моноцитів у макрофаги [51]. При культивуванні CD14⁺-моноцитів за наявності ГМ-КСФ (10 нг/мл) і ФНП-альфа

(10 нг/мл) протягом 6-ти днів отримують незрілі ДК із фенотипом CD14⁺CD1^{lo}, які мають здатність до помірної стимуляції Т-клітин [52]. При подальшому культивуванні цих клітин за наявності ліпополісахариду (ЛПС) формуються імунні CD83⁺CD70⁺HLA-DR^{high}CD14^{low}-ДК. Показано, що ці клітини експресують високі рівні мРНК для ІЛ-6, ІЛ-15 та ІЛ-23 і здатні стимулювати імунну відповідь Т-хелперів 1-го типу та Т-хелперів 17-го типу.

При культивуванні гемопоетичних клітин (CD34⁺) КМ із ГМ-КСФ і ФНП-альфа їх кількість збільшується в 10–30 разів, при цьому вони утворюють класичні ДК, що підтверджено за оцінки їхніх імунофенотипових і функціональних властивостей [53]. Фактор стовбурових клітин (c-kit) і ліганд flt3 також можуть збільшити вихід незрілих ДК у 5 разів при культивуванні CD34⁺-клітин за наявності ГМ-КСФ і ФНП-альфа [54]. Використання ІЛ-4, разом із ФНП-альфа під час культивування незрілих ДК *in vitro* навпаки призводить до порушення ефекту дозрівання реалізованого ФНП-альфа [55]. Як припускають автори дослідження, це може бути пов'язано з впливом ІЛ-4 на синтез простагландіна E2 (ПГЕ2), який опосередковується пригніченням ферментів, таких як фосфоліпаза A2 або циклооксигеназа-2.

Культивування CD34⁺-клітин КМ протягом 17-ти діб у середовищі з додаванням FLT3L (50 нг/мл) та ГМ-КСФ (2 нг/мл) призводило до диференціювання цих клітин у мієлоїдні ДК 1-го типу з фенотипом CD103⁺ [56]. Введення цих ДК тваринам з онкопатологією викликало системну та тривалу пухлиноспецифічну Т-клітинну цитотоксичність, завдяки чому інгібувався первинний і метастатичний ріст пухлини [57].

Т.Н. Chu та співавт. [58] для отримання незрілих ДК культивували моноцити периферичної крові за наявності ГМ-КСФ, ІЛ-4 та ІЛ-15 протягом 6-ти днів. Після подальшого культивування цих клітин упродовж 2-х діб із ЛПС для їх дозрівання отримані зрілі ДК мали більш високу експресію МНС I та МНС II, CD40, CD86 і CCR7 порівняно з класичними зрілими ДК. Отримані за цим методом ДК також більшою мірою зумовлюють поляризацію наївних Т-клітин у Т-хелпери 1-го типу і збільшення кількості активованих Т-клітин, цитокін-індукованих кілерних клітин і природних кілерів для індукції сильної цитотоксичності проти клітин мієломи. Культивування моноцитів у середовищі, що містить ГМ-КСФ та ІЛ-15,

призводить до диференціювання моноцитів у незрілі ДК із фенотипом $CD1a^+HLA-DR^+CD14^-$ (IL15-ДК), який відповідає фенотипу клітин Лангенгарса [59]. На відміну від диференціювання мононуклеарів КМ за наявності ІЛ-4, диференціювання за наявності ІЛ-15 й подальшого дозрівання під дією ЛПС приводить до формування ДК, які здатні індукувати протипухлинну активність і проліферацію Т-клітин [60]. Ймовірно, причиною цього є продукція цими клітинами ІЛ-15, який здатний стимулювати проліферацію Т-клітин *in vitro* [61].

А. Моокерґее і співавт. [62] провели порівняння властивостей імунних ДК, отриманих із попередників КМ, культивованих за наявності ГМ-КСФ/ІЛ-4 (ІЛ-4-ДК) та ГМ-КСФ/ІЛ-15 (ІЛ-15ДК) і подальшого дозрівання за допомогою стандартного коктейлю дозрівання (ІФН-гамма, ЛПС). Автори порівнювали фенотип різних популяцій імунних ДК, рівні продукції цитокінів і здатність стимулювати Т-клітини. У ІЛ-15-ДК спостерігалася експресія коstimуляторних молекул CD86, тоді як у ІЛ-4-ДК вона була на низькому рівні. Вакцина на основі ІЛ-15ДК була більш потужною щодо інгібіції росту пухлини, підвищувала виживаність тварин та індукувала більш виражений Т-хелпер 1-го типу – зміщену Т-клітинну відповідь у моделі раку яєчників мишей.

Н. Sanarico та співавт. [63] описали іншу методологію індукції диференціації моноцитів у незрілі ДК в умовах *in vitro* з використанням ГМ-КСФ, ІЛ-4 та ІЛ-2. Ці ДК мали подібну морфологію та фенотип, що й незрілі ДК, які утворюються за наявності ГМ-КСФ та ІЛ-4. Однак спостерігалися деякі відмінності щодо незрілих ДК, сформованих за наявності лише ГМ-КСФ та ІЛ-4. Наприклад, значно більша секреція ІЛ-1бета, ФНП-альфа та ІЛ-12p70 у відповідь на стимуляцію ЛПС. Після стимуляції ЛПС на цих клітинах також спостерігалася підвищення експресії маркерів активації, таких як лейкоцитарний антиген людини (HLA)-ABC, HLA-DR, CD80, CD86 і CD83, але не CD25 (субодиниця рецептора ІЛ-2). Відсутність експресії CD25 молекул, експресія яких поряд із коstimуляторними молекулами притаманна зрілим ДК, свідчить про напівзрілий фенотип отриманих таким чином клітин.

С.Л. Yao та співавт. [12] звернули увагу, що при культивуванні моноцитів із ІЛ-6 і М-КСФ, доданих у дуже низьких концентраціях, ці цитокіни проявляють синергічний ефект із ГМ-КСФ та ІЛ-4 у підвищеній здатності формувати

після дозрівання повнофункціональні імунні ДК із фенотипом $CD40^+CD209^+$. Така багатогранність функцій цих клітин значною мірою обумовлена наявністю мембранного CD209 класстера, що являє собою трансмембранний рецептор, який бере участь у реалізації вродженою імунною системою функції розпізнавання різних патогенів – від паразитів до вірусів [64]. Своєю чергою, CD40 є поверхневим трансмембранним рецептором, який входить у надродину рецепторів фактора некрозу пухлин, через який активується ядерний фактор каппа-бі (NF- κ B – Nuclear factor kappa B) [65].

При фармакологічному інгібуванні гамма-рецептора, що активується проліфератором пероксисом (PPARgamma – Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma), та мішені рапаміцину в ссавців (mTOR – mechanistic Target of Rapamycin) за наявності ГМ-КСФ і за відсутності ІЛ-4 відбувається диференціювання моноцитів у імунні ДК із високою фенотиповою стабільністю та підвищеними імунними властивостями [16].

Таким чином, на основі наведеного вище можна зробити висновок, що, крім стандартного методу отримання незрілих ДК, який полягає в застосуванні ІЛ-4 і ГМ-КСФ, існують також і різноманітні його модифікації. Хоча транскрипційний профіль ДК, створених цими різними методами, демонструє фундаментальні функціональні відмінності між ними, усі ці ДК після дозрівання були здатні стимулювали антигенспецифічні відповіді Т-клітин як у доклінічних, так і в клінічних дослідженнях. Однак прямого порівняння ДК, отриманих різними методами в контрольованих клінічних дослідженнях, не було. Як впливає з аналізу різних протоколів отримання незрілих ДК, варіювання умов культивування клітин-попередників ДК є інструментом для отримання клітин із заданими властивостями.

Способи стимуляції функціонального дозрівання дендритних клітин

Незріла ДК має здатність формувати як толерогенні, так й імунні ДК залежно від умов їх подальшого культивування, але в контексті нашого огляду ми зосередимо увагу на отриманні імунних ДК. Для індукції диференціювання незрілих ДК в імунні використовують різні коктейлі біологічно активних сполук [66]. Виділяють три типи індукторів дозрівання незрілих ДК: 1) цитокінові коктейлі; 2) коктейлі,

що містять ліганди до тол-подібних рецепторів (TLR – toll like receptors), наприклад Poly(I:C)), ЛПС, резиквімод (R848 – Resiquimod) і 3) коктейлі, що містять ліганди рецептора CD40 (CD40L) [67]. Передача сигналу через рецептор CD40 індукує низку змін структурно-функціональних властивостей і біохімічних процесів на рівні мембран ДК (посилення експресії на їх поверхні МНС класу II і костимуляторних молекул CD80/CD86), яким ці клітини завдячують високою антигенпрезентуючою здатністю [65].

Оскільки прозапальні молекули є природними стимуляторами дозрівання ДК, цитокинові коктейлі, які містять ФНП-альфа, ІЛ-1бета, ІЛ-6 і ПГЕ2, є компонентами ростових середовищ імунних ДК [68]. Час експозиції незрілих ДК із цими цитокінами визначає ступінь їх дозрівання. Так, у незрілих ДК, які дозрівали протягом 48 год, рівні експресії CD80, CD83, CD86 були відносно вищими, ніж у незрілих ДК, які дозрівали протягом 24 год [69]. Водночас у деяких роботах було показано, що для диференціації ДК достатньо наявності лише ФНП-альфа та ПГЕ2 [70, 71]. Чи є це найкращий коктейль для стимулювання дозрівання, залишається суперечливим, оскільки відомо, що ПГЕ2 може проявляти імуносупресивні властивості відносно функціонального стану ДК [38]. Імуносупресивний вплив ПГЕ2 на ДК здійснюється шляхом передачі сигналів через два рецептори E-Prostanoid (EP): EP2 і EP4. Як було продемонстровано J. Bodder і співавт. [72], блокування шляхів сигналювання, опосередкованих через рецептори до ПГЕ2 за допомогою антагоністів до цих рецепторів, запобігало виникненню ПГЕ2-індукованої імуносупресорної активності ДК. W. Zhang і співавт. [9] показали, що для дозрівання ДК достатньо додавання в культуру лише ФНП-альфа. Отримані клітини були здатні підвищувати рівень сироваткового ІФН-гамма й обумовлювати у деяких пацієнтів регресію метастатичного вузла.

Для дозрівання незрілих ДК також у культуру додають ІЛ-1бета. Цей цитокін здатен виступати індуктором продукції ДК мікроРНК (miR)-155, яка має важливе значення для їх активації [73]. J. Hodge та співавт. [74] показали, що введення імунних ДК із надлишковою експресією miR-155 тваринам із раком молочної залози приводило до посилення протипухлинного імунітету за рахунок збільшення продукції ефекторних Т-клітин у лімфогемопоетичних

органах, що обумовлювало пригнічення росту пухлини та різке зменшення кількості й розмірів метастатичних вогнищ у легенях.

Також слід відзначити здатність ІЛ-23 індукувати дозрівання незрілих ДК [75]. Підвищений рівень ІЛ-23 поряд із іншими прозапальними цитокінами, які використовуються для дозрівання ДК, також спостерігається при багатьох захворюваннях, а саме псоріазі, псоріатичному артриті, анкілозивному спондиліті, ревматоїдному артриті, синдромі Шегрена, розсіяному склерозі [76, 77]. З урахуванням цього факту цілком логічно здається можливість використання сироватки експериментальних тварин з індукованими запальними захворюваннями для дозрівання ДК в умовах *in vitro*. Так, у роботі [78] було показано, що синовіальна рідина пацієнтів із ревматоїдним артритом або псоріатичним артритом, але не остеоартритом, індукує диференціювання моноцитів у імунні ДК.

Другий тип індукторів дозрівання – ліганди TLR: Poly(I:C) (ліганд TLR3), ЛПС (ліганд TLR4), пептидоглікан, монофосфорил ліпід А (MPLA – monophosphoryl lipid A), R848 (ліганд TLR8). Додавання в культуру незрілих ДК лігандів TLR приводить до їх дозрівання й активації продукції інтерлейкінів ІЛ-12, ФНП-альфа та ІЛ1-бета. N. Surendran і співавт. [79] за допомогою агоністів TLR3 створили імунні ДК, які здатні секретувати біоактивний ІЛ-12(p70) та викликати поляризацію Т-хелперів 1-го типу (альфа-ДК). Поряд із цим було повідомлено про ДК моноцитарного походження, які секретували біоактивний ІЛ-12(p70) після стимуляції агоністами TLR3 і TLR7/8 [80]. Poly(I:C) взаємодіє з TLR3, що приводить до активації різних транскрипційних факторів, включаючи регуляторний фактор інтерферону 7 (IRF7 – interferon regulatory factors 7), хемокін ІЛ8L2 (interleukin 8-like 2), субодиницю Jun фактора транскрипції AP-1, p50 – субодиницю ядерного фактора-kB і регуляторний фактор інтерферону 3 (IRF3 – Interferon regulatory factor 3) [81, 82]. Крім того, використання цих сумішей для дозрівання незрілих ДК мало суттєвий вплив на реалізацію протипухлинної відповіді клітин вродженого імунітету, оскільки TLR-зрілі ДК моноцитарного походження здатні посилювати експресію CD69 на природних кілерах CD56^{dim} і CD56^{bright}, індукувати секрецію високих рівнів ІФН-гамма, активувати потужну здатність природних кілерів знищувати пухлинні клітини [83].

У роботі [84] було показано, що Poly(I:C) і R848 ліганди TLR3 і TLR7/8 відповідно являють собою оптимальну комбінацію для індукції експресії на поверхні клітинної мембрани ко-стимуляторних молекул для всіх субпопуляцій ДК, отриманих із крові. Активація вказаних TLR призводить до підвищення секреції ІФН-гамма та ІЛ-12p70 цими клітинами, а також до посилення їх міграції, активації природних кілерів і антиген-специфічних Т-клітин. Підвищення продукції ІЛ-12p70 та інших прозапальних цитокінів спостерігали також при додаванні в культуру незрілих ДК таких сполук, як TL8-506 (агоніст TLR8) у комбінації з ІФН-гамма або Poly(I:C) [29]. При цьому автори спостерігали підвищення в ДК експресії генів, відповідальних за синтез молекул, що беруть участь у протипухлинній відповіді, а саме CD40, ІФН-бета1, ІЛ-12А та ІЛ-12В. Більше того, ці агоністи приводили до посилення експресії ко-стимуляторних молекул CD80, CD83 і CD86 на поверхні міелоїдних ДК 1-го (CD141⁺) і 2-го типу (CD1c⁺) та підвищення здатності цих клітин до активації цитотоксичних Т-лімфоцитів [85].

Збільшення кількості імунних ДК можна досягти шляхом сумісного використання агоністів TLR з ІФН-гамма. Y. Bian і співавт. [86] показали, що комбінація ІФН-гамма з Poly(I:C) або R848 викликала активацію незрілих ДК більшою мірою, ніж ІФН-гамма й агоністи TLR окремо. Наприклад, при використанні ІФН-гамма (10 нг/мл) та Poly(I:C) (100 мкг/мл) автори відзначали експресію CD86-маркера у близько 60 % ДК, тоді як при використанні ІФН-гамма (10 нг/мл) – лише в 33,4 % ДК. Самі агоністи TLR в умовах цього дослідження проявляли слабку здатність до активації незрілих ДК.

При додаванні в культуру незрілих ДК таких лігандів до TLR, як R848, ЛПС, MPLA, Poly(I:C) після попередньої інкубації ДК з ІЛ-10, на їх поверхневій мембрані відбувається повторна експресія молекул CD14. Суттєво, що отримані саме таким чином клітини значно відрізняються за фенотипом і функцією від імунних CD83⁺-ДК і мають імуносупресивні властивості [87].

T. Fevzer і співавт. [11] запропонували ще один протокол отримання зрілих ДК із використанням R848, який є медичним препаратом, що має протівірусну та протипухлинну здатність і діє як специфічний активатор TLR 7/8. У своєму дослідженні автори використовували коктейль, який включав Poly(I:C), R848/ФНП-

альфа/ІЛ-1бета/ІФН-альфа/ІФН-гамма. Отримані за цим протоколом імунні ДК дослідники назвали z-ДК і порівнювали їх за функціональними характеристиками з імунними ДК, що набували характеристик зрілих клітин за допомогою коктейлю дозрівання альфа – типу 1 (альфа-ДК). Цей коктейль включав агоніст TLR-3 (Poly(I:C)), ФНП-альфа, ІЛ-1бета, ІФН-гамма та ІФН-альфа. Як виявилось, z-ДК порівняно з альфа-ДК мали більш високу експресію ко-стимуляторних молекул CD80 і CD86, продукували більш високий рівень ІЛ-12p70, а також мали значно більшу здатність до хомінгу. Вирішальне значення при отриманні z-ДК має кондиціонування незрілих ДК з Poly(I:C) саме перед додаванням інших компонентів цитокінового коктейлю. Це зумовлено тим, що попередня обробка клітин Poly(I:C) функціонально значно підсилює наступну відповідь TLR8.

До третього типу стимулів дозрівання ДК відносяться ліганди рецептора CD40 [88]. Взаємодія CD40 і CD40L зумовлює збільшення продукції імунними ДК прозапального ІЛ-12 [89]. Активація CD40 на поверхні ДК індукує їх функціональне дозрівання та підвищує здатність індукувати проліферацію Т-клітин і секрецію ІФН-гамма [90]. У роботі R.M. Hillebrand і співавт. [91] було показано, що CD40L-трансдуковані ДК (Ad-hCD40L) при спільному культивуванні з пухлиноспецифічними цитокін-індукованими клітинами-кілерами викликали значну стимуляцію останніх зі збільшенням їх проліферативної активності та цитотоксичності.

Крім зазначених вище коктейлів, для дозрівання незрілих ДК використовують також біологічно активні сполуки природного походження. С. Chen і співавт. [17] показали, що додавання в культуральне середовище леонурину пустирника, який є водорозчинним алкалоїдом, суттєво сприяє дозріванню незрілих ДК моноцитарного походження. Механізм дії цієї сполуки пов'язаний із втручанням у метаболізм арахідонової кислоти. Здатність до індукції дозрівання незрілих ДК в умовах *in vitro* мають також такі протипухлинні препарати, як помалідомід, дазатиніб, іматиніб мезилат [92–94]. У деяких роботах вказується на можливість використання для дозрівання незрілих ДК медичного препарату золедронат, який зазвичай використовується для лікування остеопорозу [95].

D. Stakheev і співавт. [96] для отримання ДК із протипухлинними властивостями використовували LL-37, який є антимікробним пептидом із потужним імуномодулювальним по-

тенціалом. Автори показали, що використання LL-37 на різних фазах формування імунних ДК *ex vivo* по-різному впливає на функціональні характеристики останніх. Максимальну протипухлинну дію імунні ДК проявляли при додаванні LL-37 під час процесу навантаження ДК антигеном (“пульсації”) з подальшим дозріванням. На моделі плоскоклітинної карциноми в мишей було показано, що антигенпрезентуючі LL-37-ДК посилювали міграцію праймованих і активованих CD8⁺ Т-клітин у бік пухлинної тканини, що супроводжувалося регресією її росту [97].

Звертається увага на можливий вплив складу культурального середовища на процес диференціювання незрілих ДК. T.Q. Chometon і співавт. показали [23], що клітини, культивовані в RPMI, краще диференціювалися в зрілі ДК порівняно з тими, що були культивовані в DMEM, причому незалежно від джерела сироватки. Що стосується самої сироватки, то її додавання (якщо вона не аутологічна) в культуральне середовище при індукуванні імунних ДК може спричинити небажані ефекти, оскільки сироватка може містити поки що невідомі імуномодуляторні компоненти. У зв'язку з цим деякі дослідники для отримання імунних ДК із моноцитів використовували культуральне середовище без сироватки [98, 99]. Як було продемонстровано J. Calmeiro та співавт. [100], за використання безсироваткового культурального середовища здатність імунних ДК активувати аутологічні природні кілери й антиген-специфічні ЦТЛ суттєво залежать від складу інших компонентів культурального середовища, яке використовується для диференціювання незрілих ДК. Заслуговує на увагу і запропоноване для цих же цілей альтернативне використання замість сироватки 10 % лізату тромбоцитів [101]. При цьому слід враховувати, що порівняно з безсироватковими середовищами лізат тромбоцитів не забезпечує достатньою мірою формування імунних ДК, що здатні індукувати гранзим В і продукцію ІФН-гамма у ЦТЛ [102].

Узагальнюючи інформацію цього розділу, слід зазначити, що оптимальні умови (стимули) формування імунних ДК з клітин-попередників усе ще залишаються предметом наукової дискусії. Це зумовлено тим, що здатність до диференціювання незрілих ДК в імунні ДК залежить від багатьох умов, а саме складу і концентрації компонентів, що входять до культурального середовища, щільності клітин у культурі та інших умов [21, 103]. Особлива увага при

цьому звертається на особливості відпрацювання “технологічного процесу” формування імунних ДК із протипухлинною активністю.

“Навантаження” дендритних клітин пухлинними антигенами *in vitro*

Відомо, що незрілі ДК, на відміну від зрілих, здатні до ендоцитозу антигенів і їх презентації в комплексі з МНС I або МНС II класу на своїй поверхні, набуваючи характерних ознак зрілих ДК [3, 10]. Саме така здатність незрілих ДК обумовлює їх використання як ключового компонента при формуванні всього ланцюга імунного протипухлинного захисту [104]. Дійсно, навантаження незрілих ДК пухлинними антигенами є ключовим етапом створення вакцин на їхній основі [105]. Дендритні клітини можна навантажувати екзогенним антигеном у формі цілих білків або пептидних фрагментів шляхом “пульсування” або електропорації (створення пор у бішаровій ліпідній мембрані під дією електричного поля) *in vitro* [68].

Як правило, за джерела пухлинних антигенів використовують: лізати пухлин [75, 106], синтетичні пухлиноспецифічні пептиди [107], пухлинні білки [108], апоптотичні пухлинні клітини [109], нуклеїнові кислоти (ДНК) [110], мРНК [111], сумарну пухлинну РНК [112] та вірусні вектори, що кодують пухлинні антигени [113]. У клінічних випробуваннях за цим напрямом для навантаження незрілих ДК переважно використовують антигени білкової природи, що містяться в лізаті пухлинних клітин (білки, пептиди, їхні залишки тощо). Перелічені субстрати дійсно здатні індукувати потужну та цілеспрямовану імунну відповідь на клітини пухлин при їх введенні як складового компонента протипухлинних вакцин. Незважаючи на можливість втрати пухлиною клітинно-специфічного антигена через імунне редагування [114], створення вакцин на основі ДК, навантажених лізатом пухлинних тканин, залишається найбільш “прагматичним” підходом до створення протипухлинних вакцин, з урахуванням досить широкої панелі існуючих пухлинних антигенів. До них можна віднести неопухлинні антигени, які потенційно здатні стимулювати потужну поліклональну імунну відповідь і таким чином запобігати формуванню імунорезистентних варіантів пухлини [115]. Вважається, що аутологічні пухлинні клітини є більш актуальним джерелом пухлинних антигенів [116]. Ці клітини вже потенційно містять повний на-

бір особистих пухлиноасоційованих неоантигенів онкохворих, що має вирішальне значення для формування “багатоспрямованої”, належної імунної відповіді й відторгнення пухлини [116]. Широкий антигенний репертуар лізатів пухлинних клітин також сприяє і забезпечує збалансовану активацію як Т-хелперів, так і ЦТЛ, що має важливе значення для ефективного знищення пухлини [117].

Відкриття стовбурових ракових клітин привнесло багато нової інформації не тільки стосовно природи самої пухлинної тканини [118], але й щодо удосконалення методів боротьби з цією тяжкою хворобою. Так, навантаження незрілих ДК лізатом стовбурових ракових клітин, порівняно з лізатом несорттованих пухлинних клітин, є більш ефективним для індукції протипухлинного імунітету [118, 119]. У мишей із раком молочної залози, що були вакциновані імунними ДК, навантаженими лізатом стовбурових ракових клітин, спостерігали зростання кількості Т-хелперів і ЦТЛ, інгібування росту пухлини та пригнічення метастазування значно більшою мірою, ніж у тварин, вакцинованих імунними ДК, що співкультивувались із загальним лізатом несорттованих пухлинних клітин [121]. Варто відзначити, що існує точка зору щодо обмеженості методу використання лізатів пухлинних тканин при навантаженні ДК, оскільки вони містять велику кількість іррелевантних антигенів, які потенційно можуть стати причиною ініціації аутоімунних реакцій.

Для отримання лізату пухлинні клітини зазвичай піддають багаторазовому заморожуванню-відтаванню [14, 122]. Для збагачення лізату білками теплового шоку (БТШ) А. Torres і співавт. [122] напередодні лізису витримували пухлинні клітини за +42 °С протягом 1 год із подальшим інкубуванням протягом 2 год за 37 °С, після чого піддавали їх лізису шляхом багаторазового заморожування-відтавання. Додатково клітинний лізат оброблювали ультразвуком й опромінювали в дозі 60 Гр. У такому багатоступеневому процесі важливу роль відіграє попереднє витримання клітин за температури 42 °С, що індукує напрацювання в них БТШ, які в позаклітинному просторі стимулюють дозрівання й активацію ДК і виступають ад’ювантом. Важливо, що температурний діапазон напрацювання БТШ із різною функціональною спрямованістю різниться [123]. Виходячи з цього, можна зробити висновок, що варіюючи температурні режими, можна “під замовлення” індукувати напрацювання тих чи

інших БТШ із різною функціональною активністю взагалі та різною роллю в протипухлинному захисті організму зокрема.

Відомо, що активні форми кисню (АФК) здатні модифікувати структуру власних білків організму, роблячи їх імуногенними [123, 124]. Формування АФК відбувається в клітинах і тканинах за різних умов, у т.ч. і під дією ультранизьких температур [126, 127]. Цей факт є вагомим обґрунтуванням використання для отримання лізату пухлин саме заморожування-відтавання пухлинних клітин із різною кратністю. У роботі С. Boudousquie і співавт. [122] для підвищення імуногенності пухлинного лізату перед проведенням циклів заморожування-відтавання до суспензії клітин додавали гіпохлористу кислоту (НОСІ), яка проявляє сильні окисні властивості. С.Л.Л. Chiang і співавт. [128] показали, що імунні ДК, навантажені антигенами пухлинних лізатів, отриманих обробкою клітин НОСІ із подальшим багаторазовим заморожуванням-відтаванням, індукували формування в тварин-пухлиноносіїв більш високих рівнів Т-клітин, що секретують ІФН-гамма, ніж у тварин-пухлиноносіїв, яким вводили імунні ДК, навантажені тільки антигенами пухлинних лізатів [128]. Підвищення імуногенних властивостей лізату пухлинних клітин можна досягти і використанням скваринової кислоти, яка також стимулює утворення супероксидних радикалів [62].

Як більш доступний аналог гіпохлористої та скваринової кислот можна використовувати пероксид водню, який також має окисні властивості [129]. Суттєво, що ефективна концентрація пероксиду водню для індукції зміни структурно-функціональних характеристик клітин залежить від типу клітин, які піддаються його впливу. Наприклад, для клітинних ліній необхідні як менші дози, так і менший час експозиції з супероксидами порівняно з первинними клітинами, щоб уникнути їх загибелі переважно через некроптоз або некроз [129]. Украв важливим є і той факт, що оксидативний стрес, який супроводжується формуванням АФК, індукує в пухлинних клітинах їх загибель шляхом імунного апоптозу, в умовах розвитку якого формуються структури з більшим імуногенним потенціалом [130] і здатністю активувати ДК [131].

Отже, навантаження ДК лізатом пухлинних клітин має суттєві переваги над іншими методами індукції протипухлинної імунної відповіді. Насамперед це широкий спектр антигенних пептидів у пухлинних лізатах, що дає

змогу уникнути необхідності їх ідентифікації для окремих пацієнтів, а також охопити більшу панель специфічних пухлинних антигенів, на які буде розвиватися імунна відповідь. Більше того, цей підхід дає можливість підвищити імуногенні властивості пухлинного біоматеріалу шляхом попередніх специфічних маніпуляцій із цілісними клітинами.

Фенотипові та функціональні характеристики зрілих дендритних клітин

Функціональна зрілість ДК визначається як за їхніми морфологічними ознаками, так і за наявністю (чи відсутністю) певних маркерних молекул на їхній поверхні. Морфологічною ознакою ДК є великі її розміри (15–20 мкм) з округлою (овальною або полігональною) формою, ексцентрично розташованим ядром, численними розгалуженими відростками мембрани (подібно до дендритів нейронів) [132]. Необхідність процесингу антигена, який поглинає ДК, обумовила наявність у ній великої кількості ендосом і лізосом. Відсутність специфічних маркерів, що притаманні лише зрілим ДК, ускладнює їх детекцію. Та все ж, за даними А. Datsi та співавт. [103], зрілі ДК відрізняються від незрілих ДК за експресією таких мембранних молекул, як CD83 і CD25, а також більш високою щільністю експресії таких молекул, як CD40, CD80, CD86 і HLA-DR. У роботі W. Zhang і співавт. [9] зрілі ДК позиціонують як клітини з фенотипом CD11c⁺, CD40⁺, CD80⁺, CD83⁺, CD86⁺, CCR7⁺ та HLA-DR⁺. На поверхні зрілих ДК відсутні такі маркери, як CD3, CD14, CD19, CD56 та CD66b, характерні для Т-клітин, моноцитів, В-клітин, природних кілерів і гранулоцитів відповідно [133].

Функціональні характеристики, зовнішній вигляд і поверхневий молекулярний репертуар зрілих ДК є різноманітними і мобільними. Такі особливості, ймовірно, обумовлені “контекстом” навколишнього середовища у якому вони перебувають у момент диференціювання, та цитокіновим профілем, який координує їх активність *ex vivo* [38]. Першочерговою умовою формування імунних ДК є розвиток запального процесу [134]. Загальною рисою зрілих ДК є довші дендрити, вони мають менш виражену фагоцитарну здатність порівняно з незрілими ДК; з іншого боку, вони більш рухливі, ніж незрілі клітини [135].

Висловлюється теза, що головними критеріями, яким повинні відповідати зрілі ДК, які

використовуються для створення ефективної протипухлинної вакцини, є посилене перекресне представлення пухлинних антигенів, продукція IL-12p70, експресія високих рівнів коштиляторних молекул і активна взаємодія з природними кілерами [136]. Не виключено, що перелік цих критеріїв і ознак буде розширюватися в міру накопичення результатів як експериментальних, так і клінічних досліджень, що стосуються таких унікальних із точки зору як структурної, так і функціональної організації клітин, якими є імунні ДК.

Кріоконсервування дендритних клітин

Використання методів кріоконсервування ДК має, як мінімум, двоспрямоване завдання: а) вивчення особливостей впливу ультранизьких температур на структурні та функціональні показники ДК; б) створення низькотемпературних банків ДК для подальшого їх застосування в клінічній практиці. Дійсно, бути замороженими та введеними відповідній категорії пацієнтів у міру затребуваності можуть різні типи ДК [137]. Такий підхід використання імунних ДК зумовлює необхідність розробки ефективних методів їх збереження в умовах ультранизьких температур для успішного подальшого клінічного використання в імунотерапії [138].

У результаті фундаментальних досліджень і розробки теоретичних основ кріоконсервування імунних ДК, його впливу на життєздатність клітин, експресію поверхневих антигенів і продукцію цитокінів були розроблені методи захисту клітин від ушкоджувальної дії заморожування [29, 68, 107, 122]. На сьогодні не існує єдиного протоколу кріоконсервування імунних ДК. У наявних протоколах їх кріоконсервування для клінічного застосування як кріопротектор використовують ДМСО у концентрації не менше 5 %, гідроксиетилкрохмаль, сироватку або плазму крові [139]. Вказується на можливе введення в середовище для кріоконсервування глюкози або трегалози [68, 140, 141]. У роботі P. Shinde та співавт. [141] заморожені за наявності ДМСО і трегалози імунні ДК були меншою мірою схильні до загибелі унаслідок апоптозу порівняно з імунними ДК, які кріоконсервували з додаванням лише ДМСО. Кріоконсервування зрілих ДК рекомендовано проводити з використанням повільної швидкості охолодження: 1 град/хв до –80 °C із подальшим зануренням у рідкий азот і відігрівом за 37 °C [140, 142, 143]. Загальноприйнятими умовами збері-

гання ДК є температури від -150 до -196 °C (у межах газової або рідкої фази азоту) [68, 140]. Для підвищення кріорезистентності імунних ДК можливою видається їх інкубація в гіпертермічних умовах для напрацювання БТШ. М.А. Shahid і співавт. [144] для напрацювання БТШ мезенхімальні стовбурові клітини інкубували протягом 1 год у CO_2 -інкубаторі за температури 43 °C, а потім протягом 3 год – за 37 °C. У роботі [145] показано, що варіювання умов кріоконсервування впливало на рівень наробки БТШ70 як у моноклеонах кісткового мозку мишей, так і в отриманих із них *in vitro* незрілих ДК. Неоднозначність результатів, отриманих у роботах за цим напрямом, підтверджується також даними Р. Lewalle та співавт. [146]. Автори продемонстрували стабільність фенотипу та функції імунних ДК після заморожування-відтавання. При цьому відомо, що до фенотипових ознак клітини входить увесь репертуар мембранних рецепторів [147]. Разом із тим у роботі Q. Zhou та співавт. [148] показано, що кріоконсервування змінює здатність імунних ДК до хоумінгу та реалізації притаманних їм функцій. Хоумінг-рецептори, як відомо, відносяться в своїй більшості до мембранних рецепторів [149]. Виходячи з цього, наведені вище дані Р. Lewalle більше ставлять запитань, ніж дають відповідей щодо однозначності (чи неоднозначності) результатів, які стосуються впливу ультранизьких температур як на структуру, так і на функцію ДК. Тобто не викликає сумніву, що кріоконсервування дійсно може бути інструментом управління структурно-функціональним станом різних типів клітин, зокрема і ДК, на що звертається увага в деяких роботах [150–153].

Застосування протипухлинних вакцин на основі імунних дендритних клітин в експерименті та клініці

В експериментальних дослідженнях імунні ДК вводять внутрішньовенно, підшкірно, навколо- або внутрішньопухлинно в дозі $1-2 \times 10^6$ клітин на мишу 1-3 рази через певний інтервал починаючи з 5-ї доби після індукції пухлин [154–158]. Усі ці способи застосування імунних ДК тою чи іншою мірою продемонстрували свою ефективність. У той же час, як було продемонстровано S.C. Krzastek і співавт. [155], ступінь і характер міграції ДК у пухлинний сайт та імунні органи залежать від шляху їх введення. Так, підшкірне введення 1×10^7 зрілих ДК у 0,1 мл фосфатного буферу тваринам на 13-ту добу після

індукції пухлини простати мишам лінією пухлинних клітин RM-1 приводило до максимальної міграції імунних ДК переважно до місця локації пухлини та регіональних лімфовузлів і було більш інтенсивним, ніж у мишей із внутрішньовенним і внутрішньопухлинним введенням вакцини. Крім того, навантаження зрілих ДК лізатом пухлини перед ін'єкцією підсилювало їх міграцію до ділянки пухлини та лімфатичних вузлів. Цей ефект був більш вираженим при підшкірному введенні, ніж при введенні навантажених пухлинним лізатом ДК безпосередньо в пухлину або внутрішньовенно. На жаль, автори не проводили оцінки терапевтичного ефекту введених ними ДК. Однак із цих даних можна припустити, що протипухлинний ефект буде спостерігатися більшою мірою при підшкірному введенні ДК, навантажених пухлинним лізатом.

Що стосується клінічних досліджень у цьому напрямі, то вакцинацію пацієнтів з онкологією імунними ДК, навантаженими пухлинними антигенами, проводять шляхом введення клітин підшкірно, внутрішньошкірно, внутрішньовенно, в регіональні лімфовузли або безпосередньо в пухлини [159]. Аналіз результатів цих робіт показав, що виражені протипухлинні властивості та здатність до міграції мають підшкірно введені імунні ДК, на відміну від імунних ДК, введених внутрішньовенно. В той же час після внутрішньошкірної ін'єкції лише 2–4 % введених імунних ДК мігрують до регіональних дренажних лімфатичних вузлів, тоді як більшість цих клітин гинуть у місці внутрішньодермальної ін'єкції та поглинаються макрофагами [38]. Заслужує на увагу внутрішньопухлинне введення ДК, яке було випробувано в кількох клінічних дослідженнях. Їхні результати свідчать, що такий тип введення ДК не тільки можливий і безпечний, але й здатен суттєво посилювати та/або індукувати специфічну відносно пухлини імунну відповідь [160].

Узагальнення в цілому отриманих результатів за цією темою дає можливість зробити певні висновки. Незважаючи на різноманітність протоколів імунотерапії пухлин за допомогою ДК-вакцин, можна виявити і певні загальні риси методично-методологічних підходів. У більшості робіт ДК вводять внутрішньошкірно або підшкірно, а кратність їх введення становить від 3 до 9 разів з інтервалом від 7-ми діб до 6-ти тижнів [68]. У деяких роботах повідомляється про введення ДК безпосередньо в топографічно найближчі до пухлини лімфатич-

ні вузли, що дає ДК можливість безпосередньо сенсibilізувати Т-клітини онкохворих. Так, А. Sarivalasis та співавт. [4] вводили $3-10 \times 10^6$ в об'ємі 1 мл навантажених пухлинним антигеном аутологічних ДК у вигляді двох внутрішньовузлових ін'єкцій половинної дози в кожне стегно. Пацієнти отримували шість персоналізованих щеплень із тижневим інтервалом.

При проведенні пацієнтам, хворим на рак простати, кріоабляції та внутрішньопухлинному введенні $2,0 \times 10^8$ аутологічних незрілих ДК було показано, що така терапія добре переноситься пацієнтами і в 33 % випадків дає тривалий (>46 тижнів) клінічний ефект із середнім показником загального виживання 40,7 місяця [8].

Останнім часом акцентується увага на перспективності використання в імунотерапії раку кріомікроглобок з імунними ДК [161, 162], які можна зберігати як за -80 °С, так і за -196 °С. При вакцинації пацієнтів з онкологією імунними ДК, навантаженими овальбуміном із використанням кріомікроглобок, автори спостерігали більш потужну антиген-специфічну імунну відповідь порівняно з введенням імунних ДК підшкірно або внутрішньовенно.

Як свідчить аналіз літературних даних, терапевтична ефективність вакцинації онкохворих імунними ДК визначається протоколом їх отримання, що має важливе значення для розробки нових підходів до створення вакцин проти раку. Науково-технічний прогрес, який домінує в сучасному світі, дає нам змогу все більш скрупульозно досліджувати протипухлинний імунітет і маніпулювати ним.

Висновки

Пошук ефективних методів лікування злоякісних пухлин є одним із найактуальніших питань сьогодення. Імунотерапія онкологічних захворювань за допомогою імунних ДК зарекомендувала себе як високоефективна і нетоксична для організму онкохворих. Поки що цей

метод не набув значного поширення в клінічній практиці, зокрема через складність і відсутність чітких стандартів отримання імунних ДК і контролю якості вакцин на їх основі. Технологічний процес отримання вакцин на основі ДК проходить у чотири етапи. Як джерела клітин-попередників ДК використовують моноцити периферичної та кордової крові, а також мононуклеари або ГСК кісткового мозку. Для отримання з них незрілих ДК у культуру додають ГМ-КСФ та ІЛ-4. Інші протоколи отримання незрілих ДК передбачають, окрім зазначених вище цитокінів, додавання в культуру клітин-попередників прозапальних цитокінів. Для дозрівання ДК використовують цитокінові коктейлі, коктейлі, що містять ліганди до толподібних рецепторів, та коктейлі, що містять ліганди рецептора CD40. На наступному етапі ДК навантажують екзогенним антигеном у формі цілих білків або пептидних фрагментів шляхом "пульсування" або електропорації *in vitro*. У цілому існує необхідність розробки чіткого алгоритму, регламентування щонайменше таких стадій отримання імунних ДК, як середовище їх культивування, склад цитокінових коктейлів, пухлинних антигенів, якими навантажують незрілі ДК для професійного дозрівання, тощо. Особлива увага в цьому переліку повинна бути приділена питанням розробки ефективних методів кріоконсервування та зберігання імунних ДК. Оцінка якості кріоконсервованих імунних ДК має бути обов'язковим компонентом протоколу атестації та застосування імунних ДК, що в цілому обумовлює успіх такого виду імунотерапії онкологічних захворювань.

Розкриття інтересів

Автори не мають конфліктів інтересів, які слід розкрити.

References

- [1] Dumansky YV, Chekhun VF. Oncology in Ukraine. State of the problem and ways of development. *Oncology*. 2022;24(3):1-6. DOI: 10.32471/oncology.2663-7928.t-24-3-2022-g.10652
- [2] Marciscano AE, Anandasabapathy N. The role of dendritic cells in cancer and anti-tumor immunity. *Semin Immunol*. 2021 Feb;52:101481. DOI: 10.1016/j.smim.2021.101481
- [3] Gardner A, de Mingo Pulido B, Ruffell B. Dendritic cells and their role in immunotherapy. *Front Immunol*. 2020 May 21;11:924. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00924

- [4] Sarivalasis A, Boudousquie C, Balint K, Stevenson BJ, Gannon PO, Iancu EM, et al. A Phase I/II trial comparing autologous dendritic cell vaccine pulsed either with personalized peptides (PEP-DC) or with tumor lysate (OC-DC) in patients with advanced high-grade ovarian serous carcinoma. *J Transl Med.* 2019 Nov 26;17(1):391. DOI: 10.1186/s12967-019-02133-w
- [5] Sutherland SIM, Ju X, Horvath LG, Clark GJ. Moving on from Sipuleucel-T: new dendritic cell vaccine strategies for prostate cancer. *Front Immunol.* 2021 Mar 29;12:641307. DOI: 10.3389/fimmu.2021.641307
- [6] Dong H, Li Q, Zhang Y, Ding M, Teng Z, Mou Y. Biomaterials facilitating dendritic cell-mediated cancer immunotherapy. *Adv Sci (Weinh).* 2023 Apr 23:e2301339. DOI: 10.1002/advs.202301339
- [7] Seya T, Takeda Y, Takashima K, Yoshida S, Azuma M, Matsumoto M. Adjuvant immunotherapy for cancer: both dendritic cell-priming and check-point inhibitor blockade are required for immunotherapy. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2018;94(3):153-60. DOI: 10.2183/pjab.94.011
- [8] Thomsen LCV, Honore A, Reisaeter LAR, Almas B, Borretzen A, Helle SI, et al. A phase I prospective, non-randomized trial of autologous dendritic cell-based cryoimmunotherapy in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2023;72(7):2357-73. DOI: 10.1007/s00262-023-03421-7
- [9] Zhang W, Lu X, Cui P, Piao C, Xiao M, Liu X, et al. Phase I/II clinical trial of a Wilms' tumor 1-targeted dendritic cell vaccination-based immunotherapy in patients with advanced cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2019 Jan;68(1):121-30. DOI: 10.1007/s00262-018-2257-2
- [10] Constantino J, Gomes C, Falcao A, Cruz MT, Neves BM. Antitumor dendritic cell-based vaccines: Lessons from 20 years of clinical trials and future perspectives. *Transl Res.* 2016 Feb;168:74-95. DOI: 10.1016/j.trsl.2015.07.008
- [11] Fevzer T, Pozenel P, Zajc K, Tesic N, Svajger U. Combined TLR-3/TLR-8 signaling in the presence of alfa-type-1 cytokines represents a novel and potent dendritic cell type-1, anti-cancer maturation protocol. *Cells.* 2022 Feb 28;11(5):835. DOI: 10.3390/cells11050835
- [12] Yao CL, Tseng TY. The synergistic and enhance effects of IL-6 and M-CSF to expand and differentiate functional dendritic cells from human monocytes under serum-free condition. *J Biol Eng.* 2023 Jan 26;17(1):6. DOI: 10.1186/s13036-023-00325-z
- [13] Cunningham S, Hackstein H. Recent advances in good manufacturing practice-grade generation of dendritic cells. *Transfus Med Hemother.* 2020 Dec;47(6):454-63. DOI: 10.1159/000512451
- [14] Torres A, Vivanco S, Lavin F, Pereda C, Chernobrovkin A, Gleisner A, et al. Haptoglobin induces a specific proteomic profile and a mature-associated phenotype on primary human monocyte-derived dendritic cells. *Int J Mol Sci.* 2022 Jun 21;23(13):6882. DOI: 10.3390/ijms23136882
- [15] Kim SJ, Kim G, Kim N, Chu H, Park BC, Yang JS, et al. Human CD141⁺ dendritic cells generated from adult peripheral blood monocytes. *Cytotherapy.* 2019 Oct;21(10):1049-63. DOI: 10.1016/j.jcyt.2019.07.007
- [16] Erra Diaz F, Mazzitelli I, Bleichmar L, Melucci C, Thibodeau A, Dalotto Moreno T, et al. Concomitant inhibition of PPAR α and mTORC1 induces the differentiation of human monocytes into highly immunogenic dendritic cells. *Cell Rep.* 2023 Mar 28;42(3):112156. DOI: 10.1016/j.celrep.2023.112156
- [17] Chen C, He L, Wang X, Xiao R, Chen S, Ye Z, et al. Leonurine promotes the maturation of healthy donors and multiple myeloma patients derived-dendritic cells via the regulation on arachidonic acid metabolism. *Front Pharmacol.* 2023 Jan 23;14:1104403. DOI: 10.3389/fphar.2023.1104403
- [18] Cobb A, Roberts LK, Palucka AK, Mead H, Montes M, Ranganathan R, et al. Development of a HIV-1 lipopeptide antigen pulsed therapeutic dendritic cell vaccine. *J Immunol Methods.* 2011 Feb 28;365(1-2):27-37. DOI: 10.1016/j.jim.2010.11.002
- [19] Hopewell EL, Cox C. Manufacturing dendritic cells for immunotherapy: monocyte enrichment. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2020 Jan 15;16:155-60. DOI: 10.1016/j.omtm.2019.12.017
- [20] Williams H, Mack C, Baraz R, Marimuthu R, Naralashetty S, Li S, et al. Monocyte differentiation and heterogeneity: inter-subset and interindividual differences. *Int J Mol Sci.* 2023 May 15;24(10):8757. DOI: 10.3390/ijms24108757
- [21] Cechim G, Chies JAB. In vitro generation of human monocyte-derived dendritic cells methodological aspects in a comprehensive review. *An Acad Bras Ciênc.* 2019;91(4):e20190310. DOI: 10.1590/0001-3765201920190310
- [22] Bhattacharjee J, Das B, Mishra A, Sahay P, Upadhyay P. Monocytes isolated by positive and negative magnetic sorting techniques show different molecular characteristics and immunophenotypic behaviour. *F1000Res.* 2017 Nov 23;6:2045. DOI: 10.12688/f1000research.12802.3
- [23] Chometon TQ, Siqueira MDS, Sant Anna JC, Almeida MR, Gandini M, et al. A protocol for rapid monocyte isolation and generation of singular human monocyte-derived dendritic cells. *PLoS One.* 2020 Apr 9;15(4):e0231132. DOI: 10.1371/journal.pone.0231132
- [24] Marques GS, Silva Z, Videira PA. Antitumor efficacy of human monocyte-derived dendritic cells: comparing effects of two monocyte isolation methods. *Biol Proced Online.* 2018 Feb 2;20:4. DOI: 10.1186/s12575-018-0069-6
- [25] Obermaier B, Dauer M, Herten J, Schad K, Endres S, Eigler A. Development of a new protocol for 2-day generation of mature dendritic cells from human monocytes. *Biol Proced Online.* 2003;5:197-203. DOI: 10.1251/bpo62

- [26] Dohnal AM, Graffi S, Witt V, Eichstill C, Wagner D, Ul-Haq S, et al. Comparative evaluation of techniques for the manufacturing of dendritic cell-based cancer vaccines. *J Cell Mol Med*. 2009 Jan;13(1):125-35. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2008.00304.x
- [27] Delirez N, Shojaefar E, Parvin P, Asadi B. Comparison the effects of two monocyte isolation methods, plastic adherence and magnetic activated cell sorting methods, on phagocytic activity of generated dendritic cells. *Cell J*. 2013 Fall;15(3):218-23.
- [28] Plantinga M, van den Beemt DAMH, Dunnebach E, Nierkens S. CD14 expressing precursors give rise to highly functional conventional dendritic cells for use as dendritic cell vaccine. *Cancers (Basel)*. 2021 Jul 29;13(15):3818. DOI: 10.3390/cancers1315381
- [29] He M, Soni B, Schwalie PC, Husser T, Waltzinger C, De Silva D, et al. Combinations of Toll-like receptor 8 agonist TL8-506 activate human tumor-derived dendritic cells. *J Immunother Cancer*. 2022 Jun;10(6):e004268. DOI: 10.1136/jitc-2021-004268
- [30] Lee KW, Yam JWP, Mao X. Dendritic cell vaccines: a shift from conventional approach to new generations. *Cells*. 2023 Aug 25;12(17):2147. DOI: 10.3390/cells12172147
- [31] Pi Y, Li Y, Liang R, Xiao J, Leng J, Zhang L. Generation of high cross-presentation ability human dendritic cells by combination of interleukin 4, interferon β and GM-CSF. *Cent Eur J Immunol*. 2022;47(2):125-38. DOI: 10.5114/ceji.2022.117767
- [32] Pulendran B, Banchereau J, Burkeholder S, Kraus E, Guinet E, Chalouni C, et al. Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets in vivo. *J Immunol*. 2000 Jul 1;165(1):566-72. DOI: 10.4049/jimmunol.165.1.566
- [33] Santa P, Roubertie A, Loizon S, Garreau A, Ferriere A, Duluc D, et al. Enrichment of large numbers of splenic mouse dendritic cells after injection of Flt3L-producing tumor cells. *Methods Mol Biol*. 2023;2618:173-86. DOI: 10.1007/978-1-0716-2938-3_13
- [34] Cueto FJ, Sancho D. The Flt3L/Flt3 axis in dendritic cell biology and cancer immunotherapy. *Cancers (Basel)*. 2021 Mar 26;13(7):1525. DOI: 10.3390/cancers13071525
- [35] Ryu SH, Shin HS, Eum HH, Park JS, Choi W, Na HY, et al. Granulocyte macrophage-colony stimulating factor produces a splenic subset of monocyte-derived dendritic cells that efficiently polarize T helper type 2 cells in response to blood-borne antigen. *Front Immunol*. 2022 Jan 3;12:767037. DOI: 10.3389/fimmu.2021.767037
- [36] Linehan JL, Dileepan T, Kashem SW, Kaplan DH, Cleary P, Jenkins MK. Generation of Th17 cells in response to intranasal infection requires TGF- β 1 from dendritic cells and IL-6 from CD301b+ dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Oct 13;112(41):12782-7. DOI: 10.1073/pnas.1513532112
- [37] Andreu-Sanz D, Kobold S. Role and potential of different T helper cell subsets in adoptive cell therapy. *Cancers (Basel)*. 2023 Mar 8;15(6):1650. DOI: 10.3390/cancers15061650
- [38] Bol KF, Schreibelt G, Rabold K, Wculek SK, Schwarze JK, Dzionek A, et al. The clinical application of cancer immunotherapy based on naturally circulating dendritic cells. *J Immunother Cancer*. 2019 Apr 18;7(1):109. DOI: 10.1186/s40425-019-0580-6
- [39] Schreibelt G, Bol KF, Westdorp H, Wimmers F, Aarntzen EH, Duiveman-de Boer T, et al. Effective clinical responses in metastatic melanoma patients after vaccination with primary myeloid dendritic cells. *Clin Cancer Res*. 2016;22(9):2155-66. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2205
- [40] 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 alpha. *J Exp Med*. 1994 Apr 1;179(4):1109-18. DOI: 10.1084/jem.179.4.1109
- [41] Vento-Tormo R, Company C, Rodríguez-Ubrea J, de la Rica L, Urquiza JM, Javierre BM, et al. IL-4 orchestrates STAT6-mediated DNA demethylation leading to dendritic cell differentiation. *Genome Biol*. 2016;17:4. DOI: 10.1186/s13059-015-0863-2
- [42] Hiasa M, Abe M, Nakano A, Oda A, Amou H, Kido S, et al. GM-CSF and IL-4 induce dendritic cell differentiation and disrupt osteoclastogenesis through M-CSF receptor shedding by up-regulation of TNF-alpha converting enzyme (TACE). *Blood*. 2009 Nov 12;114(20):4517-26. DOI: 10.1182/blood-2009-04-215020
- [43] Goltsev AN, Dubrava TG, Yampolskaya EE, Gayevskaya YA, Babenko NN, Bondarovich NA, et al. The optimization method of isolation of immature dendritic cells. *Fiziol Zh*. 2018;64(6):32-9. DOI: 10.15407/fz64.06.032
- [44] Wang S, Sun X, Zhou H, Zhu Z, Zhao W, Zhu C. Interleukin-4 affects the mature phenotype and function of rat bone marrow-derived dendritic cells. *Mol Med Rep*. 2015 Jul;12(1):233-7. DOI: 10.3892/mmr.2015.3349
- [45] Sun M, Wu J, Liu W. Profiling changes in microRNAs of immature dendritic cells differentiated from human monocytes. *Cent Eur J Immunol*. 2021;46(1):10-6. DOI: 10.5114/ceji.2021.105241
- [46] Della Bella S, Nicola S, Riva A, Biasin M, Clerici M, Villa ML. Functional repertoire of dendritic cells generated in granulocyte macrophage-colony stimulating factor and interferon-alpha. *J Leukoc Biol*. 2004;75(1):106-16. DOI: 10.1189/jlb.0403154
- [47] Santillo BT, Reis DDS, da Silva LT, Romani NT, Duarte AJDS, Oshiro TM. Phenotypic and functional profile of IFN- α -differentiated dendritic cells (IFN-DCs) from HIV-infected individuals. *Hum Vaccin Immunother*. 2019;15(9):2140-49. DOI: 10.1080/21645515.2018.1547603
- [48] Fan J, Wu Y, Jiang M, Wang L, Yin D, Zhang Y, et al. IFN-DC Loaded with autophagosomes containing virus antigen is highly efficient in inducing virus-specific human T cells. *Int J Med Sci*. 2019 May 10;16(5):741-50. DOI: 10.7150/ijms.31830

- [49] Lapenta C, Gabriele L, Santini SM. IFN- α -mediated differentiation of dendritic cells for cancer immunotherapy: advances and perspectives. *Vaccines (Basel)*. 2020 Oct 19;8(4):617. DOI: 10.3390/vaccines8040617
- [50] Ashour D, Arampatzi P, Pavlovic V, Förstner KU, Kaisho T, Beilhack A, et al. IL-12 from endogenous cDC1, and not vaccine DC, is required for Th1 induction. *JCI Insight*. 2020 May 21;5(10):e135143. DOI: 10.1172/jci.insight.135143
- [51] Chomarat P, Dantin C, Bennett L, Banchereau J, Palucka AK. TNF skews monocyte differentiation from macrophages to dendritic cells. *J Immunol*. 2003 Sep 1;171(5):2262-9. DOI: 10.4049/jimmunol.171.5.2262
- [52] Iwamoto S, Iwai S, Tsujiyama K, Kurahashi C, Takeshita K, Naoe M, et al. TNF- α drives human CD14⁺ monocytes to differentiate into CD70⁺ dendritic cells evoking Th1 and Th17 responses. *J Immunol*. 2007 Aug 1;179(3):1449-57. DOI: 10.4049/jimmunol.179.3.1449
- [53] Shortman K, Caux C. Dendritic cell development: multiple pathways to nature's adjuvants. *Stem Cells*. 1997;15(6):409-19. DOI: 10.1002/stem.150409
- [54] Siena S, Di Nicola M, Bregni M, Mortarini R, Anichini A, Lombardi L, et al. Massive ex vivo generation of functional dendritic cells from mobilized CD34⁺ blood progenitors for anticancer therapy. *Exp Hematol*. 1995 Dec;23(14):1463-71.
- [55] Chabot V, Martin L, Meley D, Sensebe L, Baron C, Lebranchu Y, et al. Unexpected impairment of TNF- α -induced maturation of human dendritic cells in vitro by IL-4. *J Transl Med*. 2016 Apr 14;14:93. DOI: 10.1186/s12967-016-0848-2
- [56] Chrisikos TT, Zhou Y, Li HS, Babcock RL, Wan X, Patel B, et al. STAT3 Inhibits CD103⁺ cDC1 vaccine efficacy in murine breast cancer. *Cancers (Basel)*. 2020 Jan 4;12(1):128. DOI: 10.3390/cancers12010128
- [57] Zhou Y, Slone N, Chrisikos TT, Kyrysyuk O, Babcock RL, Medik YB, et al. Vaccine efficacy against primary and metastatic cancer with in vitro-generated CD103⁺ conventional dendritic cells. *J Immunother Cancer*. 2020 Apr;8(1):e000474. DOI: 10.1136/jitc-2019-000474
- [58] Chu TH, Vo MC, Lakshmi TJ, Ahn SY, Kim M, Song GY, et al. Novel IL-15 dendritic cells have a potent immunomodulatory effect in immunotherapy of multiple myeloma. *Transl Oncol*. 2022 Jun;20:101413. DOI: 10.1016/j.tranon.2022.101413
- [59] Mohamadzadeh M, Berard F, Essert G, Chalouni C, Pulendran B, Davoust J, et al. Interleukin 15 skews monocyte differentiation into dendritic cells with features of Langerhans cells. *J Exp Med*. 2001;194(7):1013-20. DOI: 10.1084/jem.194.7.1013
- [60] Van Acker HH, Anguille S, De Reu H, Berneman ZN, Smits EL, Van Tendeloo VF. Interleukin-15-cultured dendritic cells enhance anti-tumor gamma delta T cell functions through IL-15 secretion. *Front Immunol*. 2018 Apr 10;9:658. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00658
- [61] Van Acker HH, Anguille S, Willemsen Y, Van den Bergh JM, Berneman ZN, Lion E, et al. Interleukin-15 enhances the proliferation, stimulatory phenotype, and antitumor effector functions of human gamma delta T cells. *J Hematol Oncol*. 2016 Sep 29;9(1):101. DOI: 10.1186/s13045-016-0329-3
- [62] Mookerjee A, Graciotti M, Kandalaf LE. IL-15 and a two-step maturation process improve bone marrow-derived dendritic cell cancer vaccine. *Cancers (Basel)*. 2019 Jan 4;11(1):40. DOI: 10.3390/cancers11010040
- [63] Sanarico N, Ciaramella A, Sacchi A, Bernasconi D, Bossù P, Mariani F, et al. Human monocyte-derived dendritic cells differentiated in the presence of IL-2 produce proinflammatory cytokines and prime Th1 immune response. *J Leukoc Biol*. 2006 Sep;80(3):555-62. DOI: 10.1189/jlb.1105690
- [64] Ni X, Austin M, Langridge T, Bojaxhi P, Bijani P, Wang X, Duvic M. CD209⁺ monocyte-derived myeloid dendritic cells were increased in patients with leukemic cutaneous T-cell lymphoma undergoing extracorporeal photopheresis via the CELLEXTM system. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2020 Jul;36(4):290-8. DOI: 10.1111/phpp.12552
- [65] Ma DY, Clark EA. The role of CD40 and CD154/CD40L in dendritic cells. *Semin Immunol*. 2009 Oct;21(5):265-72. DOI: 10.1016/j.smim.2009.05.010
- [66] Perez CR, De Palma M. Engineering dendritic cell vaccines to improve cancer immunotherapy. *Nat Commun*. 2019 Nov 27;10(1):5408. DOI: 10.1038/s41467-019-13368-y
- [67] Bourque J, Hawiger D. Activation, amplification, and ablation as dynamic mechanisms of dendritic cell maturation. *Biology (Basel)*. 2023 May 14;12(5):716. DOI: 10.3390/biology12050716
- [68] Koch EAT, Schaft N, Kummer M, Berking C, Schuler G, Hasumi K, et al. A one-armed phase I dose escalation trial design: personalized vaccination with IKK β -matured, RNA-loaded dendritic cells for metastatic uveal melanoma. *Front Immunol*. 2022 Feb 4;13:785231. DOI: 10.3389/fimmu.2022.785231
- [69] Wu X, Xu F, Liu J, Wang G. Comparative study of dendritic cells matured by using IL-1 β , IL-6, TNF- α and prostaglandins E2 for different time span. *Exp Ther Med*. 2017 Aug;14(2):1389-94. DOI: 10.3892/etm.2017.4649
- [70] Cella M, Engering A, Pinet V, Pieters J, Lanzavecchia A. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature*. 1997 Aug 21;388(6644):782-7. DOI: 10.1038/42030
- [71] Ridolfi R, Riccobon A, Galassi R, Giorgetti G, Petrini M, Fiammenghi L, et al. Evaluation of in vivo labelled dendritic cell migration in cancer patients. *J Transl Med*. 2004 Jul 30;2(1):27. DOI: 10.1186/1479-5876-2-27

- [72] Bodder J, Kok LM, Fauerbach JA, Flyrez-Grau G, de Vries IJM. Tailored PGE2 immunomodulation of moDCs by nano-encapsulated EP2/EP4 antagonists. *Int J Mol Sci.* 2023 Jan 11;24(2):1392. DOI: 10.3390/ijms24021392
- [73] Arts N, Cane S, Hennequart M, Lamy J, Bommer G, Van den Eynde B, et al. microRNA-155, induced by interleukin-1beta, represses the expression of microphthalmia-associated transcription factor (MITF-M) in melanoma cells. *PLoS One.* 2015 Apr 8;10(4):e0122517. DOI: 10.1371/journal.pone.0122517
- [74] Hodge J, Wang F, Wang J, Liu Q, Saaoud F, Wang Y, et al. Overexpression of microRNA-155 enhances the efficacy of dendritic cell vaccine against breast cancer. *Oncoimmunology.* 2020 Feb 9;9(1):1724761. DOI: 10.1080/2162402X.2020.1724761
- [75] Li Y, Yu X, Ma Y, Hua S. IL-23 and dendritic cells: What are the roles of their mutual attachment in immune response and immunotherapy? *Cytokine.* 2019 Aug;120:78-84. DOI: 10.1016/j.cyto.2019.02.018
- [76] Schinocca C, Rizzo C, Fasano S, Grasso G, La Barbera L, Ciccia F, et al. Role of the IL-23/IL-17 pathway in rheumatic diseases: An overview. *Front Immunol.* 2021 Feb 22;12:637829. DOI: 10.3389/fimmu.2021.63782
- [77] Hou Y, Zhu L, Tian H, Sun HX, Wang R, Zhang L, et al. IL-23-induced macrophage polarization and its pathological roles in mice with imiquimod-induced psoriasis. *Protein Cell.* 2018 Dec;9(12):1027-38. DOI: 10.1007/s13238-018-0505-z
- [78] Zhang AL, Colmenero P, Purath U, Teixeira de Matos C, Hueber W, Klareskog L, et al. Natural killer cells trigger differentiation of monocytes into dendritic cells. *Blood.* 2007 Oct 1;110(7):2484-93. DOI: 10.1182/blood-2007-02-076364
- [79] Surendran N, Simmons A, Pichichero ME. TLR agonist combinations that stimulate Th type I polarizing responses from human neonates. *Innate Immun.* 2018 May;24(4):240-51. DOI: 10.1177/1753425918771178
- [80] Gierlich P, Lex V, Technau A, Keupp A, Morper L, Glunz A, et al. Prostaglandin E2 in a TLR3- and 7/8-agonist-based DC maturation cocktail generates mature, cytokine-producing, migratory DCs but impairs antigen cross-presentation to CD8⁺ T cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2020 Jun;69(6):1029-42. DOI: 10.1007/s00262-019-02470-1
- [81] Jang HJ, Song KD. Expression patterns of innate immunity-related genes in response to polyinosinic:polycytidylic acid (poly[I:C]) stimulation in DF-1 chicken fibroblast cells. *J Anim Sci Technol.* 2020;62(3):385-95. DOI: 10.5187/jast.2020.62.3.385
- [82] Liu Y, Mo CF, Luo XY, Li H, Guo HJ, Sun H, et al. Activation of Toll-like receptor 3 induces interleukin-1 receptor antagonist expression by activating the interferon regulatory factor 3. *J Innate Immun.* 2020;12(4):304-20. DOI: 10.1159/000504321
- [83] Frankenberger B, Schendel DJ. Third generation dendritic cell vaccines for tumor immunotherapy. *Eur J Cell Biol.* 2012 Jan;91(1):53-8. DOI: 10.1016/j.ejcb.2011.01.012
- [84] Hanel G, Angerer C, Petry K, Lichtenegger FS, Subklewe M. Blood DCs activated with R848 and poly(I:C) induce antigen-specific immune responses against viral and tumor-associated antigens. *Cancer Immunol Immunother.* 2022 Jul;71(7):1705-18. DOI: 10.1007/s00262-021-03109-w
- [85] Pearson FE, Chang K, Minoda Y, Rojas IML, Haigh OL, Daraj G, et al. Activation of human CD141⁺ and CD1c⁺ dendritic cells in vivo with combined TLR3 and TLR7/8 ligation. *Immunol Cell Biol.* 2018 Apr;96(4):390-400. DOI: 10.1111/imcb.12009
- [86] Bian Y, Walter DL, Zhang C. Efficiency of interferon-gamma in activating dendritic cells and its potential synergy with Toll-like receptor agonists. *Viruses.* 2023 May 19;15(5):1198. DOI: 10.3390/v15051198
- [87] Krakow S, Crescimone ML, Bartels C, Wiegering V, Eyrich M, Schlegel PG, et al. Re-expression of CD14 in response to a combined IL-10/TLR stimulus defines monocyte-derived cells with an immunoregulatory phenotype. *Front Immunol.* 2019 Jun 28;10:1484. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01484
- [88] Schmitt S, Tahk S, Lohner A, Hanel G, Maiser A, Hauke M, et al. Fusion of bacterial flagellin to a dendritic cell-targeting alphaCD40 antibody construct coupled with viral or leukemia-specific antigens enhances dendritic cell maturation and activates peptide-responsive T cells. *Front Immunol.* 2020 Nov 12;11:602802. DOI: 10.3389/fimmu.2020.602802
- [89] Karnell JL, Rieder SA, Ettinger R, Kolbeck R. Targeting the CD40-CD40L pathway in autoimmune diseases: Humoral immunity and beyond. *Adv Drug Deliv Rev.* 2019 Feb 15;141:92-103. DOI: 10.1016/j.addr.2018.12.005
- [90] Elmetwali T, Salman A, Wei W, Hussain SA, Young LS, Palmer DH. CD40L membrane retention enhances the immunostimulatory effects of CD40 ligation. *Sci Rep.* 2020 Jan 15;10(1):342. DOI: 10.1038/s41598-019-57293-y
- [91] Hillebrand RM, Vogt A, Strassburg CP, Gonzalez-Carmona MA, Schmidt-Wolf IGH. Immune check point CD40-CD40L activates dendritic and effector cells against human renal carcinoma cells. *Anticancer Res.* 2019 Sep;39(9):4643-52. DOI: 10.21873/anticancer.13645
- [92] Wang X, Dai J, Xia J, Ye Z, Huang X, Cao W, et al. Pomalidomide enhances the maturation of dendritic cells derived from healthy donors and multiple myeloma patients. *Front Pharmacol.* 2022 Dec 5;13:1076096. DOI: 10.3389/fphar.2022.1076096
- [93] Cao WJ, Dai JY, Dong WJ, Wang X, Wang XD, Xia JY, et al. [Effects of Dasatinib on the maturation of monocyte-derived dendritic cells derived from healthy donors and chronic myelogenous leukemia patients]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* 2022 Jun;30(3):677-87. DOI: 10.19746/j.cnki.issn.1009-2137.2022.03.004
- [94] Zheng SE, Jin J, Tong XM. [Effects of Imatinib mesylate on the development of dendritic cells derived from bone marrow mononuclear cells of patients with chronic myeloid leukemia]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2006 Aug 29;86(32):2252-5

- [95] Cho SY, Jeong SM, Jeon YJ, Yang SJ, Hwang JE, Yoo BM, et al. WT1 pulsed human CD141⁺ dendritic cell vaccine has high potential in solid tumor-targeted immunotherapy. *Int J Mol Sci.* 2023 Jan 12;24(2):1501. DOI: 10.3390/ijms24021501
- [96] Stakheev D, Taborska P, Kalkusova K, Bartunkova J, Smrz D. LL-37 as a powerful molecular tool for boosting the performance of ex vivo-produced human dendritic cells for cancer immunotherapy. *Pharmaceutics.* 2022 Dec 8;14(12):2747. DOI: 10.3390/pharmaceutics14122747
- [97] Findlay EG, Currie AJ, Zhang A, Ovcariikova J, Young L, Stevens H, et al. Exposure to the antimicrobial peptide LL-37 produces dendritic cells optimized for immunotherapy. *Oncoimmunology.* 2019;8(8):1608106. DOI: 10.1080/2162402X.2019.1608106
- [98] Guinan J, Lopez BS. Generating bovine monocyte-derived dendritic cells for experimental and clinical applications using commercially available serum-free medium. *Front Immunol.* 2020 Oct 16;11:591185. DOI: 10.3389/fimmu.2020.591185
- [99] Cunha P, Gilbert FB, Bodin J, Godry L, Germon P, Holbert S, et al. Simplified approaches for the production of monocyte-derived dendritic cells and study of antigen presentation in bovine. *Front Vet Sci.* 2022;9:891893. DOI: 10.3389/fvets.2022.891893
- [100] Calmeiro J, Mendes L, Duarte IF, Leitro C, Tavares AR, Ferreira DA, et al. In-depth analysis of the impact of different serum-free media on the production of clinical grade dendritic cells for cancer immunotherapy. *Front Immunol.* 2021 Feb 5;11:593363. DOI: 10.3389/fimmu.2020.593363
- [101] Svajger U. Human platelet lysate is a successful alternative serum supplement for propagation of monocyte-derived dendritic cells. *Cytotherapy.* 2017 Apr;19(4):486-99. DOI: 10.1016/j.jcyt.2017.01.005
- [102] Tesic N, Pekle Simonic I, Roskar K, Rozman P, Svajger U. Dendritic cells generated in the presence of platelet lysate have a reduced type 1 polarization capacity. *Immunol Invest.* 2020 Apr;49(3):215-31. DOI: 10.1080/08820139.2019.1624768
- [103] Datsi A, Sorg RV. Dendritic cell vaccination of glioblastoma: road to success or dead end. *Front Immunol.* 2021 Nov 2;12:770390. DOI: 10.3389/fimmu.2021.770390
- [104] Nelson NLJ, Zajd CM, Lennartz MR, Gosselin EJ. Fc γ receptors and toll-like receptor 9 synergize to drive immune complex-induced dendritic cell maturation. *Cell Immunol.* 2019 Nov;345:103962. DOI: 10.1016/j.cellimm.2019.103962
- [105] Zhang X, He T, Li Y, Chen L, Liu H, Wu Y, et al. Dendritic cell vaccines in ovarian cancer. *Front Immunol.* 2021 Jan 25;11:613773. DOI: 10.3389/fimmu.2020.613773
- [106] Rapp M, Grauer OM, Kamp M, Sevens N, Zotz N, Sabel M, et al. A randomized controlled phase II trial of vaccination with lysate-loaded, mature dendritic cells integrated into standard radiochemotherapy of newly diagnosed glioblastoma (GlioVax): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials.* 2018 May 25;19(1):293. DOI: 10.1186/s13063-018-2659-7
- [107] Westdorp H, Creemers JHA, van Oort IM, Schreibelt G, Gorris MAJ, Mehra N, et al. Blood-derived dendritic cell vaccinations induce immune responses that correlate with clinical outcome in patients with chemo-naïve castration-resistant prostate cancer. *J Immunother Cancer.* 2019 Nov 14;7(1):302. DOI: 10.1186/s40425-019-0787-6
- [108] Date I, Koya T, Sakamoto T, Togi M, Kawaguchi H, Watanabe A, et al. Interferon- α -induced dendritic cells generated with human platelet lysate exhibit elevated antigen presenting ability to cytotoxic T lymphocytes. *Vaccines (Basel).* 2020 Dec 24;9(1):10. DOI: 10.3390/vaccines9010010
- [109] Jarnjak-Jankovic S, Pettersen RD, Sæbøe-Larssen S, Wesenberg F, Olafsen MR, Gaudernack G. Preclinical evaluation of autologous dendritic cells transfected with mRNA or loaded with apoptotic cells for immunotherapy of high-risk neuroblastoma. *Cancer Gene Ther.* 2005 Aug;12(8):699-707. DOI: 10.1038/sj.cgt.7700820
- [110] Van Tendeloo VF, Ponsaerts P, Lardon F, Nijs G, Lenjou M, Van Broeckhoven C, et al. Highly efficient gene delivery by mRNA electroporation in human hematopoietic cells: superiority to lipofection and passive pulsing of mRNA and to electroporation of plasmid cDNA for tumor antigen loading of dendritic cells. *Blood.* 2001 Jul 1;98(1):49-56. DOI: 10.1182/blood.v98.1.49
- [111] Suso EM, Dueland S, Rasmussen AM, Vetrhus T, Aamdal S, Kvalheim G, et al. hTERT mRNA dendritic cell vaccination: complete response in a pancreatic cancer patient associated with response against several hTERT epitopes. *Cancer Immunol Immunother.* 2011 Jun;60(6):809-18. DOI: 10.1007/s00262-011-0991-9
- [112] Dorrie J, Schaft N, Schuler G, Schuler-Thurner B. Therapeutic cancer vaccination with ex vivo rna-transfected dendritic cells-an update. *Pharmaceutics.* 2020 Jan 23;12(2):92. DOI: 10.3390/pharmaceutics12020092
- [113] Joshi A, Tandel N, Tyagi P, Dalai SK, Bisen PS, Tyagi RK. RNA-loaded dendritic cells: more than a tour de force in cancer therapeutics. *Immunotherapy.* 2019 Sep;11(13):1129-47. DOI: 10.2217/imt-2019-0058
- [114] Saadeldin MK, Abdel-Aziz AK, Abdellatif A. Dendritic cell vaccine immunotherapy; the beginning of the end of cancer and COVID-19. A hypothesis. *Med Hypotheses.* 2021 Jan;146:110365. DOI: 10.1016/j.mehy.2020.110365
- [115] Diao L, Liu M. Rethinking antigen source: cancer vaccines based on whole tumor cell/tissue lysate or whole tumor cell. *Adv Sci (Weinh).* 2023 Aug;10(22):e2300121. DOI: 10.1002/advs.202300121
- [116] Dillman RO, Cornforth AN, McClay EF, Depriest C. Patient-specific dendritic cell vaccines with autologous tumor antigens in 72 patients with metastatic melanoma. *Melanoma Manag.* 2019 May 31;6(2):MMT20. DOI: 10.2217/mmt-2018-0010

- [117] Alspach E, Lussier DM, Miceli AP, Kizhvato I, DuPage M, Luoma AM, et al. MHC-II neoantigens shape tumour immunity and response to immunotherapy. *Nature*. 2019 Oct;574(7780):696-701. DOI: 10.1038/s41586-019-1671-8
- [118] Bayik D, Lathia JD. Cancer stem cell-immune cell crosstalk in tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2021 Aug;21(8):526-36. DOI: 10.1038/s41568-021-00366-w
- [119] Liao F, Zhang J, Hu Y, Najafabadi AH, Moon JJ, Wicha MS, et al. Efficacy of an ALDH peptide-based dendritic cell vaccine targeting cancer stem cells. *Cancer Immunol Immunother*. 2022 Aug;71(8):1959-73. DOI: 10.1007/s00262-021-03129-6
- [120] El-Ashmawy NE, Salem ML, Abd El-Fattah EE, Khedr EG. Targeting CD166⁺ lung cancer stem cells: Molecular study using murine dendritic cell vaccine. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2021 Oct 15;429:115699. DOI: 10.1016/j.taap.2021.115699
- [121] Acikgoz E, Duzagac F, Guven U, Yigiturk G, Kose T, Oktem G. "Double hit" strategy: removal of sialic acid from the dendritic cell surface and loading with CD44⁺/CD24⁻/low cell lysate inhibits tumor growth and metastasis by targeting breast cancer stem cells. *Int Immunopharmacol*. 2022 Jun;107:108684. DOI: 10.1016/j.intimp.2022.108684
- [122] Boudousquie C, Boand V, Lingre E, Dutoit L, Balint K, Danilo M, et al. Development and optimization of a GMP-compliant manufacturing process for a personalized tumor lysate dendritic cell vaccine. *Vaccines (Basel)*. 2020 Jan 14;8(1):25. DOI: 10.3390/vaccines8010025
- [123] Galletta L, Craven MJ, Meillere A, Crowley TM, Buchanan KL, Mariette MM. Acute exposure to high temperature affects expression of heat shock proteins in altricial avian embryos. *J Therm Biol*. 2022;110:103347. DOI: 10.1016/j.jtherbio.2022.103347
- [124] Kurien BT, Scofield RH. Autoimmunity and oxidatively modified autoantigens. *Autoimmun Rev*. 2008 Jul;7(7):567-73. DOI: 10.1016/j.autrev.2008.04.019
- [125] Kurien BT, Hensley K, Bachmann M, Scofield RH. Oxidatively modified autoantigens in autoimmune diseases. *Free Radic Biol Med*. 2006 Aug 15;41(4):549-56. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2006.05.020
- [126] Baust JG, Gage AA, Bjerklund Johansen TE, Baust JM. Mechanisms of cryoablation: clinical consequences on malignant tumors. *Cryobiology*. 2014 Feb;68(1):1-11. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2013.11.001
- [127] Len JS, Koh WSD, Tan SX. The roles of reactive oxygen species and antioxidants in cryopreservation. *Biosci Rep*. 2019 Aug 29;39(8):BSR20191601. DOI: 10.1042/BSR20191601
- [128] Chiang CLL, Kandalaf LE, Tanyi J, Hagemann AR, Motz GT, Svoronos N, et al. A Dendritic cell vaccine pulsed with autologous hypochlorous acid-oxidized ovarian cancer lysate primes effective broad antitumor immunity: from bench to bedside. *Clin Cancer Res*. 2013;19(17):4801-15. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1185
- [129] Xiang J, Wan C, Guo R, Guo D. Is hydrogen peroxide a suitable apoptosis inducer for all cell types? *Biomed Res Int*. 2016;2016:7343965. DOI: 10.1155/2016/7343965
- [130] Sun C, Wang H, Mao S, Liu J, Li S, Wang J. Reactive oxygen species involved in CT26 immunogenic cell death induced by *Clostridium difficile* toxin B. *Immunol Lett*. 2015 Apr;164(2):65-71. DOI: 10.1016/j.imlet.2015.02.007
- [131] Vo MC, Lee HJ, Kim JS, Hoang MD, Choi NR, Rhee JH, et al. Dendritic cell vaccination with a toll-like receptor agonist derived from mycobacteria enhances anti-tumor immunity. *Oncotarget*. 2015;6(32):33781-90. DOI: 10.18632/oncotarget.5281
- [132] Ueno H, Klechevsky E, Morita R, Asford C, Cao T, Matsui T, et al. Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol Rev*. 2007 Oct;219:118-42. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2007.00551.x
- [133] Unal A, Birekul A, Unal MC, Karakus E, Köker Y, Ozkul Y, et al. Dendritic cell production from allogeneic donor CD34⁺ stem cells and mononuclear cells; cancer vaccine. *Blood*. 2016;128(22):5723. DOI: 10.1182/blood.v128.22.5723.5723
- [134] Wang X, Guan F, Miller H, Byazrova MG, Cndotti F, Benlagha K, et al. The role of dendritic cells in COVID-19 infection. *Emerg Microbes Infect*. 2023 Dec;12(1):2195019. DOI: 10.1080/22221751.2023.2195019
- [135] Kim MK, Kim J. Properties of immature and mature dendritic cells: phenotype, morphology, phagocytosis, and migration. *RSC Adv*. 2019 Apr 10;9(20):11230-8. DOI: 10.1039/c9ra00818g
- [136] Calmeiro J, Carrascal MA, Tavares AR, Ferreira DA, Gomes C, Falcro A, et al. Dendritic cell vaccines for cancer immunotherapy: the role of human conventional type 1 dendritic cells. *Pharmaceutics*. 2020;12(2):158. DOI: 10.3390/pharmaceutics12020158
- [137] Cao H, Verg V, Martinache C, Leon A, Gorin NC, Bernard J, et al. Cryopreservation of dendritic cells grown in vitro from monocytes for their future clinical use. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2000 Dec;8(4):245-50.
- [138] Usero L, Miralles L, Esteban I, Pastor-Quicones C, Maleno MJ, Leal L, et al. Feasibility of using monocyte-derived dendritic cells obtained from cryopreserved cells for DC-based vaccines. *J Immunol Methods*. 2021;498:113133.
- [139] Hayden H, Friedl J, Dettke M, Sacht M, Hassler M, Dubsky P, et al. Cryopreservation of monocytes is superior to cryopreservation of immature or semi-mature dendritic cells for dendritic cell-based immunotherapy. *J Immunother*. 2009 Jul-Aug;32(6):638-54. DOI: 10.1097/CJI.0b013e3181a5bc13
- [140] Feuerstein B, Berger TG, Maczek C, Röder C, Schreiner D, Hirsch U, et al. A method for the production of cryopreserved aliquots of antigen-preloaded, mature dendritic cells ready for clinical use. *J Immunol Methods*. 2000 Nov 1;245(1-2):15-29. DOI: 10.1016/s0022-1759(00)00269-6

- [141] Shinde P, Khan N, Melinkeri S, Kale V, Limaye L. Freezing of dendritic cells with trehalose as an additive in the conventional freezing medium results in improved recovery after cryopreservation. *Transfusion*. 2019;59(2):686-96. DOI: 10.1111/trf.15028
- [142] Tuybaerts S, Noppe SM, Corthals J, Breckpot K, Heirman C, De Greef C, et al. Generation of large numbers of dendritic cells in a closed system using Cell Factories. *J Immunol Methods*. 2002 Jun 1;264(1-2):135-51. DOI: 10.1016/s0022-1759(02)00099-6
- [143] John J, Dalgleish A, Melcher A, Pandha H. Cryopreserved dendritic cells for intratumoral immunotherapy do not require re-culture prior to human vaccination. *J Immunol Methods*. 2005 Apr;299(1-2):37-46. DOI: 10.1016/j.jim.2004.12.014
- [144] Shahid MA, Kim WH, Kweon OK. Cryopreservation of heat-shocked canine adipose-derived mesenchymal stromal cells with 10% dimethyl sulfoxide and 40% serum results in better viability, proliferation, anti-oxidation, and in-vitro differentiation. *Cryobiology*. 2020 Feb 1;92:92-102. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2019.11.040
- [145] Kysielova H, Yampolska K, Dubrava T, Lutsenko O, Bondarovykh M, et al. Improvement of bone marrow mononuclear cells cryopreservation methods to increase the efficiency of dendritic cell production. *Cryobiology*. 2022 Jun;106:122-30. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2022.02.004
- [146] Lewalle P, Rouas R, Lehmann F, Martiat P. Freezing of dendritic cells, generated from cryopreserved leukaphereses, does not influence their ability to induce antigen-specific immune responses or functionally react to maturation stimuli. *J Immunol Methods*. 2000;240(1-2):69-78. DOI: 10.1016/s0022-1759(00)00173-3
- [147] Crapo PM, Medberry CJ, Reing JE, Tottey S, van der Merwe Y, Jones KE, et al. Biologic scaffolds composed of central nervous system extracellular matrix. *Biomaterials*. 2012 May;33(13):3539-47. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.01.044
- [148] Zhou Q, Zhang Y, Zhao M, Wang X, Ma C, Jiang X, et al. Mature dendritic cell derived from cryopreserved immature dendritic cell shows impaired homing ability and reduced anti-viral therapeutic effects. *Sci Rep*. 2016 Dec 13;6:39071. DOI: 10.1038/srep39071
- [149] Hu MC, Siegelman MH, Holzmann B, Crowe DT, Weissman IL. Lymphocyte homing receptors. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1992;57:291-308. DOI: 10.1101/sqb.1992.057.01.03
- [150] John J, Hutchinson J, Dalgleish A, Pandha H. Cryopreservation of immature monocyte-derived dendritic cells results in enhanced cell maturation but reduced endocytic activity and efficiency of adenoviral transduction. *J Immunol Methods*. 2003 Jan 15;272(1-2):35-48. DOI: 10.1016/s0022-1759(02)00430-1
- [151] Meijerink M, Ulluwishewa D, Anderson RC, Wells JM. Cryopreservation of monocytes or differentiated immature DCs leads to an altered cytokine response to TLR agonists and microbial stimulation. *J Immunol Methods*. 2011 Oct 28;373(1-2):136-42. DOI: 10.1016/j.jim.2011.08.010
- [152] Goltsev AN, Grischenko VI, Sirous MA, Lutsenko ED, Goltsev KA. Cryopreservation: an optimizing factor for therapeutic potential of fetoplacental complex products. *Biopreserv Biobank*. 2009 Mar;7(1):29-38. DOI: 10.1089/bio.2009.0701.ang
- [153] Goltsev A, Yampolska K, Kysielova H, Ostankov M, Dubrava T, Babenko N, et al. Cryopreservation as biotechnological application of dendritic cells in clinical practice. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2021;31(4):289-303. DOI: 10.15407/cryo31.04.289
- [154] Nishioka Y, Hiraio M, Robbins PD, Lotze MT, Tahara H. Induction of systemic and therapeutic antitumor immunity using intratumoral injection of dendritic cells genetically modified to express interleukin 12. *Cancer Res*. 1999 Aug 15;59(16):4035-41.
- [155] Krzastek SC, Goliadze E, Zhou S, Petrossian A, Youniss F, Sundaresan G, et al. Dendritic cell trafficking in tumor-bearing mice. *Cancer Immunol Immunother*. 2018 Dec;67(12):1939-47. DOI: 10.1007/s00262-018-2187-z
- [156] Yao W, Li Y, Zeng L, Zhang X, Zhou Z, Zheng M, et al. Intratumoral injection of dendritic cells overexpressing interleukin-12 inhibits melanoma growth. *Oncol Rep*. 2019 Jul;42(1):370-76. DOI: 10.3892/or.2019.7165
- [157] Fu C, Tian G, Duan J, Liu K, Zhang C, Yan W, et al. Therapeutic antitumor efficacy of cancer stem cell-derived DRibble vaccine on colorectal carcinoma. *Int J Med Sci*. 2021 Jul 23;18(14):3249-60. DOI: 10.7150/ijms.61510
- [158] Salem ML, Nassef M, Gomaa S, Essa I. Synergistic combination of murine bone marrow-derived dendritic cells loaded ex vivo with whole tumor lysate and systemic chemotherapy mediates antitumor immune responses in vivo. *Biomed Pharmacother*. 2017 Sep;93:286-95. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.06.046
- [159] Yurkovetsky ZR, Yurkovetsky GN. Trafficking of dendritic cells in the tumor environment. In: *Dendritic cells in cancer*. Shurin MR, Satler RD, editors. New York: Springer Science & Business Media; 2009. p. 347-63. DOI: 10.1007/978-0-387-88611-4_19
- [160] Castiello L, Aricri E, D'Agostino G, Santodonato L, Belardelli F. In situ vaccination by direct dendritic cell inoculation: the coming of age of an old idea? *Front Immunol*. 2019 Sep 25;10:2303. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02303
- [161] Chang H, Chew SWT, Zheng M, Lio DCS, Wiraja C, Mei Y, et al. Cryomicroneedles for transdermal cell delivery. *Nat Biomed Eng*. 2021 Sep;5(9):1008-18. DOI: 10.1038/s41551-021-00720-1
- [162] Chang H, Wen X, Li Z, Ling Z, Zheng Y, Xu C. Co-delivery of dendritic cell vaccine and anti-PD-1 antibody with cryomicroneedles for combinational immunotherapy. *Bioeng Transl Med*. 2022 Nov 27;8(5):e10457. DOI: 10.1002/btm2.10457

A.M. Goltsev^{1,2}, M.O. Bondarovich¹, Yu.O. Gaevska¹, T.G. Dubrava¹, N.M. Babenko¹, M.V. Ostankov¹

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, NAS of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

²Interdepartmental Research Center of Cryobiology and Cryomedicine, NAS of Ukraine, AMS of Ukraine and Ministry of Health of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

MODERN METHODS OF OBTAINING IMMUNE DENDRITIC CELLS WITH ANTI-TUMOR POTENTIAL

Dendritic cells (DCs) initiate and shape both innate and adaptive immune responses. They specialize in presenting antigens to naïve T cells, thereby directing T cell immune responses and contributing significantly to the maintenance of antitumor immunity. In both human and animal bodies, these cells are present in limited quantities, posing challenges in their procurement. Hence, the quest for obtaining DCs with antitumor properties *in vitro* from progenitor cells for clinical or experimental use remains pertinent. This research aims to consolidate existing studies on deriving immune DCs from progenitor cells for application in anticancer therapy. Analysis of published reports reveals that monocytes from peripheral blood, mononuclear cells from bone marrow, and cord blood can serve as precursor cells of immune DCs. Protocols for generating immature DCs from progenitor cells involve the addition of various combinations of cytokines to the culture, including granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-4, and other cytokines. The extensive range of cytokines and conditions influencing the differentiation and functional activity of DCs results in considerable heterogeneity in the phenotypic and functional characteristics of these cells. Sources of tumor antigen for DC-based vaccines encompass tumor lysates, individual tumor proteins, peptides, and tumor cells in a state of immunogenic apoptosis. This paper delves into the use of maturation factors and cryopreservation as integral stages in obtaining immune DCs. A comprehensive understanding of the parameters involved in obtaining immune DCs is imperative for the development of DC-based vaccines to unleash their full antitumor potential.

Keywords: dendritic cells; antigens; antitumor properties; cytokines; cryopreservation.