

VALSTYBINIS MOKSLINIŲ TYRIMŲ INSTITUTAS
INOVATYVIOS MEDICINOS CENTRAS

Neringa DOBROVOLSKIENĖ

***IN VITRO* MODULIUOTŲ DENDRITINIŲ LĄSTELIŲ
FUNKCINIŲ SAVYBIŲ TYRIMAS**

Daktaro disertacija,
Biomedicinos mokslų sritis, biologijos mokslo kryptis (01B)

Kaunas, 2016

UDK 576.3:616-006

Do-45

Mokslo daktaro disertacija rengta 2011–2015 metais Valstybiniame mokslinių tyrimų institute Inovatyvios medicinos centre ir Nacionaliniame vėžio institute Mokslinių tyrimų centre Imunologijos laboratorijoje pagal suteiktą Vytauto Didžiojo universitetui, Valstybiniam mokslinių tyrimų institutui Inovatyvios medicinos centrui, Gamtos tyrimų centrui, *Agder* universitetui ir Latvijos universitetui (2011 m. birželio 8 d., Nr. V-1019) doktorantūros teisę.

Mokslinis vadovas:

Dr. Vita Pašukonienė (Nacionalinio vėžio instituto Mokslinių tyrimų centras, biomedicinos mokslų sritis, biologija - 01 B)

Mokslinis konsultantas:

Dr. Marius Strioga (Nacionalinio vėžio instituto Mokslinių tyrimų centras, biomedicinos mokslų sritis, biologija - 01 B)

Lietuvių kalbą redagavo Gražina Pruskuvienė

ISBN 978-609-467-213-2

TURINYS

SANTRUMPOS.....	6
1. ĮVADAS.....	8
1.1. Problemos aktualumas.....	8
1.2. Darbo tikslas.....	9
1.3. Darbo uždaviniai.....	9
1.4. Ginamieji teiginiai.....	9
1.5. Darbo mokslinis naujumas ir reikšmė.....	10
2. LITERATŪROS APŽVALGA.....	11
2.1. Navikas ir imuninė sistema. Navikinis imunoredagavimas.	11
2.2. Priešvėžinio imuninio atsako efektoriai ir supresoriai.....	12
2.2.1. CD8 ⁺ T limfocitai.....	12
2.2.2. Th1/Th2/Th17 CD4 ⁺ ląstelės.....	13
2.2.3. Treg ląstelės – imuninio atsako supresoriai.....	14
2.3. Naviko mikroaplinka ir dendritinės ląstelės.....	16
2.3.1. Imunosupresinės molekulės.....	18
2.3.2. Mieloidinės kilmės supresinės ląstelės (MDSCs).....	19
2.3.3. Th2 ląstelės ir aliarminai.....	19
2.3.4. Inhibitorinių (slopinančių) ligandų ekspresija.....	20
2.4. Dendritinės ląstelės (DL).....	20
2.4.1. Žmogaus DL klasifikacija.....	21
2.4.2. DL brendimas.....	24
2.4.3. DL subrendimo faktoriai <i>in vivo</i>	25
2.4.4. Imunomoduliacinis DL potencialas.....	26
2.4.5. DL panaudojimas medicinoje. DL reikšmė gydant vėžį ir autoimunines ligas.....	27
2.5. Priešvėžinės DL vakcinos.....	28
2.5.1. DL išskyrimas iš periferinio kraujo vienbranduolių ląstelių (PKVL).....	30
2.5.2. DL įsotinimas naviko antigenais <i>ex vivo</i>	31
2.5.3. DL brandinimas <i>in vitro</i>	32
2.5.4. Citokinų brandinimo mišiniai.....	33
2.6. Bakteriniai adjuvantai.....	34
2.6.1. Lipopolisacharidas (LPS).....	35
2.6.2. Bakteriniai vaikuokliai (BGs).....	36
2.6.3. BGs vėžio imunoterapijoje.....	37

3. TYRIMO METODIKA IR TIRIAMIEJI.....	39
3.1. Tiriamieji.....	39
3.2. Tiriamųjų atrankos kriterijai.....	39
3.3. Tyrimo metodika.....	40
3.3.1. Tyrimo schema ir protokolai.....	41
3.4. Periferinio kraujo apdorojimas.....	43
3.5. Monocitų atskyrimas iš PKVL ir nesubrendusių DL gavimas.....	45
3.6. Navikinių ląstelių lizato paruošimas.....	46
3.7. DL brandinimas. I ir II brandinimo būdai.....	46
3.8. Ląstelių morfologinis įvertinimas.....	47
3.9. Ląstelių skaičiavimas ir gyvybingumo vertinimas.....	48
3.10. Ląstelių užšaldymas ir atšildymas.....	48
3.11. DL ir CD4 ⁺ limfocitų paviršiaus žymenų dažymas.....	49
3.12. CD4 ⁺ limfocitų viduląstelinio žymenų dažymas.....	49
3.13. Tėkmės citometrija.....	50
3.14. Treg ląstelių nustatymas CD4 ⁺ limfocitų populiacijoje.....	51
3.15. DL funkcinio aktyvumo įvertinimas (MLR).....	51
3.16. Magnetinis T limfocitų atskyrimas.....	53
3.17. CD3 ⁺ T limfocitų atskyrimas.....	55
3.17.1. CD3 ⁺ rūšiavimas į CD4 ⁺ ir CD8 ⁺ T limfocitus.....	55
3.18. Autologinių CD4 ⁺ T limfocitų stimuliacija ir restimuliacija subrendusiomis donorų dendritinėmis ląstelėmis.....	56
3.19. Fluorescuojančių rutuliukų metodas CBA	57
3.20. ELISA metodas.....	59
3.21. Statistiniai metodai.....	60
4. TYRIMO REZULTATAI.....	60
4.1. Tiriamųjų charakteristikos.....	60
4.1.1. Pacientų grupė.....	60
4.1.2. Savanorių donorų grupė.....	61
4.2. DL paviršinių žymenų raiškos analizė.....	62
4.2.1. Pacientų DL imunogeninių ir migracines savybes lemiančių žymenų analizė.....	62
4.2.2. Sveikų donorų DL imunogeninių žymenų raiškos analizė.....	64
4.2.3. Pacientų tolerogeninių žymenų raiškos analizė DL CD83 ^{high} ir CD83 ^{low} populiacijose.....	65

4.2.4. Sveikų donorų DL tolerogeninių žymenų raiškos analizė.....	67
4.3. Treg subpopuliacijų nustatymas CD4 ⁺ T limfocitų populiacijoje.....	68
4.4. DL funkcinio aktyvumo įvertinimas (MLR).....	70
4.5. DL sekretuojamų citokinų analizė.....	71
4.5.1. Citokinų IL-12p70 ir IL-10 sekrecijos įvertinimas pacientų DL.....	71
4.5.2. Citokinų IL-12p70, TNF- α , IL-1 β , IL-6 ir IL-10 sekrecijos įvertinimas sveikų donorų dendritinėse ląstelėse.....	72
4.6. Th1/Th2/Th17 imuninio atsako poliarizacijos įvertinimas sveikų donorų suaktyvintų CD4 ⁺ T limfocitų populiacijoje.....	76
5. REZULTATŲ APTARIMAS.....	78
6. IŠVADOS.....	83
7. PUBLIKACIJŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS.....	84
8. PRANEŠIMAI KONFERENCIJOSE.....	85
9. LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	86
10. PRIEDAI.....	102
11. PADĖKA.....	109

SANTRUMPOS

BGs (angl. *Bacterial Ghosts*) – bakteriniai vaiduokliai

CBA (angl. *cytometric bead array*) – fluorescuojančių rutuliukų metodas

CD (angl. *cluster of differentiation*) - leukocitų diferenciacijos antigenai

CD3^{high/low} (angl. *high* aukšta, gausi ar *low* žema, negausi CD3 molekulių raiška ląstelės paviršiuje

CD8^{high/low} (angl. *high* aukšta, gausi ar *low* žema, negausi CD8 molekulių raiška ląstelės paviršiuje

CD25^{high/low} (angl. *high* (aukšta, gausi) ar *low* (žema, negausi) CD25 molekulių raiška ląstelės paviršiuje

CTL - citotoksiniai T limfocitai

CTLA-4 (angl. *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) – su citotoksinais T limfocitais susijęs antigenas 4

CFSE (angl. *Carboxyfluorescein succinimidyl ester*) – karboksifluorescein sukcinimidil esteris

DAMPs (angl. *damage-associated molecular pattern molecules*) - su pažeidimu susijusios molekulinės struktūros

DL – dendritinė ląstelė

DLP – dendritinių ląstelių preparatas

DMSO (angl. *Dimethyl Sulfoxide*) – dimetilsulfoksidas

DNR (angl. *DNA deoxyribonucleic acid*) – deoksiribonukleorūgštis

ELISA (angl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) – imunofermentinė analizė

ELISPOT (angl. *Enzyme-Linked ImmunoSpot*) – imunofermentinis metodas

FBS (angl. *fetal bovine serum*) – fetalinis veršelio serumas

FoxP3 (angl. *forkhead box P3*) – forkhead/winged-helix šeimos transkripcijos faktorius

FSC (angl. *forward scatter*) – priekinė sklaida

GM-CSF (angl. *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) – granulocitų ir makrofagų kolonijas stimuliuojantis faktorius

HLA (angl. *human leukocyte antigens*) – 1. žmogaus leukocitų antigenai; 2. žmogaus pagrindinis audinių dermės kompleksas

IFN (-α,-β ar -γ) - alfa, beta ar gama interferonas

IL (-1,-1β,-2,-3,-4,-5,-6,-7,-8,-10,-12,-13,-17 ar -23) – interleukinai

KEAV - kraujagyslių endotelio augimo veiksnys

LPS (angl. *Lipopolysaccharides*) – lipopolisacharidas

MACS (angl. *magnetic-activated cell sorting*) - magnetinis ląstelių rūšiavimas

MDSCs (angl. *myeloid-derived suppressor cells*) - mieloidinės kilmės supresinės ląstelės

MHC I, II (angl. *major histocompatibility complex*) - pagrindinis audinių dermės kompleksas

MLR – mišrioji limfocitų reakcija

mo Ak – monokloninis antikūnas

mRNR (angl. *messenger ribonucleic acid*) – informacinė ar matricinė ribonukleorūgštis

NK ląstelė (angl. *natural killer*)– natūralus žudikas

NKT (angl. *natural killer T cells*) – T ląstelės žudikės

PAMPs (angl. *pathogen-associated molecular patterns*) - su patogenų susijusios molekulinės struktūros

pAPL – profesionali antigeną pateikianti ląstelė

PBS (angl. *phosphate-buffered saline*) - fosfatinis buferinis tirpalas

PGE₂ (angl. *prostaglandin E2*) – prostaglandinas E2

PKVL (angl. *PBMC peripheral blood mononuclear cells*) - periferinio kraujo vienbranduolės ląstelės

Poly I:C (angl. *polyinosinic:polycytidylic acid*) - policitidilo rūgštis

SK-MEL 28 – melanomos ląstelių linija

SSC (angl. *side scatter*) – šoninė sklaida

TAA (angl. *tumor-associated antigens*) – su naviku susiję antigenai

Th (angl. *T helper cells*) (-1,-2 ar -17) - T ląstelių pagalbininkų tipai

TGFβ (angl. *transforming growth factor*) – transformuojantis augimo veiksnys beta

TNF (-α arba -β) (angl. *tumor necrosis factor*) – alfa arba beta navikų nekrozės veiksnys

Treg (angl. *regulatory T cells*) – T reguliacinės ląstelės

1. ĮVADAS

1.1. Problemos aktualumas

Naujausi imuninės sistemos ir vėžio tyrimai parodė, jog navikas sugeba išvengti imuninės sistemos priežiūros. Navikas suformuoja sau palankią, imuninę sistemą slopinančią mikroaplinką, užkirsdamas kelią efektyviai atpažinti naviko antigenus, slopindamas efektorines imuninės sistemos ląsteles ir panaudodamas imuninės sistemos mechanizmus tolerancijai jo atžvilgiu išvystyti ir palaikyti. Todėl gydant vėžį yra svarbu įveikti imuninės sistemos slopinimą ir atkurti efektyvų specifinį priešvėžinį atsaką [1]. Pastaruoju metu taikomos vis naujesnės ir pažangesnės gydymo strategijos, tokios kaip taikinių terapija ar imunoterapija, kurių tikslas yra atstatyti vėžio išbalansuotą imuninę sistemą bei perprogramuoti priešvėžinį imuninį atsaką iš vėžį „pripažįstančios“ (tolerogeninės) būsenos į vėžį naikinančią (imunogeninę) būseną.

Vis daugiau dėmesio sulaukia sparčiai besivystanti navikų imunoterapijos rūšis - specifinė aktyvi imunoterapija (arba gydomoji vakcinacija nuo vėžio) dendritinių ląstelių preparatais (DLP). Šių vakcinų pagrindinis tikslas – sustiprinti ir nukreipti imuninį atsaką prieš organizme jau esantį vėžį. Dėl savo unikalių savybių dendritinės ląstelės (DL) idealiai tinka gydomajai vakcinacijai. Klinikiniuose tyrimuose atsakas į gydymą vakcinomis pasiekiamas vidutiniškai 54 % pacientų [2]. Akivaizdu, jog reikiamas vakcinų efektyvumas dar nėra pasiektas, todėl norint jį pagerinti, svarbu nustatyti optimalias vakcinavimui naudojamų dendritinių ląstelių moduliavimo *in vitro* sąlygas, kuriomis paruoštos autologinės dendritinės ląstelės sugebėtų sukelti ilgalaikį specifinį imuninį atsaką prieš vėžį. Yra daug veiksnių, darančių įtaką DL sąveikai su imunine sistema bei sukeliančių veiksmingą imuninį atsaką. Naudojant skirtingus DL stimuliacijos (brandinimo) būdus, pasiekama skirtinga imuninės sistemos sužadavimo būseną. Norint gauti efektyvias subrendusias DL, svarbu sukurti ir optimizuoti DL, kurios užtikrintų maksimalų priešvėžinį imuninį atsaką, gamybos strategijas bei, taikant inovatyvius DL brandinimo metodus, atrasti veiksmingiausius iš jų. Pagamintas DLP turėtų būti detalčiai charakterizuotas. Į DLP kokybės vertinimo kriterijus turėtų būti įtrauktas ne tik kompleksinis DL imunogeninį ir tolerogeninį potencialą atspindinčių žymenų vertinimas, bet ir DL bei CD4⁺ ir CD8⁺ limfocitų funkcinės savybės apibūdinantys parametrai (mišrioji limfocitų reakcija (MLR), citokinų sekrecija). Norint efektyviai pritaikyti DLP klinikinėje priešvėžinėje terapijoje, be išvardytų rodiklių, ateityje dar reikėtų atlikti papildomus DL funkcinį potencialą atspindinčius CD8⁺ limfocitų paviršiaus žymenų, chemokinių bei citokinų sekrecijos tyrimus. DL imunoterapija turėtų būti taikoma kiekvienam asmeniui individualiai, sudarant individualų vakcinacijos grafiką bei parenkant dozes.

Taigi, šio darbo paskirtis – palyginti skirtingais būdais *in vitro* moduluotų dendritinių ląstelių preparatų imunogenines ir tolerogenines savybes, ištirti jų funkcinį aktyvumą ir imunomoduliacinį potencialą, įvertinti, kurios brandinimo sąlygos ir koks brandinimo laikas yra optimaliausi imunogeniniams preparatams sukurti, bei nustatyti DLP kokybės vertinimo kriterijų kompleksą.

1.2. DARBO TIKSLAS

Nustatyti optimaliausią imunogeniškų priešvėžinių dendritinių ląstelių gamybos būdą ir sudaryti DLP kokybės vertinimo kriterijus.

1.3. DARBO UŽDAVINIAI

1. Nustatyti dendritinėms ląstelėms brandinti naudojamų brandinimo mišinių įtaką DL imunogeniškumą ($CD80^+$, $CD83^+$, $CD86^+$, $HLA-DR^+$, $CD197/CCR7^+$) ir tolerogeniškumą ($CD85k^+$, $CD273^+$, $CD274^+$) atspindinčių žymenų raiškai.
2. Nustatyti bakterinių adjuvantų (LPS ir BGs) įtaką *in vitro* moduluotiems priešvėžiniams imunogeniniams DLP gauti.
3. Sudaryti DLP kokybės vertinimo kriterijų kompleksą.

1.4. GINAMIEJI TEIGINIAI

1. DL brandinimas LPS/IFN- γ mišinyje yra pranašesnis už brandinimą TNF- α , IL-1 β , IL-6 ir PGE₂ mišinyje dėl didesnės DL imunogeninių žymenų raiškos.
2. DL brandinimas naudojant bakterinį adjuvantą BGs sąlygoja mažiausią tolerogeninių žymenų raišką DL.
3. Pagamintų imunogeninių DLP kokybei įvertinti neužtenka nustatyti vien tik standartinių DL aktyvumą atspindinčius žymenis, būtina nustatyti ir jų imunogeniškumą bei tolerogeniškumą apibūdinančius žymenis.

1.5. DARBO MOKSLINIS NAUJUMAS IR REIKŠMĖ

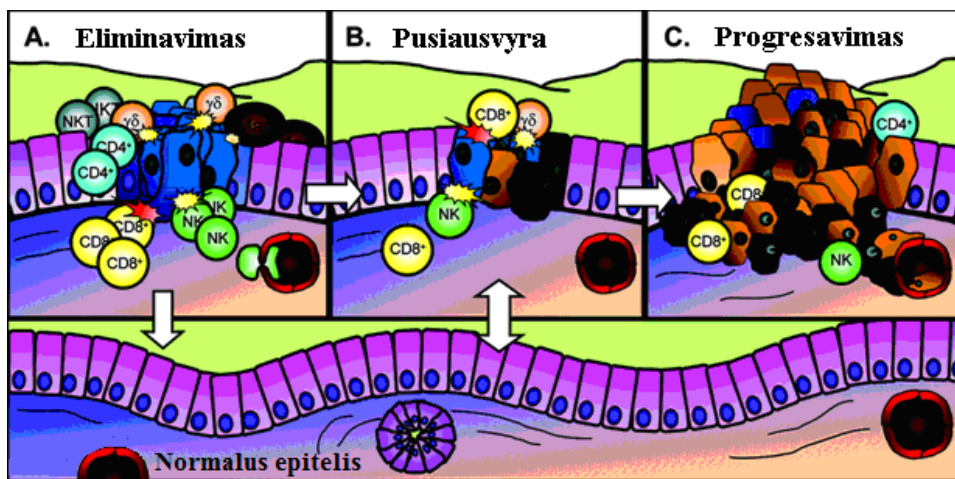
Pirmą kartą šiame darbe kompleksiškai įvertintas *in vitro* moduluotų dendritinių ląstelių imunogeninis ir tolerogeninis potencialas bei funkcines savybes atspindinti citokinų sekrecija. Pirmą kartą žmogaus dendritinių ląstelių gamyboje buvo panaudotas naujos kartos produktas – bakterinis adjuvantas (BGs), kuris dėl savo savybių (navikinių antigenų pernešimo ir brandinimo inicijavimo) tyrime naudotas atliekant vienos pakopos DL brandinimą. Įvertinus DL imunogeninį bei tolerogeninį potencialą, ateityje būtų galima patentuoti *in vitro* moduluotų DL imunogenines ir tolerogenines savybes atspindinčių parametrų rinkinį.

2. LITERATŪROS APŽVALGA

2.1. Navikas ir imuninė sistema. Navikinis imunoredagavimas

Idėją, kad imuninė sistema gali atpažinti ir sunaikinti navikines ląsteles, 1909 metais pirmasis paskelbė *P. Erlich*. Kadangi ši teorija nebuvo pagrįsta eksperimentiniais tyrimais, didelio susidomėjimo nesulaukė. Vėliau, XX a. viduryje, priešnavikinio imuniteto hipotezę paskelbė australų imunologas *M. Burnet* ir amerikiečių gydytojas *L. Thomas*. Savo atradimuose jie teigė, kad viena pagrindinių imuninės sistemos funkcijų – atpažinti ir sunaikinti genetiškai pakitusias organizmo ląsteles dar prieš joms išsivystant į navikus. Nuo teorijos paskelbimo praėjus 20 metų, ši hipotezė taip pat buvo atmesta dėl neteisingai pasirinkto eksperimentinio modelio (naudotos imunodeficitinės (neturinčios čiobrialiaukės) CBA/H pelės), nes nebuvo pastebėta ryšio tarp imunosupresijos ir spontaninių ar chemiškai sukeltų navikų.

Dabartinė vėžio imunologijos teorija, pagrįsta klinikiniais ir eksperimentiniais įrodymais, susiformavo po 2003-ųjų metų. Šios teorijos autoriai amerikiečiai *G. Dunn*, *L. Old* ir *R. Schreiber*. Ši teorija remiasi koncepcija, kad tiek imuninė sistema, tiek navikas aktyviai dalyvauja onkogenezės procese, ir ši sąveika kinta, priklausomai nuo augančio bei plintančio naviko. Naviko-imuninės sistemos tarpusavio sąveika pereina tris pagrindinius etapus: (A) imuninė sistema kovoja prieš naviką - navikinių ląstelių sunaikinimas (angl. *Elimination*); (B) pusiausvyra tarp naviko augimo ir imuninės sistemos poveikio navikinėms ląstelėms (angl. *Equilibrium*); (C) navikinių ląstelių pabėgimas (naviko progresavimas) nuo imuninės sistemos priežiūros (angl. *Evasion*).



1 pav. Naviko ir imuninės sistemos tarpusavio sąveika

3E koncepcija – sunaikinimas (angl. *Elimination*), pusiausvyra (angl. *Equilibrium*) ir progresavimas (angl. *Evasion*). Imuninei sistemai naviką sunaikinus tiek A, tiek B etapuose, epitelinis audinys iš navikinio vėl gali virsti normaliu (modifikuota pagal Gavin P. Dunn et al, 2004)

[3]. Šie etapai vadinami naviko imuninės sistemos redagavimu. Jeigu organizme atsiradusias pakitusias ląsteles sunaikina įgimto ir įgyto imuniteto komponentai (NK ląstelės, makrofagai, citotoksiniai T limfocitai), tai šis procesas baigiasi navikinių ląstelių pašalinimu (sunaikinimu). Jeigu imuninei sistemai nepavyksta sunaikinti navikinių ląstelių, tarp likusių piktybinių navikinių ląstelių ir imuninės sistemos efektorių komponentų nusistovi pusiausvyra. Šiuo etapu vyksta naviko sukeltų specifinių priešnavikinių reakcijų slopinimas, navikinių antigenų toleravimas, reguliacinių supresinių ląstelių stimuliacija. Laikui bėgant, navikinėse ląstelėse kaupiasi mutacijos ir susiformuoja tokie ląstelių klonai, kurių imuninė sistema jau negali kontroliuoti – prasideda naviko progresavimas ir klinikinis naviko formavimasis. Navikas plinta dėl navikinių ląstelių, atsparių imuninės sistemos efektoriams, mažo imunogeniškumo. Vėžio imunologijos esmė ir tikslas – tobulinti ir plėsti vėžio imunologinės ir biologinės terapijos galimybes.

2.2. Priešvėžinio imuninio atsako efektoriai ir supresoriai

2.2.1. CD8⁺ T limfocitai

CD8 T limfocitai yra pagrindiniai efektyvaus imuninio priešvėžinio atsako efektoriai. CD8⁺ citotoksinių T limfocitų (CTL) infiltracija naviko mikroaplinkoje teigiamai koreliuoja su ilgesniu vėžio pacientų išgyvenamumu [4]. Kai DL savo MHC I molekulėse pateikia su naviku susijusių antigenų peptidus CD8⁺ T limfocitams bei duoda jiems kostimuliacinius signalus, šie subręsta ir tampa efektoriniais CTL [5]. Manoma, jog CTL vaidmuo priešvėžiniuose imuniniuose atsakuose yra svarbiausias, naviko antigenams specifinės CTL pasižymi gebėjimu tiesiogiai naikinti naviko ląsteles. Kai CTL atpažįsta naviko ląstelės ekspresuojamą antigeną, jis į sąveikos vietą išskiria citotoksines granules, kuriose yra ląstelės žūtį sukelianti serino proteazė – granzimas, bei poras ląstelės membranoje formuojantis baltymas perforinas, leidžiantis granzimui patekti į ląstelės taikinio vidų ir sukelti apoptozę [6]. Išplitusio vėžio atveju, veikiami imunosupresinės naviko aplinkos, CTL negali vykdyti savo funkcijų, yra blokuojami [7].

Po CD8⁺ T limfocitų sąveikos su antigenu ir buvusio atsako, susidaro ne tik CTL, bet ir kita T ląstelių populiacija – CD8⁺ atminties ląstelės. Jos yra ypač svarbios priešvėžinio imuninio atsako efektyvumui, kadangi, pakartotinai susidūrusios su antigenu, ima greitai reaguoti ir suformuoja naują efektorinių ląstelių antplūdį į naviko mikroaplinką [8]. Pastebėta, jog kuo daugiau vietiška yra išplitęs navikas, tuo mažiau jame aptinkama naviką infiltruojančių CD8⁺ atminties ląstelių [9].

2.2.2. Th1/Th2/Th17 CD4⁺ ląstelės

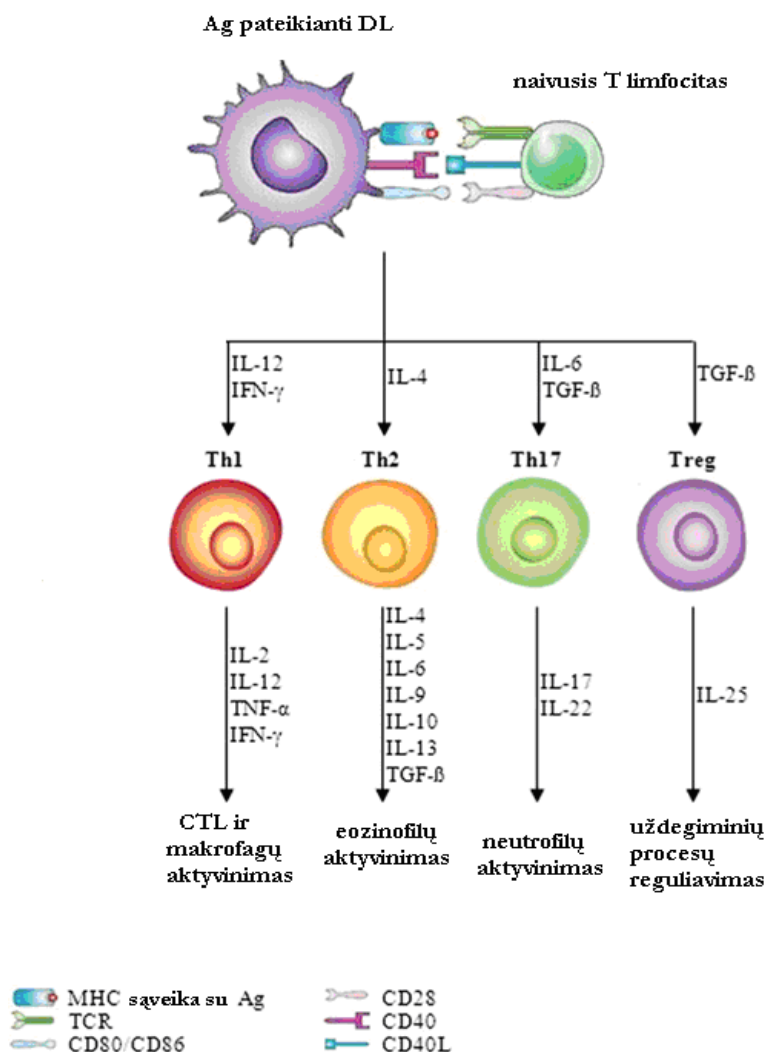
CD4⁺ T ląstelės yra labai svarbios atliekant pagrindinį vaidmenį, kai vyksta imuninio atsako reguliavimas. Naivieji CD4⁺ T limfocitai tampa aktyvūs po antigeno ir MHC (angl. *major histocompatibility complex*) komplekso, kurį pateikia profesionalios antigeną pateikiančios dendritinės ląstelės, sąveikos ir diferencijuojasi į skirtingus Th (angl. *T helper cells*) potipius, priklausomai nuo mikroaplinkoje esančių citokinų ir sąveikos su antigeną pateikiančiomis ląstelėmis. Pagal citokinų sekreciją efektorinės CD4⁺ ląstelės dažniausiai yra skirstomos į Th1 (angl. *T helper cells 1*), Th2 (angl. *T helper cells 2*), Th17 (angl. *T helper cells 17*), Treg (angl. *regulatory T cells*) ląsteles (2 pav.). CD4⁺ poliarizacijos pobūdis priklauso nuo antigeno, sukėlusio DL brendimą, pobūdžio bei brendimo sąlygų.

Aktyvintų DL išskirti IL-2 (interleukinas 2), IL-12 (interleukinas 12), IFN- γ (interferonas gama), TNF- α (navikų nekrozės faktorius alfa) citokinai, sukelia Th1 CD4⁺ limfocitų poliarizaciją. Šie limfocitai geba aktyvuoti CD8⁺ T limfocitus, stimuliuoja NK ląstelių citotoksines funkcijas ir skatina MHC molekulių raišką ant antigeną pateikiančių ląstelių [11,12]. Manoma kad CD4⁺ limfocitų palaikomame priešvėžiniame imunitete svarbiausią vaidmenį atlieka Th1 tipo imuniniai atsakai [10]. Yra pastebėta, jog Th1 ląstelės ir jų produkuojami citokinai koreliuoja su geromis klinikinėmis prognozėmis [9]. Th1 ląstelių gaminamas IFN- γ taip pat tiesiogiai slopina Th2 populiacijos ląstelių proliferaciją ir tolimesnę diferenciaciją [13]. Tai prisideda prie priešvėžinio imuniteto formavimosi.

Priešuždegiminiai citokinai IL-10 (interleukinas 10), IL-13 (interleukinas 13), IL-4 (interleukinas 4) slopina IFN- γ ir IL-2 sekreciją Th1 ląstelėse, Th1 tolimesnę diferenciaciją, IL-12 sekreciją antigeną pateikiančiose ląstelėse (APL). IL-10 slopina DL ir makrofagų aktyvinimo mechanizmus (tarpininkaujant TLR (T limfocitų receptorius) ir IFN- γ), skatina APL funkcijas blokuojančių genų raišką [13,14]. Padidėję Th2 sekretuojamų IL-4, IL-5 (interleukinas 5), IL-6 (interleukinas 6), IL-10, IL-13 citokinų kiekiai daugeliu atvejų yra susiję su agresyviais navikais [9].

Th17 ląstelės, kurių pagrindinis gaminamas citokinas yra IL-17 (interleukinas 17), buvo identifikuotos pakankamai neseniai – 2005 metais [15]. Nors ir vykdoma nemažai tyrimų, kurių metu siekiama nustatyti šių ląstelių reikšmę vėžio kontekste, Th17 imuninio atsako tipo funkcijos lieka gana kontroversiškos. Skirtingo tipo ir lokalizacijos navikų mikroaplinką infiltruojančioms Th17 ląstelėms gali pasižymėti skirtingais veikimo mechanizmais. Th17 būdingi priešvėžiniai mechanizmai apima IFN- γ sekreciją bei chemokinų receptorių raiškos skatinimą, dėl kurio į naviko mikroaplinką sutelkiamos efektorinės ląstelės (DL, CTL, NK (angl. *natural killer*)) [16]. Jų gaminamas IL-17 taip pat skatina aplinkines ląsteles išskirti uždegiminius citokinus, tokius kaip TNF- α , IL-1 (interleukinas 1), IL-6 [13], tačiau taip pat gali skatinti

kraujagyslių endotelio augimo veiksnio (KEAV), PGE₂ (prostaglandinas E2) gamybą ir taip prisidėti prie naviko angiogenezės [16].



2 pav. Dendritinių ląstelių ir T limfocitų sąveika

Priklausomai nuo fagocituotų antigenų bei brendimo sąlygų dendritinės ląstelės gali sukelti skirtingos poliarizacijos limfocitų populiacijų proliferaciją (modifikuota pagal Katrin Manda et al, 2012).

2.2.3. Treg ląstelės – imuninio atsako supresoriai

Dar viena ypač svarbi imuninės sistemos tolerancijai naviko atžvilgiu susidaryti ląstelių populiacija yra T reguliacinės ląstelės (Treg). CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg ląstelės yra CD4 T ląstelių subpopuliacija, kuri slopina imuninį atsaką. Treg limfocitai sudaro 5–15 % visų CD4⁺ limfocitų. CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg limfocitai palaiko supresinę aplinką bei slopina priešnavikinį imuninį atsaką. Jie ekspresuoja inhibitorinius (slopinančius) receptorius CTLA-4 (angl. *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*), PD-1 (angl. *programmed cell death protein 1*) ir Tim-3 baltymą [17]. Kai kurie tyrimai rodo, kad Treg per CTLA-4 gali sukelti DL

kostimuliacinių molekulių (CD80, CD86) raiškos sumažėjimą [18], be to, sekretuodami du pagrindinius imunosupresinius citokinus IL-10 ir TGF- β (angl. *transforming growth factor*), gali slopinti tiek specifinių efektorinių T limfocitų, tiek įgimto imuniteto NK ląstelių aktyvumą.

Tyrimai taip pat parodė, kad įvairių navikų (kepenų ląstelių karcinomos, kiaušidžių, krūties, kepenų ir skrandžio navikų, melanomos) mikroaplinkoje yra padidėjęs naviką infiltravusių Treg ląstelių skaičius [19-21]. Naviką infiltravusios Treg ląstelės blokuoja priešvėžinį imuninį atsaką, slopindamos T efektorinių ląstelių aktyvinimą ir proliferaciją [22]. Treg tam naudoja tris pagrindinius mechanizmus: 1) ląstelės – ląstelės kontaktų blokavimą, 2) citolizės slopinimą, 3) imuninę sistemą slopinančių faktorių sekreciją [23]. Pagrindiniai Treg sekretuojami citokinai yra **TGF- β** ir **IL-10** [24]. TGF- β yra daugiafunkcinis imuninę sistemą slopinantis citokinas, IL-2 antagonistas, kuris skatina vėžio plitimą, stimuliuodamas epitelinį-mezenchiminį virsmą, naviko invaziją ir metastazių formavimąsi [12]. TGF- β taip pat veikia slopindamas Th2 ir priešvėžiniam imunitetui ypač svarbių Th1 ląstelių diferenciaciją [25]. Neseniai atliktame tyrime buvo nustatyta koreliacija tarp laipsniškai didėjančio Th17 ir Treg ląstelių kiekio skrandžio navikų mikroaplinkoje ir ligos progresavimo. Treg ląstelės skatino naviko augimą padėdamos jam išvengti imuninės sistemos priežiūros savo išskiriamu TGF- β , kuris savo ruožtu skatino tolesnę Treg ir Th17 ląstelių diferenciaciją ir proliferaciją [26]. Tradiciškai imunofenotipiškai Treg ląstelės apibūdinamos kaip CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ ląstelės. Papildomi žymenys, naudojami identifikuoti Treg, yra CD39, CD127 [27].

CD4 yra 55 kDa glikoproteinas, išskiriamas daugiausia ant Th ląstelių paviršiaus. Jis yra TLR koreceptorius, dalyvaujantis atpažįstant antigenus, pateikiamus MHC II molekulėse [28]. Sąveikaudamas su invariantinėmis MHC II grandinėmis, CD4 stabilizuoja TLR-peptido-MHC II kompleksą [29].

CD25 yra IL-2 receptoriaus IL-2R α grandinė. IL-2R gali egzistuoti kaip dviejų skirtingų formų receptoriaus: kaip žemo afiniškumo dimerinis receptoriaus, sudarytas iš CD122 ir γ c subvieneto (angl. *common gamma chain*), bei kaip trimerinis aukšto afiniškumo receptoriaus, kurį sudaro CD122, γ c bei CD25, ir kuris yra būdingas daugiausia Treg ląstelėms. Būtent aukšta CD25 ekspresija ant Treg paviršiaus lemia didelį ląstelių jautrumą IL-2. Pastarojo sąveika su IL-2R yra svarbi Treg homeostazei, jų išgyvenamumui užtikrinti ir per FOXP3 ir CD25 vykdomoms imuninę sistemą slopinančioms funkcijoms atlikti [30].

FOXP3 baltymas, dar žinomas kaip skurfinas, priklauso *forkhead/winged* transkripcijos faktorių šeimai. Jam būdingas konservatyvus FKH domenas, esantis baltymo C gale ir skirtas sąveikai su DNR [31]. FOXP3 ekspresuojamas ant CD4⁺CD25⁺ Treg ląstelių ir yra būtinas šioms ląstelėms vystytis bei vykdyti slopinančias funkcijas [32]. Pastaraisiais metais parodyta, jog, be imuninei sistemai svarbių genų transkripcijos reguliacijos, FOXP3 gali turėti ir kitų

funkcijų, kadangi pastebėta jo raiška ir ant ne-hemopoetinės kilmės ląstelių, pavyzdžiui ant naviko epitelinių ląstelių. Manoma, kad FOXP3 ant naviko ląstelių gali būti susijęs su metastazių formavimusi [33].

CD127 yra IL-7 (interleukinas 7) receptoriaus IL-7R α grandinė. IL-7 yra svarbus periferinių $CD4^+$ ir $CD8^+$ T ląstelių homeostazei ir išgyvenimui, jis palaiko reguliuodamas molekulių, atsakingų už mitochondrinio apoptozės kelio blokavimą, raišką [34] bei skatindamas gliukozės metabolizmą [35]. *Yu* ir bendradarbiai parodė, jog Treg ląstelėse CD127 receptoriaus raiška neigiamai koreliuoja su FOXP3 transkripcijos faktoriaus raiška, bei kad $CD4^+CD25^+CD127^{low/-}$ ląstelės pasižymi aukščiausia FOXP3 raiška, todėl Treg ląstelės gali būti identifikuojamos pagal $CD4^+CD25^+CD127^{low/-}$ fenotipą [36].

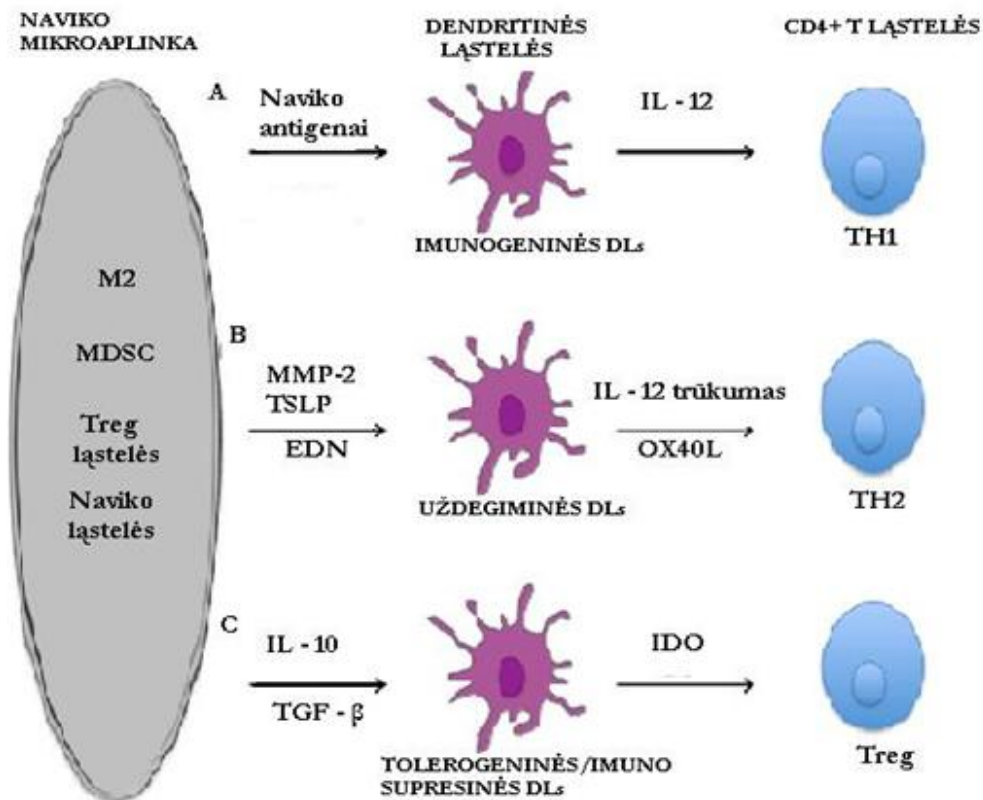
CD39 yra paviršiaus baltymas, kuris veikia kaip ektonukleozido trifosfato difosfohidrolazė (ENTPD1), kitaip dar – ektonukleotidazė (angl. *ecto-nucleotidase*). Tai ląstelės išorėje veikiantis fermentas, kuris hidrolizuoja ATP (adenozino trifosfatas) į ADP (adenozino difosfatas) ir AMP (adenozino monofosfatas). Tokiu būdu CD39 inicijuoja reakcijų kaskadą, kurios metu užląstelinis imunostimuliacinėmis savybėmis pasižymintis ATP yra paverčiamas į imuninę sistemą slopinamai veikiantį adenosiną [37], gebantį modifikuoti $CD4^+$, $CD8^+$ T ir NK ląstelių priešvėžinius atsakus. CD39-adenozino reakcijų kelias ypač svarbus mechanizmas, kuriam pasireiškus Treg ląstelės atlieka imuninę sistemą slopinančias funkcijas [38]. Aukšta CD39 raiška Treg ląstelėse nustatyta galvos ir kaklo vėžiu sergančiuose pacientuose [39]. Kadangi tyrimai rodo, jog norint nustatyti Treg ląsteles vien $CD4$, $CD25$ ir FOXP3 žymenų kombinacijos gali nepakakti, kartu su jais bei CD127 [40] siekiant tiksliau identifikuoti Treg ląsteles, naudotinas CD39 žymuo, nes būtent jis susijęs su stipriomis Treg ląstelių imuninę sistemą slopinančiomis savybėmis [41].

2.3. Naviko mikroaplinka ir dendritinės ląstelės

Nepaisant to, kad daugeliui pacientų navikui specifinis T ląstelių atsakas sužadinamas, tačiau terapinis DL vakcinų poveikis nėra ilgalaikis. Viena iš priežasčių – imunines reakcijas slopinantis naviko mikroaplinkos poveikis. Norint geriau suprasti, kaip navikas aplink esančias ląsteles panaudoja idant išvengtų imuninės sistemos, reikia detaliau patyrinėti naviko mikroaplinką.

Naviką sudaro ne tik vėžinės ląstelės. Kad galėtų egzistuoti, navikui labai svarbu sukurti apie save tam tikrą mikroaplinką, užtikrinančią jam mitybą, bei visus faktorius, reikalingus sparčiai augti piktybinėms ląstelėms. Augdamas navikas apie save formuoja jungiamąjį audinį, kraujagyslių bei imuninį barjerą sudarančių ląstelių tinklą. Šioje aplinkoje esantys fibroblastai, makrofagai, limfocitai, dendritinės ląstelės naudojamos naviko išskiriamus citokinus bei

fermentus sukelia stiprų imunines reakcijas slopinantį barjerą. Naviko mikroaplinkos ląstelių sukeliama pronavikiniai mechanizmai slopina ir *ex vivo* paruoštų dendritinių ląstelių vakcinų efektyvumą (3 pav.). (A) Naviko antigenai turėtų sukelti brendimą imunogeninių DL, kurios aktyvinimo metu išskirtų didelius kiekius IL-12. IL-12 sustiprina NK ląstelių ir Th1 efektorių citotoksinį aktyvumą bei stimuliuoja T ir NK ląstelių išskiriamą (interferono-gama IFN- γ ir naviko nekrozės faktoriaus – alfa TNF- α) gamybą. (B) Naviko bei jo aplinkos supresinių ląstelių (II tipo su naviku susiję makrofagai M2, mieloidinės kilmės supresinės ląstelės MDSC ir Treg) išskiriami aliarminai (užkrūčio liaukos stromos limfopoetinas, eozinofilinės kilmės neurotoksinas ir matrikso metalo proteinazė 2) aktyvina uždegiminių DL formavimąsi ir Th2 limfocitų poliarizaciją. (C) Naviko bei jo aplinkos supresinių ląstelių išskiriami imunosupresiniai citokinai citokinai IL - 10 ir TGF - β stimuliuoja nesubrendusių/tolerogeninių/imunosupresinių DL formavimąsi ir viso priešnavikinio imuniteto atsako slopinimą. T limfocitai efektoriniai, aktyvinti imunogeninių DL, turėtų atpažinti ir sunaikinti navikines ląsteles. Tačiau imunosupresinių Treg ląstelių, mieloidinės kilmės supresinių ląstelių (MDSC) bei navikinių ląstelių sekretuojami citokinai TGF – β , IL – 10 ir aliarminai gali išreguluoti DL funkcijas ir apriboti T limfocitų efektorių funkcijas.



3 pav. Galimas naviko mikroaplinkos mechanizmų poveikis DL aktyvinimui ir T limfocitų poliarizacijai

A – naviko Ag sukeliamas Th1 priešnavikinis atsakas; B – uždegiminės aplinkos sąlygotas Th2 atsakas; C – imunines reakcijas slopinantis Treg atsakas (modifikuota pagal A. Gallois and N. Bhardwaj, 2013).

Imunoterapija, skatinanti priešnavikines imunines reakcijas, išlieka perspektyvi, tačiau, norint efektyviai gydyti vėžį, būtina kuo daugiau ištirti naviko ir paciento, naviko mikroaplinkos dėsningumus bei molekulinis mechanizmus ir juos panaudoti imunobiologinėje taikinių terapijoje.

2.3.1. Imunosupresinės molekulės

Kai kurie naviko išskiriami TGF- β , M-CSF (makrofagų kolonijas stimuliuojantis faktorius), GM-CSF (granulocitų ir makrofagų kolonijas stimuliuojantis faktorius), IL-6, IL-10 citokinai ir IDO (angl. *Indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase*) / TDO (angl. *tryptophan 2,3-dioxygenase*) fermentai neigiamai veikia DL funkcijas. Navikinių ląstelių išskiriamas TGF- β gali skatinti nesubrendusių DL tolerogenines funkcijas, stimuliuoti T reguliacinių ląstelių, MDSC ląstelių bei M2 makrofagų kaupimąsi naviko mikroaplinkoje [42]. Citokinai IL-6 ir GM-CSF keičia monocitų diferenciaciją: monocitai diferencijuojasi į makrofagus, o ne į DL [43]. IL-10 transformuoja imunostimuliacines DL į tolerogenines antigeną pateikiančias ląsteles bei

slopina efektorinius T limfocitus, stimuliuodamas anerginius (neaktyvius) CD8⁺ T limfocitų klonus [44], aktyvina navikinėse ląstelėse Stats (angl. *signal transducers and activators of transcription*), MAPK (angl. *mitogen-activated protein kinases*), β -catenin (angl. *Catenin beta-1*) signalinius kelius [45]. Chemokinas CCL2, pritraukdamas uždegiminius monocitus ir II tipo makrofagus M2, skatina navikinę angiogenezę bei Treg ląstelių aktyvumą [46,47].

2.3.2. Mieloidinės kilmės supresinės ląstelės (MDSC)

Sąlyginai neseniai identifikuotos MDSCs – dar viena imunosupresinių vėžio mikroaplinkos ląstelių populiacija. Mieloidinės kilmės supresinės ląstelės slopina CD8⁺ T ląstelių priešnavikinį imunitetą [48,49] ir sužadina Treg ląstelių proliferaciją [50]. Šios ląstelės ne tik sekretuoja imunosupresinį citokiną IL-10, bet taip pat dideliais kiekiais išskiria ARG1 ir NOS fermentus, skaidančius T limfocitams būtiną amino rūgštį arginą. Tokiu būdu yra blokuojamas signalų perdavimas per TLR (T ląstelių receptorius) receptorių, sukelia efektorinių T limfocitų apoptozę, slopinamas IFN- γ išsiskyrimas [51-53]. Naviko mikroaplinkoje MDSC išskiriamų citokinų ir fermentų fone susikaupia M2 makrofagai, kurie, išskirdami didelius imunosupresinių citokinų (IL-10, TGF- β , KEAV) kiekius, taip pat aktyviai palaiko imunosupresiją. [54-56].

2.3.3. Th2 ląstelės ir aliarminai

Aliarminai yra natūraliai aptinkami endogeniniai mediatoriai, kuriuos išskiria daugelio tipų ląstelės, reaguodamos į infekciją ir/ar į kai kurių tipų ląstelių audinių sužalojimą. Šių „pavojaus signalų“ funkcija – suaktyvinant bei sutelkiant įgimto ir įgyto imuniteto efektorines ląsteles, įspėti šeimininko imuninę sistemą apie ląstelių ar audinių pažeidimą [57]. Navikinės ląstelės taip pat sugeba išskirti aliarminus, o DL paviršiaus bei viduląsteliniais receptoriais sugeba juos pajusti. Šie mikroaplinkos aliarminai keičia DL poliarizaciją iš imunogeninės į uždegiminę, sukeliančią Th2 limfocitų formavimąsi ir priešnavikinių reakcijų slopinimą.

Čiobrialiaukės stromos limfopoetinas (TSLP) taip pat aprašomas kaip vienas iš DL funkcijų reguliatorių bei Th2 atsako iniciatorius [58]. Buvo įrodyta, kad navikinių ląstelių gaminamas TSLP gali stimuliuoti Th2 ląsteles, kurios, išskirdamos IL-3 ir IL-4, skatina kasos vėžio bei krūties vėžio naviko augimą [59,60]. Kitas aliarminas - eozinofilinės kilmės neurotoksinas (EKN) dendritinėse ląstelėse aktyvina TLR2 (angl. *toll-like receptor 2*) MyD88 (angl. *myeloid differentiation primary response gene 88*) signalinį kelią ir taip pat sustiprina Th2 imuninį atsaką [61].

2.3.4. Inhibitorinių (slopinančių) ligandų ekspresija

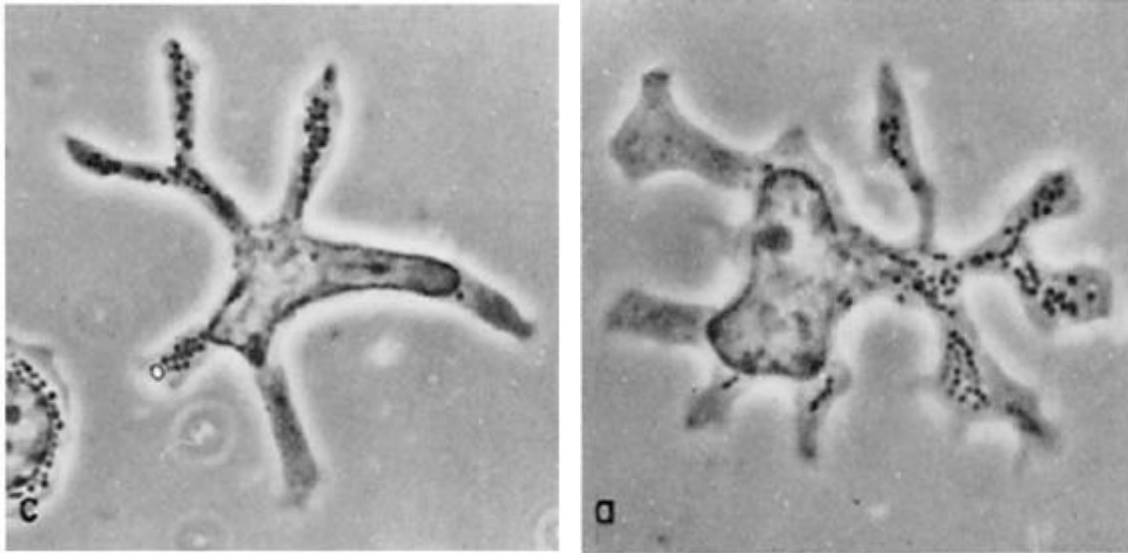
Slopinantys receptoriai CTLA-4, PD-1, Tim-3, LAG3 (angl. *lymphocyte-activation gene 3*), ICOSL (angl. *inducible T-cell COstimulator ligand*), GITR1 (angl. *glucocorticoid-induced TNFR-related protein 1*) ir B7-H3 (angl. *costimulatory molecule of the B7 family*) reguliuojantys imuninį atsaką, užtikrina imuninę toleranciją bei apsaugo nuo autoimuninių ligų. CTLA-4, PD-1 bei Tim-3 baltymus dideliais kiekiais ekspresuoja Treg ląstelės, suaktyvinti efektoriniai CD8⁺ T limfocitai. CD47 ląstelės, SIRPα (angl. *signal regulatory protein α*) ligandas, vadinamas „nevalgyk manęs“ signalu fagocitinėms ląstelėms, kurių funkcija yra blokuoti fagocitozę. Didelė CD47 žymens raiška žmogaus navikinėse ląstelėse parodo kitą mechanizmą padedantį navikui išvengti imuninės sistemos priežiūros. Šiuo būdu navikinės ląstelės išvengia fagocitozės ir sunaikinimo [62]. Pastarieji duomenys rodo, kad šio mechanizmo blokavimas neutralizuojančiais antikūnais gali slopinti migracijos ir metastazavimo procesus įvairiuose navikiniuose modeliuose.

Taigi iš pateiktų rezultatų matome, kad DL turi galimybę sukelti specifinį priešnavikinį imuninį atsaką, tačiau kai kurie naviko mikroaplinkos komponentai gali keisti DL fenotipą ir funkcijas – iš imunokompetencinių virsta imunosupresinėmis. Naviko mikroaplinka ne tik silpnina specifinį T ląstelių atsaką, bet ir suaktyvina imuninę sistemą slopinančias DL funkcijas. Norint pasiekti ilgalaikį navikui specifinį imunitetą bei surasti veiksmingus priešvėžinės imunoterapijos metodus, reikia ne tik stiprinti DL funkcijas jas stimuliuojant *ex vivo*, tačiau ir taikininės terapijos metodais perprogramuoti imuninę sistemą slopinančią naviko mikroaplinką.

2.4. Dendritinės ląstelės

Dendritinės ląstelės – tai įgimto imuniteto ląstelės, kurių funkcija – identifikuoti, fagocituoti ir pristatyti įgyto imuniteto ląstelėms svetimus antigenus. Tai profesionalios antigeną pateikiančios ląstelės (pAPL), nes kartu su antigenu limfocitams pristato kostimuliuojančius, poliarizaciją bei migravimo pobūdį nusakančius signalus.

Dendritinės imuninės sistemos ląstelės identifikuotos ir aprašytos 1973 m. Jų atradėjui Ralfui Steinmanui 2011 metais buvo paskirta Nobelio medicinos premija. 2007 metais pats susirgęs kasos vėžiu, 5 metus gydėsi DL vakcinomis ir mirė likus 3 dienoms iki Nobelio premijos įteikimo. Dendritinės ląstelės buvo atrastos tyrinėjant pelių blužnies ląstelių suspensiją. Buvo aptiktos naujos, į makrofagus nepanašios, didelės ląstelės su pseudopodijomis („dendritais“), dėl kurių ląstelių forma varijavo nuo pailgos iki žvaigždėtos. Šių ląstelių branduolys buvo didelis ir netaisyklingos formos, o citoplazma pasiskirsčiusi minėtose pseudopodijose (4 pav.). Dėl savo formos naujai atrastos ląstelės įgavo „dendritinių ląstelių“ pavadinimą [63].



4 pav. Dendritinės ląstelės, išskirtos iš pelių blužnies (modifikuota pagal Steinman and Cohn, 1973)

Vėliau R. Steinmanas eksperimentiškai įrodė unikalų šių ląstelių gebėjimą aktyvinti ir reguliuoti įgytą imuninę sistemą, jų vaidmenį vėžio imunologijoje bei DL vakcinų reikšmę gydant vėžį.

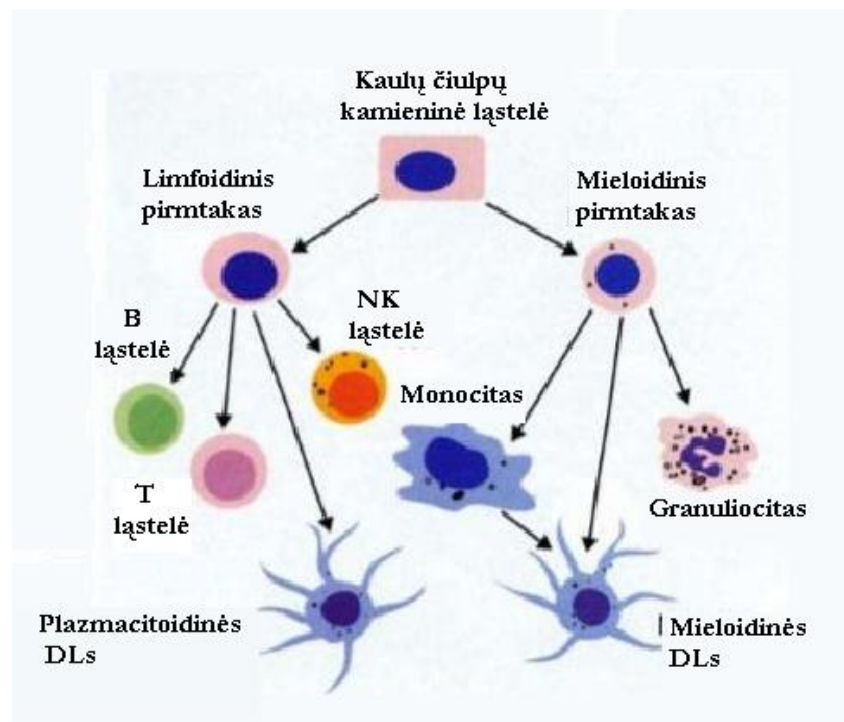
Dendritinės ląstelės dėl sugebėjimo specifiskai aktyvinti citotoksinius T limfocitus ir imuninį atsaką nukreipti tinkama linkme [64] bei sukurti imuninę toleranciją organizme [65], šiuo metu sėkmingai naudojamos priešnavikinėje imunoterapijoje bei gydant autoimunines ligas.

Pastaruoju metu gydyti onkologinėms ligoms, šalia kitų gydymo būdų vis dažniau taikoma pažangi priešvėžinė gydomoji DL vakcinacija. Šis imunoterapijos metodas yra saugus, gerai toleruojamas, neturintis toksinio šalutinio poveikio, tačiau norimo klinikinio efekto dar nepasiekama. Šiuo metu atliekamais tyrimais ieškoma optimaliausių vakcinos gamybos būdų, jos vertinimo kriterijų, pacientų parinkimo bei gydymo individualizavimo žymenų.

2.4.1. Žmogaus DL klasifikacija

Dendritinės ląstelės, kaip monocitai ir makrofagai, tradiciškai yra jungiamos į vienbranduolių fagocitų grupę. DL aptinkamos limfoidiniuose organuose, jų gausu odos epidermyje (Langerhanso ląstelės), ryklėje, virškinimo ir kvėpavimo trakto gleivinėse, daugelio organų (širdies, plaučių, kepenų, inkstų) intersticiume (organus gaubiančiame audinyje). Per pastarąjį dešimtmetį buvo nustatyta, kad dendritinių ląstelių populiacija labai heterogeniška pagal kilmę, lokalizacijos vietą bei atliekamas funkcijas. Nepaisant to, kad dendritinės ląstelės, kaip ir visos kitos kraujodaros ląstelės yra kilusios iš kaulų čiulpų $CD34^+$ kraujodaros kamieninių ląstelių, jų pirmtakinės ląstelės gali būti tiek mieloidiniai, tiek limfoidiniai progenitoriai (5 pav.). Pirmame diferenciacijos etape kaulų čiulpų pirmtakai tampa

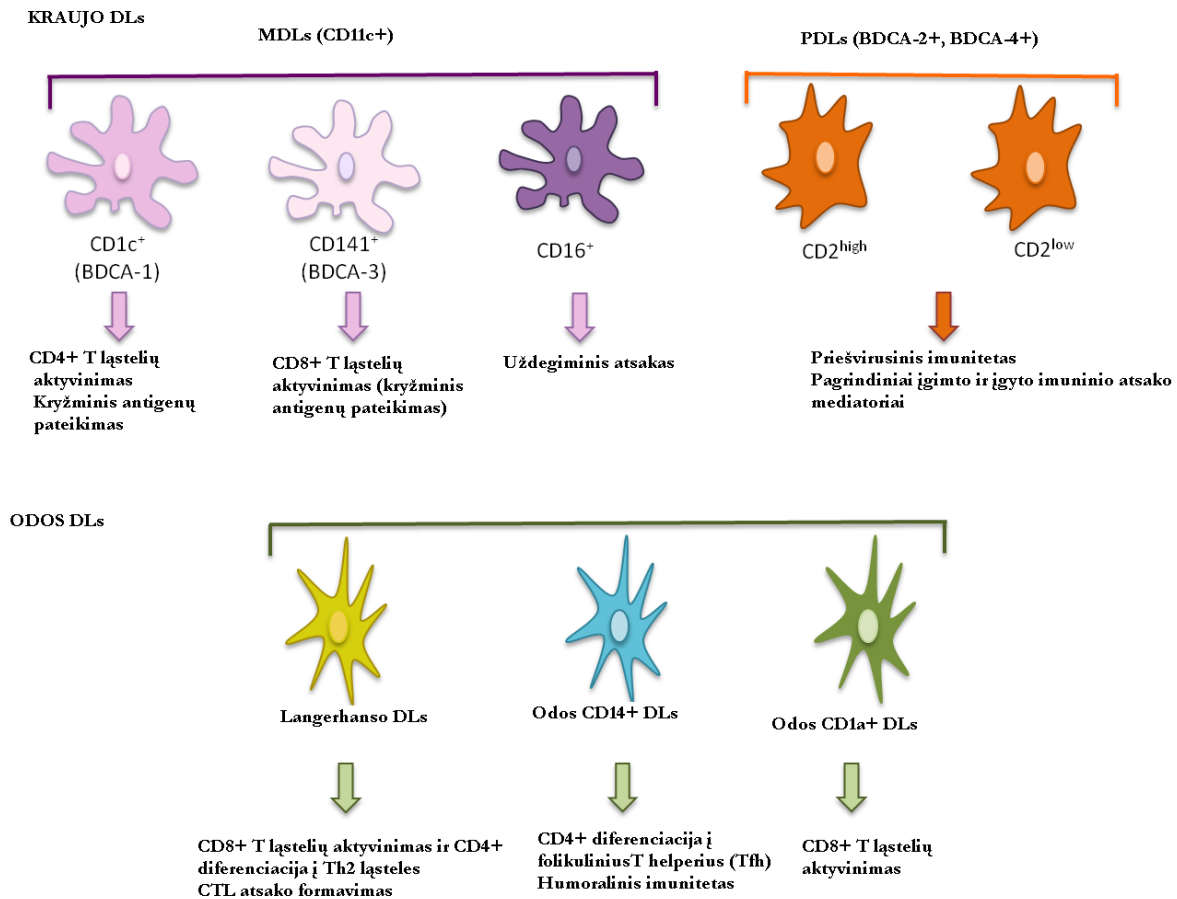
cirkuliuojančiomis progenitorinėmis ląstelėmis, kurios vėliau transendotelinės migracijos keliu grįžta į periferinius audinius. Šiose potencialiose antigeno patekimo vietose cirkuliuojantys dendritinių ląstelių pirmtakai diferencijuojasi į nesubrendusias dendritines ląsteles. Nesubrendusios dendritinės ląstelės pasižymi maža ląstelės paviršiaus MHC žymens ir kostimuliacinių (CD80, CD86) molekulių raiška, joms būdinga didelė endocitozės, ypač C tipo lektinų šeimos, receptorių raiška [66]. Šie receptoriai leidžia dendritinėms ląstelėms aptikti ekstraląstelinius antigenus.



5 pav. Hemopoezės schema

DL gali išsivystyti ir iš limfoidinio, ir iš mieloidinio pirmtako (modifikuota pagal *Andrew L Croxford et al*, 2015)

Mieloidinės kilmės žmogaus dendritinių ląstelių (dar kitaip vadinamų klasikinėmis arba tradicinėmis DL) randama ne tik kraujotakoje (3 skirtingos populiacijos), bet ir odoje bei gleivinėse. Plazmacitoidinių DL (kilusių iš limfoidinių prekursorių) randama tik kraujyje. 6 pav. pateikiamas DL heterogeniškumas pagal kilmę ir atliekamas funkcijas.



6 pav. Žmogaus kraujo ir odos DL tipai bei funkcijos

Kraujo DL gali būti mieloidinės kilmės (mDL) ir plazmocitoidinės kilmės (pDL) (modifikuota pagal Aiala Salvador et al, 2012).

Mieloidinės ir plazmacitoidinės kilmės tipų dendritinės ląstelės pasižymi skirtinga morfologija, žymenų raiška bei atliekamomis funkcijomis. mDL pasižymi CD11c⁺ CD123⁻ CD1a⁻ žymenų raiška, o pDL būdingi CD11c⁻ CD123⁺ CD1a⁻ žymenys [67].

Pagrindinė mDL funkcija yra egzogeninių (išorinių) ir endogeninių (vidinių) antigenų pateikimas T ir B ląstelėms. Gausiausiai mDL aptinkamos limfoidiniuose organuose. Išskiriami trijų potipių kraujo mDL, kurios skiriasi savo fenotipu, anatominė lokalizacija, migracijos keliais ir funkcijomis. Nors neatsakytų klausimų dar išlieka daug, manoma, kad skirtingų potipių kraujo mDL aktyvina skirtingas limfocitų populiacijas ir dalyvauja skirtingose imuninėse reakcijose.

Kito potipio dendritinės ląstelės – plazmacitoidinės dendritinės ląstelės (pDL). pDL, reaguodamos su virusais, bakterijomis ar savomis nukleininėmis rūgštimis, gamina I tipo interferoną (IFN- α/β). Kadangi I tipo interferonas yra labai svarbus priešnavikinio imuninio

atsako veiksnys, pDL galėtų būti svarbus priešnavikinio imuniteto komponentas. Praėjusios pirminį aktyvinimą ir esant gausiai I tipo interferono sekrecijai, suaktyvintos pDL, kaip ir mDL, subręsta ir tampa profesionaliomis APL. Tikėtina, kad pDL, geriau nei tokios universalios APL kaip mDL, specializuojasi pateikti labai specifinius antigenus (pvz., virusinių, navikinių) [68].

Dar viena DL grupė - folikulinės dendritinės ląstelės, kurios nesugeba pateikti antigeno ir aktyvinti T limfocitų, nes pagrindinė jų funkcija yra veikti B limfocitus [69]. Jų randama tam tikrose kūno vietose – limfiniuose folikuluose, suformuotuose B limfocitų. Dendritinės ląstelės, išskirdamos citokinus ir augimo faktorius, taip pat prisideda prie B limfocitų aktyvinimo ir diferenciacijos. Prasidėjus imuniniam atsakui, folikulinės dendritinės ląstelės suformuoja daugybę antigeno-antikūno kompleksų, kurie yra ir antikūnų „saugykla“, ir šaltinis B limfocitams stimuliuoti. Sukauptų kompleksų gyvavimo laikas gali siekti mėnesius ar net metus.

2.4.2. DL brendimas

Dendritinės ląstelės gali būti ramybės būsenos arba suaktyvintos, dar žinomos kaip nesubrendusios ir subrendusios. Šios dvi grupės skiriasi savo morfologija, fenotipu bei funkcinio aktyvumu.

Periferiniuose audiniuose ramybės būsenos dendritinės ląstelės vadinamos nesubrendusiomis. Jų fenotipas pasižymi žema paviršinių kostimuliacinių (CD80, CD86) molekulių, migracijos chemokino (CCR7) raiška bei nesugebėjimu sekretuoti T ląstelėms būtinų imunostimuliacinių citokinų [70]. Nesubrendusios dendritinės ląstelės antigenus gauna keliais būdais: 1) makropinocitozės; 2) receptoriais pagrįstos endocitozės per C-tipo lektino receptorių (manozės receptorių, DEC-205 (dendritinių ląstelių membranos receptorių)) [66] ar Fcc tipo receptorių (CD64) ir II (CD32); 3) fagocitozės (latekso dalelių, apoptozinių ir nekrozinų ląstelių fragmentų, virusų, bakterijų, viduląstelių parazitų (*Leishmania major*) virškinimo) ir 4) trogocitozės būdu. Tokios nesubrendusios ląstelės pasižymi aukštu endocitiniu aktyvumu, leidžiančiu antigenus praryti ir pateikti juos naiviesiems bei centrinės atminties T limfocitams. Nesubrendusios dendritinės ląstelės T limfocitus aktyvina nepakankamai dėl žemos kostimuliacinių, MHC II molekulių ir vidutinės MHC I molekulių raiškos savo paviršiuje [70]. Toks nepakankamas aktyvinimas sukelia T limfocitų toleranciją, dėl kurios limfocitai tampa anergiški (sumažėja imuninis atsakas į specifinį antigeną) arba sumažėja antigenui specifinių T limfocitų, ypač CD8⁺ [71], skaičius. Tolerogeniškumas, kuriuo pasižymi nesubrendusios dendritinės ląstelės, labai svarbus saugant organizmą nuo autoimuninių ligų, nes savų antigenų atpažinimas normaliomis sąlygomis nesukelia dendritinių ląstelių brendimo.

Kad dendritinės ląstelės galėtų aktyvinti T limfocitus, jos turi subręsti. Susidūrimas su patogenais ar „pavojaus signalais“ (pakitusiomis endogeninėmis molekulėmis) nesubrendusiose

dendritinėse ląstelėse inicijuoja visą kompleksą viduląstelinių persitvarkymų, kas vadinama brendimu. Ląstelei bręstant, vyksta morfologiniai, fenotipiniai bei funkciniai pokyčiai: padidėja MHC I ir MHC II klasės molekulių raiška [72]; padidėja kostimuliacinių CD80, CD86 ir adhezijos molekulių raiška [73]; padidėja CD83 molekulės raiška [74]; padidėja sekrecija citokinų, sužadinančių subrendimo signalus ir dendritinių ląstelių potipių formavimąsi [75]; padidėja chemokino receptoriaus CCR7, nukreipiančio subrendusias dendritines ląsteles į antrinius limfoidinius organus, raiška [76], sumažėja endocitinis/fagocitinis aktyvumas [70]. Funkciniai pokyčiai baigiasi ląstelėms pasiekus antrinius limfoidinius organus [77]. Patekusios į limfoidinius organus, dendritinės ląstelės antigeninės kilmės peptidus pateikia ten esantiems naiviesiems T limfocitams. Dėl šios savybės dendritinės ląstelės yra laikomos vienos efektyviausių antigeną pateikiančių ląstelių, naudojamų imunoterapijoje.

Priklausomai nuo subrendimo laipsnio, dendritinės ląstelės gali sukelti pirminį imuninį atsaką (subrendusios dendritinės ląstelės žymiai sustiprina T limfocitų stimuliacines savybes) arba jį slopinti (nesubrendusios dendritinės ląstelės skatina imunotoleranciją) [78]. Manoma, kad nesubrendusios dendritinės ląstelės prisideda prie periferinės tolerancijos vystymosi.

2.4.3. DL subrendimo faktoriai *in vivo*

Kaip jau buvo minėta anksčiau, tam, kad dendritinė ląstelė galėtų efektyviai aktyvinti naiviuosius T limfocitus, ji turi subręsti. Daugybė veiksnių sužadina ir/ar reguliuoja dendritinių ląstelių brendimą, įskaitant: a) su patogenais susijusias molekules, pavyzdžiui, lipopolisacharidas LPS [79]; bakterijų DNR (deoksiribonukleorūgštis) [80] ir dvigrandes RNR (ribonukleorūgštis) [81]; b) pusiausvyrą tarp priešuždegiminių ir uždegiminių signalų, esančių lokaliaje mikroaplinkoje, įskaitant TNF, IL-1, IL-6, IL-10, TGF- β , ir prostaglandinus; ir c) T ląstelinės kilmės signalus. Brendimo procesas ląstelėse siejamas su tokiais pokyčiais, kaip: endocitinių/fagocitinių receptorių praradimas; padidėjusi kostimuliacinių molekulių CD40, CD58, CD80, CD86 raiška; morfologiniai pokyčiai, pasireiškiantys adhezinių struktūrų praradimu, persitvarkymu citoskelete bei dideliu ląstelės judrumo įgijimu [82]; pokyčiai lizosomų struktūrose – sumažėjusi CD68 ir padidėjusi su dendritinių ląstelių lizosomomis susijusio membraninio baltymo DL-LAMP (angl. *DC-LAMP dendritic cell-lysosomal-associated membrane protein*) raiška ir pokyčiai MHC II molekulėse.

Prie būtinų DL subrendimo faktorių priskiriamas sugebėjimas atpažinti įvairius svetimus ir/ar pavojaus signalus. Tokiais signalais gali būti mikrobinės (svetimas signalas) struktūros, dar žinomos kaip su patogenų susijusios molekulinės struktūros (angl. *PAMPs*) ir endogeninės viduląstelinės molekulės (pavojaus signalas), vadinamos su pažeidimu susijusiomis molekulinėmis struktūromis (angl. *DAMPs*). Šios baltyminės arba nebaltyminės kilmės

molekulės brendimo veiksniais tampa tuomet, kai ląstelė savo paviršiuje pradeda nenormaliai dideliais kiekiais sekretuoti tokias medžiagas kaip, pvz., šlapimo rūgštis, ATP, didelio judrumo *box 1* grupės baltymas, sava DNR ir RNR, arba kai ląstelės paviršiaus baltymai, pvz. šiluminiai šoko Hsp (angl. *heat shock proteins*), tokie kaip Hsp70, Hsp90, išskiriami netipiškai.

2.4.4. Imunomoduliacinis DL potencialas

DL, kaip profesionalios antigeną pateikiančios ląstelės, po aktyvinimo savo paviršiuje išskiria molekules bei citokinus, kurie nulemia imuninio atsako pobūdį. Iki šiol buvo žinomas DL gebėjimas indukuoti (sužadinti) T ląsteles bei sukelti imuninį atsaką. Tačiau pastaruoju metu literatūroje gausėja duomenų, kad pateikdamos antigeną T ląstelėms DL gali sukelti imuninį atsaką (imunogeniškumas) arba jį slopinti (tolerogeniškumas).

Gera žinoma, kad nesubrendusios DL pasižymi tolerogeninėmis savybėmis, nes, sužadindamos reguliacinius T limfocitus, slopina imuninį atsaką [83]. Nesubrendusios DL organizme būdamos ramybės (*steady-state*) būsenos palaiko periferinę toleranciją saviems antigenams ir, susidūrusios su vadinamaisiais pavojaus signalais, subręsta, vėliau skatina imuninę sistemą aktyvinančias T ląstelių savybes [84]. Kiekviena dendritinių ląstelių subpopuliacija pasižymi skirtinga žymenų raiška bei atlieka skirtingas funkcijas, pvz., pDL neturi mDL būdingų žymenų CD13, CD14 ir CD33, bet pasižymi aukšta CD123, CD4 ir CD62L žymenų raiška [85,86]. Ir mieloidinės ir plazmacitoidinės nesubrendusios dendritinės ląstelės sukelia T ląstelių toleranciją [87,88]. Nesubrendusios dendritinės ląstelės veiksmingai pasisavina patogenus, apoptozines ląsteles ir antigenus iš aplinkos fagocitozės, makropinocitozės arba endocitozės būdu, tačiau jos negali efektyviai apdoroti ir pateikti šių antigenų T ląstelėms [89]. Todėl nesubrendusios DL sukelia T ląstelių anergiją (nejautrą) ar sužadina reguliacinius T limfocitus [90,91].

Kai kurių tyrimų rezultatai rodo, kad skirtingi subrendimo faktoriai suteikia DL skirtingą subrendimo lygį, kuris nulemia skirtingą T ląstelių poliarizaciją. Bakterinės kilmės molekulės ar virusinės kilmės produktai (lipopolisacharidas LPS, dvigrandė RNR (dgRNR), DNR molekulės CpG sritis), uždegiminiai citokinai (TNF- α , IFN- γ) bei T ląstelių signalai (CD40-ligandas (CD40L)) gali skatinti DL gaminti IL-12p70 ir IFN- α ir tokiu būdu sužadinti Th1 T helperių atsaką [92,93]. Prieš-uždegiminės molekulės (IL-10, prostaglandinas PGE₂ ir kortikosteroidai) priešingai – gali slopinti DL brendimą bei citokinų sekreciją ir dėl to skatinti Th2 T ląstelių pagalbininkų [94-96] ar T reguliacinių limfocitų (Treg) atsaką [88].

Taigi, apibendrinant galima teigti, kad T limfocitų stimuliacijos pobūdį (toleranciją ar imunogeniškumą) nulemia ne DL kilmė, bet jų aktyvinimo sąlygos.

2.4.5. DL panaudojimas medicinoje. DL reikšmė gydant vėžį ir autoimunines ligas

Dėl savo funkcinio dvilypumo DL naudojamos terapijoje sustiprinti nepakankamą imuninį atsaką sergant infekcinėmis ligomis ir vėžiu arba, sukeliant toleranciją, susilpninti pernelyg stiprų imuninį atsaką po organų transplantacijos, sergant alerginėmis ir autoimuninėmis ligomis.

Imunogeniniu potencialu pasižyminčios DL yra svarbios kuriant gydomąsias vakcinas, kurių paskirtis – stimuliuoti paciento imuninį atsaką, kad būtų atpažintos ir sunaikintos navikinės ląstelės. Įrodyta, kad nekontroliuojamą navikinių ląstelių augimą sąlygoja nepakankamas imuninės sistemos atsakas joms. Norint suaktyvinti priešnavikinį imuninį atsaką, reikia skirti imunoterapiją, kurią taikant neretai pavyksta efektyviai sunaikinti pirminius ir antrinius vėžio židinius.

Imunoterapinių DL, įsotintų su naviku susijusiais antigenais (angl. TAA), vakcinacijos sėkmė buvo įrodyta ikiklinikiniuose tyrimuose [97-99]. Atliekant klinikinius tyrimus su TAA įsotintomis DL, buvo pasiektas imunologinis ir klinikinis atsakas (IFN- γ sekrecija proliferuojančiose T ląstelėse) nesant toksinio poveikio [100-102]. Tačiau, nepaisant to, kad po vakcinacijos daugumos pacientų organizme padaugėja antigenui specifinių T ląstelių, tik nedidelei daliai šių pacientų sukeliamas tinkamas klinikinis atsakas, t. y. naviko regresija ar ilgesnė remisijos trukmė [103,104]. Iki šiol klinikiniuose tyrimuose, kuriuose buvo taikomos DL, sulaukta tik vidutinės sėkmės, todėl pastaruoju metu mokslininkai kuria naujas gydymo strategijas, kurios pagerintų DL sukeliamą imuninį atsaką. Vienas iš galimų būdų – išnaudoti DL gebėjimą pateikti fagocituotų negyvų navikinių ląstelių peptidus tiek MHC I klasės, tiek ir MHC II klasės molekulėms [105,106]. Šiuo atveju navikinių ląstelių imunogeniškumas pagerinamas transfekuojant TLR ligandą. TLR ligandu transfekuotos navikinės ląstelės gali stipriau aktyvinti ir subrandinti DL nei netransfekuotos vėžinės ląstelės [107]. Šie rezultatai dar kartą įrodo, kad siekiant sukurti stabilias visiškai suaktyvintas ir gydymui tinkančias DL, galinčias sužadinti navikui specifinius citotoksinius T limfocitus (CTL), pasižyminčius ribota/ ar jokia Treg indukcija, reikalingi stiprūs subrendimo signalai. Todėl didelis dėmesys skiriamas patogeninės kilmės molekulių panaudojimui DL subręsti [93,108,109]. Navikų vakcinacijos strategijoje TLR ligandų panaudojimas DL leidžia pajusti „pavojų“, dėl kurio jos tampa visiškai subrendusiomis imunostimuliacinėmis DL. Neseniai vieni autoriai savo darbuose parodė, kad stimuliuojant poliinozino policitidino rūgštimi dendritinių ląstelių TLR3 galima pakeisti tolerogenines DL funkcijas [110].

Dendritinių ląstelių vaidmuo svarbus ir autoimuninių ligų patologijoje, nes nuo DL funkcinų savybių gali priklausyti, ar imuninė reakcija vystysis citotoksiškumo, ar tolerancijos

linkme. Imuninio toleravimo procese dalyvauja DL sekrecijos produktai – citokinai. Vieno eksperimentinio darbo su pelėmis autoriai pažymėjo, kad dendritinės ląstelės gali sužadinti $CD4^+CD25^+$ T ląsteles (Treg), kurios slopina autoimunines ligas *in vivo* [111]. Šios reguliacinės ląstelės nenutukusiose diabetinėse pelėse (NOD) slopina diabeto vystymąsi [112,113]. Šis faktas galėtų būti naudingas kuriant antigenui specifinę terapiją prieš autoimunines ligas.

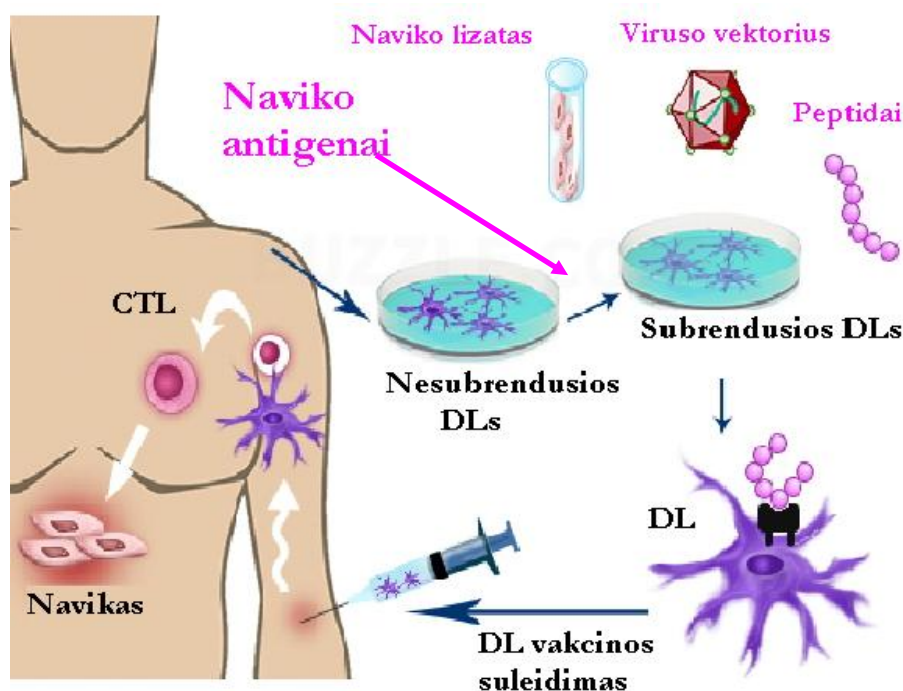
Kaip minėta, citokinai yra svarbūs autoimuninio proceso mediatoriai (tarpininkai). Dendritinės ląstelės pačios išskirdamos citokinus jiems yra jautrios, nes citokinai turi įtakos DL subręsti. Kontroliuodami dendritinių ląstelių brendimą, citokinai reguliuoja imuninę homeostazę bei tolerogeniškumo ir imunogeniškumo balansą. Padidėjusi citokinų sekrecija keičia DL homeostazę, tokiu būdu darydama įtaką įvairioms žmogaus uždegiminėms ir autoimuninėms ligoms; pvz., citokino IL-6 padidėja serume vaikų, sergančių sisteminiu jaunatviniu artritu [114]; užblokavus specifiniais antikūnais aktyvia Krono (*Crohn*) liga sergančių pacientų IL-12, pasiekama stabili ligos remisija [115]; IL-23 turi įtakos psoriazei ir uždegiminėms žarnyno ligoms [116,117]; citokino TNF blokada efektyvi gydant reumatoidinį artritą (RA), psoriazę [118,119]. DL homeostazės pokyčiai tiesiogiai susiję su tokiais žmogaus autoimuninėmis ligomis kaip I tipo diabetas, išsėtinė sklerozė bei sisteminė raudonoji vilkligė (SLE) [120,121].

2.5. Priešvėžinės DL vakcinos

Pagrindiniai vėžiu sergančių pacientų gydymo metodai yra chirurginis, spindulinis ir medikamentinis. Tačiau nors šie metodai tobulėja, vėžys lieka viena pagrindinių mirtingumo priežasčių pasaulyje. Ieškoma naujesnių, efektyvesnių vėžio gydymo būdų. Vienas iš šiuo metu plačiai tyrinėjamų – vėžio imunoterapija. Nespecifinė imunoterapija, pvz. citokinų imunoterapija, BCŽ (bakterijos *Calmette-Guerin* vakcina) vakcinacija pradėta onkologijoje naudoti jau prieš kelis dešimtmečius. Pastaruoju metu vis didesnis dėmesys skiriamas specifinei ląstelinei priešnavikinei imunoterapijai, kuri gali būti aktyvi (vakcinacija dendritinėmis ląstelėmis) ir pasyvi (suaktyvintų T limfocitų skyrimas). Viena perspektyviausių kryptių yra gydomoji vakcinacija dendritinėmis ląstelėmis. Ja siekiama sustiprinti kovą su organizme jau esančiu vėžiu, aktyvinant imuninį atsaką piktybinėms ląstelėms. Gydomoji vakcinacija dendritinėmis ląstelėmis vis plačiau taikoma įvairiose pasaulio klinikose. Klinikinis atsakas į gydymą DL pasiekiamas apie 54 % pacientų. Šiuo metu yra naudojama FDA (ang. *Food and Drug Administration*) patvirtinta pirmoji ląstelių pagrindu sukurta priešvėžinė vakcina – *Dendreon* firmos vakcina Provenge^R. Ši autologiniais antigenais įsotinta priešvėžinė DL vakcina yra skirta sergantiesiems metastazavusiu prostatos vėžiu. Atlikus atsitiktinių imčių III fazės klinikinį tyrimą buvo gauta, kad bendra šia vakcina gydomų pacientų išgyvenimo trukmė

vidutiniškai pailgėja daugiau nei 4 mėnesius, palyginti su placebo vakciną gaunančių pacientų išgyvenimo trukme. Mokslininkų nuomone, šis išgyvenimo trukmės rodiklis gali ir turi būti padidintas, skiriant daugiau dėmesio konkrečioms paciento organizmo savybėms.

Gydamosios autologinės dendritinių ląstelių vakcinos gaminamos individualiai kiekvienam pacientui. Tam tikslui naudojami paciento naviko mėginiai (lizatas, peptidai ar kiti modifikuoti produktai) bei iš kraujo išskirti monocitai, iš kurių *ex vivo* susidaro dendritinės ląstelės, kurios, kad subręstų, įsotinamos naviko antigenais. Taip paruoštos ir atgal į sergančio paciento organizmą suleistos, dendritinės ląstelės sugeba aktyvinti organizmo imuninį atsaką kovai su vėžinėmis ląstelėmis (7 pav.).



7 pav. Autologinės DL vakcinacijos schema

Gydosioms autologinių dendritinių ląstelių vakcinoms gaminti naudojami iš paciento kraujo išskirti monocitai, iš kurių gaunamos nesubrendusios dendritinės ląstelės, o šios įsotinamos naviko antigenais (naviko lizatas, peptidai ar kiti modifikuoti produktai) ir, naudojant citokinų mišinį, subrandinamos.

Taip paruoštos subrendusios dendritinės ląstelės, suleistos atgal į sergančio paciento organizmą, aktyvina organizmo imuninį atsaką kovai su vėžiu (modifikuota pagal Strategies for cancer vaccine development, 2013).

Šiuo metu vakciną sudarančių dendritinių ląstelių subrendimas ir aktyvinimas apibūdinami nustatant konkrečių žymenų raišką (CD80, CD83, CD86, HLA-DR, CD11b). Tačiau paskutiniu metu gausėja duomenų, kad vien tik minėtų žymenų raiškos nustatymas pagamintose DL vakcinose gali būti apgaulingas, nes dalis DL gali ekspresuoti ir ligandus per kuriuos slopinamas

priešnavikinių T limfocitų atsakas (CD273, CD274, CD85k). Remiantis paskutiniais DL biologijos tyrimų rezultatais, tikslinga nuodugniau ištirti DL funkcines savybes.

Gydymas dendritinėmis ląstelėmis, kaip ir kiti gydymo metodai, turi būti standartizuojamas. Standartizuojami turi būti šie kriterijai: DL paruošimo būdas, DL tipas, DL subrendimo ir aktyvinimo būklė, laiko intervalas ir dozė, gydymo kursas ir įsotinimo antigenais būdas. Pirmuose paskelbtuose eksperimentiniuose darbuose buvo pastebėta nemažai trūkumų (per mažai paaiškinimų, tyrimo planavimo trūkumai). Daugelyje tyrimų yra per mažai informacijos apie DL vakcinų kokybės kontrolę, DL fenotipo skirtumus tarp atskirų pacientų, klinikinį atsaką, kuris vertinamas neatsižvelgiant į specifinius bei gerai apibrėžtus, visuotinai pripažintus naviko atsako kodavimo kriterijus. Šios atsako vertinimo schemas gerai aprašytos Pasaulinės sveikatos organizacijos (PSO) ir atsako solidiniuose navikuose (RECIST) kriterijuose, kas leidžia objektyviai įvertinti navikinį atsaką. Vieni autoriai planuodami DL vakcinų klinikinius tyrimus siūlo vadovautis šiais minimaliais nesubrendusių ir subrendusių DL fenotipo bei funkcinių savybių klinikiniais ir imunologiniais kokybės kriterijais [122]:

Būtinieji kriterijai: mikrobiologinė kontrolė (neigiama bakterijų ir grybų tarša); **grynumas** ($>80\%$ taikant tėkmės citometrijos metodą); **morfologija** (nesubrendusios DL – silpnai adherentinės, plaukiojančios, apvalokos ląstelės su tam tikrais išsišakojimais; subrendusios DL – silpnai prisitvirtinusios, susitelkusios ląstelės); **fenotipas**: monocitų kilmės DL žymenys: *nesubrendusių DL* ($CD14^{-/lo}CD83^{-}CD80^{-/lo}CD86^{lo}MHC\ I^{+}MHC\ II^{+}CCR5^{+}$); *subrendusių DL* ($CD83^{+}CD80^{+}CD86^{+}MHC\ I^{+}MHC\ II^{+}CCR7^{+}$); **gyvybingumas** ($>70\%$ gyvų ląstelių nustatoma Tripano mėlio išmetimo testu);

Papildomi patikros kriterijai: imuninio atsako sužadinimas: mišri limfocitų reakcija (MLR) – auginant DL ir PKVL (periferinio kraujo vienbranduolės ląstelės) santykiu 1:20 (vieno donoro), vertinama T ląstelių proliferacija); **antigenui specifinės stimuliacijos testas** – vertinamas antigenų įsotintų DL gebėjimas stimuliuoti antigenui specifines T ląsteles.

Taigi, norint pasiekti maksimalų klinikinį gydomąjį vakcinacijos efektą onkologiniams pacientams, gautą DL preparatą būtina detalčiai charakterizuoti bei atlikti griežtą kokybės kontrolę.

2.5.1. DL išskyrimas iš periferinio kraujo vienbranduolių ląstelių (PKVL)

Dendritinių ląstelių vakcinoms gaminti reikalingos nesubrendusios dendritinės ląstelės, kurios *ex vivo* aktyvinamos ir įsotinamos navikiniais antigenais. Nesubrendusios DL gali būti gaunamos: 1) iš kraujo išskiriant monocitus ir iš jų *ex vivo* gaunant nDL, 2) išskiriant kraujyje cirkuliuojančias natūralias DL. Naujausi eksperimentiniai tyrimai suteikia vilčių, kad ateityje

DL galima bus gaminti iš *in vitro* moduluotų kamieninių ląstelių [123], tačiau tokie metodai dar praktikoje netaikomi.

Šiuo metu daugumoje eksperimentinių ir klinikinių tyrimų naudojamos *in vitro* sąlygomis išaugintos DL, kurios yra kilusios iš pirmtakinių (angl. *progenitor*) CD34⁺ ląstelių ar kraujo monocitų [124,125]. Dažniausiai nesubrendusios DL gaunamos *ex vivo* iš monocitų, išskirtų iš paciento periferinio kraujo vienbranduolių ląstelių frakcijos (PKVL) [126]. Monocitai, naudojant citokinus GM-CSF ir IL-4, per 5–7 dienas virsta nesubrendusiomis dendritinėmis ląstelėmis. Norint gauti visiškai subrendusias, pasižyminčias stipriomis stimuliacinėmis savybėmis DL, nesubrendusios DL toliau turi būti dar 2 – 3 dienas aktyvinamos mikrobinės, uždegiminės ar T ląstelinės kilmės faktoriais.

Kraujyje cirkuliuojančių DL yra labai mažai (sveikų žmonių PKVL sudaro nuo 0,5–1%, o onkologiniai pacientai, ypač sergantys išplitusia liga, jų turi dar mažiau [127]), todėl labai sunku surinkti pakankamą ląstelių skaičių. Siekiant pagausinti DL populiaciją *in vivo* bei padidinti gaunamų ląstelių išeigą, naudojami hemopoetiniai augimo faktoriai (Flt-3 ligandas, GM-CSF) [128]. Dėl didelės minėtų faktorių kainos, šis metodas nėra plačiai taikomas. Natūralios DL gali būti tiesiogiai išskirtos iš periferinio kraujo arba iš leukaferozės produktų imunomagnetinio atskyrimo būdu [129-131]. Tuomet izoliuotos DL įsotinamos navikiniais antigenais, subrandinamos ir suleidžiamos atgal pacientui. Kadangi šios ląstelės yra natūralios kilmės, savo kokybe jos gali lenkti iš CD34⁺ pirmtakų ar iš *ex vivo* gautas DL. Yra duomenų, kad šviežiai izoliuotos DL geriau sužadina antigenui specifinį Th1 tipo atsaką negu kilusios iš monocitų DL [132].

Onkologiniams pacientams dėl mažo natūralių DL kiekio gali būti sudėtinga izoliuoti pakankamą jų kiekį vakcinai gaminti. Be to, onkologinių pacientų kraujo DL imunogeniškumas gali būti funkciškai naviko nuslopintas [127,133,134]. Naviko imunosupresinis poveikis monocitams nenustatytas, todėl monocitai tampa tinkamiausiu objektu DL vakcinoms gaminti *ex vivo* [127,129]. Labai svarbu, kad subrendusios, iš monocitų *ex vivo* pagamintos DL yra atsparios sisteminiam navikinės kilmės slopinančiam signalui [93,95,135].

2.5.2. DL įsotinimas naviko antigenais *ex vivo*

Pagrindinis vakcinacijos prieš vėžį tikslas – sukelti stiprų atsaką citotoksinių T limfocitų, naikinančių navikines ląsteles bei plėtojančių savo ilgalaikę, padedančią išvengti vėžio atsinaujinimo atmintį. Šis vakcinacijos būdas yra saugus, gerai toleruojamas, skatinantis ląstelinį

imuninį atsaką bei navikui specifinių CD4⁺ ir CD8⁺ T limfocitų proliferaciją. Tačiau daugumai pacientų efektyvus klinikinis atsakas dar nepasiekiamas [136].

Veiksmingų priešvėžinių DL vakcinų paruošimo svarbiausias momentas – jų įsotinimas naviko antigenais. Istoriskai pirmosios DL vakcinos buvo ruošiamos neišskiriant monocitų susidarymo ir brandinimo etapų. Monocitai *ex vivo* buvo įsotinami antigenu kartu su citokiniais GM-CSF ir IL-4. Vėlesniuose vakcinų ruošimo protokoluose šie etapai buvo išskirti, ypač didelį dėmesį skiriant naviko antigeno įsotinimo metodams.

Vakcinacijos efektyvumui įtakos gali turėti antigeno, reikalingo DL įsotinti, pasirinkimas. Daugiausia naudojami dviejų tipų antigenai: mutavę (unikalūs) ir nemutavę (universalūs). Naudojant mutavusius antigenus, gydymas turi būti individualizuojamas. Kaip pavyzdys galėtų būti idiotipu įsotintos DL. Idiotipą sudaro kiekvieno individo imunoglobulinų determinantų antigenų derinys. Šis DL įsotinimo antigenais būdas buvo įvertintas III fazės klinikinio tyrimo metu – gerokai prailgėjo folikuline limfoma sergančių pacientų ligos remisijos periodas [137]. Tačiau daugybinės mielomos atveju toks išgyvenimo pailgėjimas nebuvo nustatytas [138]. Kaip alternatyva daugiausia taikomoms vakcinoms plėtoti galėtų būti naudojami universalūs, nemutavę antigenai, tik šių vakcinų veiksmingumą gali susilpninti jau esantys Treg limfocitai [139].

Šiuo metu taikomi keli *in vitro* navikinių antigenų pateikimo dendritinėms ląstelėms būdai. Vienas iš paprasčiausių ir plačiausiai naudojamų yra autologinio naviko arba alogeninių navikinių ląstelių mišinio lizatai. Šio metodo privalumas – pateikiamas realus naviko antigenų spektras. Kita vertus, autologiniai antigenai gali sukelti nepakankamą T limfocitų stimuliaciją.

Tam tikrų standartizuotų naviko antigenų mRNR transfekcija arba įsotinimas elektroporacijos būdu yra labai perspektyvūs, tačiau kol kas rekomenduojami navikų antigenų deriniai nėra pakankamai standartizuoti pagal onkologinių ligų nozologijas [140]. Šis metodas yra toliau pažengęs tik vakcinų prieš melanomą srityje.

Ex vivo būdu išaugintų DL gebėjimas moduluoti suaktyvintų T limfocitų migraciją į naviką priklauso nuo paruošimo metodikų ir dažnai yra nepakankamas [141,142]. Natūraliai DL T limfocitus aktyvina ne tik pateikdamos svetimus antigenus. DL, kaip profesionalios APL, papildomai aktyvina T limfocitus per kostimuliacinius receptorius ir suteikia jiems poliarizacijos bei „homingo“ signalus. *In vitro* paruoštų DL sugebėjimą papildomai stimuliuoti ir nukreipti T limfocitus didina naudojami įvairūs faktoriai (adjuvantai), kurie formuoja stiprų imuninį atsaką [140]. Adjuvantais gali būti aliuminio druskos, citokinai, bakteriniai produktai (peptidai, negyvų bakterijų apvalkalai), nanodalelės.

2.5.3. DL brandinimas *in vitro*

Dendritinėms ląstelėms brandinti yra naudojamos kelios strategijos, kurios pasižymi aukštu imuninių ląstelių aktyvinimo potencialu. Nesubrendusioms DL brandinti *in vitro* naudojami bakteriniai adjuvantai, DL aktyvinimo receptorių ligandai, įvairūs citokinų deriniai. Norint imituoti uždegiminę aplinką, naudojami brandinimo kokteiliai su keliais faktoriais: prostaglandinu E2 (PGE₂), interleukinu-1 β (IL-1 β), IL-6 ir poliinoziniu. Yra išskiriami trys pagrindiniai DL brandinimo protokolai: LPS, CD40L/TNF- α ir nuo IFN priklausomas.

TNF- α /CD40L sužadina tų genų grupių raišką, kurios yra glaudžiai susijusios su TNF šeimos signaliniais keliais: *CCL17* (*TARC*), *IL-10R*, *IL-13R*, *MYO1A* ir *GM-CSFR* [143-146]. *CCL17* yra chemokinas, sutelkiantis atminties DL, CD4⁺ limfocitus ir Th2-T ląsteles. Didelis *CCL17* kiekis melanoma sergančių pacientų serume siejamas su išgyvenimo trukme iki prasidedant ligos progresavimui kaip atsakas į DL imunoterapiją [147]. Citokinų receptoriai *IL-10R* ir *IL-13R* dalyvauja Th2 ląstelių diferenciacijoje [148], daro DL jautresnes Th2-citokinų pusiausvyrai kai kurių navikų mikroaplinkoje [149] ir tokiu būdu susilpnina imunogenines DL savybes. TNF- α /CD40L subbrandintų DL transkripcinis profilis rodo, kad šios DL nukreipia T ląsteles Th2 atsako linkme [149]. TNF- α -subbrandintos DL pasižymi mažesne IL-12 ir IFN- γ sekrecija, taigi ir mažesniu nei LPS gebėjimu aktyvinti citotoksinių T limfocitų atsaką *in vitro* [149].

IFN vaidmuo inicijuojant įgimtą bei įgytą imuninį atsaką *in vivo* bei *in vitro* yra plačiai aprašytas DL brandinimo protokoluose [150,151]. Tačiau fiziologinė IFN reikšmė DL funkcijoms *in vivo* iki šiol išlieka neaiški. Nustatyta, kad IFN- α sužadina DL susidarymą *in vitro*, o IFN- γ , naudojamas vienas ar mišinyje su kitomis medžiagomis, padeda DL subręsti. Naudojant IFN subbrandintos DL išskiria didelius kiekius citokino IL-12 [152,153].

2.5.4. Citokinų brandinimo mišiniai

Bandydami atkurti fiziologinę DL subrendimo aplinką, dauguma tyrėjų pasisako už subalansuotus brandinimo mišinius. Dažniausiai naudojamus brandinimo mišinius sudaro TNF- α , IL-1 β , IL-6 ir PGE₂. Šio mišinio paskirtis – imituoti uždegiminę aplinką, kurioje DL subręsta fiziologiškai. Įdomu pažymėti, kad LPS subbrandintų DL genų raiškos profilis labai skiriasi nuo šiuo mišiniu subbrandintų DL genų raiškos. Šiuo brandinimo mišiniu, kaip ir brandinant vien tik TNF- α , sužadinama *CCL17*, *CXCR4* ir *IL13R* genų raiška, bet nebūna *IL10R* ir *GMCSFR* genų raiškos [154]. Naudojant minėtą brandinimo mišinį, padidėja ir kitų genų raiška: *NF-kB1/2*, *CXCL-2/GRO- β* , *TNFAIP3/6*, *CXCL-8/IL-8*, *CXCL-16*, *CD58*, *IL-2R*, *IL-7R*, *CRIP1*, *ISG20*, *BCL2A1*, *IER3*, *CFLAR*, *NCK2*, ir *RUNX3* [154]. Šių genų funkcija yra susijusi su uždegiminiu

atsaku ir apoptoze. *In vitro* tyrimai parodė, kad šiuo mišiniu subrandintos DL ypač stipriai stimuliuoja limfocitų proliferaciją [155,156].

PGE₂ naudojimas brandinimo mišiniuose yra kontroversiškas. Nors šio faktoriaus vaidmuo uždegimo metu yra neabejotinas, tačiau jis tiesiogiai stimuliuoja Treg proliferaciją bei TGF ir efektorinių T limfocitų apoptozę [157]. Taigi bręsdamos PGE₂ aplinkoje DL gali suaktyvinti tolerogeninį imuninį atsaką [154,158,159]. Kelių klinikinių tyrimų metu buvo nustatyta, kad metastazavusia melanoma ir inkstų ląstelių karcinoma sergančių pacientų, gydytų šiuo mišiniu subrandintomis DLs, plazmoje padaugėjo ir Th1, ir Th2 profilio citokinų [160-162]. Dėl šios priežasties buvo pasiūlyta DL brandinimo mišiniuose PGE₂ atsisakyti.

Kaip alternatyva prieš tai minėtam mišiniui siūlomas kitas brandinimo mišinys: IL-1β, TNF-α, IFN-α, IFN-γ ir poli (I:C). Šiame brandinimo protokole DL brandimas nukreipiamas Th1 atsako formavimosi kryptimi, nes *IL-12p40*, *IL-1α/β*, *IL-2Rα/β/γ*, *IL-6*, *CXCL-8/IL-8*, *IL-15*, *CXCL-9/Mig*, *CXCL-10/IP10* bei *CXCL-11* sekretuojami žymiai didesniais kiekiais negu naudojant brandinimo mišinį su PGE₂ [154].

Trečias galimas brandinimo mišinys, kurio sudėtyje nėra PGE₂, yra LPS ir IFN-γ [163]. Atlikus šiuo mišiniu subrandintų DL genų raiškos analizę buvo nustatyti kai kurie uždegimą sukeliantys citokinai, chemokinai bei su uždegimu susiję genai. Padidėjusi faktorių *CCL2*, *CCL3*, *CCL4*, *CCL5*, *CCL8*, *CXCL-9*, *CXCL-10*, *CXCL-11*, *IL-1*, *IL-6*, *IL-8*, *IL-10*, *IL-12*, *TNF*, *DUSP5* ir *SOD2* raiška buvo aptikta 24 valandas brandintų LPS ir IFN-α DL supernatante, kas rodė stiprų Th1 poliarizacijos potencialą [163]. Tyrimai *in vitro* parodė, kad LPS ir IFN-γ mišinyje subrandintos DL antigenui specifines CD4⁺ ir CD8⁺ T ląsteles stimuliuoja žymiai geriau negu PGE₂ subrandintos DL [164].

2.6. Bakteriniai adjuvantai

Vakcinų efektyvumui svarbūs yra **adjuvantai** – medžiagos, sustiprinančios imuninį atsaką į antigeną. *Ex vivo* vakcinose imunostimuliaciniai adjuvantai naudojami brandinant DL. Kaip adjuvantai gali būti naudojamos įvairios medžiagos, pavyzdžiui, TLR receptorių agonistai, citokinai, chemokinai, cheminės medžiagos, lipidinio pagrindo medžiagos bei nanodalelės, bakterijų fragmentai (pvz. bakterijų sienelės komponentai) [165,166].

2.6.1. Lipopolisacharidas

Pirmasis tyrime naudotas bakterinis adjuvantas buvo lipopolisacharidas (LPS). LPS yra pagrindinis gramneigiamų bakterijų sienelės išorinės membranos komponentas (ši molekulė taip pat gali būti vadinama endotoksinu), kuris sukelia stiprų imuninį atsaką gyvūnuose.

Dėl savo bakterinės kilmės LPS yra pristatomas kaip tipiškas DL brandinimo modelis. LPS sugeba sužadinti DL brendimą *toll-like* receptorių. LPS naudojamas kaip efektyvus DL brendimo faktorius, skatinantis IL-12p70 sekreciją [72,74]. LPS sužadina *toll-like* receptorių 4 (TLR4), tarpininkauja aktyvinant ląstelės branduolio faktorių *kappa B* (*NF-kB*) bei mitogenu suaktyvintas proteino kinazes (MAPKs) ir inicijuoja DL brendimą [70,79]. Kitas svarbus DL brendimo veiksnys – IFN- γ , kuris sustiprina TLR signalinį kelią ir reguliuoja uždegiminius DL citokinus. Yra žinoma, kad IFN- γ žymiai padidina IL-12p70 gamybą [80]. Naudojant LPS ir IFN- γ gaunamos subrendusios DL (sDL), iš kurių ruošiamos klinikinės vakcinos vaikų solidiniams navikams ir krūties vėžiui gydyti [81,82]. HER2/neu teigiamu krūties vėžiu sergančios pacientės buvo vakcinuotos peptidais įsotintomis sDL, kurioms brandinti buvo naudojami LPS ir IFN- γ . Ši vakcina sužadino *HER2/neu*-specifinių T limfocitų atsaką bei žymiai sumažino naviko apimtį [82].

Genų profilio tyrimai parodė kad LPS gali sužadinti keletą chemokinių genų: *CCL5* (*RANTES*), *CCL4* (*MIP-1 β*), *CCL20*, *CCL18* (*DC-CK1*), *CCL19* (*MIP-3 β*), ir *CCL23* (*MPIF-1*) [85, 86, 87]. Genų *CCL5*, *CCL4*, *CCL20*, *CCL18* raiška buvo patvirtinta RT-PCR (angl. *real time polymerase chain reaction*) ar ELISA (angl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) metodais [167-170].

Chemokinas *CCL5* tarpininkauja ne tik monocitų ir T ląstelių *homingo* (grįžimo namo) procese, bet veikia ir kitas chemokino receptorių (*CCR*)-5 ekspresuojančias ląsteles – bazofilus, eozinofilus, natūralius kilerius (NK) DL ir putliąsias ląsteles [171]. Padidėjusi *CCL5* raiška yra susijusi su įvairiomis uždegiminėmis ligomis bei patologijomis. *CCL4* pasižymi chemotaktinėmis (pritraukiančiomis) ir uždegimą skatinančiomis savybėmis [172]. *CCL20* sąveikauja su *CCR-6*, sutelkia nesubrendusias DL bei jų pirmtakus ir NKT (angl. *natural killer T cells*) ląsteles [93]. Chemokinai *CCL18* ir *CCL23* gali pritraukti limfocitus, nesubrendusias DL ir monocitus. Išlieka neaišku, ar *CCL18* palaiko uždegimą skatinantį (Th1) ar uždegimą slopinantį/tolerogeninį (Th2) atsaką priklausomai nuo mikroaplinkos, kurioje jis sekretuojamas [173].

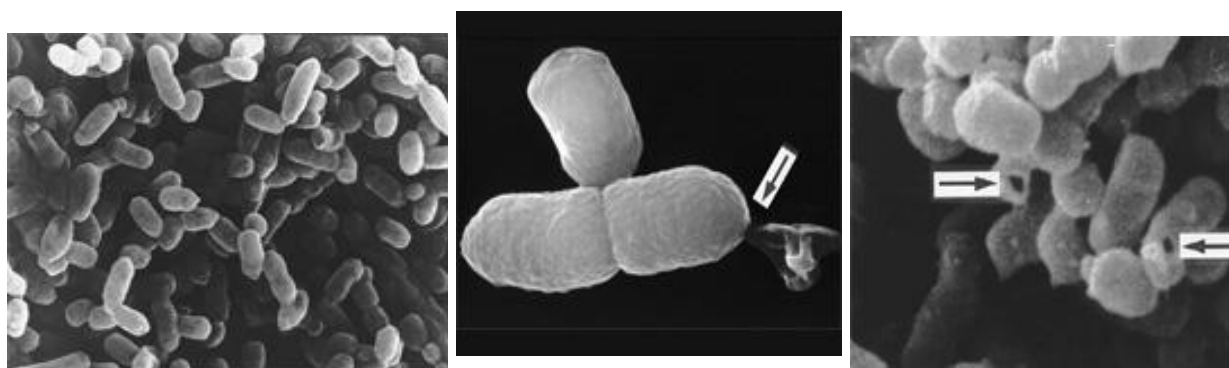
Kitas dažnai tyrinėjamas transkriptas, kuris gali būti sužadintas LPS subbrandintų DL – su *BCL* susijęs A1 (*BCL2A1*) baltymas, kuris, kaip ir *BCL-2*, pasižymi antiapoptozinėmis savybėmis [174]. Jis skatina imuninių ląstelių išgyvenamumą bei formuoja stipresnį imuninį

atsaką [175]. Visi šie faktai rodo, kad LPS sukelti DLs stimuliaciniai signalai pagerina įvairių imuninės sistemos ląstelių sutelkimą ir aktyvina pirminį imuninį atsaką.

2.6.2. Bakteriniai vaiduokliai

Bakteriniu adjuvanto pavyzdžiu galėtų būti inovatyvi vakcinų pateikimo sistema – bakteriniai „vaiduokliai“ BGs (angl. *Bacterial Ghosts*). Bakteriniai vaiduokliai gaminami iš tokių bakterijų kaip *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Vibrio cholerae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida* ir *Helicobacter pylori*. Tai tušti, negyvų gramneigiamų bakterijų apvalkalai (8a pav.), gaunami kontroliuojant į bakteriją įvesto viruso su baltymo E lizės genu raišką. Sužadinto geno E raiška sukelia bakterijos išorinės ir vidinės sienelių susiliejamą ir suformuoja tarpmembraninį tunelį, per kurį visas bakterijos citoplazmos turinys pašalinamas, o vidinės ir išorinės membranos struktūros išlieka nepakitusios. Kadangi citoplazma ir bakterijos DNR fragmentai per susiformavusią skylę išstumiami (8 b pav. ir 8 c pav.), bakterija negali daugintis. Membranoje išlieka visi originalios bakterijos paviršiniai baltymai su savitomis struktūrinėmis, imunogeninėmis ir bio-adhezinėmis savybėmis [176]. Apvalkalo komponentai, veikdami kaip natūralūs adjuvantai, sukelia pavojaus signalus aktyvindami PRR (angl. *pattern recognition receptor*) struktūros atpažinimo receptorius bei taip skatina efektyvų DL brandinimą ir aktyvinimą [177].

BGs apvalkalai - modernios natūralios dalelės, imituojančios gyvas bakterijas, kurias galima saugiai bei efektyviai naudoti vakcinacijoje ir vėžio imunoterapijoje.



a) Gyvos bakterijos

b) Bakterijos turinio lizė

c) Bakterijų apvalkalai

8 pav. BGs gavimas

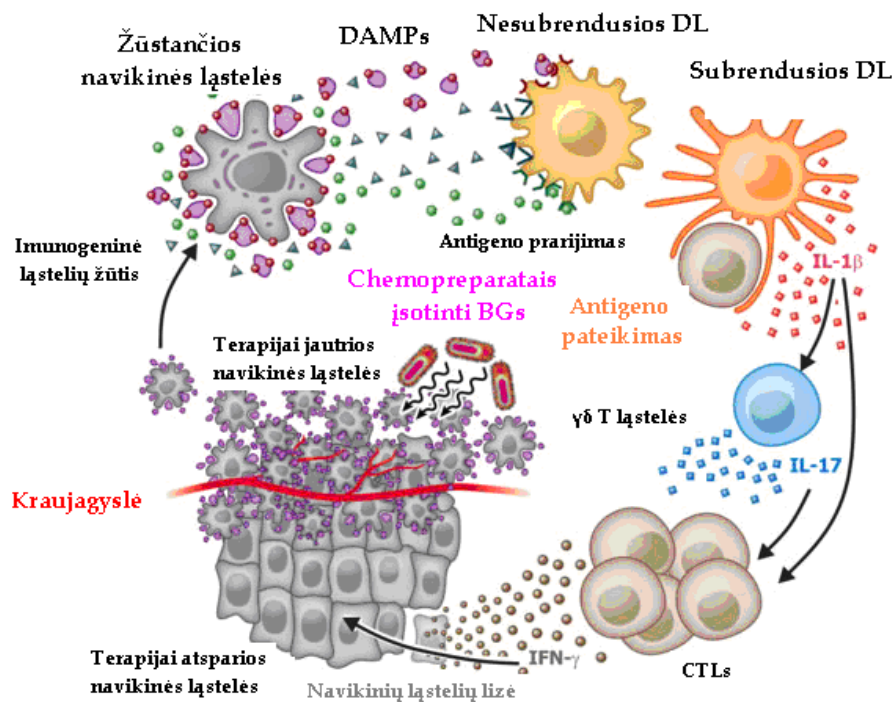
Bakteriniai vaiduokliai (BGs) gaunami iš gyvų *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* ir kt. bakterijų (a); kontroliuojant į bakteriją įvesto viruso baltymo E lizės geno ekspresiją, suformuojamas tarpmembraninis tunelis, per kurį pašalinamas visas bakterijos citoplazmos turinys, o vidinės ir išorinės membranos struktūros išlieka nepakitusios (b); per susiformavusią skylę pasišalinus

citoplazmos turiniui, gaunami tušti, negyvų gramneigiamų bakterijų apvalkalai (c) (modifikuota pagal Bacterial ghost platform technology, 2015)

BGs pasižymi šiomis savybėmis: saugumu (bakterijos negyvos ir nekelia jokios patogeninės grėsmės; nesukelia horizontalaus genų perdavimo pavojaus; nepriklauso genetiškai modifikuotiems organizmams; nereikalauja papildomų adjuvantų); stabilumu (turi visus gramneigiamai bakterijai būdingus paviršiaus baltymus; net ir liofilizuotas išlieka stabilus kambario temperatūroje keletą metų; kitaip nei tradicinėms vakcinoms nereikia šaldymo); imunogeniškumu (BGs yra natūralus adjuvantas; puikiai tinkantis gleivinės imunizacijai; BGs vakcinos recipientui sukelia stiprų imuninį atsaką); įvairiapusiškumu (gali būti sukurtas iš įvairių gramneigiamų bakterijų; BGs vakcinų platforma idealiai tinka vakcinoms prieš naujus antigenus sukurti); pigia ir greitą gamybą (gaminamas fermentacijos būdu).

2.6.3. BGs vėžio imunoterapijoje

Moksliniai BGs efektyvumo ir saugumo tyrimai buvo atlikti naudojant eksperimentinius pelių [178] bei ląstelių kultūrų modelius [179]. Eksperimento autoriai nustatė, kad geriamoji O157:H7 serotipą turinti enterohemoraginė žarnyno bakterija *Escherichia coli* EHEC (angl. *enterohemorrhagic Escherichia coli*) vakcina vaikuoklis, be jokių papildomų adjuvantų, BALB/c pelėms sukelia ląstelinį ir humoralinį imunitetą [178]. Geri bakterinių vaikuoklių BGs efektyvumo rezultatai gauti atliekant eksperimentą su storosios žarnos karcinomos ląstelių kultūromis ir chemopreparatais, kurio metu nustatyta, kad doksorubicinu įsotinti BGs pasižymi dvigubai didesniu citotoksiniu sugebėjimu slopinti storosios žarnos karcinomos ląstelių proliferaciją nei vienas tokios pat koncentracijos doksorubicinas [179].



9 pav. Bakterinių vaiduoklių veikimo schema organizme, sukeliant navikinių ląstelių imunogeninę žūtį

Vėžiui gydyti naudojant chemopreparatais įsotintą BGs adjuvantą, ne tik sunaikinamos vėžinės ląstelės, bet ir sužadinas priešnavikinis imuninis atsakas. Terapija gali būti nukreipta tiek prieš pirminį naviką, tiek prieš metastazes visame organizme. Chemopreparatai (oksaliplatina ir doksorubicinas) suaktyvina imunogeninę ląstelių žūtį, kuri atpalaiduoja DAMPs (su pavojumi susijusios molekulių dalys). Šie signalai pagreitina DL migraciją į navikinę mikroaplinką ir suaktyvina išsiskyrusių naviko antigenų fagocitozę. Išlaisvinti DAMPs jungiasi prie DL paviršiuje esančio toll-like receptoriaus (TLR)-4 sukeldami DL subrendimą, kuris svarbus optimaliai pateikti antigenus T limfocitams bei susiformuoti naviko antigenams specifiniam imuniniam atsakui, naikinančiam esamas naviko ląsteles (modifikuota pagal Annu Rev Immunol, 2013).

Šiuo metu vykdomi ikiklinikiniai BGs tyrimai ruošiant in vitro dendritinių ląstelių vakcinas. BGs tokiose vakcinose gali atlikti dvigubą funkciją – bakterinių adjuvantų ir naviko antigenų pateikimo dendritinėms ląstelėms sistemų. Šiuose tyrimuose aktyviai dalyvauja ir NVI Imunologijos laboratorija kartu su partneriais iš Austrijos (Viena). BGs vakcinacijos strategija kaip gydymas kol kas nėra patvirtintas ir pakartotinai vykdomas tik eksperimentinių gyvūnų modeliuose, todėl nėra taikomas nei veterinarijoje, nei žmonėms [180]. Tačiau remdamiesi kitų autorių bei mūsų pačių gautais rezultatais galime tikėtis, kad BGs dėl savo saugumo bei sugebėjimo sukelti efektyvų imuninį atsaką taps svarbiu preparatu priešvėžinėje imunoterapijoje ateityje.

3. TYRIMO METODIKA IR TIRIAMIEJI

3.1. Tiriamieji

Atliekant šį tyrimą, DL preparatai buvo ruošiami iš pacientų, sergančių pirminiu urogenitaliniu naviku (prostatos adenokarcinoma, šviesiųjų ląstelių tipo inkstų ląstelių karcinoma ar šlapimo pūslės karcinoma), ir sveikų donorų periferinio kraujo monocitų. Tyrime dalyvavo 32 Nacionaliniame vėžio institute (NVI) 2011–2012 metais Onkourologijos skyriuje gydyti asmenys ir 15 sveikų savanorių. Savanorių donorų kraujo preparatai buvo gauti iš VšĮ Nacionalinio kraujo centro. Tyrimui atlikti buvo gauti du Regioninio biomedicininės etikos komiteto leidimai (2011–2012 m. Nr.158200-09-381-104 ir 2014–2015 m. Nr.158200-14-720-237). Visi tyrimo dalyviai pasirašė informuoto asmens sutikimo formą (žr. prieduose).

3.2. Tiriamųjų atrankos kriterijai

Įtraukimo į tyrimą kriterijai:

- visiems tyrimo dalyviams ≥ 18 metų
- onkologiniams pacientams histologiškai verifikuotas III–IV stadijos prostatos, inkstų ar šlapimo pūslės navikas;
- visi tyrimo dalyviai pasirašė informuoto asmens sutikimą;
- visiems tyrimo dalyviams nebuvo taikyta kaulų čiulpų kamieninių ląstelių ar alogeninė organų transplantacija.

Neįtraukimo kriterijai:

- jaunesni nei 18 metų individai;
- sergantys nestabiliomis psichikos ligomis, ūmiomis infekcinėmis ligomis, sunkiomis (intensyvaus gydymo reikalaujančiomis) širdies ir kraujagyslių, kvėpavimo, virškinimo, urogenitalinės, bei endokrininės sistemų ligomis, taip pat hematologinėmis ligomis;
- sergantys autoimuninėmis ligomis (sisteminė raudonąja vilklige, reumatoidiniu artritu, dermatomiozitu ir kt.);
- per paskutinius penkerius metus sirgę kitos lokalizacijos piktybiniu naviku;
- sergantys ūmiu ar lėtiniu hepatitu B, hepatitu C, sifiliu;
- infekuoti ŽIV-1, ŽIV-2;

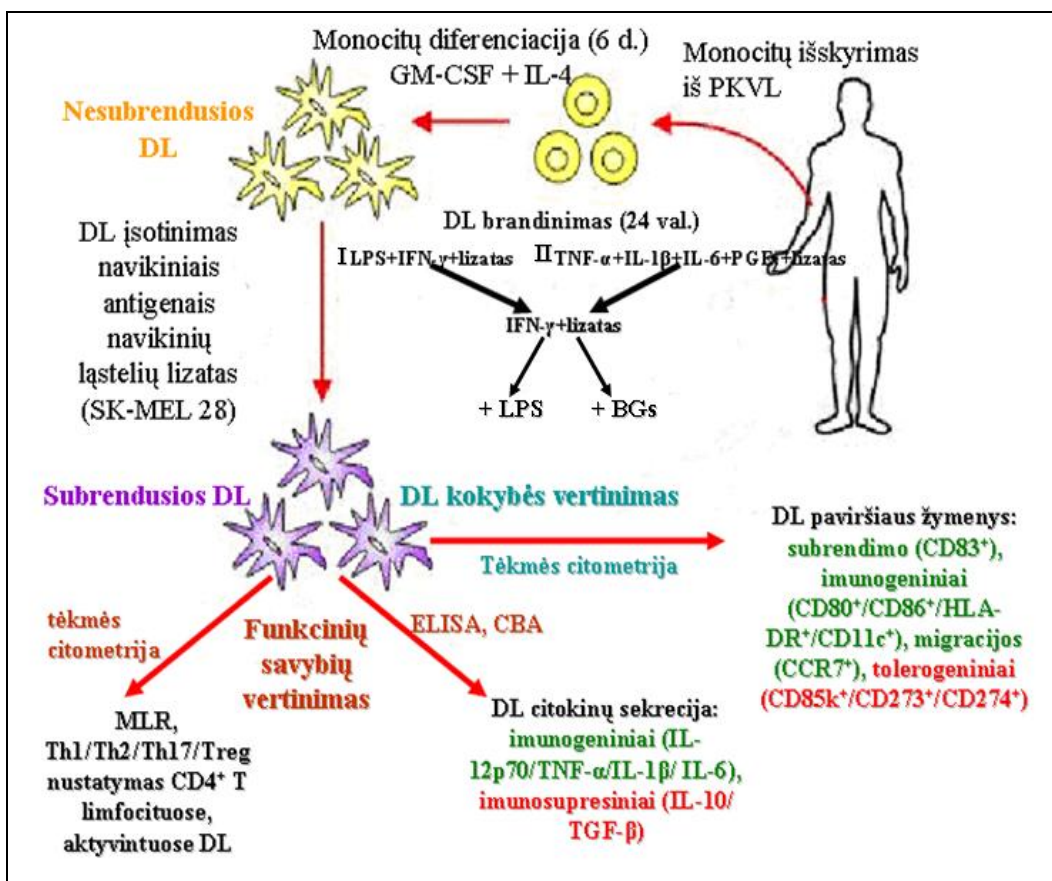
3.3. Tyrimo metodika

Medžiagos ir priemonės

1 lentelė. Darbe naudotos medžiagos ir priemonės

Įranga ir priemonės	Gamintojo pavadinimas
Laminarinio oro srauto boksas	Labgard NU-440, Nuaire
CO ₂ inkubatorius	Autoflow NU-5510, Nuaire
Automatinis ląstelių skaičiuotuvas	Adam, Digital Bio
Šaldoma centrifuga	Rotixa 50RS Hettich; ALC PK 120R
Inversinis mikroskopas	Biolam P-1, Lomo
Purtyklė	Vortex V-1 plus, Biosan
Tėkmės citometras	BD LSR II
Šaldomoji dėžutė	Thermo Scientific
Spektrofotometras	NanoDrop 2000, Thermo Scientific
CPT mėgintuvėliai	BD Vacutainer
Medžiagos ir tirpalai	Gamintojo pavadinimas
Reagentai tėkmės citometrijai: BD FACSTFlow, BD FACSRinse, BD FACSClean	BD Biosciences
„Adam“ dažų rinkinys	NanoEnTek
X-VIVO- 15 mitybinė terpė	Lonza
FBS	Gibco
Lymphoprep tirpalas	Fresenius Kabi Norge AS
PBS tirpalas	Lonza
DMSO tirpalas	Sigma-Aldrich
Trypsin/EDTA tirpalas	Lonza
CellFix tirpalas	BD Biosciences
CellWash tirpalas	BD Biosciences
Penicilinas ir streptomocinas	Lonza
CFSE	Sigma-Aldrich
PHA	Sigma-Aldrich
LPS	Sigma-Aldrich
IFN	Miltenyi Biotec
IL-4	Miltenyi Biotec
SK-MEL 28 melanomos ląstelių linija	ATTC
BGs	BIRD-C
Anti- human HLA-DR-PerCP	BD Biosciences
Anti-human CD197- PE	BD Biosciences
Anti-human CD11c -APC	BioLegend
Anti-human CD83-BV510	BD Biosciences
Anti-human CD14 -V450	BD Biosciences
Anti-human CD80 -FITC	BD Biosciences
Human CD85k-FITC	Miltenyi Biotec
Anti-human CD274 -PE	BD Biosciences
Anti-human CD3-APC	BD Biosciences

3.3.1. Tyrimo schema ir protokolai



10 pav. Supaprastinta eksperimentinio darbo (dendritinių ląstelių moduliavimo ir funkcijų tyrimo) schema

Monocitų išskyrimas: iš paimto veninio kraujo išskiriamos periferinio kraujo vienbranduolės ląstelės (PKVL); iš PKVL išskiriami monocitai. **Nesubrendusių DL gavimas iš monocitų:** naudojant GM-CSF ir IL-4 citokinus, monocitai virsta nesubrendusiomis dendritinėmis ląstelėmis. **DL brandinimas:** šeštą monocitų keitimosi dieną DL įsotinamos navikiniais antigenais, DL inkubuojant su navikinių ląstelių lizatu, paruoštu iš melanomos ląstelių linijos SK-MEL 28. Po įsotinimo navikiniais antigenais DL brandinamos su skirtingais citokinų brandinimo mišiniais (pirmame tyrimo etape DL brandinimui naudoti I (LPS/IFN- γ /lizatas) ir II (TNF- α /IL-1 β /IL-6/PGE $_2$ /lizatas) brandinimo mišiniai. Nustačius, kad I brandinimo mišinys su IFN- γ buvo pranašesnis už II brandinimo mišinį, antrame tyrimo etape naudotas I mišinys, papildant tyrimą dar vienu bakteriniu adjuvantu BGs. **Subrendusių DL kokybės vertinimas tėkmės citometrijos metodu:** subrendimo (CD83 $^{+}$), imunogeninių (CD80 $^{+}$, CD86 $^{+}$, HLA-DR $^{+}$, CD11c $^{+}$) ir tolerogeninių (CD85k $^{+}$, CD273 $^{+}$, CD274 $^{+}$) žymenų analizė (žalia žymenų spalva atspindi imunogenines DL savybes, raudona – tolerogenines savybes). **Funkcinių savybių vertinimas ELISA ir CBA metodu:** citokinų sekrecija DL brandimo metu (žalia citokinų spalva atspindi imunostimuliacines DL savybes, raudona – imunosupresines savybes). **DL savybių aktyvinti ir poliarizuoti limfocitus vertinimas tėkmės citometru:** CD3 $^{+}$ T limfocitų proliferacijos potencialo vertinimas MLR metodu, CD4 $^{+}$ T limfocitų Th1/Th2/Th17/Treg poliarizacijos fenotipo bei citokinų sekrecijos analizė.

I tyrimo etapas

- Pacientams, sergantiems pirminiu urogenitaliniu naviku, prieš operaciją buvo imama iki 32 ml veninio kraujo į 4 specialius CPTTM (angl. *Cell Preparation Tube With Sodium Heparin*) mėgintuvėlius, į kuriuos telpa po 8 ml kraujo. CPTTM vakuminiai, sterilūs, su natrio citratu mėgintuvėliai naudojami vienbranduolėms ląstelėms išskirti iš periferinio kraujo. Ląstelių atskyrimo terpę sudarė poliesterio gelis ir tankio gradiento skystis. Dėltokios sudėties ląstelės galima atskirti vieno centrifugavimo metu. Paimtas veninis kraujas naudotas vienbranduolėms ląstelėms (PKVL) išskirti. Iš PKVL išskirti monocitai, iš kurių, naudojant GM-CSF ir IL-4 citokinus, buvo gautos nesubrendusios dendritinės ląstelės. Šios vėliau brandintos dviem skirtingais citokinų brandinimo mišiniais, į kurių sudėtį įėjo navikinis lizatas, paruoštas iš melanomos ląstelių linijos SK-MEL 28:

I – LPS + IFN- γ + naviko lizatas

II – TNF- α + IL-1 β + IL-6 + PGE₂ + naviko lizatas

- Tėkmės citometrijos būdu ištirta imunogenines ir tolerogenines dendritinių ląstelių savybes atspindinčių žymenų raiška.

- ELISA metodu ląstelių kultūrų supernatante nustatyta imunosupresinio IL-10 ir imunogeninio IL-12p70 (interleukinas 12p70) citokinų sekrecija.

Atlikus I eksperimento dalį ir nustačius, kad I brandinimo mišinys su bakteriniu adjuvantu LPS buvo pranašesnis už II brandinimo mišinį be jo, II tyrimo etape kaip antigenų pernešimo komponentas DL brandinti pasirinktas dar vienas bakterinis adjuvantas – BGs. Brandinimo mišiniai su skirtingais bakteriniais adjuvantais buvo palyginti tarpusavyje.

II tyrimo etapas

- Sveikų donorų kraujas buvo paimtas Nacionaliniame kraujo centre standartinės patvirtintos procedūros metu. Tyrimui naudotas 50 ml konservuoto kraujo vieneto trombocitų ir leukocitų sluoksnis (trombocitų ir leukocitų priemaišos), atskirtas standartinės patvirtintos kraujo komponentų ruošimo procedūros metu. Iš šio kraujo išskirtos PKVL. Iš PKVL išskirti monocitai, naudojant GM-CSF bei IL-4 citokinus, gautos nesubrendusios DL, kurios buvo brandintos dviem citokinų brandinimo mišiniais su skirtingais bakteriniais adjuvantais. Į brandinimo mišinių sudėtį įėjo navikinių ląstelių lizatas, paruoštas iš melanomos ląstelių linijos SK-MEL 28. Kontrolinių brandinimo mišinių sudėtyje navikinių ląstelių lizato nebuvo:

I – LPS brandinimo mišinys su navikinių ląstelių lizatu ir be jo

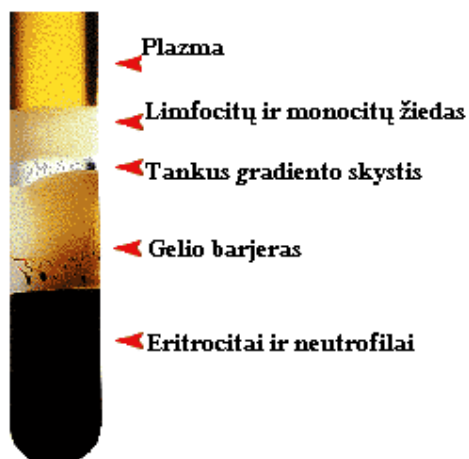
II – BGs brandinimo mišinys su navikinių ląstelių lizatu ir be jo

- Tėkmės citometrijos būdu įvertinta imunogenines bei tolerogenines dendritinių ląstelių savybes atspindinčių žymenų raiška;
- Magnetiniu metodu MACS (angl. *magnetic-activated cell sorting*) iškirtos autologinės CD4⁺ ir CD8⁺ T ląstelės. Magnetinis ląstelių atskyrimas vykdytas dviem etapais: iš sveikų donorų PKVL išskirti CD3⁺ T limfocitai, kurie vėliau surūšiuoti į CD8⁺ ir CD4⁺ T ląsteles.
- Tėkmės citometrijos būdu įvertinti CD4⁺ T limfocitų imunogenines ir tolerogenines savybes atspindintys paviršiaus ir viduląsteliniai žymenys;
- Atlikta autologinė mišrioji limfocitų funkcinio aktyvumo reakcija (MLR);
- DL brendimo metu, taikant citometrinę CBA (angl. *cytometric bead array*) analizę, nustatyta DL citokinų sekrecijos profilio dinamika. Citokinų sekrecijos kokybiniai ir kiekybiniai pokyčiai buvo išmatuoti 5 laiko taškuose (praėjus 2, 4, 6, 12 ir 24 val. po brandinimo mišinių užpylimo).
- Po CD4⁺ stimuliacijos subrendusiomis DL, taikant citometrinę CBA analizę, ląstelių kultūrų supernatante nustatytas DL ir T limfocitų funkcinis aktyvumas.

3.4. Periferinio kraujo apdorojimas

I būdas - CPTTM kraujo mėginiai

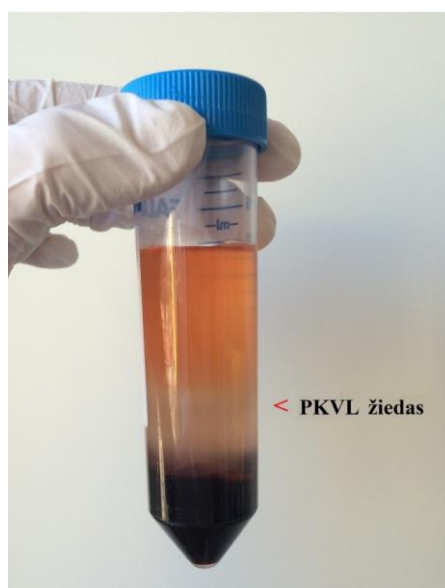
CPTTM mėgintuvėliuose esantis pacientų kraujas centrifuguotas 20 min. 1500 g greičiu. Po centrifugavimo gauti PKVL žiedai (11 pav.) nusiurbti ir perkelti į 50 ml sterilų konusinį mėgintuvėlį, kuris iki 50 ml žymės užpildytas steriliu fosfatiniu buferiniu tirpalu PBS ir visa tai centrifuguota 10 min. 250 g greičiu. Nupiltas supernatantas dar du kartus praplautas PBS tirpalu ir centrifuguotas tokiu pat režimu. Po centrifugavimo ląstelės resuspenduotos X-VIVO terpėje, gaunant ląstelių suspensiją, kurios koncentracija $\sim 5 \times 10^6$ ląst./ml.



11 pav. Kraujo komponentų pasiskirstymas pagal tankio gradientą

II būdas – PKVL išskyrimas iš trombocitų/leukocitų sluoksnio

Sveikų donorų kraujas buvo skiedžiamas X-VIVO terpe, santykiu 1:1. Skiestas kraujas atsargiai sulašintas ant perpus mažesnio tūrio tankio gradientą formuojančios medžiagos (Limfoprep) tirpalo (analogiško CPT mėgintuvėlyje esančiam jau paruoštam tankio gradiento tirpalui) ir centrifuguotas 30 min 400 g greičiu. Po centrifugavimo nusiurbti balti PKVL žiedai perkelti į sterilų 50 ml konusinį mėgintuvėlį (12 pav.). Į mėgintuvėlį iki 50 ml žymės įpilta sterilaus PBS tirpalo ir centrifuguota 10 min 250 g greičiu. Nupylus supernatantą ir dar 2 kartus praplovus PBS tirpalu, buvo centrifuguojama tokiu pat režimu. Nucentrifuguotų ir resuspenduotų X-VIVO terpėje ląstelių koncentracija buvo 5×10^6 ląst./ml.



12pav. Po kraujo centrifugavimo matomas PKVL žiedas

3.5. Monocitų atskyrimas iš PKVL ir nesubrendusių DL gavimas

Pacientų nesubrendusių DL gavimas iš monocitų ir įsotinimas navikiniais antigenais

Gautoji ląstelių suspensija išpilstyta po 3 ml į sterilios 6 šulinėlių plokštelės kiekvieną šulinėlį. Ląstelės inkubuotos 2 val. 37 °C temperatūros 5 % CO₂ režimu (monocitų prilipimas prie dugno). Po inkubacijos terpė su joje esančiomis neprilipusiomis ląstelėmis nupilta, o kiekviename šulinėlyje prilipę monocitai 2 kartus plauti 5 ml steriliu PBS tirpalu. Monocitai resuspenduoti diferencijavimo terpėje (50 ng/ml GM-CSF ir 50 ng/ml IL-4 X-VIVO terpėje, turinčioje 2 % FCS). Į kiekvieną šulinėlį įpilta po 3 ml monocitams paveikti naudotos terpės ir inkubuota 37° C temperatūros 5 % CO₂ režimu. Trečią inkubavimo dieną iš kiekvieno šulinėlio buvo nusiurbta pusė tūrio (1.5 ml) naudotos terpės, pakeičiant ją tokiu pat tūriu šviežios terpės ir toliau inkubuota tokiu pačiu režimu. Šeštą dieną labai atsargiai, nepaliekiant šulinėlio dugne nusėdusių suspensinių nesubrendusių dendritinių ląstelių ir nusiurbus 2,8 ml naudotą terpės bei įpylus šviežios (kitokios sudėties) 2 ml X-VIVO terpės, į kiekvieną šulinėlį buvo dedama navikinių ląstelių lizato (toks tūris, kuriame yra 30 µg baltymų) ir 4 val. inkubuota 37° C temperatūros 5 % CO₂ režimu.

Donorų nesubrendusių DL gavimas iš monocitų ir įsotinimas navikiniais antigenais

Ląstelių, kurių koncentracija 5x10⁶ ląst./ml, suspensija kultivuota keturiuose 75 cm plastikiniuose flakonuose 2 valandas 37° C temperatūros, 5 % CO₂ režimu (monocitų prilipimas prie dugno). Neprilipusios prie flakonų dugno T, B ir NK ląstelės buvo nupiltos ir saugomos tolesniems eksperimentams. Prilipę monocitai 6 dienas auginti 37° C temperatūros 5 % CO₂ režimu 10 ml 2 % FCS X-VIVO terpėje, kurios sudėtyje buvo 1000 UI/ml GM-CSF ir 3000 UI/ml IL-4 bei antibiotikų (penicilino ir streptomicino). Trečią inkubavimo dieną buvo nusiurbta pusė tūrio naudotos terpės ir įpilta tokio pat tūrio šviežios terpės bei toliau inkubuota tokiomis pat sąlygomis.

Šeštą dieną labai atsargiai, nepaliekiant šulinėlio dugne nusėdusių suspensinių nesubrendusių DL, buvo nusiurbta 9 ml terpės ir įpilta 2 ml šviežios kitos sudėties terpės – X-VIVO. Tuomet į brandinimui su lizatu skirtą flakoną (LPS/IFN-γ) įpilta navikinių ląstelių lizato (toks tūris, kuriame yra 30 µg baltymų) ir inkubuota 4 val. drėgnoje 37° C temperatūros 5 % CO₂ režimu (nesubrendusios DL įsotintos navikiniais antigenais). Bakterinis adjuvantas BGs navikiniais antigenais buvo įsotintas BGs inkubuojančią su navikiniu lizatu 1 val [181]. Tuo tikslu

buvo paimta BGs (3µl/ml) ir toks navikinių ląstelių lizato tūris, kuriame yra 30 µg baltymų, ir inkubuota 1 val. steriliomis sąlygomis (laminare) kambario temperatūroje.

3.6. Navikinių ląstelių lizato paruošimas

Navikiniam lizatui paruošti naudota melanomos ląstelių linija SK-MEL 28. Fiziologiniame tirpale esanti navikinių ląstelių suspensija centrifuguota 7 min 250 g režimu, +4° temperatūroje. Po centrifugavimo susidaręs supernatantas nupiltas, o mėgintuvėlio dugne esančios ląstelės resuspenduotos steriliame distiliuotame vandenyje. Mėgintuvėlis su navikinių ląstelių suspensija perkeltas į -196° C temperatūros skystą azotą. Suspensijai užšalus, mėgintuvėlis staigiai perkeltas į +37° C temperatūros vandens vonelę ir laikytas tol, kol ląstelių suspensija atšildavo. Šis šildymo/šaldymo ciklas kartotas 5 kartus. Gautas navikinių ląstelių lizatas centrifuguotas 12 min 400 g, + 4° C temperatūroje. Po centrifugavimo supernatantas nupiltas ir perkeltas į kitą mėgintuvėlį. Į mėgintuvėlį įpilta 1/10 jo tūrio PBS tirpalo ir smarkiai supurtyta. Siekiant išvengti užkrėtimo, supernatantas, naudojant sterilius švirkštą ir filtrą, laminare steriliai nufiltruotas. Pagaminto navikinių ląstelių lizato baltymų koncentracija skaičiuota *NanoDrop* 2000 spektrofotometru. Gautas lizatas užšaldytas -70 °C temperatūroje.

3.7. DL brandinimas. I ir II brandinimo būdai

I būdas

Po įsotinimo navikiniais antigenais, nesubrendusios pacientų DL brandintos 24 val. 37° C temperatūros, 5% CO₂ režimu šiais brandinimo mišiniais:

- a) bakteriniu adjuvantu LPS (200 ng/ml) ir IFN-γ (50 ng/ml)
- b) IL-1β (10 ng/ml), IL-6 (10 ng/ml), TNFα (10 ng/ml) ir PGE₂ (1 µg/ml) citokinų mišiniu

Skirtingais būdais subrandintų DL suspensijos ląstelės suskaičiuotos ir suspensija dalimis išpilstyta į atskirus sterilius mėgintuvėlius. Atliktas ląstelių morfologinis įvertinimas mikroskopu. Dalis pacientų ląstelių panaudota paviršinių žymenų analizei tėkmės citometrijos būdu. Likusios DL panaudotos citokinų (IL-10 ir IL-12p70) sekrecijos nustatymui ELISA būdu. Citokinų sekrecija buvo pamatuota po 24 val. DL restimuliacijos su CD40L (šia restimuliacija buvo norima imituoti sąlygas *in vivo*, kuriomis, migruodamos iš periferinių audinių ir

susidūrusios su antigenais DL subręsta, o limfmazgiuose subrendusios DL yra restimuliuojamos Th ląstelių). Tuo tikslu ląstelės buvo resuspenduotos 500 µl X-VIVO terpėje, perkeltos į 200 µl šulinėlį, į kurį pridėta 5 µl paruošto CD40L tirpalo, ir inkubuotos 24 val. 37° C temperatūros, 5% CO₂ režimu (citokinų sekrecijos stimuliavimas). Vėliau ląstelės centrifuguotos 10 min. 250 g greičiu, supernatantas nusiurbtas, patalpintas į 2 ml talpos šalčiui atsparų sterilų mėgintuvėlį ir užšaldytos –70° temperatūroje.

II būdas

Po įsotinimo navikiniais antigenais, nesubrendusios sveikų donorų DL brandintos 24 val. 37° C temperatūros, 5% CO₂ režimu šiais brandinimo mišiniais:

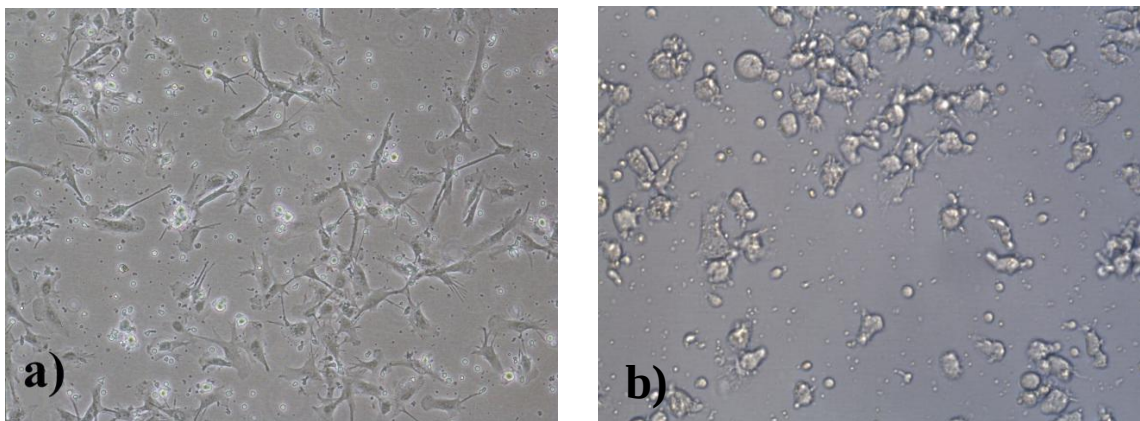
- a) adjuvanto LPS (200 ng/ml) brandinimo mišiniu (kontrolė – LPS be navikinio lizato)
- b) adjuvanto LPS (200 ng/ml) brandinimo mišiniu ir navikiniu lizatu
- c) adjuvanto BGs (3µl/ml) brandinimo mišiniu (kontrolė – BGs be navikinio lizato)
- d) brandinimo mišiniu su navikinių ląstelių lizatu įsotintu adjuvantu BGs (3µl/ml).

Brandinant šiuo būdu bakterinis adjuvantas BGs 1 valandą buvo inkubuotas su navikinių ląstelių lizatu (vyko BGs įsotinimas naviko antigenais) [181] ir tik paskui dedamas į brandinimo terpę su DL.

Dalis donorų subrendusių DL panaudota paviršinių žymenų analizei tėkmės citometrijos būdu (1,5 mln ląstelių), o likusios ląstelės užšaldytos tolesniems eksperimentams atlikti.

3.8. Ląstelių morfologinis įvertinimas

DL subrendimas susijęs su jų morfologiniais pokyčiais. Brendimo metu ląstelės įgauna joms specifinę formą – keičiasi jų ataugėlių skaičius ir forma, membranos ploto santykis su ląstelės „kūnu“. Norint įvertinti bei palyginti ląstelių išorinius pokyčius, jos buvo nufotografuotos brandinimo pradžioje ir pabaigoje naudojant inversinį mikroskopą *Biolam P-1*.



13 pav. DL vaizdas per inversinę mikroskopą, (a) bręstančios ir (b) subrendusios DL

3.9. Ląstelių skaičiavimas ir gyvybingumo vertinimas

Ląstelės skaičiuotos naudojant matavimo rinkinį, skirtą automatiniam ląstelių skaičiuotuvui, *Adam*. Po 20 μ l ląstelių tirpalo perkelta į du 1 ml talpos mėgintuvėlius. Į vieną mėgintuvėlį lašinta 20 μ l dažų, skirtų įvertinti bendrą ląstelių skaičių, o į kitą mėgintuvėlį lašintas toks pats dažų kiekis, skirtas įvertinti negyvų ląstelių skaičių. Speciali *AccuChip* plokštelė, į kurią buvo sulašinta po 12 μ l paruoštų tiriamųjų mėginių, įdėta į *Adam* skaičiuotuvą. Skaičiuotuvo ekrane pateiktas ląstelių gyvybingumo (%) įvertinimas bei duomenys apie bendrą ir negyvų ląstelių skaičių.

3.10. Ląstelių užšaldymas ir atšildymas

Ląstelėms šaldyti naudota šaldymo terpė, sudaryta iš 90% veršelio serumo (FBS) ir 10% DMSO (dimetilsulfoksidas). Ląstelės buvo resuspenduotos PBS tirpale, perkeltos į mėgintuvėlius ir centrifuguotos 7 min 250 g greičiu. Supernatantas nupiltas, o mėgintuvėlio dugne nusėdusios ląstelės užpiltos puse šaldymui reikiamo FBS kiekio. Tirpalas su ląstelėmis perkeltas į specialius, giluminiam šaldymui atsparius *Cryo* mėgintuvėlius. Siekiant kuo mažiau pažeisti šaldomas DL, likusi FBS dalis sumaišyta su DMSO ir atsargiai užpilta ant mėgintuvėlyje esančių ląstelių. Mėgintuvėliai buvo sudėti į šaldymo dėžutę su kambario temperatūros izopropanoliu, reikalingu laipsniškam šaldymo procesui kontroliuoti. Mėginiai su šaldymo dėžute mažiausiai 4 val. laikyti -70°C šaldiklyje, o vėliau išimti iš dėžutės ir palikti -70°C šaldiklyje reikiamam laikui.

Atšildant ląsteles, mėgintuvėliai su ląstelėmis buvo perkelti į 37°C temperatūros vandens vonelę ir išimti visiškai joms neatšilus, t.y. kai mėgintuvėlyje dar buvo matomi maži ledo kristalai. Siekiant kuo greičiau pašalinti šaldymo terpės likučius, ląstelės su ledo kristalais perkeltos į 37°C temperatūros X-VIVO mitybinę terpę ir nucentrifuguotos.

3.11. DL ir CD4⁺ limfocitų paviršiaus žymenų dažymas

Surinktos į citometrinius mėgintuvėlius DL buvo praplautos 1 ml PBS tirpalu ir centrifuguotos 7 min. 250 g greičiu. Supernatantas nupiltas, ląstelės kiekviename mėgintuvėlyje resuspenduotos 100 µl PBS tirpalo. Ląstelių paviršinių žymenų dažymui buvo naudoti moAk, konjuguoti su šiais fluorochromais: a) fluoresceino izotiocianatu (FITC), b) fikoeritrinu (PE), c) peridinino-chlorofilo proteinu (PerCP), d) žalsvai mėlynai (*Alexa Fluor 647*), e) fikoeritrino ir cianino tandemu (PE-Cy5), f) peridinino-chlorofilo proteino ir organinio dažo *eFluor* tandemu (*PerCP-eFluor 710*), g) horizonto violetu (*Horizon V500* ir *Horizon V450*), j) alofikocianinu (APC), k) briliantiniu violetu (BV 421 ir BV 510). Kontrolę atitiko nenusidažiusios ląstelės, o kitos DL inkubuotos 20 min. tamsoje kambario temperatūroje su 10 µl skirtingais fluorochromais konjuguotais monokloniniais antikūnais: anti-CD80-FITC⁺ arba anti-CD80-Horizon V450⁺; anti-CD83-BV510⁺ arba anti-CD83-PE-Cy5⁺; anti-HLA-DR-PerCP⁺ arba anti-HLA-DR-Horizon V500; anti-CD197-PE⁺ arba anti-CD197-APC⁺; anti-CD11c-APC⁺; anti-CD273-PE⁺; anti-CD274-PE⁺ arba anti-CD274-FITC⁺; anti-CD85k-FITC⁺ arba anti-CD85k-*PerCP-eFluor 710*⁺; anti-CD14-Horizon V450⁺. Po dažymo moAk ląstelės 2 kartus plautos 1 ml *CellWash* (ląstelių praplovimo) buferiniu tirpalu ir centrifuguotos 7 min. 250 g greičiu. Supernatantas nupiltas, nusidažiusios ląstelės fiksuotos 300 µl *Cell-FIX* tirpale ir laikytos +4° C temperatūroje ne ilgiau kaip 24 val., o po to atlikta citometrinė analizė. Siekiant nustatyti nespecifinį antikūnų jungimąsi, buvo naudotos izotipinės kontrolės kiekvienam antikūnui (IgG1/IgG2a/IgG2b).

Tokia pati dažymo procedūra buvo atlikta dažant paviršinius CD4⁺ (anti-CD4-BV510⁺; anti-CD3-*Alexa Fluor 488*⁺ (žalsvai mėlynas); anti-CD25-PE-Cy7⁺ (fikoeritrino ir cianino fluorochromų tandemas); anti-CD127- BV421⁺ (briliantinis violetas); anti-CD39-PE⁺) žymenis. Norėdami įvertinti nespecifinį molekulių prisijungimą, kiekvienam moAk naudojome izotipines IgG1/IgG2a/IgG2b kontroles.

3.12. CD4⁺ limfocitų viduląstelinių žymenų dažymas

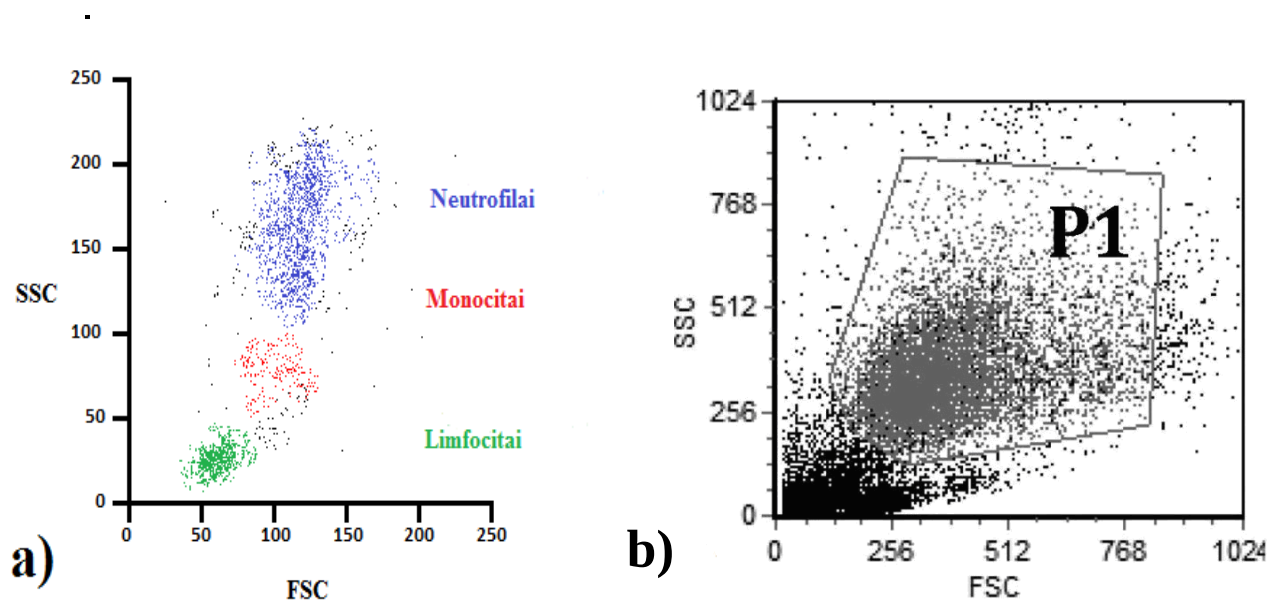
Viduląstelinių žymenų dažymui naudotas „*BD Cytofix/Cytoperm plus*“ rinkinys pagal gamintojo rekomendacijas. Limfocitai, prieš tai nudažyti paviršiniaisiais žymenimis, siekiant išvengti agregatų susiformavimo, supurtyti elektrine purtykle bei resuspenduoti 250 µl fiksacijos-permeabilizacijos tirpale. Ląstelių suspensija inkubuota 20 min 4° C. Po inkubacijos, į mėgintuvėlius su ląstelėmis, įpilta po 1 ml permeabilizacijos-plovimo buferinio tirpalo ir 5 min

centrifuguota 250 g greičiu. Supernatantas nupiltas, į mėgintuvėlį įdėta 10 μ l anti-FoxP3-APC⁺ viduląstelinių moAk ir inkubuota 20 min 4° C. Pasibaigus inkubacijos laikui, ląstelės praplautos 1 ml permeabilizacijos-plovimo buferiu ir 5 min centrifuguotos 250 g greičiu. Supernatantas nupiltas, ląstelės, purtant elektrine purtykle, resuspenduotos 300 μ l *CellWash* tirpale. Paruošti mėginiai buvo išanalizuoti tėkmės citometru.

3.13. Tėkmės citometrija

T limfocitų fenotipo, DL subrendimo bei aktyvumo, ląstelių paviršinių bei viduląstelinių žymenų raiškos analizė buvo atlikta LSR II tėkmės citometru, turinčiu tris lazerius (*VioFlame* 405 nm, *Sapphire blue* 488 nm ir *HeNe* 633 nm) ir galinčiu aptikti 8 skirtingų spalvų fluorescencijas. Limfocitai ir dendritinės ląstelės nuo monocitų ir granulocitų buvo atskirta pagal priekinę ir šoninę lazerio šviesos sklaidas (14 pav.). Nespecifinei monokloninių antikūnų sąveikai su ląstelėje esančiomis įvairiomis molekulėmis atskirti buvo naudotos izotipinės kontrolės.

Ląstelės buvo išanalizuotos taikant kompiuterines *FACSDiva* ir *FlowJo* programas. Kiekvieno mėginio buvo analizuota po 10⁴ ląstelių.

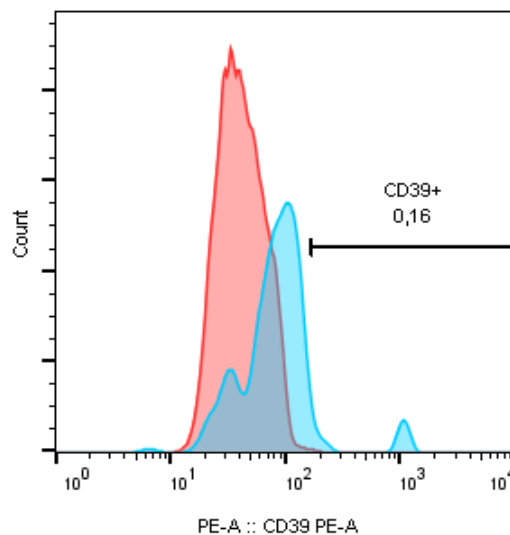


14 pav. Periferinio kraujo vienbranduolių ląstelių (PKVL) ir dendritinių ląstelių (DL) populiacijų taškiniai grafikai

a) PKVL analizė pagal SSC ir FSC parametrus, kur kiekvienas taškas atspindi ląstelę; b) DL populiacijos (P1) pasiskirstymas pagal dydį (FSC) ir granulių turumą (SSC).

3.14. Treg ląstelių nustatymas CD4⁺ limfocitų populiacijoje

Yra žinoma, jog stimuliuojant CD4⁺ T limfocitus dendritinėmis ląstelėmis gali susidaryti ne tik efektorinių ląstelių populiacijos, bet ir tolerancija pasižyminčios Treg ląstelės. Šios ląstelės fenotipiškai apibūdinamos kaip CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺CD127⁻ [40], tačiau daugėjant tyrimų, ima aiškėti, jog tolerogeniškoms, aktyvioms ir stipriomis imunosupresinėmis funkcijomis pasižyminčioms Treg ląstelėms būdinga ir aukšta CD39 raiška [41]. Todėl norėdami nustatyti, iš kokios dalies aktyvintų CD4⁺ ląstelių po stimuliacijos subrendusiomis DL susidarė Treg ląstelės, CD4⁺ T limfocitus dažėme viduląstelinio FOXP3 moAk, paviršiniaus CD4, CD25, CD127 bei CD39 moAk, konjuguotais su atitinkamais fluorochromais, ir tėkmės citometru išmatavome jų fluorescenciją. Žymėtų moAk ląstelių fluorescencija buvo lyginta su izotipine kontrole ir nustatytas Treg CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺CD127⁻CD39⁺ ląstelių fenotipas (15 pav).



15 pav. Treg CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺CD127⁻ populiacijos pasiskirstymas pagal CD39⁺ raišką

Histograma atspindinti žymens CD39 raišką Treg CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺CD127⁻ ląstelių populiacijoje; raudona spalva pažymėta kontrolė (nedažytos ląstelės), žydra spalva žymi CD39⁺ žymens raišką.

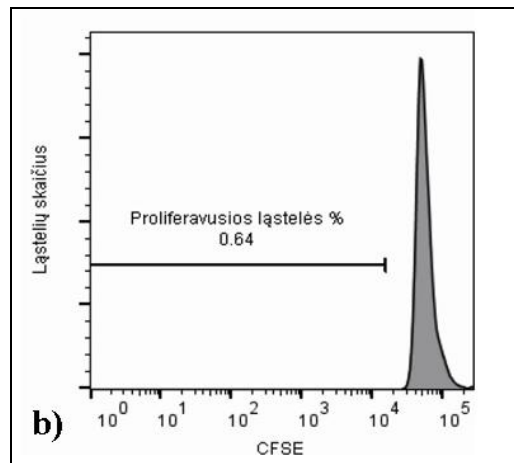
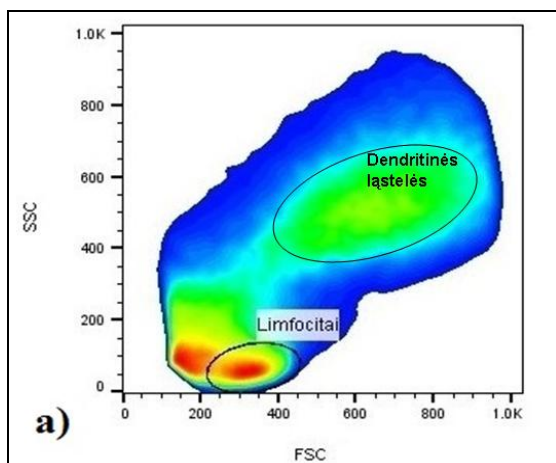
3.15. DL funkcinio aktyvumo įvertinimas (MLR)

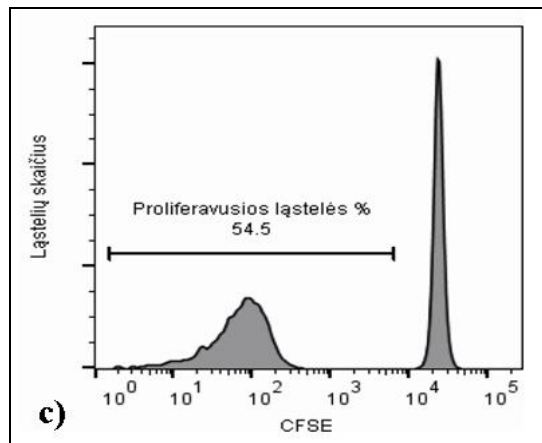
Mišrioji limfocitų reakcija (MLR) – imunologinis metodas, naudojamas ląstelinio imuninio atsako tyrimams. Šio tyrimo metu vertinama T limfocitų, aktyvintų subrendusiomis DL, proliferacija. Daugybei medžiagų specifiškai ir nespecifiškai sukėlus T ląstelių aktyvinimą, padidėja citokinų bei jų receptorių raiška ir, svarbiausia, sukeliamas aktyvių T ląstelių proliferacija. Tyrimai, susiję su proliferacija, yra patikimi, paprastai atliekami ir plačiai taikomi įvertinti bendrą ląstelių imunogeninį potencialą ir funkcinį aktyvumą [182]. T ląstelės,

inkubuojamos su alogeninėmis/autologinėmis stimuliuojančiomis ląstelėmis, gauna aktyvinimo signalus, kuriais paprastai yra svetimi antigenai, pavyzdžiui, stimuliuojančių ląstelių paviršiuje išreikštos MHC I ir II klasės molekulės, o sąveika tarp DL ir T ląstelių yra pagrįsta peptido pateikimu T limfocitui per MHC kompleksą [183]. Taigi, DL-T ląstelių sąjunga gali sukelti T limfocitų proliferaciją, skatinti citokinų gamybą ir jų receptorių raišką, o įvertinus šias savybes, nustatoma DL branda bei bendras efektyvumas.

MLR buvo atlikta su atšildytais donorų CD3⁺ T limfocitais, kurie eksperimento pradžioje buvo užšaldyti. Atšildytų limfocitų skaičius ir jų gyvybingumas įvertinti automatinio ląstelių skaičiuotuvu *Adam*. Autologiniai limfocitai 7 dienas inkubuoti X-VIVO terpėje su skirtingais būdais subrandintomis DL 37° C temperatūroje, 5 % CO₂ režimu santykiu 1:10, t.y. 100 000 limfocitų ir 10 000 DL. MLR atlikti buvo paruošti šie ląstelių inkubavimo plokštelės šulinėliai (16 pav.):

- a) kontrolė (nedažyti limfocitai);
- b) kontrolė (limfocitai dažyti CFSE reagentu), parodanti spontaninę T limfocitų proliferaciją;
- c) skirtingais būdais subrandintos DL, inkubuotos su T limfocitais, dažytais CFSE reagentu. Rodo T limfocitų, aktyvintų DL, proliferaciją.





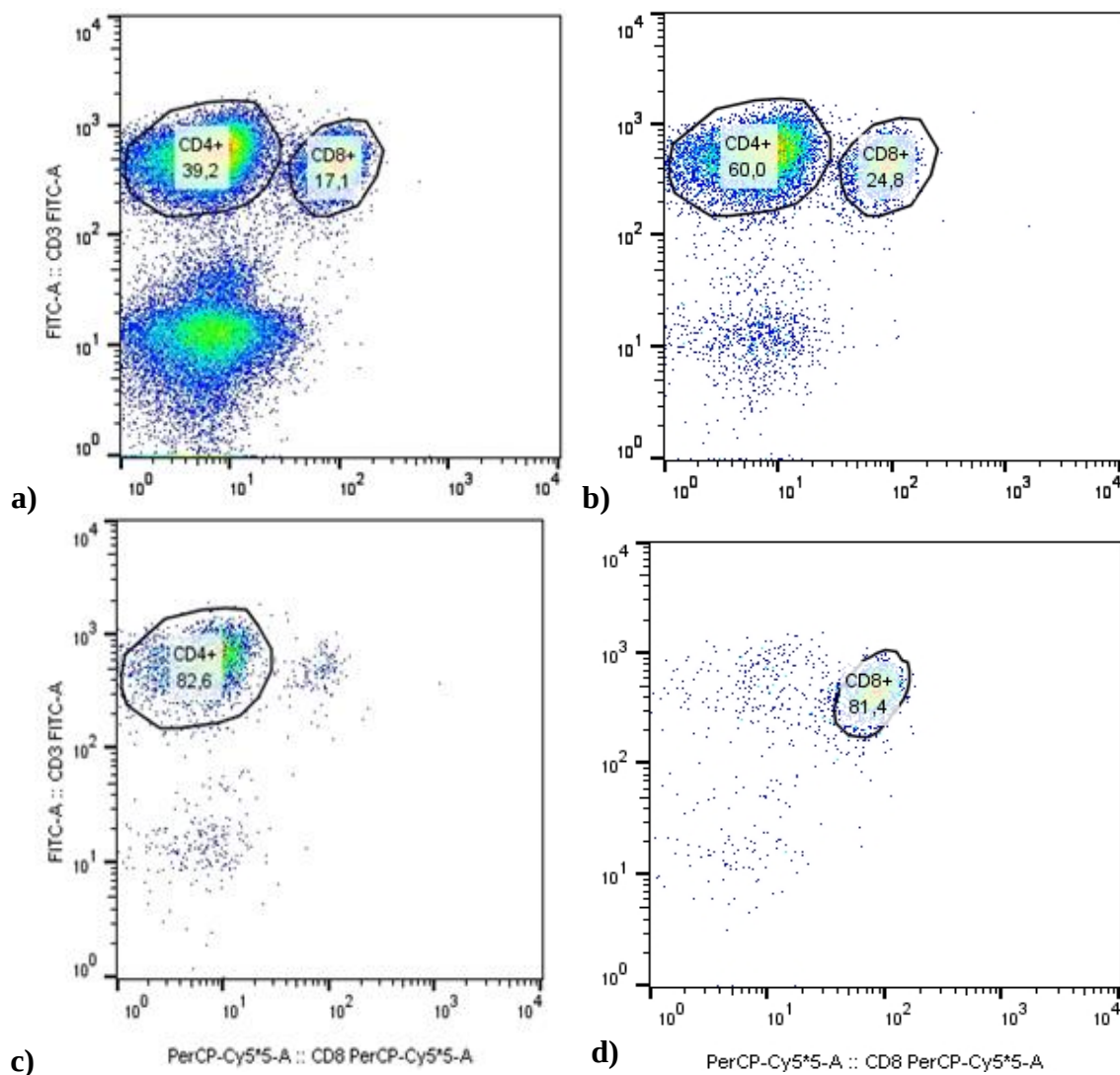
16 pav. $CD3^+$ T limfocitų populiacijos proliferaciją (spontanineę ir sukeltą dendritinėmis ląstelėmis) atspindinčios histogramos

a) limfocitų ir DL populiacijų tankį vaizduojantis spalvinis grafikas. Matomos trys populiacijos - dendritinės ląstelės, limfocitai ir negyvų limfocitų populiacija (schemoje neapibrėžta); b) histograma atspindinti $CD3^+$ T limfocitų, dažytų CFSE reagentu, spontanineę proliferaciją; c) histograma atspindinti T limfocitų, aktyvintų subrendusiomis DL, proliferaciją.

Limfocitai buvo dažomi CFSE reagentu. Autologiniai limfocitai centrifuguoti 7 min 250 g greičiu, supernatantas nupiltas, o ant ląstelių užpilta 15 ml PBS tirpalo, į kurį buvo įdėta 3 μ l CFSE reagento. Ląstelės dažytos tamsoje, kambario temperatūroje 20 min. Nudažytos ląstelės nucentrifuguotos ir resuspenduotos X-VIVO mitybinėje terpėje bei paskirstytos ląstelių inkubavimo plokštelės šulinėliuose po 100 000 ląstelių. Nedažyti kontrolės limfocitai (a) taip pat resuspenduoti X-VIVO terpėje ir paskirstyti šulinėliuose. Į atskirus šulinėlius (c) buvo įdėtas reikiamas kiekis skirtingais būdais subrandintų DL. Ląstelės buvo inkubuotos 7 dienas 37° C, 5 % CO_2 režimu. Po inkubavimo ląstelės iš šulinėlių perkeltos į atskirus citometrinius mėgintuvėlius, surinktos tėkmės citometru ir išanalizuotos *FlowJo* kompiuterine programa. T ląstelių proliferacija vertinta pagal jų kiekį (%), palyginus rezultatus su neigiamų kontrolių rezultatais.

3.16. Magnetinis T limfocitų atskyrimas

Limfocitai buvo surūšiuoti MACS būdu, tėkmės citometru buvo įvertintas populiacijų grynumas pagal paviršiaus žymenų raišką. Gautos T limfocitų populiacijos pavaizduotos paveiksle (17 pav.). Tolesniems tyrimams buvo naudotos surūšiuotos $CD4^+$ ląstelės. Jos buvo stimuliuotos ir vėliau restimuluotos skirtingais būdais subrandintomis DL. Po restimuliacijos buvo matuotas $CD4^+$ išskiriamų citokinų IFN- γ (Th1 tipo atsakas), IL-5, IL-4 (Th2 tipo atsakas), IL-17A (Th17 tipo atsakas), IL-10, TGF- β (Treg) kiekis CBA būdu.



17 pav. Nerūšiuotų ir magnetiniu būdu rūšiuotų T limfocitų populiacijos ir jų grynumas pagal CD8⁺ ir CD4⁺ žymenų raišką, išreikštas procentais

Nerūšiuoti limfocitai, b) CD3⁺ T limfocitai po I magnetinio atskyrimo etapo, c) CD4⁺ T limfocitai po II magnetinio atskyrimo etapo, d) CD8⁺ T limfocitai po II magnetinio atskyrimo etapo.

Magnetinis ląstelių atskyrimas vykdytas dviem etapais: pirmiausia iš PKVL buvo išskirti CD3⁺ T limfocitai, o vėliau jie surūšiuoti į CD8⁺ ir CD4⁺ T ląsteles.

3.17. CD3⁺ T limfocitų atskyrimas

Limfocitų atskyrimas atliktas naudojant *Pan T Cell Isolation Kit* rinkinį pagal gamintojo rekomendacijas. Neprilipusios prie flakono dugno ląstelės surinktos ir perkeltos į sterilius konusinius mėgintuvėlius bei suskaičiuotos. Rūšiuoti buvo paimta 10 mln ląstelių, kurios praplautos 2 ml PBS tirpalu ir 10 min centrifuguotos 300 g greičiu. Praplovimas ir centrifugavimas kartoti du kartus. Po antrojo centrifugavimo supernatantas nupiltas, ląstelės

resuspenduotos 40 μ l PBS tirpale ir įlašinta 10 μ l su biotinu konjuguoto monokloninio antikūno prieš visų kraujo ląstelių, išskyrus T limfocitus, antigenus. Švelniai supurtyta ląstelių suspensija 20 min inkubuota 4° C temperatūroje. Praėjus nustatytam laikui, į ląstelių suspensiją papildomai įpilta 30 μ l PBS tirpalo ir įdėta 20 μ l magnetinių rutuliukų, konjuguotų su antikūnais prieš biotiną ir CD61. Tuomet ląstelės 10 min inkubuotos 4° C temperatūroje. Po inkubacijos į suspensiją dar įpilta 500 μ l PBS tirpalo ir ląstelės rūšiuotos naudojant ląstelių magnetinio atskyrimo platformą *Midi MACS*. Pirmiausia, į magnetinio rūšiavimo kolonėlę supilta 3 ml PBS tirpalo ir, jam sulašėjus, supilta ląstelių suspensija. Po to kolonėlę praplauta 3 ml PBS tirpalo. Iš kolonėlės ištekėjusios ir surinktos ląstelės buvo neigiama frakcija, sudaryta iš CD3⁺ T limfocitų. Kolonėlėje likusi teigiama frakcija nebuvo surinkta, kadangi ji tyrime nebuvo naudojama.

3.17.1. CD3⁺ rūšiavimas į CD4⁺ ir CD8⁺ T limfocitus

Rūšiavimas atliktas naudojant *CD8⁺ T Cell Isolation Kit* rinkinį pagal gamintojo rekomendacijas. CD3⁺ ląstelės 10 min centrifuguotos 300 g greičiu. Supernatantas nupiltas, ląstelės resuspenduotos 40 μ l PBS tirpale ir įlašinta 10 μ l su biotinu konjuguoto monokloninio antikūno prieš visų kraujo ląstelių, išskyrus CD8⁺ T limfocitus, antigenus. Kadangi CD3⁺ frakcija sudaryta iš CD8⁺ ir CD4⁺ T limfocitų, minėti antikūnai prisijungdami pažymėjo CD4⁺ ląsteles. Ląstelės inkubuotos 10 min. 4° C temperatūroje. Praėjus nustatytam laikui, į ląstelių suspensiją papildomai įpilta 30 μ l PBS tirpalo ir įdėta 20 μ l magnetinių rutuliukų, konjuguotų su antikūnais prieš biotiną ir CD14. Po inkubacijos ląstelės praplautos 2 ml PBS tirpalu ir 10 min. centrifuguotos 300 g greičiu. Supernatantas nupiltas, ląstelės resuspenduotos 500 μ l PBS tirpale. Į magnetinio rūšiavimo kolonėlę, įstatytą į *Midi MACS* platformą, įpilta 3 ml PBS tirpalo ir, jam sulašėjus, supilta ląstelių suspensija. Kolonėlę 3 kartus praplauta po 3 ml PBS tirpalu. Iš kolonėlės ištekėjusios ir surinktos ląstelės buvo neigiama frakcija, sudaryta iš CD8⁺ T ląstelių. Surinkus CD8⁺ T ląsteles, kolonėlę iš platformos buvo išimta ir įstatyta į kitą konusinį mėgintuvėlį. Į kolonėlę pripilta 5 ml PBS tirpalo, o joje buvusios ląstelės išspausťos į mėgintuvėlį. Šios surinktos išspausťos ląstelės buvo teigiama frakcija - CD4⁺ T limfocitai.

Atskirtos ląstelės 7 min. centrifuguotos 250 greičiu, supernatantas nupiltas, ląstelės resuspenduotos 2 ml PBS tirpale. Ląstelės suskaičiuotos bei įvertintas jų gyvybingumas. Dalis ląstelių nudažyta monokloniniais antikūnais ir atlikta paviršiaus žymenų raiškos analizė tėkmės citometru. Likusios ląstelės užšaldytos inkubuoti su skirtingais būdais subrandintomis DL.

3.18. Autologinių CD4⁺ T limfocitų stimuliacija ir restimuliacija subrendusiomis donorų dendritinėmis ląstelėmis

CD4⁺ stimuliacija

Skirtingais būdais subrandintos donorų DL ir magnetinio rūšiavimo būdu gauti autologiniai CD4⁺ T limfocitai atšildyta, suskaičiuota bei įvertinta jų gyvybingumas. Ląstelėms inkubuoti naudota 96 šulinėlių plokštelė (po vieną šulinėlį kiekvienam brandinimo būdai). Į kiekvieną iš 4 šulinėlių įdėta po 10⁴ DL ir 10⁵ CD4⁺ T limfocitų, resuspenduotų X-VIVO terpėje. Stimuliacijos metu DL ir CD4⁺ T limfocitų santykis buvo 1:10 atitinkamai. Stimuliaciją sudarė du stimuliacijos ciklai po 7 dienas. Antrą inkubacijos dieną į kiekvieną šulinėlį su ląstelėmis pridėta citokino IL-2, kurio koncentracija ląstelių suspensijoje sudarė 25 UI/ml. 4-tą ir 7-ą kiekvieno stimuliacijos ciklo dieną iš kiekvieno šulinėlio nusiurbta po 100 µl terpės, pakeičiant ją šviežia X-VIVO terpe, papildyta IL-2 (25 UI/ml).

CD4⁺ restimuliacija

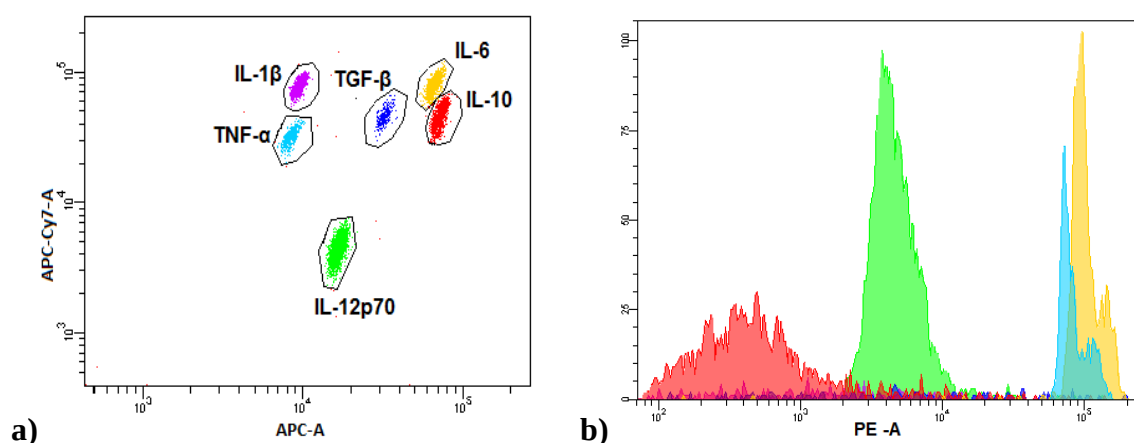
Praėjus nustatytam inkubacijos laikui, atlikta stimuliuotų CD4⁺ ląstelių restimuliacija skirtingai subrandintomis DL (buvo siekiama imituoti organizme vykstantį imuninį atsaką). Ląstelių suspensija iš šulinėlių perkelta į citometrinius mėgintuvėlius, 7 min centrifuguota 250 g greičiu. Supernatantas nupiltas, ląstelės praplautos 1 ml steriliu PBS tirpalu ir dar kartą centrifuguotos tokiomis pat sąlygomis. Supernatantą nupylus, ląstelės resuspenduotos 200 µl X-VIVO terpės ir supilstytos į 96 šulinėlių plokštelę. Į šulinėlius pridėta po 10⁴ subrendusių DL ir inkubuota 24 val. (be IL-2). Po 24 val. ląstelės surinktos į citometrinius mėgintuvėlius, supernatantas ir ląstelės naudoti vertinant:

- Th1/Th2/Th17 imuninio atsako poliarizaciją taikant CBA, kuriuo matuota citokinų sekrecija ląstelių supernatante;
- Treg ląstelių indukciją, tėkmės citometru matuojant CD4⁺, CD25⁺, CD127⁺, FOXP3⁺ ir CD39⁺ žymenų raišką ant T ląstelių.

3.19. Fluorescuojančių rutuliukų metodas CBA (*Cytometric Bead Array*)

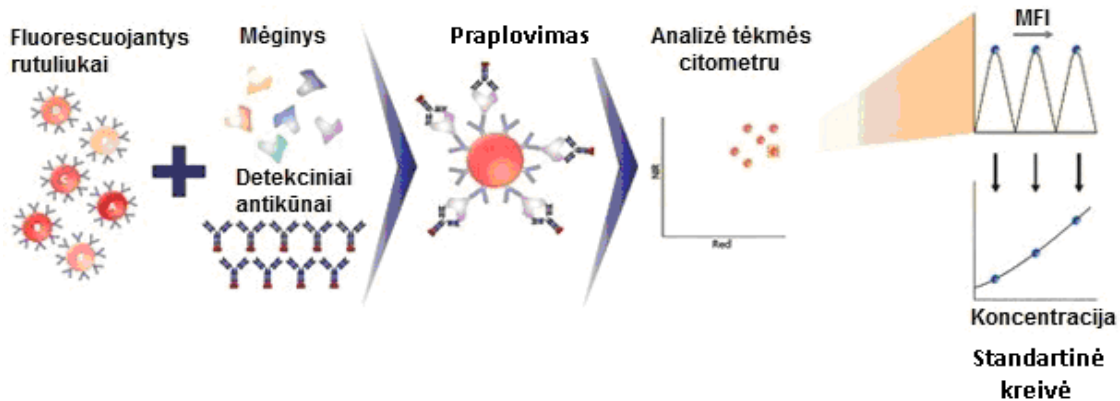
BD™ *Cytometric Bead Array* (CBA, *BD Biosciences*) yra technologija, kurioje pritaikoma tėkmės citometrija. Ši technologija leidžia aptikti ir kiekybiškai įvertinti mėginyje esančias nedideles molekules: citokinus, chemokinus, augimo faktorius, įvairiuose signaliniuose keliuose

dalyvaujančius baltymus. Šios technologijos pagrindas – vienodo dydžio, monokloniniais antikūnais prieš skirtingas molekules padengti rutuliukai, pasižymintys skirtingu fluorescencijos intensyvumu. Skirtingi antikūnai geba specifiskai prisijungti analitę. Prisijungusi analitė yra aptinkama naudojant fluorochromu (fikoeritrinu) žymėtus detekcinius antikūnus, kurie specifiskai jungiasi prie ieškomos molekulės (BD Biosciences, 2012). Mėginiai analizuojami tėkmės citometru, kuris matuoja rutuliukų bei reporterinių antikūnų fluorescencijos intensyvumą. Ieškomos molekulės koncentracija mėginyje yra proporcinga PE (fikoeritinas) fluorescencijos intensyvumui ir yra apskaičiuojama naudojant kalibracinę kreivę [184] 18 pav.



18 pav. Citokinių IL-1 β , TNF- α , IL-6, TGF- β , IL-10 ir IL-12p70 debesėliai taškinėje diagramoje (a) ir atitinkamų citokinių fluorescencijos intensyvumo histograma (b)

Dėl naudojamų skirtingos fluorescencijos rutuliukų ir su fluorochromu konjuguotų antikūnų, kurie mėginyje gali būti sumaišomi, metodas leidžia vienu metu įvertinti platų spektrą to paties mėginio analiziui. Tai suteikia galimybę atlikti išsamią analizę turint net ir nedidelį mėginio kiekį – vos 25–30 μ l tiriamos medžiagos pakanka nustatyti iki 30 skirtingų baltymų. Šis metodas yra ypač tikslus – įmanoma nustatyti iki 0,274 pg/ml baltymo, bei pakankamai greitas, nes reikalingas mažesnis mėginių kiekis. Dėl šių priežasčių CBA yra pranašesnis už tradicines ELISA bei Western blot technikas (BD Biosciences, 2012).



19 pav. CBA analizės schema

MFI (angl. *Median Fluorescence Intensity*) – fluorescencijos intensyvumo mediana (pagal *BD Biosciences*, 2012).

Šiame darbe CBA analizė buvo vykdoma naudojant skirtingiems citokinams nustatyti skirtus reagentų rinkinius *BD™ CBA Flex Set* bei buferinių tirpalų rinkinį *BD™ CBA Human Soluble Protein Master Buffer Kit* pagal gamintojo rekomendacijas. Prieš tyrimą buvo paruošti atitinkamų skiedimų (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256) standartai ir neigiama kontrolė. Sudarytos standartinės kreivės, kurios buvo naudojamos įvertinti kiekvieno citokino koncentracijoms. Sudarius kreives, buvo ruošiami tyrime naudojami tirpalai bei atliekama analizė.

Tirpalų ruošimas

Naudojant buferinių tirpalų ir reagentų rinkinius paruošti tyrimui reikalingi tirpalų mišiniai:

1) **fluorescuojančių rutuliukų mišinys**. Vienam mėginiui imta 50 μ l fluorescuojančių rutuliukų mišinio, kuriame yra po 1 μ l kiekvieno tiriamo citokino fluorescuojančių rutuliukų, padengtų mo Ak (*Capture beads*), bei likęs kiekis rutuliukų skiediklio. Gaminant mišinį keliems mėginiams, iš kiekvieno tiriamo citokino reagentų rinkinio paimtas apskaičiuotas kiekis fluorescuojančių rutuliukų ($1\mu\text{l} \times \text{mėginių skaičius}$) ir sumaišytas su apskaičiuotu kiekiu rutuliukų skiediklio ($50\mu\text{l} - \text{skirtingų tiriamų citokinių skaičius} \times \text{mėginių skaičius}$).

2) **detekcinių antikūnų mišinys**. Šis mišinys paruoštas ir iki naudojimo saugotas tamsoje, siekiant apsaugoti jį nuo fotoišblukimo. Jis sudarytas iš detekcinių antikūnų, konjuguotų su PE, ir detekcinių antikūnų skiediklio. Reikalingi reagentų kiekiai apskaičiuoti ir mišinys paruoštas tokiu pačiu būdu, kaip ir fluorescuojančių rutuliukų mišinys.

Tyrimo eiga

Tirtas mėginys perkeltas į citometrinius mėgintuvėlius, praskiestas mėginio skiedimui skirtu tirpalu santykiu 1:5 ir supurtytas purtykle. Į kiekvieną mėgintuvėlį įpilta po 50 µl paruošto fluorescuojančių rutuliukų mišinio, švelniai išmaišyta. Inkubuota 1 val. kambario temperatūroje. Praėjus inkubavimo laikui, į kiekvieną mėgintuvėlį pridėta po 50 µl paruošto detekcinių antikūnų mišinio ir švelniai išmaišyta. Mėginiai inkubuoti 2 val. Pasibaigus inkubacijai, kiekvienas mėginys praplautas 1 ml plovimo buferiu ir 5 min. centrifuguotas 200 g greičiu. Supernatantas nupiltas, į mėginius įdėta po 300 µl plovimo buferio ir trumpai supurtyta elektrine purtykle. Paruošti mėginiai surinkti tėkmės citometru ir išanalizuoti.

3.20. ELISA metodas

Citokinų IL-10 ir IL-12p70 koncentracija buvo nustatyta DL kultūrų supernatante imunofermentiniu ELISA metodu, naudojant komercinius ELISA rinkinius (*BioSource Human IL-10-Easia* ir *BioSource Human IL-12+p40 Easia*). Mėginiai paruošti, ištirti ir išanalizuoti pagal gamintojo rekomendacijas. Rinkinį sudarė 96-šulinėlių mikroplokštelės, padengtos monokloniniais antikūnais, specifiniais žmogaus citokinams IL-10 arba IL-12. Rinkiniuose esantys 6 liofilizuoti citokinų standartai (rekombinantiniai baltymai IL-10, IL-12) ir 2 kontroliniai serumai prieš tyrimą buvo skiedžiami skiedimo buferiniu tirpalu iki nurodytos koncentracijos. Visi rinkinyje naudoti reagentai prieš reakciją buvo atšildyti iki kambario temperatūros.

Vienu metu į mikroplokštelės visus šulinėlius buvo pilama po 100 µl inkubacinio buferinio tirpalo, po to – po 100 µl standartinių (žinomos IL-10, IL-12 koncentracijos) ir tiriamųjų (DL supernatanto) mėginių. Kiekvienas tiriamasis mėginys piltas į du šulinėlius, t.y. darytas kiekvieno mėginio pakartojimas. Užpildytos mikroplokštelės inkubuotos 2 val. kambario temperatūroje horizontaliojoje purtyklėje (700 ± 100 rpm). Po inkubacijos skystis iš šulinėlių nupiltas, plokštelė plauta 3 kartus plovimo buferiniu tirpalu (400 µl į šulinėlį). Toliau į kiekvieną šulinėlį įpilta po 100 µl mėginių skiedžiamojo tirpalo ir 50 µl antrinių monokloninių antikūnų, žymėtų krienų peroksidaze (anti-IL-10-HRP, anti-IL-12-HRP), tirpalo. Inkubuota 2 val. kambario temperatūroje horizontaliojoje purtyklėje (700 ± 100 rpm). Po inkubacijos skystis iš šulinėlių nupiltas, plokštelė plauta 3 kartus plovimo buferiniu tirpalu (400 µl į šulinėlį). Į kiekvieną šulinėlį pilta po 200 µl paruošto tetrametilbenzidino (TMB – peroksidazės substrato) tirpalo. Inkubuota 30 min., esant kambario temperatūrai tamsoje horizontaliojoje purtyklėje (700 ± 100 rpm). Fermentinė reakcija sustabdyta į šulinėlius įpylus po 50 µl buferinio tirpalo.

Absorbcija matuota valandos laikotarpiu mikroplokštelių skaitytuvu, esant 450 nm ilgio bangai. Citokinų koncentracijos mėginiuose apskaičiuotos pagal standartinę kreivę.

3.21. Statistiniai metodai

Duomenų pasiskirstymo normalumas buvo įvertintas, taikant **Shapiro-Wilk's W testą**. Jei duomenų pasiskirstymas buvo parametrinis (simetrinis, normalusis, Gauso), tai skirtumų statistinis reikšmingumas tarp grupių buvo vertintas pagal **parametrinį Stjudento (Student's) t testą**. Jei duomenų pasiskirstymas buvo neparametrinis, tai jų skirtumų statistinis reikšmingumas tarp grupių buvo vertinamas pagal **neparametrinį Mann-Whitney's U testą**. Eksperimento rezultatai apdoroti naudojant *FACSDiva*, *Microsoft Office Excel 2010* ir *FlowJo* programas. Skirtumas tarp duomenų statistinio patikimumo įvertintas naudojant *STATISTICA (10,0 versija)* programą ir *SPSS (21,0 versija)* paketą, o duomenys laikyti statistiškai reikšmingais, jei nustatyta p reikšmė buvo mažesnė ar lygi 0,05 ($p \leq 0,05$).

4. TYRIMO REZULTATAI

4.1. Tiriamųjų charakteristikos

4.1.1. Pacientų grupė

Ištirti 32 pacientai, sergantys pirminiu urogenitaliniu naviku (prostatos adenokarcinoma, šviesiųjų ląstelių tipo inkstų ląstelių karcinoma ar šlapimo pūslės urotelio karcinoma). Visi tyrime dalyvavę pacientai 2011-2012 metais gydėsi Nacionaliniame vėžio institute (NVI) Onkourologijos skyriuje. Daugumai pacientų (n = 21; 66 %) buvo diagnozuota I ir II stadijos liga. Visiems pacientams kraujas buvo imtas vieną kartą, prieš operaciją. Pacientų duomenys pateikti 2 lentelėje.

2 lentelė. Tyrime dalyvavusių pacientų charakteristikos

Charakteristika	Skaičius
Visų ligonių skaičius	32
Lokalizacija:	
Inkstų ląstelių karcinoma	12
Prostatos vėžys	18
Šlapimo pūslės karcinoma	2
Stadija:	
<i>Inkstų ląstelių karcinoma:</i>	
I	6
III	2
IV	3
nežinoma	1
<i>Prostatos vėžys:</i>	
I	4
II	11
III	1
nežinoma	2
<i>Šlapimo pūslės karcinoma:</i>	
III	1
IV	1
Lytis:	
vyras	24
moteris	8
Amžius:	
Mediana	61
Vidurkis	63
Intervalas	60-66

4.1.2. Savanorių donorų grupė

Ištirta 15 sveikų kraujo donorų, kurių kraujo buvo paimta 2014–2015 metais VšĮ Nacionaliniame kraujo centre. Duomenys apie donorinės grupės asmenis pateikti 3 lentelėje.

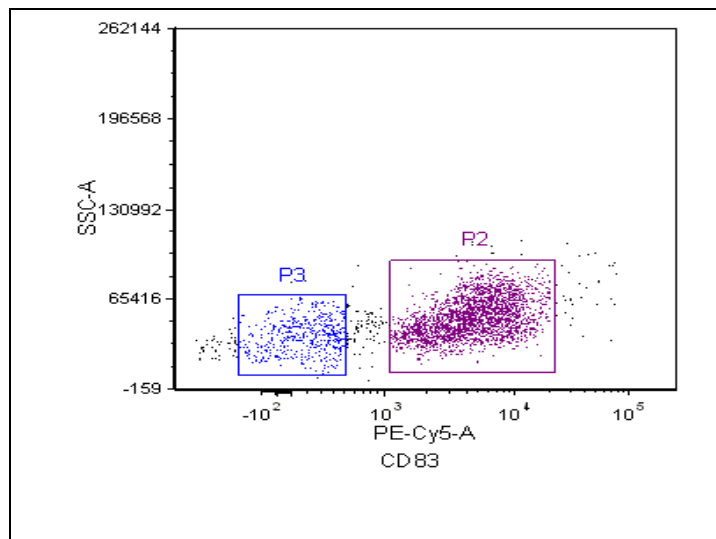
3 lentelė. Kontrolinės grupės donorų charakteristikos

Charakteristika	Skaičius
Visų asmenų skaičius	15
Lytis:	
vyrų	7
moterų	8
Amžius:	
Vidurkis	37
Mediana	35
Intervalas	18-56

4.2. Dendritinių ląstelių paviršinių žymenų raiškos analizė

4.2.1. Pacientų DL imunogeninių ir migracines savybes lemiančių žymenų analizė

Imunogenines (CD80, CD83, CD86, HLA-DR) ir migracines (CD197/CCR7) DL savybes atspindinčių žymenų raiška buvo analizuota daugiaspalvės tėkmės citometrijos būdu. DL populiacija buvo identifikuota pagal dydį (FSC-A) ir viduląstelinį granuliuotumą (SSC-A) (19 pav.). Pirmiausia buvo įvertinta pagrindinio DL subrendimą atspindinčio CD83 žymens raiška. Nustatyta, kad prieš subrendimą, t. y. nesubrendusiose DL, šio žymens raiška DL paviršiuje buvo maža (CD83^{low}). Tuo tarpu inkubacija brandinimo mišiniais sukėlė didelę (CD83^{high}) CD83 žymens raišką DL paviršiuje. Pagal CD83 žymens raiškos intensyvumą bendra DL populiacija buvo suskirstyta į dvi subpopuliacijas (20 pav.)

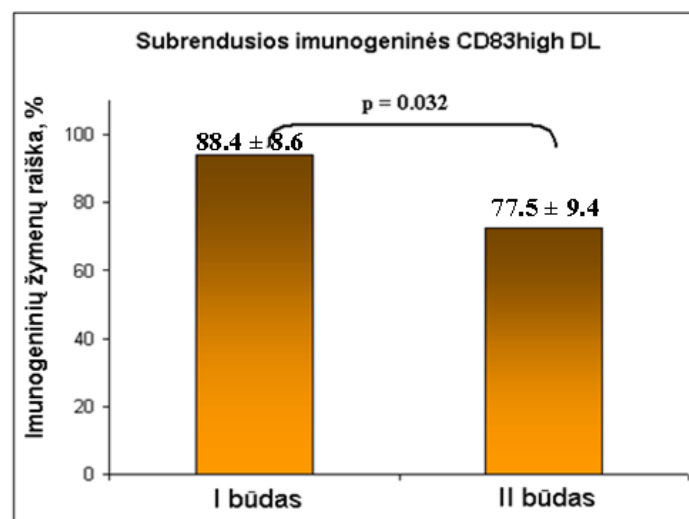


20 pav. CD83^{high} (P2) ir CD83^{low} (P3) DL populiacijos

Iš gautos taškinės diagramos apibrėžtų populiacijų (angl. gated) gaunama CD83^{high} (high – didelė CD83 žymens raiška, P2 populiacija) ir CD83^{low} (low – maža CD83 žymens raiška, P3 populiacija) žymenų raiška DL paviršiuje.

Rezultatai rodo, kad patikimai labiau subrendusių CD83^{high} DL buvo gauta brandinant I (LPS/IFN- γ /lizatas) negu II (TNF- α /IL-1 β / IL-6/ PGE₂/lizatas) būdu.

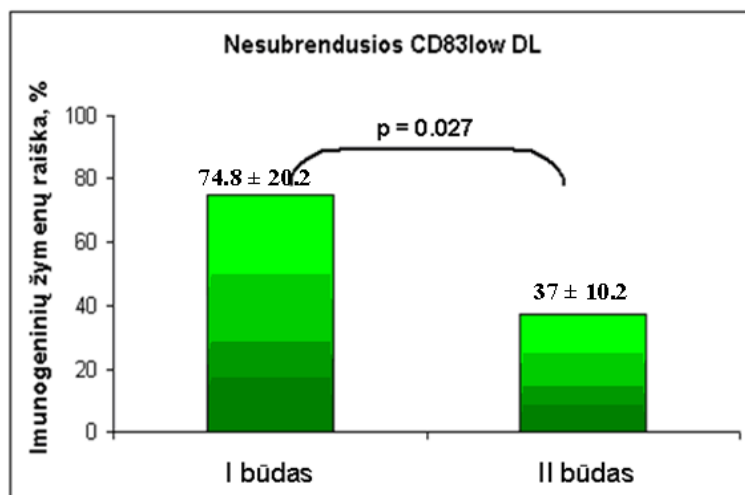
Buvo tirta pacientų DL žymenų (CD80, CD86, HLA-DR, CD197/CCR7) raiška subrendusių (CD83^{high}) ir nesubrendusių (CD83^{low}) DL paviršiuje. Išanalizavus subrendusių (CD83^{high}) DL populiacijos imunogeninių žymenų raišką, nustatyta, kad patikimai daugiau šių žymenų ekspresavo I būdu (LPS/IFN- γ /lizatas) subrandintos DL, atitinkamai $88,4 \pm 8,6$ % ir $77,5 \pm 9,4$ %, $p = 0,032$ (21 pav.).



21 pav. Subrendusios imunogeninės (CD83^{high}) dendritinės ląstelės

Lyginant I ir II DL brandinimo būdus nustatyta, kad patikimai daugiau imunogeninių žymenų (CD80, CD86, HLA-DR, CD197/CCR7) ekspresavo I būdu subrandintų CD83^{high} DL populiacija.

Tačiau akivaizdu, kad po brendimo inicijavimo ne visos ląstelės subrendo. Išliko $CD83^{low}$ DL populiacija su joms būdinga maža $CD83$ žymens raiška; jos sudarė 12,6% I būdu ir 22,5% II būdu brandintų DL. Įvertinus imunogeninių žymenų raišką išlikusioje nesubrendusių ($CD83^{low}$) DL paviršiuje nustatyta, kad I mišiniu subrandinta $CD83^{low}$ populiacija pasižymėjo statistiškai reikšmingai didesne mažiausiai dviejų imunogeninių žymenų raiška, palyginti su II būdu brandintomis DL (atitinkamai $74,8 \pm 20,2\%$ ir $37,4 \pm 10,2\%$, $p = 0,027$) (22 pav.).



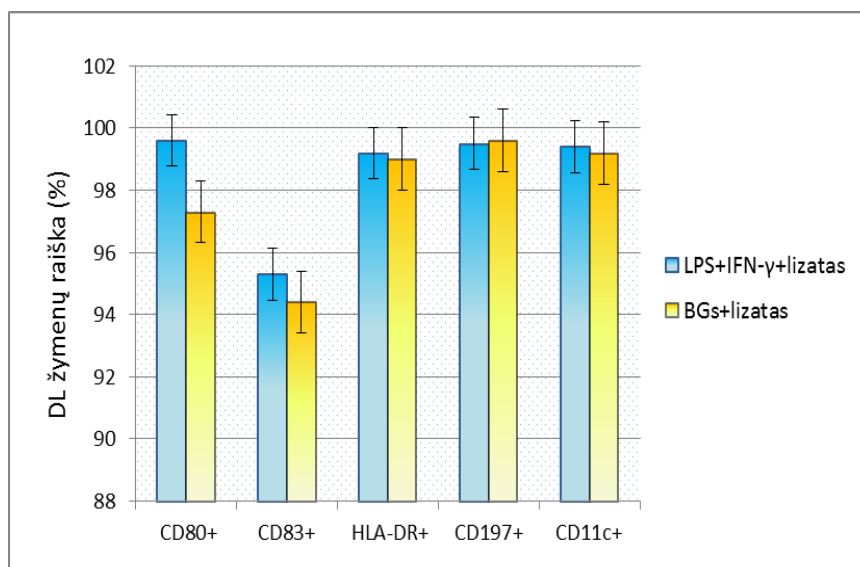
22 pav. Nesubrendusių ($CD83^{low}$) DL populiacija, pasižyminti didele mažiausiai dviejų imunogeninių žymenų raiška

Tik nedidelė $CD83^{low}$ DL populiacijos dalis pasižymėjo aukšta imunogeninių žymenų raiška taikant abu brandinimo būdus. Kadangi ši maža nesubrendusių DL populiacija nepasižymėjo pagrindinio subrendimo žymens $CD83$ raiška, bet savo paviršiuje turėjo kitus aktyvinimo/brandumo žymenis, manoma, kad tai buvo tranzitinės, funkcionuojančios tarp $CD83^{low}$ ir $CD83^{high}$ populiacijų, DL.

Apibendrinus šiuos rezultatus galima teigti, kad brandinimo mišinys LPS/IFN- γ /lizatas yra pranašesnis už „standartinį“ citokinų brandinimo derinį TNF- α /IL-1 β /IL-6/PGE₂/lizatas norint gauti subrendusias imunogeniškas DL.

4.2.2. Sveikų donorų DL imunogeninių žymenų raiškos analizė

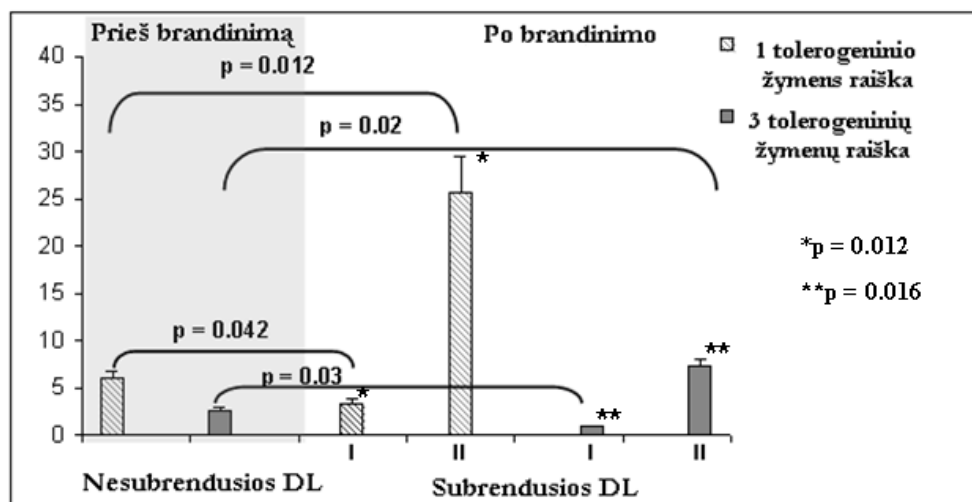
Palyginus sveikų donorų DL brandumą, imunogeniškumą bei migracines savybes atspindinčių žymenų raiškos procentinius vidurkius pagal skirtingus brandinimo būdus, statistiškai patikimų skirtumų nerasta ($p = 0,81$). Pagal imunogeninį potencialą atspindinčių žymenų raiškos pobūdį, abu brandinimo mišiniai (LPS/IFN- γ /lizatas ir BGs/lizatas) yra yra lygiaverčiai – sukelia didelę šių žymenų raišką (nuo 94,4 % iki 99,6 %) (23 pav.).



23 pav. Dviejų skirtingų brandinimo būdų DL paviršinių žymenų raiškos procentiniai vidurkiai LPS/IFN- γ /lizatas ir BGs/lizatas brandinimo mišiniai sukelia didelę imunogeninių žymenų raišką.

4.2.3. Pacientų tolerogeninių žymenų raiškos analizė DL CD83^{high} ir CD83^{low} populiacijose

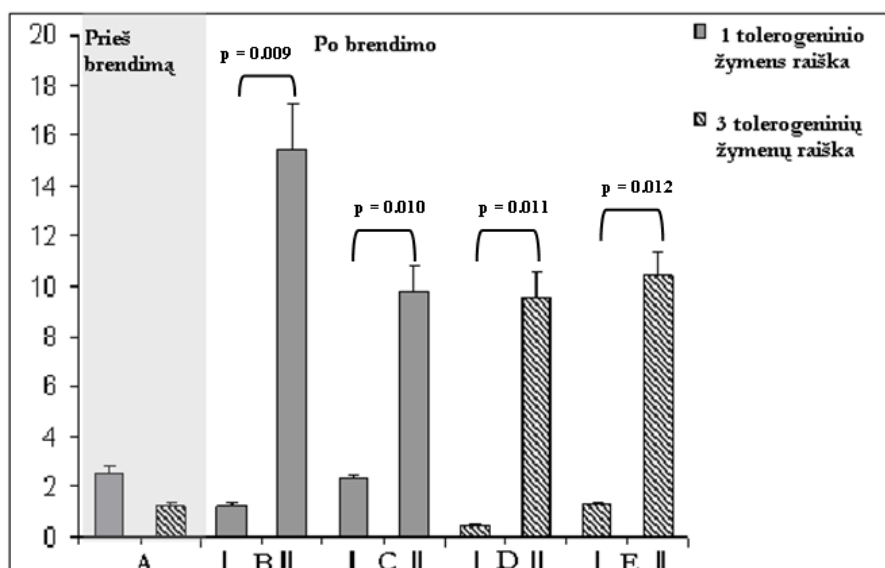
DL paviršiaus tolerogeninių žymenų (CD85k, CD273, CD274) raiška taip pat buvo vertinta CD83^{low} ir CD83^{high} populiacijose. Nustatyta, kad CD83^{low} DL populiacijoje, kurios maža imunogeninių žymenų raiška, prieš subrendimą buvo $6 \pm 1,1$ % ląstelių, ekspresavusių mažiausiai vieną tolerogeninį žymenį ir $2,7 \pm 0,4$ % ląstelių, pasižyminčių visų trijų tolerogeninių žymenų raiška (24 pav.).



24 pav. Tolerogeninių žymenų raiška $CD83^{low}$ (DL, kurių maža $CD83$ žymens raiška) ir $CD83^{high}$ (DL, kurių didelė $CD83$ žymens raiška) DL populiacijose, pasižyminčiose žema imunogeninių žymenų raiška

I – brandinimo mišinys 1 (LPS/IFN- γ /lizatas), II – brandinimo mišinys 2 (TNF- α /IL-1 β /IL-6/PGE₂/lizatas). Y ašyje pavaizduota tolerogeninių žymenų raiška, %.

Panaši žymenų raiška buvo ir negausioje $CD83^{low}$ DL populiacijoje, pasižyminčioje aukšta imunogeninių žymenų raiška (tranzitinės DL): nustatyta, kad $2,6 \pm 0,3$ % ląstelių ekspresavo mažiausiai vieną tolerogeninį žymenį ir $1,23 \pm 0,15$ % ląstelių pasižymėjo visų trijų tolerogeninių žymenų raiška (25 pav.).



25 pav. Tolerogeninių žymenų raiška $CD83^{low}$ (DL, kurių maža $CD83$ žymens raiška) DL prieš brendimą ir po brendimo

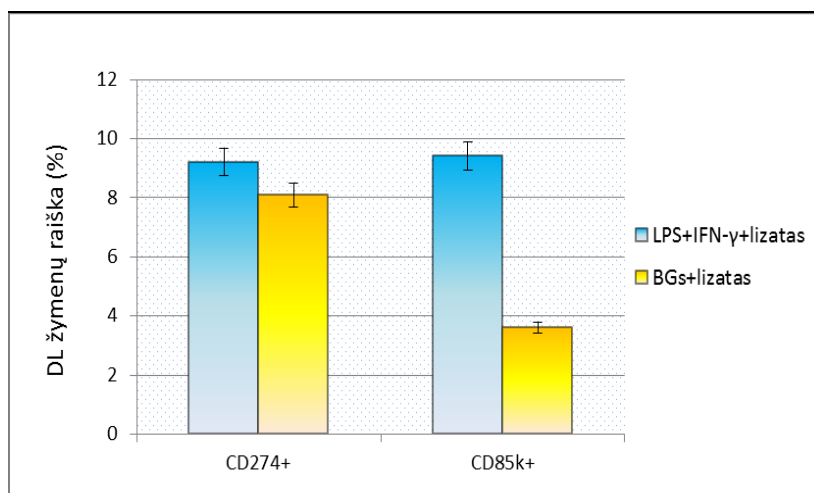
A, B, D – $CD83^{low}$ DL, kurių didelė mažiausiai dviejų imunogeninių žymenų raiška; C, E – $CD83^{low}$ DL, kurių maža mažiausiai dviejų imunogeninių žymenų raiška, I – brandinimo mišinys 1 (LPS/IFN-

γ /lizatas), II – brandinimo mišinys 2 (TNF- α /IL-1 β /IL-6/PGE₂/lizatas). Y ašyje pavaizduota tolerogeninių žymenų raiška, %.

Nustatyta, kad po DL brendimo indukavimo vieno ir visų trijų paviršiaus tolerogeninių žymenų raiška statistiškai patikimai aukštesnė buvo abiejose (CD83^{high} ir CD83^{low}) II mišiniu brandintose DL populiacijose negu I brandinimo mišiniu brandintų DL populiacijose (24,25 pav.). Taip pat nustatyta, kad žymi CD83^{high} DL populiacijos, kurioje didelė imunogeninių žymenų raiška, dalis ekspresavo mažiausiai vieną tolerogeninį potencialą atspindintį žymenį. Tai geriausiai buvo matyti lyginant I ir II būdu subrandintas DL: I būdu brandintų DL, kurios pasižymėjo bent vieno ar visų trijų tolerogeninių žymenų raiška, atitinkamai buvo $3,4 \pm 0,7$ % ir $0,9 \pm 0,05$ % subrendusių CD83^{high} DL populiacijoje. Tačiau DL brandinant II būdu vieną tolerogeninį žymenį ekspresavo net $25,6 \pm 4,7$ % ląstelių, o visus tris tolerogeninius žymenis – $7,4 \pm 0,8$ % ląstelių (24 pav.). Analogiškas tolerogeninių žymenų raiškos pasiskirstymas po DL brandinimo I ir II būdais buvo nustatytas likusių nesubrendusių ir tranzitinių CD83^{low} DL populiacijose (25 pav.).

4.2.4. Sveikų donorų DL tolerogeninių žymenų raiškos analizė

Palyginus skirtingais būdais subrandintų donorų DL tolerogeninį potencialą atspindinčių žymenų CD274 ir CD85k raiškos procentinius vidurkius nustatyta, kad CD274 žymens raiška nepriklausė nuo brandinimo būdo ($p = 0,064$), tačiau CD85k žymens raiška buvo statistiškai patikimai mažesnė ($p = 0,035$) BGs/lizato mišiniu subrandintose DL, palyginti su LPS/IFN- γ /lizatu brandintose DL (26 pav.).



26 pav. DL tolerogeninių žymenų CD274 ir CD85k raiškos procentiniai vidurkiai

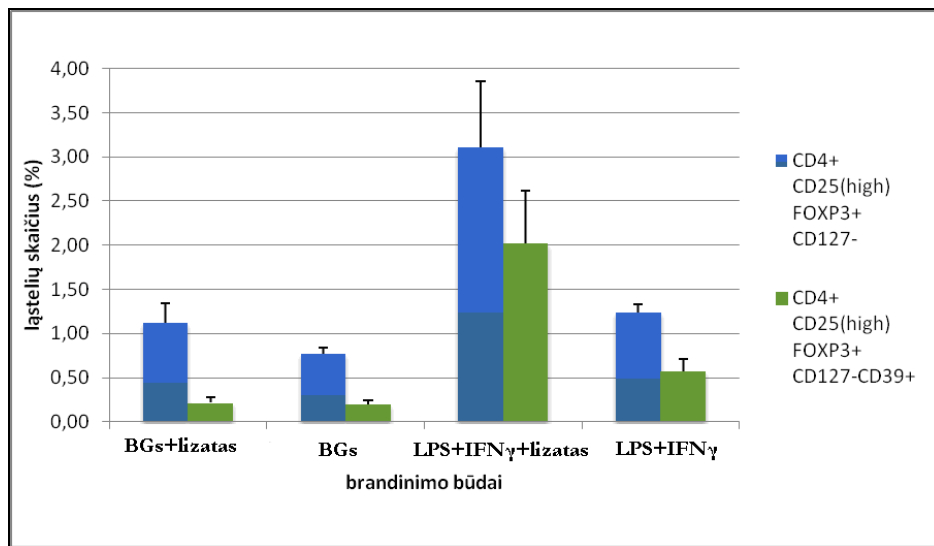
LPS/IFN- γ / lizatas (CD274⁺ – 9,2 %, CD85k⁺ – 9,4 %); BGs/lizatas (CD274⁺ – 8,1 %, CD85k⁺ – 3,6 %).

Apibendrinus skirtingus brandinimo būdus pagal imunogeninį ir tolerogeninį potencialą atspindinčių žymenų raiškos pobūdį galima teigti, kad brandinimo mišinys LPS/IFN- γ /lizatas yra pranašesnis už TNF- α /IL-1 β /IL-6/PGE₂/lizatas brandinimo mišinį, o brandinimas BGs/lizato deriniu lėmė mažesnę tolerogeninio žymens CD85k⁺ raišką DL, palyginti su LPS/IFN- γ /lizato brandinimu.

4.3. Treg subpopuliacijų nustatymas CD4⁺ T limfocitų populiacijoje

Treg yra CD4 T ląstelių subpopuliacija, slopinanti imuninį atsaką. Yra žinoma, kad CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ Treg limfocitai palaiko supresinę aplinką bei slopina priešnavikinį imuninį atsaką. Tyrimai rodo, jog vien tik „klasikinių“ CD4, CD25 ir FOXP3/CD127 žymenų derinio nepakanka, norint tiksliai charakterizuoti Treg ląsteles. Todėl kartu su šiais žymenimis naudotinas ir CD39 žymuo, kurio raiška būdinga funkciškai aktyviems, t.y. stipriai imunosupresiniu poveikiu pasižymintiems Treg limfocitams [27].

Mūsų rezultatai rodo, jog didžiausios CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺CD127⁻ Treg procentinės dalies (3,1 %) susidarymą lėmė limfocitų stimuliavimas DL, brandintomis LPS/IFN- γ /lizato mišiniu, o mažiausiai CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺CD127⁻ Treg ląstelių susidarė limfocitus stimuliuojant BGs brandintomis DL – vidutiniškai 0,8 %, t.y. trigubai mažiau nei LPS/IFN- γ /lizato atveju. Šie skirtumai buvo statistiškai reikšmingi ($p = 0,007$) (27 pav.). Panaši tendencija nustatyta ir CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺CD127⁻CD39⁺ populiacijos atveju. T limfocitų stimuliavimas kontroliniu brandinimo mišiniu (LPS/IFN- γ) ir LPS/IFN- γ /lizato mišiniu subbrandintomis DL lėmė didesnės šių ląstelių procentinės dalies (atitinkamai 2,02 % ir 0,57 %) susidarymą, palyginti su DL, brandintomis naudojant kontrolinį (BGs) bei BGs/lizato brandinimo mišinius (atitinkamai 0,22 % ir 0,2).



27 pav. $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+CD127^-$ ir $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+CD127^-CD39^+$ Treg ląstelių fenotipo vidutinė procentinė dalis $CD4^+$ T limfocitų populiacijoje, stimuliuotoje skirtingais būdais subbrandintomis DL

Didžiausią $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+CD127^-$ Treg procentinės dalies susidarymą lėmė limfocitų stimuliavimas DL, brandintomis LPS/IFN- γ /lizato mišiniu, o mažiausia $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+CD127^-$ Treg ląstelių susidarė limfocitus stimuliuojant BGs brandintomis DL, $p = 0,007$). Brandinimo mišiniai BGs ir LPS/IFN- γ – kontroliniai, be navikinio lizato DL brandinimo mišiniai.

Taip pat įvertinta $CD39^+$ žymens raiška pasižyminčių ląstelių procentinė dalis $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+CD127^-$ Treg ląstelių populiacijoje (4 lentelė). Matyti, jog BGs bei BGs/lizato mišiniu brandintomis DL stimuliuotuose limfocituose $CD39^+$ Treg sudaro mažiausią dalį – beveik penktadalį, o LPS/IFN- γ /lizato mišiniu – didžiausią, beveik du trečdalius visų $CD127^-$ Treg ląstelių. Palyginus brandinimo būdus, kai buvo naudojamas lizatas, matyti, kad LPS/IFN- γ /lizatu brandintos DL lėmė didesnės $CD39^+$ populiacijos susidarymą nei BGs/lizato mišiniu brandintos DL (skirtumas statistiškai reikšmingas, $p = 0,015$).

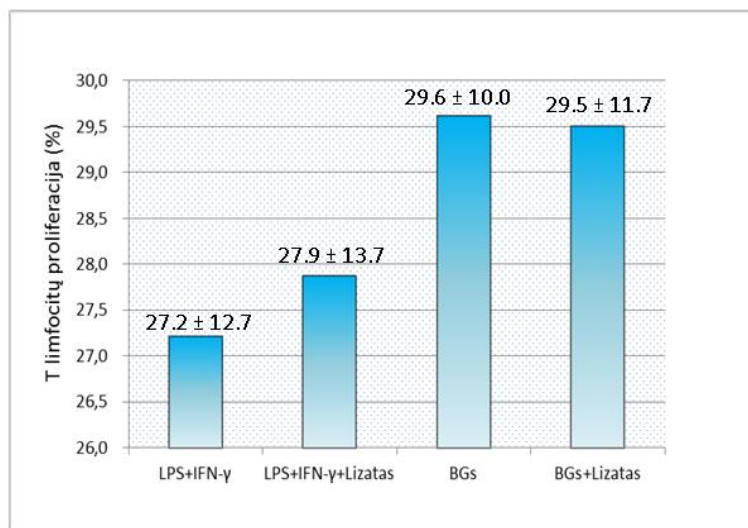
4 lentelė. $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+CD127^-$ Treg procentinė dalis $CD4^+$ T ląstelių populiacijoje ir atitinkamai $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+CD127^-CD39^+$ Treg ląstelių dalis tarp $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+CD127^-$ ląstelių

LPS/IFN- γ /lizatu brandintos DL lėmė didesnės $CD39^+$ populiacijos susidarymą nei BGs/lizato mišiniu brandintos DL, $p = 0,015$.

Ląstelių žymenys	BGs	BGs/lizatas	LPS/IFN- γ	LPS+/IFN- γ /lizatas
$CD4^+CD25^{high}FOXP3^+CD127^-$	1,12	0,77	3,1	1,23
$CD4^+CD25^{high}FOXP3^+CD127^-CD39^+$	29,34	18,34	47,46	63,96

4.4. DL funkcinio aktyvumo įvertinimas (MLR)

Mišrioji limfocitų reakcija (MLR) buvo atlikta, norint įvertinti DL ląstelių funkcinį aktyvumą. Po T limfocitų ir DL inkubacijos *in vitro* buvo įvertinta limfocitų proliferacija, kuri atspindėjo DL sugebėjimą aktyvinti T limfocitus. Gautieji MLR testo rezultatai rodo, kad efektyvesne proliferacija pasižymėjo T limfocitai, stimuliuoti BGs subbrandintomis DL, palyginti su T limfocitais, stimuliuotais brandinimo mišiniais, kuriuose BGs nebuvo, nors statistiškai reikšmingų skirtumų ir nebuvo rasta (28 pav.).



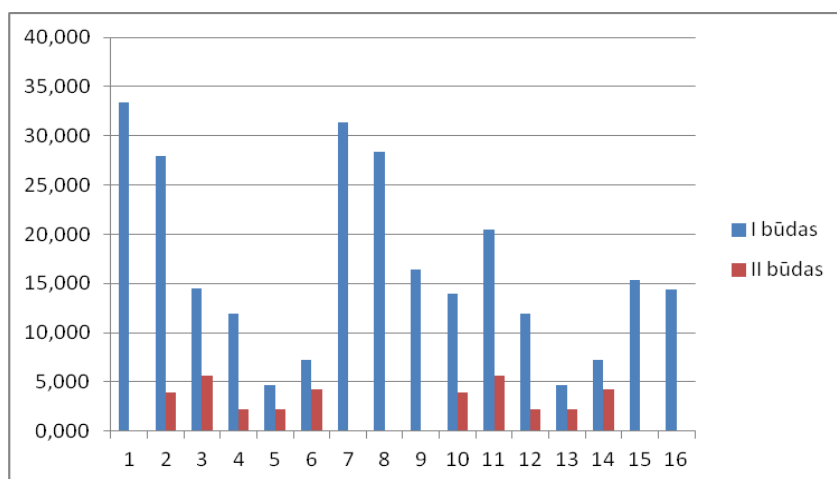
28 pav. T limfocitų proliferacijos, sukeltos skirtingais brandinimo mišiniais brandintomis DL, procentiniai vidurkiai

Efektyvesne proliferacija pasižymėjo T limfocitai, stimuliuoti BGs subbrandintomis DL, palyginti su T limfocitais, stimuliuotais brandinimo mišiniais, kuriuose BGs nebuvo. BGs ir LPS/IFN- γ – kontroliniai brandinimo mišiniai be navikinio lizato.

4.5. DL sekretuojamų citokinų analizė

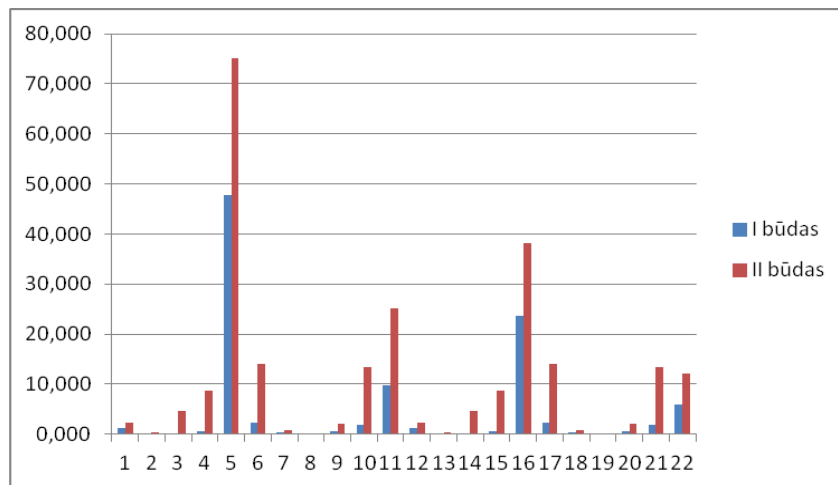
4.5.1. Citokinų IL-12p70 ir IL-10 sekrecijos įvertinimas pacientų dendritinėse ląstelėse

Dviejų citokinų – IL-10 ir IL-12p70 sekrecija buvo tirta pacientų subrendusių ir restimuliuotų CD40L DL ląstelių kultūrų supernatante ELISA būdu. IL-10 sekrecija atspindėjo imunosupresines, o IL-12p70 sekrecija – imunogenines DL savybes. Nustatyta, kad I būdu (LPS/IFN- γ /lizatas) subrandintos DL pasižymėjo didesne imunogeninio IL-12p70 sekrecija, nei II būdu (IL-1 β /IL-6/TNF α /PGE₂/lizatas) subrandintos DL (29 pav.). I būdu subrandintų DL išskirto IL-12p70 koncentracijos vidurkis buvo 13,26, o II būdu – 3,6. Nustatyti skirtumai nebuvo reikšmingi, nes abiejose grupėse buvo dideli reikšmių išsibarstymai.



29 pav. Imunogeninio citokino IL-12p70 sekrecijos skirtumai I ir II būdu subrandintose DL
I būdu (LPS/IFN- γ /lizatas) subrandintos DL pasižymėjo didesne imunogeninio IL-12p70 sekrecija nei II būdu (IL-1 β /IL-6/TNF α /PGE₂/lizatas) subrandintos DL. Y ašyje pavaizduota citokino koncentracija (pg/ml), X ašyje pavaizduoti pacientai.

Įvertinus imunosupresinio IL-10 sekreciją nustatyta, kad II būdu subrandintos DL šio citokino sekretavo daugiau negu I būdu subrandintos DL (IL-10 koncentracijos vidurkiai: I būdas – 10,9; II būdas – 17,00) (30 pav.). Reikšmingų skirtumų nenustatyta, nes nustatytas didelis reikšmių išsibarstymas abiejose grupėse, tikėtina, kad dėl nedidelės tiriamųjų imties.



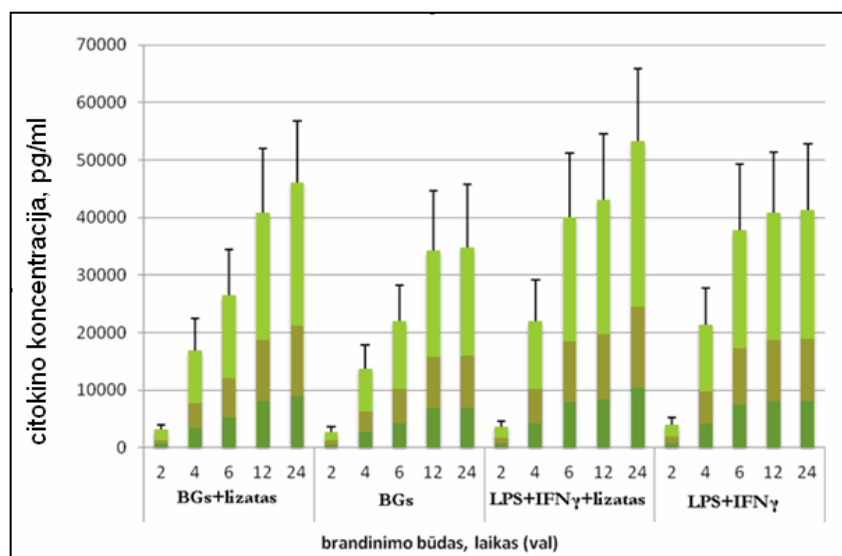
30 pav. Imunosupresinio citokino IL-10 sekrecijos skirtumai I ir II būdu brandintose DL II būdu (IL-1 β /IL-6/TNF α /PGE $_2$ /lizatas) subbrandintos DL IL-10 sekretavo daugiau negu I būdu (LPS/IFN- γ /lizatas) subbrandintos DL. Y ašyje pavaizduota citokino koncentracija (pg/ml), X ašyje pavaizduoti pacientai.

4.5.2. Citokinų IL-12p70, TNF- α , IL-1 β , IL-6 ir IL-10 sekrecijos įvertinimas sveikų donorų dendritinėse ląstelėse

Ištyrus donorų DL brandimo metu sekretuojamų citokinų koncentracijas, pastebėta, jog citokinų sekrecija kai kuriais atvejais ženkliai skyrėsi tarp skirtingų donorų. Nustatyta, jog **IL-6** ir **TNF- α** sekretavo visų donorų DL, o **IL-12p70** sekrecija nustatyta 12 iš 15 donorų DL, **IL-10** – 9 iš 15 donorų DL, **TGF- β** – 2 iš 15 donorų DL, **IL-1 β** – 4 iš 15 donorų DL. Šie skirtumai galėjo būti susiję ne tik su DL brandinimui naudotais mišiniais, tačiau ir su individualiomis donorų imuninės sistemos savybėmis ar su fiziologinėmis arba patologinėmis būklėmis, į kurias imuninė sistema buvo priversta reaguoti skirtingu citokinų sekrecijos profiliu.

TNF- α sekrecija

Išmatavus DL brandimo metu išskiriamo TNF- α kiekius, nustatyta, jog šio citokino sekrecija pasižymėjo visais būdais brandintos DL (31 pav.). TNF- α sekrecija pastebėta jau pačiu pirmu tirtuoju laiko momentu – praėjus 2 val. nuo DL brandinimo pradžios. Brandinimo mišiniais (su navikiniu lizatu ir kontroliniai brandinimo mišiniai be navikinio lizato) brandintų DL sekretuojamo TNF- α koncentracija didėjo priklausomai nuo laiko – pirmosiomis valandomis nuo brandinimo pradžios koncentracija didėjo staigiai, o vėliau šis didėjimas sulėtėjo. Ypač ryškiai tai buvo matyti DL brandinimui naudojant brandinimo mišinius su naviko lizatu – praėjus 12 val. išskiriamo TNF- α kiekis nustojo didėti.



31 pav. Skirtingais būdais brandintų DL išskiriamo TNF- α vidutinė koncentracija pagal laiką

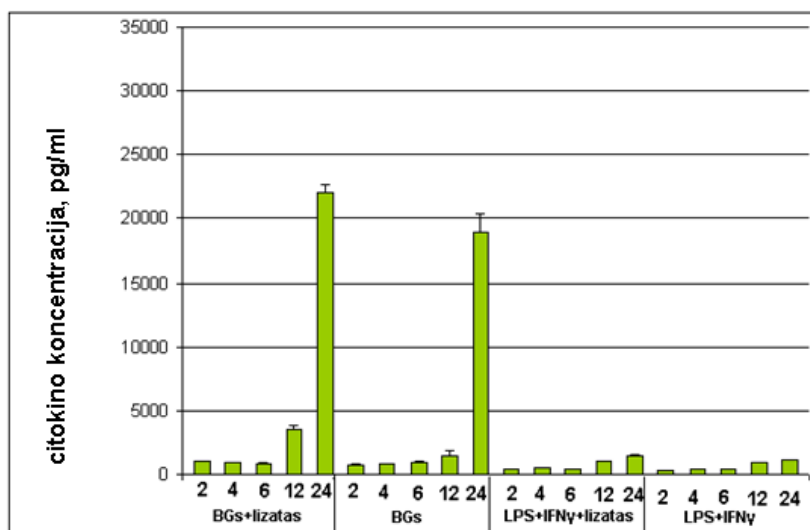
TNF- α sekrecija pasižymėjo visais būdais brandintos DL, bet brandinimo mišiniai su lizatu lėmė didesnę TNF- α sekreciją nei atitinkami deriniai be lizato.

Įvertinus TNF- α sekrecijos priklausomybę nuo brandinimo mišinio matyti, jog brandinimo mišiniai su lizatu lėmė didesnę TNF- α sekreciją, nei atitinkami deriniai be lizato. Šie skirtumai nebuvo statistiškai reikšmingi. Didžiausias skirtumas buvo matomas po 6 val. tarp BGs su lizatu brandintų DL TNF- α kiekio ir LPS/IFN- γ /lizatu bei LPS/IFN- γ deriniais brandintų DL TNF- α sekrecijos.

IL-12p70 sekrecija

Ištyrus IL-12p70 sekreciją, nustatyta, jog BGs ir BGs su lizatu brandintos DL sekretavo didelius kiekius IL-12p70, tačiau, priešingai nei TNF- α kiekio tyrime, LPS/IFN- γ ir LPS/IFN- γ /lizato mišiniu subrandintos DL pasižymėjo labai žema IL-12p70 sekrecija (32 pav.). Iš gautų duomenų matyti, jog praėjus 2, 4 ir 6 val. nuo DL inkubacijos su brandinimo mišiniais pradžios, IL-12p70 sekrecija buvo nežymi. DL citokino sekrecija prasidėjo po 12 val., t.y. įpusėjus BGs su lizatu ir BGs brandinimui, ir ženkliai padidėjo brendimo pabaigoje – po 24 val. IL-12p70 sekrecijos skirtumai tarp BGs ir BGs/lizatas brandinimo būdų buvo nežymūs, $p = 0,40$.

Visgi tokia IL-12p70 sekrecija pasižymėjo ne visų donorų DL (7-o, 11-o ir 14 donorų atveju IL-12p70 sekrecijos nenustatyta).



32 pav. Skirtingais būdais brandintų DL išskiriamo IL-12p70 vidutinė koncentracija pagal laiką (po 2, 4, 6, 12 ir 24 val.)

BGs ir BGs/lizatu subbrandintos DL sekretavo didelius kiekius IL-12p70, kitaip nei LPS/IFN- γ ir LPS/IFN- γ /lizato mišiniu subbrandintos DL, kurios pasižymėjo maža IL-12p70 sekrecija.

IL-1 β sekrecija

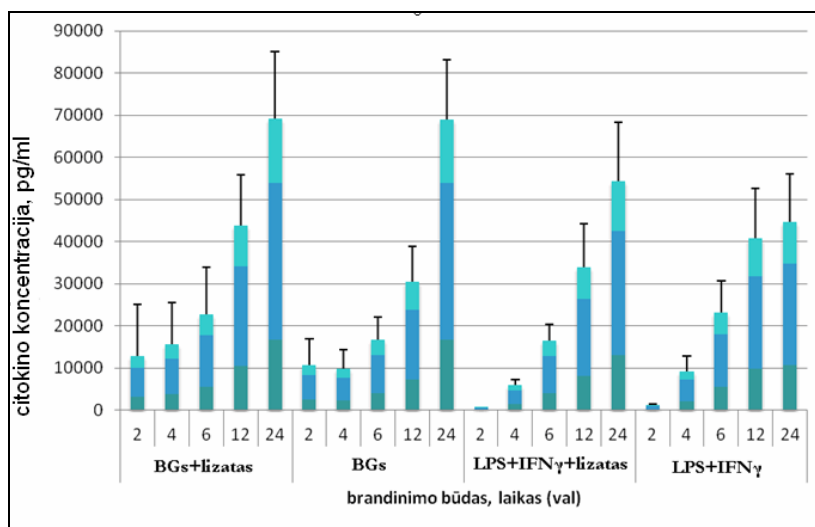
Ištyrus citokino IL-1 β koncentraciją, skirtingas jo kiekis nustatytas tik 4 donorų DL. Gauti duomenys šių donorų atveju rodo, jog didesne IL-1 β sekrecija pasižymėjo LPS/IFN- γ bei LPS/IFN- γ /lizatu subbrandintos DL, negu DL, subbrandintos BGs bei BGs ir lizatu. Dėl mažos tiriamųjų imties ir didelio duomenų išsibarstymo šie skirtumai nebuvo statistiškai reikšmingi.

IL-6 sekrecija

Įvertinus IL-6 sekreciją atsižvelgiant į laiką nustatyta, kad šį citokiną sekretavo DL, subbrandintos visais būdais (su naviko lizatu ir be jo). IL-6 sekrecija didėjo pagal laiką ir didžiausia jo koncentracija buvo po 24 val. Tačiau toks didėjimas skirtingose grupėse buvo nevienodas. Pastebėta, jog po 2 val. BGs bei BGs/lizato mišiniu brandintų DL išskiriamo IL-6 procentinė dalis nuo galutinės jo koncentracijos brandinimo pabaigoje (atitinkamai 18,6 % ir 15,6 %) buvo didesnė nei brandintų LPS/IFN- γ ir LPS/IFN- γ /lizato deriniais DL išskiriamo IL-6 (atitinkamai 1,29 % ir 2,6 %).

Palyginus IL-6 koncentraciją tarp skirtingų brandinimo būdų, matyti, kad BGs bei BGs/lizatu subbrandintos DL po 24 val. išskyrė tokį patį citokino kiekį – vidutiniškai 69000 pg/ml (33 pav.). Tuo pačiu laiko momentu, LPS/IFN- γ /lizato bei LPS/IFN- γ mišiniais subbrandintos DL IL-6 sekretavo mažiau – atitinkamai 54302,04 pg/ml ir 44727,16 pg/ml.

Svarbus skirtumas buvo matomas pastaruoju būdu brandintų DL atveju – nuo BGs bei BGs/lizatu brandintų DL išskirto IL-6 kiekio jų sekretuotas citokino kiekis buvo mažesnis 35 %. Šis skirtumas buvo statistiškai reikšmingas ($p = 0,034$).

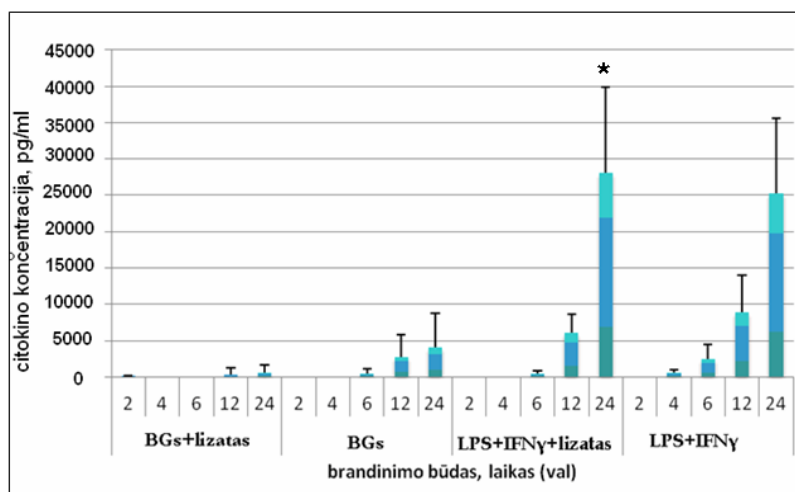


33 pav. Skirtingais būdais subrandintų DL išskiriamo IL-6 vidutinė koncentracija pagal laiką

BGs bei BGs/lizatu subbrandintos DL po 24 val. išskyrė tokį patį citokino kiekį, o LPS/IFN- γ mišiniu subrandintų DL sekretuotas IL-6 kiekis buvo 35 % mažesnis už BGs ir BGs/lizatu brandintų DL išskirtą IL-6 kiekį, ($p = 0,034$).

IL-10 sekrecija

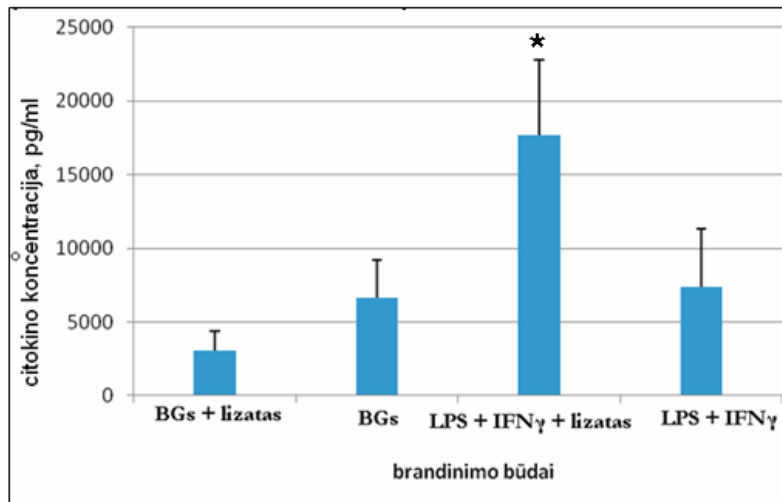
Visais būdais subbrandintose DL buvo nustatyta skirtinga IL-10 sekrecija. DL, brandintose BGs, IL-10 sekrecija buvo nustatyta tik įpusėjus brandinimui, BGs bei LPS/IFN- γ /lizatu brandintose DL – 6-ą valandą, o LPS/IFN- γ mišiniu brandintose DL – jau 4-ą valandą nuo brandinimo pradžios. Visais būdais brandintų DL išskirto IL-10 kiekis didėjo per laiką. Palyginus kiekybinę IL-10 sekreciją nustatyta, jog LPS/IFN- γ /lizatu bei LPS/IFN- γ subbrandintos DL IL-10 sekretavo ženkliai daugiau ($p = 0,018$) nei DL, brandintos BGs ir BGs/lizato mišiniais. Ryškiausiai šis skirtumas buvo matomas brandinimo pabaigoje (po 24 val.), kai IL-10 koncentracija pasiekė piką (34 pav.).



34 pav. Skirtingais būdais subrandintų DL išskiriamo IL-10 vidutinė koncentracija pagal laiką
LPS/IFN- γ /lizatu bei LPS/IFN- γ subrandintos DL sekretavo ženkliai daugiau IL-10 ($p = 0,018$), nei DL, brandintos BGs ir BGs/lizato mišiniais.*

4.6. Th1/Th2/Th17 imuninio atsako poliarizacijos įvertinimas sveikų donorų suaktyvintų CD4⁺ T limfocitų populiacijoje

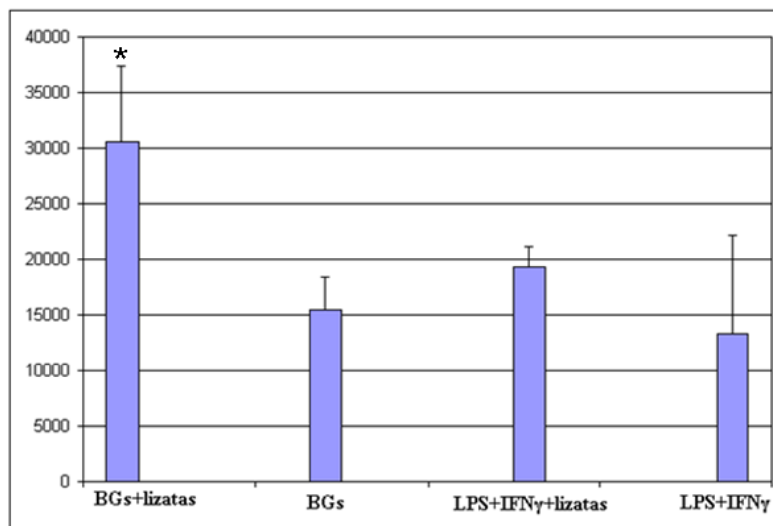
Atlikus analizę, didžiojoje dalyje mėginių buvo nustatyta tik citokinų IL-4 ir IFN- γ sekrecija. IL-4 koncentracija pavaizduota 34 pav. Iš gautų duomenų matyti, jog CD4⁺ T limfocitams, restimuluotiems skirtingais būdais subrandintomis DL, buvo būdinga nevienodai intensyvi IL-4 sekrecija. Limfocitai, restimuluoti BGs ir lizatu subrandintomis DL, gamino santykinai mažą IL-4 kiekį (vidurkis – 3035 pg/ml), o LPS/IFN- γ /lizato mišiniu – dvigubai daugiau nei LPS/IFN- γ mišiniu be navikinio lizato. Nežymiai didesnė IL-4 sekrecija buvo būdinga BGs subrandintomis DL restimuluotiems limfocitams. Skirtingai nuo visų kitų, limfocitų restimuliacija LPS/IFN- γ /lizatu brandintomis DL lėmė itin aukštą IL-4 sekreciją, kuri siekė net 17669 pg/ml (35 pav.). Šis skirtumas statistiškai reikšmingas ($p = 0,033$).



35 pav. CD4⁺ T limfocitų, restimuliuotų skirtingais būdais subrandintomis DL, vidutinė išskiriamo IL-4 koncentracija

Limfocitų restimuliacija LPS/IFN- γ /lizatu brandintomis DL lėmė itin aukštą IL-4 sekreciją, $p = 0,033$.

CD4⁺ T limfocitai, restimuliuoti skirtingais būdais subrandintomis DL, taip pat pasižymėjo nevienoda IFN- γ sekrecija (36 pav.). Daugiausia šio citokino sekretavo limfocitai, restimuliuoti BGs/lizatu brandintomis DL (30507 pg/ml), palyginti su limfocitais, restimuliuotais LPS/IFN- γ /lizatu brandintomis DL (19414 pg/ml). Šis nustatytas skirtumas buvo statistiškai reikšmingas ($p = 0,043$).



36 pav. CD4⁺ T limfocitų, restimuliuotų skirtingais būdais subrandintomis DL, vidutinė išskiriamo IFN- γ koncentracija

*Daugiausiai IFN- γ sekretavo limfocitai, restimuliuoti BGs/lizatu brandintomis DL (30507 pg/ml), * $p = 0,043$. Y ašyje pavaizduota IFN- γ koncentracija pg/ml, X ašyje pavaizduoti DL brandinimo būdai.*

Kiti tirti citokinai (TNF- α , IL-5, IL-17A, IL-10, TGF- β) buvo nustatyti tik vieno donoro CD4⁺ T limfocitų populiacijoje.

5. REZULTATŲ APTARIMAS

Šis tyrimas buvo atliktas siekiant charakterizuoti pagamintų DL imunogeninį (imuninį atsaką sukeliantį) ir tolerogeninį (imuninį atsaką slopinantį) potencialą, optimizuoti imunogeniškų priešvėžinių DLP gamybos būdą ir sudaryti preparatų kokybės vertinimo kriterijus. Šiuo metu DLP kokybė charakterizuojama pagal DL subrendimo bei aktyvinimo žymenų ekspresiją. Mūsų tyrimų rezultatai pirmą kartą pasaulyje parodė, kad brandinimo mišiniai gali skirtingai veikti DL sugebėjimą sukelti tolerogeninį imuninį atsaką.

Kokybiškiems DLP paruošti didelę įtaką daro citokinų brandinimo mišinių sudėtis ir brandinimo *in vitro* laikas. Į brandinimo mišinius įeinantys citokinai skirtingai veikia DL poliarizuojančių bei migracijos signalų limfocitams formavimą, o brandinimo nutraukimo momentą būtina pasirinkti tokį, kurio metu DL pasižymi maksimalia imunines reakcijas stimuliuojančių signalų ekspresija. Tyrimą sudarė du etapai. I etape iš pacientų periferinio kraujo monocitų buvo gautos DL, kurios brandintos dviem skirtingais brandinimo mišiniais. Pirmąjį brandinimo mišinį sudarė LPS ir IFN- γ , antrąjį citokinų TNF- α , IL-1 β , IL-6 ir PGE₂ mišinys. Į abiejų brandinimo mišinių sudėtį įėjo navikinių ląstelių lizatas. Nustačius, kad brandinimo mišinys su IFN- γ yra pranašesnis už citokinų TNF- α , IL-1 β , IL-6 ir PGE₂ brandinimo mišinį, į antrąjį tyrimo etapą, buvo įtrauktas kitas bakterinis adjuvantas BGs, kuris DL veikė ir kaip brandinimo, ir kaip naviko antigenus pateikiantis faktorius. Į abu brandinimo mišinius dėta navikinių ląstelių lizato. Kaip kontrolė šiems brandinimo mišiniams DL brandinti buvo naudoti tie patys bakteriniai adjuvantai ir citokinai, tik be navikinių ląstelių lizato.

Eksperimentiniais *in vitro* tyrimais buvo patvirtinta, kad DL, pasižyminčios standartiniu CD80⁺, CD83⁺, CD86⁺, HLA-DR⁺, CD14⁻ imunofenotipu bei gausia IL-12p70 sekrecija, efektyviausiai sužadina autologinių ir alogeninių T limfocitų gamybą ir sukelia stipriausią naviko antigenams specifinių CD8⁺ citotoksiinių T limfocitų atsaką [188]. Terapinis tokių DL priešvėžinis efektyvumas *in vivo* taip pat turėtų būti didesnis. Tačiau gausėja mokslinių duomenų, įrodančių, kad subrendusios CD83^{high} DL, priklausomai nuo jų brandinimo sąlygų, gali ekspresuoti ne tik imunogeninius, bet ir įvairius tolerogeninius žymenis, slopinančius imunogeninių žymenų perduodamus būtinus signalus T limfocitams [185-187]. Todėl, norint detaliai įvertinti DL, neužtenka vien tik nustatyti imunogeninius DL žymenis. Norint DL

panaudoti klinikoje, reikia įvertinti ir funkcinės savybės atspindintį DL sekretuojamų citokinų profilį.

Kaip buvo minėta anksčiau, įvertinant DLP efektyvumą, labai svarbu buvo nustatyti DL tolerogeninius žymenis, galinčius turėti įtakos subrendusių DL imunostimuliacinėms savybėms bei dalyvaujantiems susidarant T reguliacinėms ląstelėms ar T anergiškiems (nejautriems antigenams) [185,187]. Buvo įvertinti labiausiai charakterizuoti DL tolerogeniniai žymenys – CD85k (ILT3), CD273 (PD-L2) bei CD274 (PD-L1) – subrendusių DL paviršiuje. Išanalizavus onkologinių pacientų DLP nustatyta, kad brandinimas TNF- α , IL-1 β , IL-6 ir PGE₂ mišiniu sukėlė žymiai didesnę DL tolerogeninių žymenų ekspresiją nei brandinimas LPS ir IFN- γ . Iki šiol literatūroje nebuvo skelbta duomenų apie kompleksinį imunogeninių ir tolerogeninių žymenų raiškos nustatymą skirtingais brandinimo mišiniais subrandintose DL. Mūsų tyrimo metu pirmą kartą buvo kompleksiskai įvertinti imunogeniniai ir tolerogeniniai DL žymenys. Remiantis mūsų rezultatais ir literatūros šaltinių apie tolerogeninių žymenų imunosupresinį poveikį efektyviam imuniniam atsakui duomenimis, galime teigti, kad DL gamyboje naudojant TNF- α , IL-1 β , IL-6, PGE₂ brandinimo mišinį gaunamos klinikiniam naudojimui netinkamos DL. Nors šis citokinų mišinys ilgą laiką buvo vadinamas standartiniu brandinimo deriniu ir naudotas gaminant gydomąsias DL vakcinas [192], paskutinių tyrimų rezultatai aiškiai įrodė, kad šiuo būdu subrandintos DL pasižymi tik geromis migracinėmis savybėmis, tačiau nesukelia efektyvaus priešnavikinio imuninio atsako [157,188,193-195].

Šio darbo metu buvo nustatyta, kad imunoterapijai skirtų DLP kokybė ir priešvėžinis potencialas labai priklauso nuo brandinti naudojamų mišinių. Naviko lizato, IFN- γ ir LPS derinys *in vitro* moduluojamose DL skatina didesnę imunogeninio citokino IL-12p70 ir mažesnę imunosupresinio citokino IL-10 sekreciją, palyginti su TNF- α , IL-1 β , IL-6 ir PGE₂ citokinų mišiniu subrandintomis DL. Nustatyta, kad vienas svarbiausių iš monocitų pagamintų DL vakcinų, tinkamų naudoti onkologiniams pacientams, parametrų yra aukšta citokino IL-12p70 sekrecija [198-202]. IL-12p70 yra pagrindinis citokinas, sukeliantis ir palaikantis Th1 tipo imuninį atsaką, svarbų navikinėms ląstelėms aptikti ir sunaikinti [202], kitaip nei imunosupresinis citokinas IL-10, slopinantis imuninį atsaką bei skatinantis imunosupresiniu aktyvumu pasižyminčių imuninių ląstelių proliferaciją [203]. Remiantis literatūros duomenimis, lėtiniu hepatitu C sergančiųjų DL, subrandintoms TNF- α , IL-1 β , IL-6 ir PGE₂ citokinų mišiniu, taip pat buvo būdinga aukšta IL-10 bei žema IL-12p70 sekrecija [196], o Azzaoui ir kt. autoriai nustatė, kad sveikų žmonių LPS mišiniu subrandintos DL pasižymi gausia imunostimuliacinio IL-12p70 bei negausia imunosupresinio IL-10 citokinų sekrecija [187].

DL brandinti naudodami abu brandinimo mišinius (LPS/IFN- γ ir TNF- α /IL-1 β /IL-6/PGE₂) nustatėme, jog abiem atvejais susidaro nepakankamai subrendusių tranzitinių (CD83^{low}) DL

populiacija, kuri, tikėtina, baigia bręsti *in vivo* [189-191]. Mes nustatėme, kad, priklausomai nuo brandinimo sąlygų, šios tranzitinės DL pasižymėjo skirtingomis savybėmis: subbrandintos antruoju mišiniu CD83^{low} DL turėjo reikšmingai didesnę tolerogeninių žymenų raišką. Todėl, remdamiesi savo tyrimo rezultatais, manome, kad pagal terapinį *in vitro* moduluotą DL potencialą vertingesnės būtų DL, subbrandintos pirmuoju būdu.

Bakterinių adjuvantų parinkimas gali reikšmingai pagerinti ruošiamo preparato kokybę. Vietoj LPS panaudojus BGs, kuris atlieka ne tik adjuvanto funkcijas, bet yra ir naviko antigenų pateikimo sistema [181], galima dar labiau suaktyvinti limfocitų proliferaciją, paskatinti imunogeninio citokino IL-12p70 sekreciją.

Analizuodami skirtingų bakterinių adjuvantų įtaką DL subrendimui, nustatėme, kad standartinių DL brandumo ir aktyvinimo žymenų (CD80⁺, CD83⁺, HLA-DR⁺, CD197⁺, CD11c⁺) raiškai bakteriniai adjuvantai įtakos neturėjo. Abu LPS bei BGs brandinimo mišiniai sukėlė didelę šių žymenų raišką.

Palyginus LPS ir BGs su navikiniu lizatu subbrandintų DL tolerogeninį potencialą, nustatyta, kad CD274 žymens raiška nepriklausė nuo brandinimo metu naudoto adjuvanto, o CD85k žymens raiška reikšmingai mažesnė buvo BGs ir lizatu subbrandintų DL preparatuose. Mūsų tyrimo metu pirmą kartą buvo įvertinta minėtų žymenų ekspresija BGs su navikiniu lizatu brandintose DL ir nustatyta, kad BGs naudojant vietoj LPS, DLP tolerogeniškumą galima sumažinti dar labiau. . Todėl, remdamiesi gautais rezultatais, galime daryti prielaidą, kad BGs subbrandintos DL pasižymėjo mažesniu tolerogeniniu potencialu, kuris yra itin nepalankus formuojantis priešvėžiniam imuniniam atsakui.

Įvertinus donorų DL sekretuojamų citokinų (IL-12p70, TNF- α , IL- β , TGF- β , IL-10, IL-6) profilį DL brandimo metu buvo nustatyta, kad kai kurių citokinų (TGF- β , IL- β) sekrecija skyrėsi tarp skirtingų donorų. Manome, kad šie skirtumai galėjo būti susiję ne tik su DL brandinti naudotais adjuvantų ir citokinų mišiniais, tačiau ir su individualiomis donorų imuninės sistemos savybėmis. TNF- α sekrecija buvo nustatyta visais brandinimo mišiniais brandintose DL ir citokino koncentracija didėjo per laiką. Tai rodo, kad visi brandinimui naudoti mišiniai inicijavo efektyvų DL subrendimą. Galime teigti, kad TNF- α sekretavusios DL pasižymėjo imunostimuliacinėmis savybėmis, nes, remiantis literatūros duomenimis, tik suaktyvintos DL gamina TNF- α , IL-2, IL-12, IFN- γ citokinus, gebančius suaktyvinti CD8⁺ CTL bei pasižyminčius priešvėžiniu poveikiu [11,204].

Brandžių ir kokybiškų DL susiformavimą nulemia ne tik citokinų sudėtis brandimo metu, bet ir ekspozicijos laikas. DL brandinimo trukmė iki šiol yra diskusinis klausimas. Mes savo darbe vertinome, kaip keičiasi brandinamų DL citokinų sekrecinis profilis per laiką. Tai labai svarbu nustatant optimalias brandinimo sąlygas. Literatūros duomenimis, norint pasiekti visiškai

subrendusių ir aktyvinimą atspindinčių žymenų raišką DL, šias ląsteles su brandinimo mišiniu reikia inkubuoti 24 val. Mūsų tyrimų duomenimis, maksimali TNF- α sekrecija pasiekama po 12 val, ir toks maksimumas laikosi dar 12 val. Citokinams IL-12p70 bei IL-6 būtina ekspozicija ne trumpesne negu 24 val. Pastebėta, kad ir sekretuojamo IL-10 kiekis maksimumą pasiekia po 24 inkubacijos val., tačiau reikšminga paminėti, kad, BGs turintis mišinys skatina minimalią šio citokino sekreciją palyginti su LPS/IFN- γ /lizato mišiniu. Todėl 24 val. inkubacijos trukmė, nors ir sukelianti didesnę šio supresinio citokino sekreciją, yra optimali, vertinant visuminį imunogeninių ir supresinių citokinų santykį.

Atlikus DL funkcinį aktyvumą atspindinčią mišrią limfocitų reakciją (MLR) buvo nustatyta, kad efektyvesne proliferacija pasižymėjo tie autologiniai T limfocitai, kurie buvo stimuliuoti BGs subbrandintomis DL, palyginti su proliferacija naudojant brandinimo mišinius, kuriuose BGs nebuvo. Pasaulyje yra atlikta adjuvantų (LPS) poveikio dendritinėms ląstelėms aktyvinti limfocitus tyrimų [205], tačiau tyrimų, apie BGs brandintų DL įtaką limfocitams aktyvinti atlikta nebuvo. Taigi mes pirmieji nustatėme BGs adjuvanto poveikį aktyvinant limfocitus bei skatinant jų proliferaciją ir galime teigti, kad didesniu imunostimuliaciniu potencialu pasižymėjo DL, subbrandintos bakteriniu adjuvantu BGs.

DLP kokybė buvo įvertinta ir pagal CD4⁺ T limfocitų išskiriamų citokinų (IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-5, IL-17A, IL-10, TGF- β) sekreciją, ir pagal Treg ląstelių susidarymą CD4 T limfocitų populiacijoje. Literatūroje Treg ląstelės apibūdinamos kaip CD4 T ląstelių subpopuliacija, kuri, sekretuodama imunosupresinius citokinus IL-10 ir TGF- β , slopina tiek specifinių efektorinių T limfocitų, tiek įgimto imuniteto NK ląstelių aktyvumą [17,18]. Mūsų tyrimo rezultatai parodė, jog didžiausią CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺CD127⁻ Treg ląstelių skaičiaus susidarymą lėmė limfocitų stimuliavimas DL, kurios buvo subbrandintos LPS ir lizato mišiniu, o mažiausiai šių ląstelių susidarė limfocitus stimuliuojant BGs ir lizatu brandintomis DL. Panašūs rezultatai gauti vertinant aktyvintas CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺CD127⁻CD39⁺ Treg ląsteles. Įvertinę CD39⁺ žymens raišką pasižyminčių ląstelių procentinę dalį CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺CD127⁻ Treg ląstelių populiacijoje nustatėme, kad limfocituose, stimuliuotuose BGs ir lizato mišiniu brandintomis DL, CD39⁺ Treg sudarė mažiausią (18,34 %) dalį, o LPS/IFN- γ /lizato mišiniu – didžiausią (63,96 %). Taigi, galime teigti, jog CD4 T limfocitų aktyvinimas bakteriniu adjuvantu LPS brandintomis DL lėmė didesnę Treg populiacijos, galinčios neigiamai (slopinančiai) paveikti besiformuojantį efektyvų priešvėžinį imuninį atsaką, susidarymą.

Pagal sekrecinį CD4⁺ T limfocitų, suaktyvintų subrendusiomis dendritinėmis ląstelėmis, profilį galima spręsti, kokios krypties (Th1, Th2, Th17, Treg) imuninį atsaką sukelia *in vitro* moduluotos DL. Yra žinoma, kad Th1 ląstelės sukelia priešvirusinį ir priešvėžinį, Th2 – priešbakterinį ir priešparazitinį imuninį atsaką, Th17 ląstelės svarbų vaidmenį vaidina audinių

uždegiminiuose procesuose, o Treg ląstelės slopina T ląstelių pagalbininkų aktyvumą bei kai kurias jų funkcijas ir sukelia toleranciją antigenams [206]. Tyrimo rezultatai parodė, kad limfocitai, stimuliuoti BGs/lizatu brandintomis DL, pasižymi mažesne IL-4, atspindinčia Th2 poliarizaciją, ir didesne IFN- γ (Th1 poliarizacija) sekrecija, palyginti su limfocitais, stimuliuotais LPS/lizato mišiniu brandintomis DL. Taigi, tikėtina, kad limfocitai, aktyvinti BGs/lizatu brandintomis DL, imuninį atsaką nukreips labiau Th1 nei Th2 kryptimi. Galima padaryti išvadą, kad BGs/lizato mišiniu subrandintos DL tinkamai aktyvina, t. y. inicijuoja priešvėžinį Th1 imuninį atsaką.

Taigi, šio darbo tikslas buvo optimizuoti DLP gamybos sąlygas, norint gauti tinkamos poliarizacijos potencialo priešvėžinėje terapijoje naudotinus pažangios terapijos vaistinius preparatus – dendritinių ląstelių vakcinas. Šie preparatai, vartojami kaip imunoterapinė priemonė, turi sukelti ilgalaikį priešvėžinį organizmo atsaką. Nustatyta, kad DLP kokybei lemiamą įtaką daro brandinimui naudojamų mišinių sudėtis, brandinimo laikas ir panaudoti adjuvantai, nespecifiniai imuninio atsako stiprintojai. Darbe panaudoti inovatyvūs biotechnologiniai veiksniai, bakteriniai adjuvantai BGs, pasižymėjo unikaliomis savybėmis – užtikrino vienos pakopos DL brandinimą (adjuvantas + antigeno pernašos sistema). Šių veiksmų panaudojimas DLP gaminti leido pagaminti didesniu imunogeniniu ir mažesniu tolerogeniniu potencialu pasižyminčias dendritinių ląstelių priešvėžines vakcinas.

BGs ir navikinio lizato mišiniu subrandintos DL gali būti naudojamos taikant individualizuotą priešnavikinę imunoterapiją bei, įvertinus didesnės kohortos DL imunogeninį bei tolerogeninį potencialą, ateityje būtų galima patentuoti *in vitro* moduluotų DL imunogenines ir tolerogenines savybes atspindinčių parametrų rinkinį.

6. IŠVADOS

1. DL brandinimas LPS/IFN- γ /lizato mišinyje yra pranašesnis už brandinimą citokinų TNF- α /IL-1 β /IL-6/PGE₂/lizatas mišinyje, nes subbrandintos DL pasižymi didesne imunogeninių ir mažesne tolerogeninių žymenų raiška.

2. Brandinimo mišinys BGs/lizatas lemia mažesnę subbrandintų DL tolerogeninį potencialą atspindinčio CD85k⁺ žymens raišką.

3. Sudarytas *in vitro* moduluotų DLP kokybės vertinimo kriterijų rinkinys:

a) DL paviršiaus žymenų rinkinys: subrendimo (CD83⁺), imunogeninio (CD80⁺ ir HLA-DR⁺) ir tolerogeninio (CD274⁺ (PD-L1), CD85k⁺ (ILT3)) potencialo žymenys;

b) DL citokinų profilis: imunostimuliacinio (IL-12p70, TNF- α , IL-6) ir imunosupresinio (IL-10, TGF- β) potencialo citokinai.

7. PUBLIKACIJŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS

1. **Dobrovolskienė N**, Strioga M, Liudkevičienė R, Petraitis T, Darinskas A, Pašukonienė V, Gudlevičienė Ž. Expression of tolerogenic potential-representing markers on clinical-grade therapeutic dendritic cell-based cancer vaccines. *Acta medica Lituanica*. 2013;20(4):161–173.
2. Strioga M, Felzmann T, Powell DJ, Ostapenko V, **Dobrovolskiene NT**, Matuskova M, Michalek J, Schijns V. Therapeutic dendritic cell-based cancer vaccines: the state of the art. *Crit Rev Immunol*. 2013;33(6):489-547.
3. Schijns V, Tartour E, Michalek J, Stathopoulos A, **Dobrovolskienė NT**, Strioga MM. Immune adjuvants as critical guides directing immunity triggered by therapeutic cancer vaccines. *Cytotherapy*. 2014;16(4):427-439.
4. Strioga MM, **Dobrovolskiene NT**. Dendritic cells as critical targets of vaccines and adjuvants in Immunopotentiators in Modern Vaccines, 2nd ed. Editors Virgil Schijns, Derek O'Hagan. *Elsevier*, 2016 (priimtas spausdinimui)

8. PRANEŠIMAI KONFERENCIJOSE

1. „Expression of tolerogenic and immunogenic markers on dendritic cells generated by two different maturation methods“ – stendinis pranešimas tarptautinėje konferencijoje „11th EFIS –EJI Tatra Immunology Conference“, kuri vyko 2014 metų rugsėjo 6–10 dienomis, Štrebske Pleso (Slovakija).

2. „Dendritinių ląstelių priešvėžinių savybių tyrimų rezultatai“ – žodinis pranešimas Nacionalinio vėžio instituto mokslinėje rytinėje konferencijoje, kuri vyko 2015 metų spalio 21 dieną Vilniuje.

3. „Autologinių dendritinių ląstelių vakcinų imunogeniškumo tyrimai Nacionaliniame vėžio institute“ – žodinis pranešimas Lietuvos imunologų draugijos konferencijoje, kuri vyko 2014 metų gruodžio 18 dieną Vilniuje.

9. LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Swann JB, Smyth MJ. Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest* 2007;117:1137-1146.
2. Draube A, Klein-Gonzalez N, Mattheus S, et al. Dendritic cell based tumor vaccination in prostate and renal cell cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* 2011;6:e18801.
3. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* 2004;22:329-60.
4. Thiery J, Lieberman J. Perforin: A Key Pore-Forming Protein for Immune Control of Viruses and Cancer. *Subcell Biochem* 2014;80:197-220.
5. Foged C, Hansen J, Agger EM. License to kill: Formulation requirements for optimal priming of CD8(+) CTL responses with particulate vaccine delivery systems. *Eur J Pharm Sci* 2012;45:482-91.
6. Shortman K., Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2002, 2:151.
7. Oelkrug C, Ramage JM. Enhancement of T cell recruitment and infiltration into tumours. *Clin Exp Immunol* 2014;178:1-8.
8. Klebanoff CA, Gattinoni L, Restifo NP. CD8+ T-cell memory in tumor immunology and immunotherapy. *Immunol Rev* 2006;211:214–24.
9. Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 2012;12:298-306.
10. Terhune J, Berk E, Czerniecki BJ. Dendritic Cell-Induced Th1 and Th17 Cell Differentiation for Cancer Therapy. *Vaccines* 2013;1:527-49.
11. Chen LJ, Zheng X, Shen YP, et al. Higher numbers of T-bet(+) intratumoral lymphoid cells correlate with better survival in gastric cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2013;62:553-61.
12. Gaur P, Singh AK, Shukla NK, Das SN. Inter-relation of Th1, Th2, Th17 and Treg cytokines in oral cancer patients and their clinical significance. *Hum Immunol* 2014;75:330-7.
13. Mak TW, Saunders ME, Jett BD. Primer to The Immune Response. 2nd Edition; 2014:702.
14. Mittal SK, Roche PA. Suppression of antigen presentation by IL-10. *Curr Opin Immunol* 2015;34:22-7.

15. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, et al. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005;6:1123-32.
16. Ye J, Livergood RS, Peng G. The Role and Regulation of Human Th17 Cells in Tumor Immunity. *The American Journal of Pathology* 2013;182:10-20.
17. Tai X, Van Laethem F, Pobezinsky L, et al. Basis of CTLA-4 function in regulatory and conventional CD4 (+) T cells. *Blood* 2012;119:5155–63.
18. Oderup C, Cederbom L, Makowska A, et al. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4⁺ CD25⁺ regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology* 2006;118:240–9.
19. Ormandy LA, Hillemann T, Wedemeyer H, et al. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2005; 65:2457–64.
20. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 2014;10:942–9.
21. Nishikawa H, Sakaguchi S. Regulatory T cells in tumor immunity. *Int J Cancer* 2010;127:759–67.
22. Nishikawa H, Sakaguchi S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 2014;27:1-7.
23. Devaud C, Darcy PK, Kershaw MH. Foxp3 expression in T regulatory cells and other cell lineages. *Cancer Immunol Immunother* 2014;63:869-76.
24. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology. 7th ed. Saunders, 2011.
25. Chung Y, Chang SH, Martinez GJ, et al. Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity* 2009;30:576–87.
26. Li Q, Chen J, Liu Y, et al. Prevalence of Th17 and Treg cells in gastric cancer patients and its correlation with clinical parameters. *Oncol Rep* 2013;30:1215-22.
27. Whiteside TL. Clinical Impact of Regulatory T cells (Treg) in Cancer and HIV. *Cancer Microenviron* 2015;8:201-7.
28. Reinherz EL, Meuer SC, Schlossman SF. The human T cell receptor: analysis with cytotoxic T cell clones. *Immunol Rev* 1983;74:83-112.
29. Madrenas J, Chau LA, Smith J, et al. The efficiency of CD4 recruitment to ligand-engaged TCR controls the agonist/partial agonist properties of peptide–MHC molecule ligands. *J Exp Med* 1997;185:219-30.

30. Létourneau S, Krieg C, Pantaleo G, Boyman O. IL-2- and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123:758-62.
31. Schubert LA, Jeffery E, Zhang Y, et al. Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. *J Biol Chem* 2001;276:37672-9.
32. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003;4:330-6.
33. Triulzi T, Tagliabue E, Balsari A, Casalini P. FOXP3 expression in tumor cells and implications for cancer progression. *J Cell Physiol* 2013;2;228:30–5.
34. Carrette F, Surh CD. IL-7 signaling and CD127 receptor regulation in the control of T cell homeostasis. *Seminars in Immunology. Semin Immunol* 2012;24:209–217.
35. Rathmell JC, Farkash EA, Gao W, Thompson CB. IL-7 enhances the survival and maintains the size of naive T cells. *J Immunol* 2001;167:6869-76.
36. Yu N, Li X, Song W, et al. CD4(+)CD25 (+)CD127 (low/-) T cells: a more specific Treg population in human peripheral blood. *Inflammation* 2012;35:1773-80.
37. Rao S, Yang H, Penninger JM, Kroemer G. Autophagy in non-small cell lung carcinogenesis: A positive regulator of antitumor immunosurveillance. *Autophagy* 2014;10:529-31.
38. Bastid J, Cottalorda-Regairaz A, Alberici G, et al. ENTPD1/ CD39 is a promising therapeutic target in oncology. *Oncogene* 2013;32:1743-51.
39. Mandapathil M, Szczepanski MJ, Szajnik M, et al. Increased ectonucleotidase expression and activity in Treg of patients with head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15:6348–57.
40. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *J Exp Med* 2006;203:1701-11.
41. Dwyer KM, Hanidziar D, Putheti P, et al. Expression of CD39 by human peripheral blood CD4⁺CD25⁺ T cells denotes a regulatory memory phenotype. *Am J Transplant* 2010;10:2410–20.
42. Massague J. TGF beta in cancer. *Cell* 2008;134:215–30.
43. Chomarat P, Banchereau J, Davoust J, Palucka AK. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat Immunol* 2000;1:510–4.
44. Steinbrink K, Jonuleit H, Müller G, et al. Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood* 1999;93:1634–42.
45. Kawakami Y, Yaguchi T, Sumimoto H, et al. Improvement of cancer immunotherapy by combining molecular targeted therapy. *Front Oncol* 2013;3:136.

46. Qian BZ, Li J, Zhang H, et al. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature* 2011;475:222–5.
47. Gabrilovich D, Ishida T, Oyama T, et al. Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. *Blood* 1998;92:4150–66.
48. Bronte V, Wang M, Overwijk WW, et al. Apoptotic death of CD8⁺ T lymphocytes after immunization: induction of a suppressive population of Mac-1⁺/Gr-1⁺ cells. *J Immunol* 1998;161:5313–20.
49. Seung LP, Rowley DA, Dubey P, Schreiber H. Synergy between T-cell immunity and inhibition of paracrine stimulation causes tumor rejection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:6254–8.
50. Huang B, Pan PY, Li Q, et al. Gr-1⁺ CD115⁺ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res* 2006;66:1123–31.
51. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2009;9:162–74.
52. Bronte V. Myeloid-derived suppressor cells in inflammation: uncovering cell subsets with enhanced immunosuppressive functions. *Eur J Immunol* 2009;39:2670–2.
53. Highfill SL, Rodriguez PC, Zhou Q, et al. Bone marrow myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) inhibit graft-versus-host disease (GVHD) via an arginase-1-dependent mechanism that is up-regulated by interleukin-13. *Blood* 2010;116:5738–47.
54. Mantovani A, Sica A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr Opin Immunol* 2010;22:231–7.
55. Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 2010;141:39–51.
56. Sica A, Bronte V. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *J Clin Invest* 2007;117:1155–66.
57. Oppenheim JJ, Tewary P, de la Rosa G, Yang D. Alarmins initiate host defense. *Adv Exp Med Biol* 2007;601:185–94.
58. Ito T, Wang YH, Duramad O, et al. TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand. *J Exp Med* 2005; 202:1213–23.
59. Aspod C, Pedroza-Gonzalez A, Gallegos M, et al. Breast cancer instructs dendritic cells to prime interleukin 13-secreting CD4⁺ T cells that facilitate tumor development. *J Exp Med* 2007, 204:1037–47.

60. De Monte L, Reni M, Tassi E, et al. Intratumor T helper type 2 cell infiltrate correlates with cancer-associated fibroblast thymic stromal lymphopoietin production and reduced survival in pancreatic cancer. *J Exp Med* 2011;208:469–78.
61. Yang D, Chen Q, Su SB, et al. Eosinophil- derived neurotoxin acts as an alarmin to activate the TLR2-MyD88 signal pathway in dendritic cells and enhances Th 2 immune responses. *J Exp Med* 2008;205:79–90.
62. Willingham SB, Volkmer JP, Gentles AJ, et al. The CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPα) interaction is a therapeutic target for human solid tumors. *Proc Nat Acad Sci USA* 2012;109:6662–7.
63. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 1973; 1;137:1142-62.
64. Kumar S, Jack R. Origin of monocytes and their differentiation to macrophages and dendritic cells. *Journal of Endotoxin Research* 2006;5:278-284.
65. Conti L, Gessani S. GM-CSF in the generation of dendritic cells from human blood monocyte precursors: Recent advances. *Immunobiology* 2008;213:859-870.
66. Doherty GJ, McMahon HT. Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem* 2009;78:857-902.
67. Collin M, McGovern N, Haniffa M. Human dendritic cell subsets. *Immunology* 2013; 140:22-30.
68. Villadangos JA, Young L. Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* 2008;29: 352-361.
69. El Shikh ME, El Sayed RM, Sukumar S, et al. Activation of B cells by antigens on follicular dendritic cells. *Trends Immunol* 2010;31:205-11.
70. Trombetta ES, Mellman I. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annual Review of Immunology* 2005;23: 975-1028.
71. Redmond WL, Marincek BC, Sherman LA. Distinct requirements for deletion versus anergy during CD8 T cell peripheral tolerance in vivo. *J Immunol* 2005;15;174:2046-53.
72. Satthaporn S. and Eremin O. Dendritic cells (I): biological functions. *J R Coll Surg Edinb* 2001;46: 9-19.
73. Benvenuti F, Lagaudriere-Gesbert C, Grandjean I, et al. Dendritic cell maturation controls adhesion, synapse formation, and the duration of the interactions with naive T lymphocytes. *Journal of Immunology* 2004;172:292-301.

74. Prazma CM, Tedder TF. Dendritic cell CD83: A therapeutic target or innocent bystander? *Immunology Letters* 2008;115:1-8.
75. Ju X., Clark G., Hart DN. Review of human DC subtypes. *Methods Mol Biol* 2010; 595:3-20.
76. Martín-Fontecha A., Lanzavecchia A, Sallusto F. Dendritic cell migration to peripheral lymph nodes. *Handb Exp Pharmacol* 2009;188:31-49.
77. Aragoneses-Fenoll LA, Corbi L. Dendritic cells: still a promising tool for cancer immunotherapy. *Clinical and Translational Oncology* 2007;9:77-82.
78. Dhodapkar MV, Steinman RM, Krasovsky J, et al. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med* 2001;193:233-8.
79. Rescigno M, Granucci F, Citterio S, et al. Coordinated events during bacteria-induced DC maturation. *Immunol Today* 1999;20:200-3.
80. Akbari O, Panjwani N, Garcia S, et al. DNA vaccination: transfection and activation of dendritic cells as key events for immunity. *J Exp Med* 1999;189:169-78.
81. Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, et al. CD34⁺ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor alpha: II. Functional analysis. *Blood* 1997;90:1458-70.
82. Winzler C, Rovere P, Rescigno M, et al. Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J Exp Med* 1997;185:317-28.
83. Wakkach A, Fournier N, Brun V, et al Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity* 2003;18:605-17.
84. Steinman RM, Turley S, Mellman I, Inaba K. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med* 2000;7;191:411-6.
85. Brière F, Bendriss-Vermare N, Delale T, et al. Origin and filiation of human plasmacytoid dendritic cells. *Hum Immunol* 2002;63:1081-93.
86. Bendriss-Vermare N, Barthélémy C, Durand I, et al. Human thymus contains IFN-alpha-producing CD11c(-), myeloid CD11c(+), and mature interdigitating dendritic cells. *J Clin Invest* 2001;107:835-44.
87. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2003;21:685-711.
88. Jonuleit H., Schmitt E, Steinbrink K, Enk AH. Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells. *Trends Immunol* 2001;22:394-400.

89. Wilson NS, El-Sukkari D, Villadangos JA. Dendritic cells constitutively present self antigens in their immature state in vivo and regulate antigen presentation by controlling the rates of MHC class II synthesis and endocytosis. *Blood* 2004;103:2187-95.
90. Steinbrink K, Wöfl M, Jonuleit H, et al. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol* 1997;159:4772-80.
91. Lutz MB, Schuler G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol* 2002;23:445-9.
92. Schulz O, Edwards AD, Schito M, et al. CD40 triggering of heterodimeric IL-12 p70 production by dendritic cells in vivo requires a microbial priming signal. *Immunity* 2000;13:453-62.
93. Vieira PL, de Jong EC, Wierenga EA, et al. Development of Th1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction. *J Immunol* 2000;164:4507-12.
94. Kalinski P, Hilkens CM, Snijders A, et al. Dendritic cells, obtained from peripheral blood precursors in the presence of PGE₂, promote Th2 responses. *Adv Exp Med Biol* 1997;417:363–367.
95. Kalinski P., Vieira PL, Schuitemaker JH, et al. Prostaglandin E(2) is a selective inducer of interleukin-12 p40 (IL-12p40) production and an inhibitor of bioactive IL-12p70 heterodimer. *Blood* 2001;97:3466–3469.
96. Faries MB, Bedrosian I, Xu S, et al. Calcium signaling inhibits interleukin-12 production and activates CD83(+) dendritic cells that induce Th2 cell development. *Blood* 2001;98:2489–2497.
97. Grabbe S, Bruvers S, Gallo RL, et al. Tumor antigen presentation by murine epidermal cells. *J Immunol* 1991;146:3656–3661.
98. Flamand V, Sornasse T, Thielemans K, et al. Murine dendritic cells pulsed in vitro with tumor antigen induce tumor resistance in vivo. *Eur J Immunol* 1994;24:605–610.
99. Zitvogel L, Regnault A, Lozier A, et al. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med* 1998;4:594–600.
100. Banchereau J, Palucka AK. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol* 2005;5:296–306.
101. Su Z, Dannull J, Heiser A, et al. Immunological and clinical responses in metastatic renal cancer patients vaccinated with tumor RNA-transfected dendritic cells. *Cancer Res* 2003;63:2127–2133.

102. Nair SK, Morse M, Boczkowski D, et al. Induction of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes in cancer patients by autologous tumor RNA-transfected dendritic cells. *Ann Surg* 2002;235:540–549.
103. Rosenberg SA, Dudley ME. Cancer regression in patients with metastatic melanoma after the transfer of autologous antitumor lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:14639–14645.
104. Maker AV, Phan GQ, Attia P, et al. Tumor regression and autoimmunity in patients treated with cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and interleukin 2: a phase I/II study. *Ann Surg Oncol* 2005;12:1005–1016.
105. Larsson M, Fonteneau JF, Somersan S, et al. Efficiency of cross presentation of vaccinia virus-derived antigens by human dendritic cells. *Eur J Immunol* 2001;31:3432–3442.
106. Somersan S, Larsson M, Fonteneau JF, et al. Primary tumor tissue lysates are enriched in heat shock proteins and induce the maturation of human dendritic cells. *J Immunol* 2001;167:4844–4852.
107. Smits EL, Ponsaerts P, Van de Velde AL, et al. Proinflammatory response of human leukemic cells to dsRNA transfection linked to activation of dendritic cells. *Leukemia* 2007;21:1691–1699.
108. Van Duin D, Medzhitov R, Shaw AC. Triggering TLR signaling in vaccination. *Trends Immunol* 2006;27:49–55.
109. Zobywalski A, Javorovic M, Frankenberger B, et al. Generation of clinical grade dendritic cells with capacity to produce biologically active IL-12p70. *J Transl Med* 2007;5:18.
110. Cools N, Van Tendeloo VF, Smits EL, et al. Immunosuppression induced by immature dendritic cells is mediated by TGF-beta/IL-10 double-positive CD4⁺ regulatory T cells. *J Cell Mol Med* 2008;12:690-700.
111. Tarbell KV, Yamazaki S, Olson K, et al. CD25⁺CD4⁺ T cells, expanded with dendritic cells presenting a single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med* 2004;199:1467-77.
112. Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, et al. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 2000;12:431-440.
113. Wu Q, Salomon B, Chen M, et al. Reversal of spontaneous autoimmune insulitis in nonobese diabetic mice by soluble lymphotoxin receptor. *J Exp Med* 2001;193:1327-1332.

114. Keul R, Heinrich PC, Müller-newen G, et al. A possible role for soluble IL-6 receptor in the pathogenesis of systemic onset juvenile chronic arthritis. *Cytokine* 1998;10:729-34.
115. Mannon PJ, Fuss IJ, Mayer L, et al. Anti-interleukin-12 antibody for active Crohns disease. *N Engl J Med* 2004;351:2069-79.
116. Cargill M, Schrodi SJ, Chang M, et al. A large-scale genetic association study confirms IL-12B and leads to the identification of IL-23 R as psoriasis-risk genes. *Am J Hum Genet* 2007;80:273-90.
117. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 2006;314:1461-3.
118. Feldmann M, Maini RN. Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? *Annu Rev Immunol* 2001;19:163-96.
119. Victor FC, Gottlieb AB, Menter A. Changing paradigms in dermatology: tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) blockade in psoriasis and psoriatic arthritis. *Clin Dermatol* 2003;21:392-7.
120. Banchereau J, Pascual V, Palucka AK. Autoimmunity through cytokine-induced dendritic cell activation. *Immunity* 2004;20:539-50.
121. Banchereau J, Pascual V. Type I interferon in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. *Immunity* 2006;25:383-92.
122. Figdor CG, de Vries IJ, Lesterhuis WJ, Melief CJ. Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nat Med* 2004;10:475-80.
123. Tseng SY, Nishimoto KP, Silk KM, et al. Generation of immunogenic dendritic cells from human embryonic stem cells without serum and feeder cells. *Regen Med* 2009;4: 513-526.
124. Romani N, Gruner S, Brang D, et al. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 1994;180:83.
125. 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;179:1109.
126. Berger TG, Strasser E, Smith R, et al. Efficient elutriation of monocytes within a closed system (Elutra (TM)) for clinical-scale generation of dendritic cells. *J Immunol Methods* 2005;298:61-72.

127. Pinzon-Charry A, Ho CS, Maxwell T, et al. Numerical and functional defects of blood dendritic cells in early- and late-stage breast cancer. *Br J Cancer* 2007;97:1251-9.
128. Pulendran B, Banchereau J, Burkeholder S, et al. Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets in vivo. *J Immunol* 2000; 165:566.
129. Dohnal AM, Luger R, Paul P, et al. CD40 ligation restores type 1 polarizing capacity in TLR4-activated dendritic cells that have ceased interleukin-12 expression. *J Cell Mol Med* 2009;13:1741-1750.
130. López JA, Bioley G, Turtle CJ, et al. Single step enrichment of blood dendritic cells by positive immunoselection. *J Immunol Methods* 2003;274:47-61.
131. Campbell JD, Piechaczek C, Winkels G, et al. Isolation and generation of clinical-grade dendritic cells using the CliniMACS System. *Methods Mol Med* 2005;109:55-70.
132. Osugi Y, Vuckovic S, Hart DN. Myeloid blood CD11c(+) dendritic cells and monocyte-derived dendritic cells differ in their ability to stimulate T lymphocytes. *Blood* 2002;100:2858-2866.
133. Orsini E, Foa R. Dendritic cell generation for leukemia immunotherapy. *Leuk Res* 2002;26:409-410.
134. Brown RD, Pope B, Murray A, et al. Dendritic cells from patients with myeloma are numerically normal but functionally defective as they fail to up-regulate CD80 (B7-1) expression after huCD40LT stimulation because of inhibition by transforming growth factor-beta(1) and interleukin-10. *Blood* 2001;98:2992-2998.
135. Kalinski P, Hilkens CM, Wierenga EA, Kapsenberg ML. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today* 1999;20: 561-567.
136. Kalinski P, Urban J, Narang R, et al. Dendritic cell-based therapeutic cancer vaccines: what we have and what we need. *Future Oncol* 2009;5:379–390.
137. Schuster SJ, Neelapu SS, Gause BL, et al. Idiotypic vaccine therapy (BiovaxID) in follicular lymphoma in first complete remission: Phase III clinical trial results. *ASCO Meeting Abstracts* 2009;27:2.
138. Nguyen-Pham TN, Lee YK, Lee HJ, et al. Cellular immunotherapy using dendritic cells against multiple myeloma. *Korean J Hematol* 2012;47:17-27.
139. Palucka K, Banchereau J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat Rev Cancer* 2012;12:265-277.

140. Schijns V, Tartour E, Michalek J, et al. Immune adjuvants as critical guides directing immunity triggered by therapeutic cancer vaccines. *Cytotherapy* 2014;16:427-39.
141. Appay V, Douek DC, Price DA. CD8⁺ T cell efficacy in vaccination and disease. *Nat Med Jun* 2008;14:623-628.
142. Harlin H, Meng Y, Peterson AC, et al. Chemokine expression in melanoma metastases associated with CD8⁺ T-cell recruitment. *Cancer Res* 2009;69:3077-3085.
143. Messmer D, Messmer B, Chiorazzi N. The global transcriptional maturation program and stimulus-specific gene expression profiles of human myeloid dendritic cells. *Int Immunol* 2003;15:491– 503.
144. Korthals M, Safaian N, Kronenwett R, et al. Monocyte derived dendritic cells generated by IFN α acquire mature dendritic and natural killer cell properties as shown by gene expression analysis. *J Transl Med* 2007;5:46.
145. Matsunaga T, Ishida T, Takekawa M, et al. Analysis of gene expression during maturation of immature dendritic cells derived from peripheral blood monocytes. *Scand J Immunol* 2002;56:593–601.
146. Tureci O, Bian H, Nestle FO, et al. Cascades of transcriptional induction during dendritic cell maturation revealed by genome-wide expression analysis. *FASEB J* 2003; 17:836–847.
147. Wang YC, Hu XB, He F, et al. Lipopolysaccharide-induced maturation of bone marrow-derived dendritic cells is regulated by Notch Signaling through the up-regulation of CXCR4. *J Biol Chem* 2009;284:15993-16003.
148. Satyam A, Khandpur S, Sharma VK, Sharma A. Involvement of T(H)1/T(H)2 cytokines in the pathogenesis of autoimmune skin disease-pemphigus vulgaris. *Immunological Investigations* 2009;38:498–509.
149. Decker WK, Li S, Xing D, et al. Deficient T(H)-1 responses from TNF- α -matured and α -CD40-matured dendritic cells. *J Immunother* 2008;31:157-165.
150. Severa M, Remoli ME, Giacomini E, et al. Differential responsiveness to IFN- α and IFN- β of human mature DC through modulation of IFNAR expression. *J Leukoc Biol* 2006;79:1286–1294.
151. Blanco P, Palucka AK, Pascual V, Banchereau J. Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 2008; 19:41–52.

152. Korthals M, Safaian N, Kronenwett R, et al. Monocyte derived dendritic cells generated by IFN α acquire mature dendritic and natural killer cell properties as shown by gene expression analysis. *J Transl Med* 2007;5:46.
153. Santini SM, Lapenta C, Santodonato L, et al. IFN- α in the generation of dendritic cells for cancer immunotherapy. *Handb Exp Pharmacol* 2009;295–317.
154. Moller I, Michel K, Frech N, et al. Dendritic cell maturation with poly(I:C)-based versus PGE2-based cytokine combinations results in differential functional characteristics relevant to clinical application. *J Immunother* 2008;31:506–519.
155. Spisek R, Bretaudeau L, Barbieux I, et al. Standardized generation of fully mature p70 IL-12 secreting monocyte-derived dendritic cells for clinical use. *Cancer Immunol Immunother* 2001;50:417–427.
156. Colic M, Mojsilović S, Pavlović B, et al. Comparison of two different protocols for the induction of maturation of human dendritic cells in vitro. *Vojnosanit Pregl* 2004;61:471–478.
157. Muthuswamy R, Urban J, Lee JJ, et al. Ability of mature dendritic cells to interact with regulatory T cells is imprinted during maturation. *Cancer Res* 2008;68:5972–5978.
158. Lee AW, Truong T, Bickham K, et al. A clinical grade cocktail of cytokines and PGE2 results in uniform maturation of human monocyte-derived dendritic cells: implications for immunotherapy. *Vaccine* 2002;4:A8–A22.
159. Liu W, Kelly KA. Prostaglandin E-2 modulates dendritic cell function during chlamydial genital infection. *Immunology* 2008;123:290–303.
160. Kyte JA, Mu L, Aamdal S, et al. Phase I/II trial of melanoma therapy with dendritic cells transfected with autologous tumor-mRNA. *Cancer Gene Ther* 2006;13:905–918.
161. Kyte JA, Trachsel S, Risberg B, et al. Unconventional cytokine profiles and development of T cell memory in long-term survivors after cancer vaccination. *Cancer Immunology Immunotherapy* 2009;58:1609–1626.
162. Soleimani A, Berntsen A, Svane IM, Pedersen AE. Immune responses in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with dendritic cells pulsed with tumor lysate. *Scandinavian Journal of Immunology* 2009;70:481–489.
163. Jin P, Han TH, Ren J, et al. Molecular signatures of maturing dendritic cells: implications for testing the quality of dendritic cell therapies. *J Transl Med* 2010;8:4.
164. Felzmann T, Hüttner KG, Breuer SK, et al. Semi-mature IL-12 secreting dendritic cells present exogenous antigen to trigger cytolytic immune responses. *Cancer Immunol Immunother* 2005;54:769–780.

165. Gnjjatic S, Sawhney NB, Bhardwaj N. Toll-like receptor agonists: are they good adjuvants? *Cancer J* 2010;16:382–39.
166. Mohan T, Verma P, Rao DN. Novel adjuvants & delivery vehicles for vaccines development: a road ahead. *Indian J Med Res* 2013;138:779-795.
167. Duenas AI, Aceves M, Orduña A, et al. Francisella tularensis LPS induces the production of cytokines in human monocytes and signals via Toll-like receptor 4 with much lower potency than E. coli LPS. *Int Immunol* 2006;18:785–795.
168. Yoshikawa H, Kurokawa M, Ozaki N, et al. Nicotine inhibits the production of proinflammatory mediators in human monocytes by suppression of I-kappaB phosphorylation and nuclear factor- kappaB transcriptional activity through nicotinic acetylcholine receptor alpha7. *Clin Exp Immunol* 2006;146:116–123.
169. Vulcano M, Dusi S, Lissandrini D, et al. Toll receptor-mediated regulation of NADPH oxidase in human dendritic cells. *J Immunol* 2004;173:5749–5756.
170. Pivarcsi A, Gombert M, Dieu-Nosjean MC, et al. CC chemokine ligand 18, an atopic dermatitisassociated and dendritic cell-derived chemokine, is regulated by staphylococcal products and allergen exposure. *J Immunol* 2004;173:5810–5817.
171. Appay V, Rowland-Jones SL. RANTES: a versatile and controversial chemokine. *Trends Immunol* 2001;22:83-87.
172. Schutyser E, Struyf S, Van Damme J. The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003;14:409-426.
173. Schutyser E, Richmond A, Van Damme J. Involvement of CC chemokine ligand 18 (CCL18) in normal and pathological processes. *J Leukoc Biol* 2005;78:14-26.
174. Mandal M, Borowski C, Palomero T, et al. The BCL2A1 gene as a pre-T cell receptorinduced regulator of thymocyte survival. *J Exp Med* 2005;201:603-614.
175. Perera PY, Qureshi N, Christ WJ, et al. Lipopolysaccharide and its analog antagonists display differential serum factor dependencies for induction of cytokine genes in murine macrophages. *Infect Immun* 1998;66:2562-2569.
176. Kudela P, Koller VJ, Lubitz W. Bacterial ghosts (BGs)-advanced antigen and drug delivery system. *Vaccine* 2010;28:5760-7.
177. Langemann T, Koller VJ, Muhammad A, et al. The bacterial ghost platform system, *Bioengineered Bugs* 2010;1:5:326-336.
178. Mayr UB, Haller C, Haidinger W, et al. Bacterial ghosts as an oral vaccine: a single dose of *Escherichia coli* O157:H7 bacterial ghosts protects mice against lethal challenge. *Infect Immun* 2005;73:4810-7.

179. Paukner S, Kohl G, Lubitz W. Bacterial ghosts as novel advanced drug delivery systems: antiproliferative activity of loaded doxorubicin in human Caco-2 cells. *J Control Release* 2004;94:63-74.
180. Lubitz P, Mayr UB, Lubitz W. Applications of bacterial ghosts in biomedicine. *Adv Exp Med Biol* 2009;655:159-70.
181. Michalek J, Hezova R, Turanek Knötigova P, Strioga M.M, Lubitz W, Kudela P. Oncolysate-loaded Bacterial Ghosts enhance stimulatory capacity of dendritic cells. Submitted for publication, 2016.
182. Kruisbeek AM, Shevach E, Thornton AM. Proliferative assays for T cell function. *Current Protocols in Immunology* 2004;Chapter 3:Unit 3.12.
183. Gijzen K, Tacke PJ, Zimmerman A, et al. Relevance of DC-SIGN in DC-induced T cell proliferation. *J Leukoc Biol* 2007;81:729–740.
184. Tárnok A, Hambsch J, Chen R, Varro R. Cytometric bead array to measure six cytokines in twenty-five microliters of serum. *Clin Chem* 2003;49:1000-2.
185. Manavalan JS, Rossi PC, Vlad G, et al. High expression of ILT3 and ILT4 is a general feature of tolerogenic dendritic cells. *Transpl Immunol* 2003;11:245–58.
186. Hobo W, Maas F, Adisty N, et al. siRNA silencing of PD-L1 and PD-L2 on dendritic cells augments expansion and function of minor histocompatibility antigen-specific CD8⁺ T cells. *Blood* 2010;116:4501-11.
187. Azzaoui I, Yahia SA, Chang Y, et al. CCL18 differentiates dendritic cells in tolerogenic cells able to prime regulatory T cells in healthy subjects. *Blood* 2011;118:3549–58.
188. Vopenkova K, Mollova K, Buresova I, Michalek J. Complex evaluation of human monocyte-derived dendritic cells for cancer immunotherapy. *J Cell Mol Med* 2012;16:2827-37.
189. Strioga M, Schijns V, Powell DJ Jr, et al. Dendritic cells and their role in tumor immunosurveillance. *Innate Immun* 2013;19:98-111.
190. Steinman RM, Hawiger D, Liu K, et al. Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance. *Ann N Y Acad Sci* 2003;987:15-25.
191. Banchereau J, Briere F, Caux C, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000;18:767-811.
192. Jonuleit H, Kühn U, Müller G, et al. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol* 1997;27:3135-42.

193. Mailliard RB, Wankowicz-Kalinska A, Cai Q, et al. alpha-type-1 polarized dendritic cells: a novel immunization tool with optimized CTL-inducing activity. *Cancer Res* 2004;64:5934-7.
194. Zobywalski A, Javorovic M, Frankenberger B, et al. Generation of clinical grade dendritic cells with capacity to produce biologically active IL-12p70. *J Transl Med* 2007;5:18.
195. Gustafsson K, Junevik K, Werlenius O, et al. Tumour-loaded alpha-type 1-polarized dendritic cells from patients with chronic lymphocytic leukaemia produce a superior NK-, NKT- and CD8⁺ T cell-attracting chemokine profile. *Scand J Immunol* 2011;74:318-26.
196. Gelderblom HC, Nijhuis LE, de Jong EC, et al. Monocyte-derived dendritic cells from chronic HCV patients are not infected but show an immature phenotype and aberrant cytokine profile. *Liver Int* 2007;27:944-53.
197. Kalinski P, Okada H. Polarized dendritic cells as cancer vaccines: directing effector-type T cells to tumors. *Semin Immunol* 2010;22:173-82.
198. Butterfield LH, Comin-Anduix B, Vujanovic L, et al. Adenovirus MART-1-engineered autologous dendritic cell vaccine for metastatic melanoma. *J Immunother* 2008;31:294-309.
199. Watchmaker PB, Berk E, Muthuswamy R, et al. Independent regulation of chemokine responsiveness and cytolytic function versus CD8⁺ T cell expansion by dendritic cells. *J Immunol* 2010;184:591-7.
200. DeBenedette MA, Calderhead DM, Tcherepanova IY, et al. Potency of mature CD40L RNA electroporated dendritic cells correlates with IL-12 secretion by tracking multifunctional CD8(+)/CD28(+) cytotoxic T-cell responses in vitro. *J Immunother* 2011;34:45-57.
201. Okada H, Kalinski P, Ueda R, et al. Induction of CD8⁺ T-cell responses against novel glioma-associated antigen peptides and clinical activity by vaccinations with (alpha)-type 1 polarized dendritic cells and polyinosinic-polycytidylic acid stabilized by lysine and carboxymethylcellulose in patients with recurrent malignant glioma. *J Clin Oncol* 2011;29:330-6.
202. Kaliński P, Schuitemaker JH, Hilkens CM, Kapsenberg ML. Prostaglandin E2 induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a+CD83+ dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation. *J Immunol* 1998;161:2804-9.

203. Taylor A, Verhagen J, Blaser K, et al. Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor-beta: the role of T regulatory cells. *Immunology* 2006;117:433-42.
204. Gaur P, Singh AK, Shukla NK, Das SN. Inter-relation of Th1, Th2, Th17 and Treg cytokines in oral cancer patients and their clinical significance. *Hum Immunol* 2014;75:330-7.
205. Li DY, Gu C, Min J, Chu ZH, Ou QJ. Maturation induction of human peripheral blood mononuclear cell-derived dendritic cells. *Exp Ther Med* 2012;4:131-134.
206. Kaiko GE, Horvat JC, Beagley KW, Hansbro PM. Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunology* 2008;123:326-38

..

10. PRIEDAI

Priedas Nr. 1: INFORMUOTO ASMENS SUTIKIMAS

Mokslinio tyrimo pavadinimas: „*In vitro* moduluotų dendritinių ląstelių preparatų (DLP) imunogeniškumo ir funkcinio aktyvumo tyrimas“.

Aš perskaičiau pridedamą asmens informavimo formą, ir suprantu šio tyrimo tikslą, o taip pat galimą dalyvavimo šiame tyrime naudą ir riziką. Man buvo duota galimybė ir laikas užduoti klausimus, ir į visus juos buvo atsakyta.

Aš suprantu, kad mano dalyvavimas yra savanoriškas, ir kad aš galiu laisvai pasitraukti bet kuriuo metu, nenurodydamas priežasties, be jokio neigiamo poveikio savo sveikatos priežiūrai ar įstatyminėms teisėms.

Aš sutinku, kad šio tyrimo rezultatai gali būti publikuojami, neatskleidžiant mano tapatybės. Aš sutinku, kad duomenys ir įrašai, neatskleidžiantys mano tapatybės, būtų įtraukiami į duomenų bazę, kuri gali būti naudojama šio tyrimo tikslams.

Aš savanoriškai duodu savo, kaip informuoto asmens, sutikimą dalyvauti šiame tyrime.

_____ Tiriamajo vardas, pavardė (spausdintomis raidėmis)	_____ Tiriamajo parašas	_____ Data
_____ Pagrindinio tyrėjo vardas, pavardė (spausdintomis raidėmis)	_____ Pagrindinio tyrėjo parašas	_____ Data

Priedas Nr. 2: ASMENS INFORMAVIMO FORMA

Mes kviečiame Jus dalyvauti moksliniame tyrime „***In vitro* moduluotų dendritinių ląstelių preparatų (DLP) imunogeniškumo ir funkcinio aktyvumo tyrimas**“, kuris bus vykdomas Nacionaliniame vėžio institute.

Tyrimo metu bus lyginami sveikų asmenų ir onkologine liga sergančių pacientų duomenys, todėl kviečiame Jus dalyvauti šio tyrimo kontrolinėje (sveikų asmenų) grupėje.

Šio dokumento tikslas – informuoti Jus apie tyrimą, ir kaip reikės jame dalyvauti. Labai svarbu, kad Jūs, prieš nusprendamas dalyvauti, gautumėte visą su šiuo biomedicininio tyrimu susijusią informaciją, susipažintumėte su visomis procedūromis, galima rizika ir nepatogumais tyrimo metu.

TYRIMO TIKSLAS IR PASKIRTIS

Šiame tyrime, analizuodami kraują, sieksime apibūdinti gydomąją priešvėžinę vakciną - dendritinių ląstelių preparatą. Dendritinės ląstelės – tai imuninės ląstelės, kurios yra svarbi organizmo imuninės sistemos dalis.

Šio tyrimo tikslas – ištirti periferinio kraujo mėginius, atliekant išsamią kraujo T ląstelių imunoprofilio analizę, tokiu būdu nuodugniai charakterizuojant priešvėžinę vakciną. Šiuo tikslu, iš paimto Jūsų kraujo bus išskiriamos ląstelės (monocitai), kurios toliau eksperimentiniu *in vitro* būdu laboratorijoje bus paverčiamos į subrendusias dendritines ląsteles.

PAGRINDINIAI ĮTRAUKIMO KRITERIJAI

Jūs kviečiamas dalyvauti šio tyrimo kontrolinėje grupėje, nes esate sveikas (onkologine liga nesergantis) asmuo.

TYRIMO NAUDINGUMAS TIRIAMAJAM

Biomedicininis tyrimas Jums tiesioginės naudos neturės. Tačiau apibendrinti viso projekto rezultatai gali padėti sukurti efektyvesnius dendritinių ląstelių preparatus bei tiksliau įvertinti šių preparatų tinkamumą klinikiniam taikymui.

PROCEDŪROS

Jei Jūs sutiksite dalyvauti šiame tyrime, iš Jūsų periferinės alkūnės linkio venos bus paimta 50 ml kraujo.

RIZIKA IR DISKOMFORTAS

Žala ir rizika minimali, nes tyrimui veninis kraujas bus paimtas standartinės procedūros metu.

MĖGINIŲ SAUGOJIMAS

Procedūros metu paimtas kraujas bus panaudotas išsamiai kraujo T ląstelių bei priešvėžinės vakcinos - dendritinių ląstelių preparato charakteristikai, kurią atlikus, mėginiai bus nedelsiant sunaikinami.

IŠLAIDOS/KOMPENSACIJOS

Dalyvaujantys tyrime jokių papildomų išlaidų neturės. Kompensacija už dalyvavimą tyrime taip pat nebus skiriama. Tyrimo užsakovas ir tyrėjai yra apsidraudę civilinės atsakomybės draudimu.

KONFIDENCIALUMAS

Visa informacija, susijusi su Jūsų dalyvavimu tyrime bus konfidenciali. Dalyvaujančiųjų pavardės bus koduojamos, kodus pagrindinis tyrėjas saugos seife. Nei Jūsų pavardė, nei kiti asmeniniai duomenys (asmens kodas, gimimo data, adresas, sveikatos būklė) jokiuose dokumentuose bei mokslinėse publikacijose nebus minimi. Informacija, gauta atliekant tyrimą, gali būti paskelbta, tačiau pagal ją nebus galima identifikuoti tiriamojo.

SAVANORIŠKAS DALYVAVIMAS

Jūsų dalyvavimas šiame tyrime yra savanoriškas. Jūs bet kada galite anuliuoti savo sutikimą, nenurodydamas priežasties ir be jokio neigiamo poveikio savo sveikatos priežiūrai ar įstatyminėms teisėms.

KONTAKTAI

Iškilus neaiškumams ar ieškant kitos informacijos, Jūs galite kreiptis į pagrindinį tyrėją:
Dr. Marius Strioga, P. Baublio g. 3B-321, LT-08660, Vilnius. Tel. nr.: mob.: +370 601 69 551; darbo: (8-5) 2 190 932; el. p.: marius.strioga@vuo.lt

Iškilus klausimų dėl dalyvaujančių tyrimo pacientų teisių, Jūs galite kreiptis:
Vilniaus regioninis biomedicininis tyrimų etikos komitetas, tel.: (8-5) 2 686 998, adresas: M. K. Čiurlionio g. 21/27, LT-03101, Vilnius.

Priedas Nr. 3: ASMENS INFORMAVIMO FORMA

Mes kviečiame Jus dalyvauti moksliniame tyrime „**Gydomųjų dendritinių ląstelių vakcinų skyrimo onkologiniams pacientams individualizavimas**“, kuris bus vykdomas Nacionaliniame vėžio institute. Šio dokumento tikslas – informuoti Jus apie tyrimą ir pakviesti jame dalyvauti. Labai svarbu, kad Jūs, prieš nusprendamas dalyvauti, gautumėte visą su tyrimu susijusią informaciją, susipažintumėte su visomis procedūromis, galima rizika ir nepatogumais tyrimo metu.

TYRIMO TIKSLAS IR PASKIRTIS

Šio tyrimo tikslas – įvertinti gydomųjų priešnavikinių dendritinių ląstelių (DL) vakcinų imunogeninį ar tolerogeninį potencialą individualizuotam onkologinių pacientų gydymui. Šie tyrimai ateityje padės ieškoti gydymo metodų, labiau pritaiktų konkrečiam ligoniui.

PAGRINDINIAI ĮTRAUKIMO KRITERIJAI

- dalyvauti tyrime kviečiami asmenys, kuriems nustatytas III–IV stadijos urologinis navikas;
- tyrimo dalyviai supažindinami su tyrimu, jiems pateikiama Asmens informavimo ir Informuoto asmens sutikimo formos;
- asmenys, pasirašę Asmens informavimo ir Informuoto asmens sutikimo formas įtraukiami į tyrimą.

NEĮTRAUKIMO KRITERIJAI

- kitos lokalizacijos gretutinis pirminis piktybinis navikas;
- psichinėmis ligomis sergantys bei sunkiai kontaktuojantys ligoniniai.

TYRIMO NAUDINGUMAS TIRIAMAJAM

Biomedicininis tyrimas pačiam tiriamajam nebus naudingas.

PROCEDŪROS

Jei Jūs priklausote tiriamųjų asmenų grupei ir sutinkate dalyvauti šiame tyrime, jums bus paimta 32 ml kraujo, išskiriami monocitai, iš kurių gaunamos subrendusios dendritinės ląstelės.

RIZIKA IR DISKOMFORTAS

Žala ir rizika minimali, nes tyrimui bus naudojamas veninis kraujas, 32 ml. Be to, mums reikės užrašyti ir peržiūrėti šio tyrimo metu gautą informaciją ir duomenis iš Jūsų ambulatorinės kortelės, esančios Nacionaliniame vėžio institute.

IŠLAIDOS/KOMPENSACIJOS

Dalyvaujantis tyrime jokių papildomų išlaidų neturės. Jums nereikės mokėti nei už procedūras, nei už vizitus pas gydytoją.

KONFIDENCIALUMAS

Visa informacija, susijusi su Jūsų dalyvavimu tyrime bus konfidenciali. Dalyvaujančiųjų pavardės bus koduojamos, kodus pagrindinis tyrėjas saugos seife. Nei Jūsų pavardė, nei kiti asmeniniai duomenys (asmens kodas, gimimimo data, adresas, sveikatos būklė) jokiuose dokumentuose nei publikacijose nebus minimi. Su įrašais Jūsų medicininiuose dokumentuose teisę susipažinti turės tiksliai tyrėjai. Pasirašydami sutikimą, Jūs tokią teisę jiems suteiksite. Informacija, gauta atliekant tyrimą, gali būti paskelbta, tačiau pagal ją nebus galima identifikuoti tiriamojo.

LAISVANORIŠKAS DALYVAVIMAS

Jūsų dalyvavimas šiame tyrime yra laisvanoriškas. Jūs bet kada galite anuliuoti savo sutikimą, nenurodydamas priežasties. Nedalyvavimas tyrime ar vėlesnis atsisakymas tęsti dalyvavimą neturės jokios įtakos Jūsų tolimesniam gydymui. Pasirašydamas šią sutikimo formą, Jūs neapribojate jokių savo, kaip paciento, teisių.

KONTAKTAI

Iškilus neaiškumams ar ieškant kitos informacijos Jūs galite kreiptis į pagrindinį tyrėją:
dr. Živilė Gudlevičienė, Baublio3B, Vilnius 08660, Tel. nr.: mob.: +370 686 82417; darbo: +370 5 2 19 09 09; el. p.: zivile.gudleviciene@vuo.lt

Iškilus klausimų dėl dalyvaujančių tyrime pacientų teisių, Jūs galite kreiptis:
Vilniaus regioninio biomedicininio tyrimų etikos komitetas, tel.:(8-5) 2 398743, fax.:(8-5)2 398743 , adresas: M.K.Čiurlionio g. 21/27 LT-03101, Vilnius.



VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETAS

Viešojo įstaiga, Universiteto g. 3, LT-01513 Vilnius, tel. (8 5) 268 7001, faks. (8 5) 272 8646, el. p. infor@cr.vu.lt.
Duomenys kaupiami ir saugomi Juridinių asmenų registre, kodas 211950810.
Fakulteto duomenys: M.K. Čiurlionio g. 21/27, LT-03101 Vilnius, tel. (8 5) 239 8701, (8 5) 239 7800, faks. (8 5) 239 8705,
el. p. mf@mf.vu.lt

VILNIAUS REGIONINIS BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ ETIKOS KOMITETAS

M.K. Čiurlionio g. 21/27, LT-03101 Vilnius, tel. (8 5) 268 6998, el. p. rbtek@mf.vu.lt

LEIDIMAS ATLIKTI BIOMEDICININĮ TYRIMĄ

2014-02-11 Nr.158200-14-720-237

Tyrimo pavadinimas:

***In vitro* moduluotų dendritinių ląstelių preparatų (DLP) imunogeniškumo
ir funkcinio aktyvumo tyrimas**

Protokolo Nr.: 1-2014-1
Data: 2014 02 17
Versija: 2
Asmens informavimo forma : (Nr. 1)
Data: 2014-02-17
Versija: 2
Asmens informavimo forma : (Nr. 2)
Data: 2014-02-17
Versija: 2
Pagrindiniai tyrėjai: Marius Strioga
Įstaigos pavadinimas: Vilniaus universiteto Onkologijos institutas
VUOI Mokslinių tyrimų centras
Adresas: Santariškių g. 1, LT- 08660 Vilnius
Leidimas galioja iki: 2015-10-31

Leidimas išduotas Vilniaus regioninio biomedicininio tyrimų etikos komiteto posėdžio
(protokolas Nr. 158200-2014/02), vykusio 2014 m. vasario mėn. 11 d., sprendimu.

Vilniaus regioninio biomedicininio tyrimų etikos komiteto ekspertų grupės nariai			
Nr.	Vardas, pavardė	veiklos sritis	dalyvavo posėdyje
1	doc. dr. Dr. Laimutė Jakavonytė	filosofija	taip
2	prof.dr. Jolanta Dadonienė	epidemiologija, medicina	taip
3	doc.dr. Jaunius Gumbis	teisė	ne
4	Genovaitė Bulzgytė	slauga	taip
5	Laura Linkevičienė	odontologija	taip
6	prof.dr. Augustina Jankauskienė	medicina	taip
7	dr. Laura Malinauskienė	medicina	taip
8	Eglė Zubienė	farmakologija	taip
9	Ugnė Sakūnienė	pacientų teisės	ne

Pirmininkė



Laura Malinauskienė



VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETAS

Kodas 211950810, M.K. Čiurlionio 21/27, 03101, Vilnius Tel.(85)2398701, 2398700, faks.2398705, El.p. mf@mf.vu.lt

VILNIAUS REGIONINIS BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ ETIKOS KOMITETAS

M.K.Čiurlionio 21/27, LT-03101, Vilnius Tel.(85) 2686998, el.p.: rbtek@mf.vu.lt

LEIDIMAS ATLIKTI BIOMEDICININĮ TYRIMĄ

2011-09-06 Nr.158200-09-381-104

Tyrimo pavadinimas:

Gydomųjų dendritinių ląstelių vakcinų skyrimo onkologiniams pacientams individualizavimas

Protokolo Nr.: MPI-11038

Versija: I

Data: 2011.06.22

Asmens informavimo forma ir Informuoto asmens sutikimo forma (lietuvių kalba):

Versija: 2

Data: 2011-09-05

Pagrindiniai tyrėjai: Ž.Gudlevičienė

Biomedicininio tyrimo vieta:

Ištaigos pavadinimas: Vilniaus Universiteto Onkologijos Institutas

Ištaigos adresas: Santariškių g. 1, LT-08661 Vilnius

Leidimas išduotas Vilniaus regioninio biomedicininių tyrimų etikos komiteto posėdžio (protokolas Nr. 158200-2011/09), vykusio 2011 m. rugsėjo 06 d., sprendimu.

Vilniaus regioninio biomedicininių tyrimų etikos komiteto ekspertų grupės nariai			
Nr.	Vardas, pavardė	veiklos sritis	dalyvavo posėdyje
1	doc. Dr.Laimutė Jakavonytė	filosofija	taip
2	doc. Dr. Kęstutis Žagminas	epidemiologija	taip
3	dr. Indrė Isokaitė	teisė	ne
4	dr. Marija Veniūtė	visuomenės sveikata	ne
5	doc.dr. Jolanta Gulbinovič	medicina	ne
6	prof.dr. Vytautė Pečiulienė	medicina, odontologija	taip
7	Laura Malinauskienė	medicina	taip
8	dr. Gražina Pastavkaitė	klinikinė psichologija	ne
9	Ugnė Šakūnienė	pacientų teisės	taip

Pirmininkė



Vytautė Pečiulienė

11. PADĖKA

Noriu padėkoti visiems, kurie padėjo atlikti šį darbą. Ypač norėčiau padėkoti:

- darbo vadovei dr. Vitai Pašukonienei už nuolatinį rūpestį, geranoriškumą, vertingas pastabas bei pataisymus;
- darbo konsultantui dr. Mariui Striogai už naudingus patarimus, draugišką palaikymą ir gerą nuotaiką;
- savo kolegoms – Janui Krasko, Agatai Mlynskai, Karolinai Žilionytei, Danutei Ramaškevičienei bei studentams - Ilonai Trockajai, Donatai Dulkevičiūtei ir Martynui Tamulevičiui už pagalbą atliekant eksperimentus;
- savo šeimai už palaikymą, tikėjimą manimi ir kantrybę.