

Ф.А. Фадеев¹, А.Д. Никанорова¹, А.В. Замятин²

ЭКСПРЕССИЯ ДЕНДРИТНЫМИ КЛЕТКАМИ РЕЦЕПТОРА CCR7 ПРИ ПРИМЕНЕНИИ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБОВ СТИМУЛЯЦИИ СОЗРЕВАНИЯ

¹ ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий,
г. Екатеринбург, Российская Федерация

² ГАУЗ СО «Свердловский областной онкологический
диспансер», г. Екатеринбург, Российская Федерация

Иммунотерапия является одним из перспективных и динамично развивающихся современных направлений в лечении онкологических заболеваний. Данный способ лечения, в отличие от традиционных методов химиотерапии, у которых есть побочный эффект в виде иммуносупрессии, направлена на стимуляцию у пациента противоопухолевого иммунного ответа. Применение препаратов на основе аутогенных дендритных клеток (ДК) пациента («дендритноклеточных вакцин») рассматривается как перспективный способ противоопухолевой иммунотерапии. Дендритноклеточные вакцины не являются токсичными и оказывают минимальный негативный побочный эффект [Burgdorf, 2008]. Иммунотерапия ДК применяется для лечения онкологических заболеваний в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова (Санкт-Петербург). Применяемая там методика также была внедрена в ГАУЗ СО «Свердловский областной онкологический диспансер».

Основной функцией ДК является поглощение и презентация антигена Т-лимфоцитам, что делает их ключевым звеном в активации адаптивного иммунного ответа. Помимо этого, ДК являются источником костимулирующих сигналов для активации иммунного ответа за счет как прямого лиганд-рецепторного взаимодействия с клетками иммунной системы, так и секретиремых ими цитокинов. Для дендритноклеточной терапии могут

использоваться клетки из различных источников, в частности ДК, выделяемые из моноклеарной фракции периферической крови. Недостатком такого метода является очень небольшое количество выделяемых ДК, доля которых среди моноклеарных клеток (МНК) составляет около 1%. Также ДК могут быть получены путем искусственно стимулируемой дифференцировки из моноцитов периферической крови пациента или из гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) костного мозга. Искусственная дифференцировка позволяет получить существенно большие объемы клеточного материала, например, из моноцитов 100 мл периферической крови обычно удается получить 10-25 млн дендритных клеток. Помимо этого, рецепторный пейзаж таких искусственно получаемых дендритных клеток в значительной мере зависит от технологии дифференцировки.

Тем не менее, использование аутогенных дендритных клеток, сенсibilизированных опухолеассоциированными антигенами, в качестве средства иммунотерапии онкологических заболеваний зачастую дает ограниченный клинический эффект. Снижение эффективности дендритноклеточной терапии обусловлено целым рядом факторов, к числу которых относят снижение уровня экспрессии опухолевыми клетками антигенов, используемых для сенсibilизации дендритных клеток, толерогенный эффект опухоли, а также с низкий уровень экспрессии опухолевыми клетками рецепторов МНС [van Gulijk, 2018]. Помимо этого, функциональная активность вводимых ДК зависит от их способности мигрировать в периферические лимфоузлы для вступления в контакт с Т-лимфоцитами [Nestle, 2005].

Считается, что ключевую роль в миграции дендритных клеток играет рецептор CCR7. В частности, показано, что ДК, не экспрессирующие данный рецептор, достигают лимфоузлов гораздо хуже, чем ДК «дикого типа» [Weber, 2013]. Лигандом CCR7 является хемокин CCL21, связывание которого с данным рецептором стимулирует миграцию ДК в лимфоузлы [Tal, 2011].

В связи с вышеизложенным, целью данной работы являлась сравнительная оценка уровня экспрессии рецептора CCR7 на ДК, полученных из моноцитов периферической крови, при ис-

пользовании различных способов стимуляции их созревания.

Материалы и методы

Получение ДК из моноцитов периферической крови донора путем цитокиновой стимуляции осуществляли по модифицированной методике, используемой в НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова [Нехаева, 2011]. Кровь в объеме 100 мл брали после получения от донора информированного согласия. Из крови выделяли фракцию МНК методом центрифугирования на градиенте плотности с использованием раствора «Lympholyte-N» (Cedarlane). Полученные МНК отмывали, рассаживали в культуральные флаконы T175 Nunc и переносили в CO₂-инкубатор. Через 2 часа несвязавшиеся с пластиком лимфоциты удаляли отмыванием, а адгезированные на поверхности пластика моноциты заливали дифференцировочной средой AIM-V (Thermofisher Scientific) с добавлением GM-CSF и И-4. Дифференцировка моноцитов в ДК происходила в течение 7 суток в CO₂-инкубаторе (37°C, 5% CO₂).

Полученные незрелые ДК снимали с пластика раствором TrypLE с 0,25% ЭДТА (Thermofisher Scientific), ресуспендировали в дифференцировочной средой AIM-V с добавлением GM-CSF и И-4 и рассаживали в 24-луночные культуральные планшеты (Eppendorf) с плотностью посева 100 тыс. клеток/см². В лунки также вносили соответствующие компоненты для стимуляции созревания ДК. Планшеты инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 3 суток в течение которых происходило созревание ДК.

После завершения инкубации открепившиеся от пластика ДК переносили в центрифужные пробирки. Оставшиеся на поверхности пластика клетки снимали раствором TrypLE с 0,25% ЭДТА и переносили в соответствующие пробирки с неадгезивными клетками. Клетки осаждали центрифугированием, отмывали PBS и окрашивали антителами для проточной цитофлуориметрии.

Для окрашивания клеток использовали следующие антитела и красители (производство Biolegend):

- анти-CD14-APC

- анти-CD11c-APC-Cy7
- анти-HLA-DR-PE
- анти-CCR7-PE
- анти-CD86-PC5.5
- анти-CD83-PC5.5
- Zombie Aqua (окрашивание на жизнеспособность).

Стимуляцию созревания ДК осуществляли с использованием следующих компонентов:

- без стимуляции созревания (контроль)
- TNF
- цитокиновый коктейль: TNF + IL-1 β + IL-6 + простагландин E2 (PGE2)
- poly I:C
- цитокиновый коктейль + poly I:C
- липополисахарид (ЛПС).

Окрашивание производили в соответствии с инструкциями производителя. Оценку уровня флуоресценции окрашенных клеток осуществляли с помощью проточного цитофлуориметра Navios 10 (Beckman Coulter). Анализ полученных данных осуществляли с помощью программного обеспечения проточного цитофлуориметра. Первичное гейтирование ДК осуществляли по параметрам прямого и бокового светорассеяния, из полученной фракции для дальнейшего анализа выделяли жизнеспособные клетки (ZA⁻), экспрессирующие рецептор CD11c. Уровень экспрессии CCR7 оценивали по доле CCR7⁺ ДК а также по их средней интенсивности флуоресценции.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета «Statistica 6.0». Для оценки достоверности различий между группами использовали непараметрический критерий Манна-Уитни (двусторонний вариант), при уровне значимости $p=0,05$.

Результаты

Результаты оценки уровня экспрессии рецептора CCR7 (по доле CCR⁺ клеток и по среднему уровню флуоресценции меченных антителами клеток) представлены на рисунке.

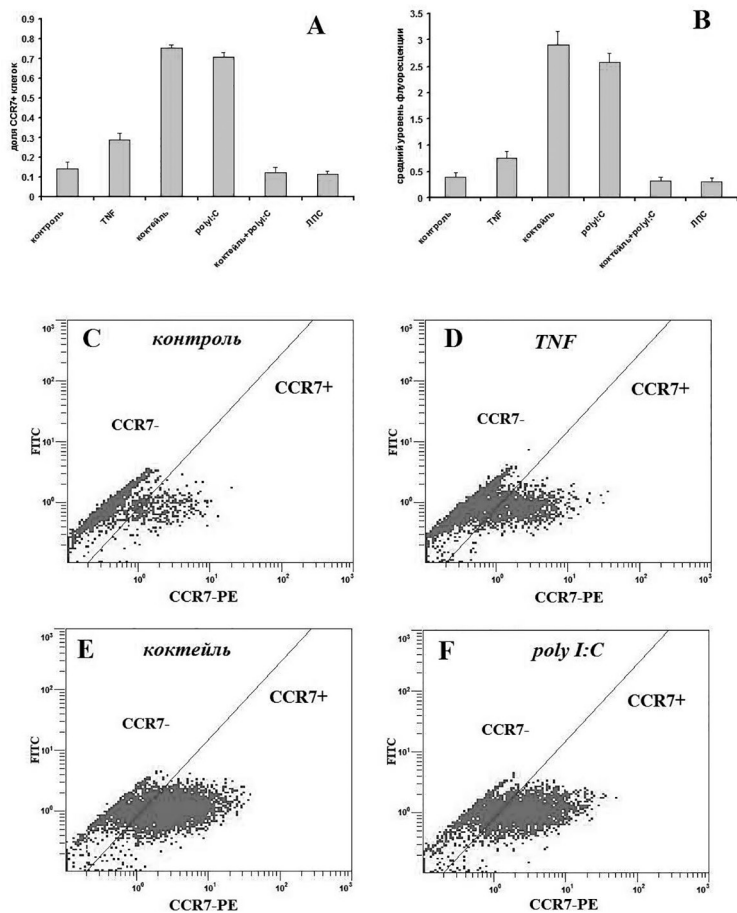


Рис. Экспрессия ДК рецептора CCR7 при использовании различных способов стимуляции созревания. А: доля CCR7+ клеток. В: средний уровень флуоресценции в соответствующем канале (на графике представлен уровень флуоресценции за вычетом фоновой аутофлуоресценции). Доля CCR7+ клеток и уровень флуоресценции при использовании коктейля + poly I:C и ЛПС не превышают контрольные значения, при использовании TNF, коктейля и poly I:C данные показатели достоверно выше контрольных ($p < 0,05$). С-Ф: репрезентативные результаты цитометрии.

В контроле, не подвергшемся стимуляции созревания, доля CCR7+ клеток была незначительной (менее 15%). При исполь-

зовании ЛПС как доля CCR7+, так и средний уровень флуоресценции, достоверно не отличались от контрольных ($p > 0,05$). В среде с добавлением TNF доля CCR7+ клеток составила почти 30%, уровень флуоресценции был также выше контрольного. Максимальный уровень экспрессии данного рецептора был достигнут при стимуляции цитокиновым коктейлем и, в меньшей степени, polyI:C (доля CCR7+ клеток составила 73,4% и 71,8%, соответственно). В то же время, при сочетании коктейля с polyI:C доля CCR7+ ДК была низкой и достоверно не отличалась от контрольной, уровень флуоресценции также не превышал контрольный (рисунок).

Обсуждение

Этап созревания дендритных клеток является крайне важным для определения их функциональной активности и, в частности, их способности к привлечению Т-лимфоцитов, презентации им антигенов и к активации их пролиферации и дифференцировки. Стимуляция созревания ДК *in vitro* чаще всего осуществляется с использованием цитокинов (в том числе их смесей) или лигандов для Toll-подобных рецепторов (TLRs). В данной работе нами была проведена оценка влияния состава смесей для стимуляции созревания ДК на экспрессию ими рецептора CCR7, играющего ключевую роль в миграции ДК в лимфоузлы.

Чаще всего для дифференцировки используют TNF α или цитокиновый коктейль на его основе, включающий в себя также IL-6, IL-1 β , а также PGE2 [Chabot, 2016]. В данной работе нами было показано, что, как TNF α , так и цитокиновый коктейль, приводят к очень значительному повышению уровня экспрессии рецепторов, являющихся маркерами созревания ДК, таких как CD86, HLA-DR (данные не представлены). Тем не менее, при использовании коктейля доля клеток, экспрессирующих CCR7, была более чем в 2 раза выше, чем при использовании только TNF α . По данным литературы, содержащийся в коктейле PGE2 усиливает стимулирующий эффект TNF α на созревание ДК и одновременно значительно увеличивает уровень экспрессии клетками рецептора CCR7 [Muthuswamy, 2010].

Также в данной работе для стимуляции созревания ДК был использован poly I:C (полиинозиновая-полицитидиловая кислота). poly I:C является лигандом TLR3, выступая в роли структурного аналога PAMP, 2-цепочечной РНК. Взаимодействие TLR3 с лигандом приводит к активации факторов транскрипции NF-κB, IRF3 и AP-1, что, в свою очередь, сопровождается секрецией ДК цитокинов (IL-6, TNF-α, IL-12) [Masumoto, 2017]. В нашей работе ДК, полученные путем стимуляции poly I:C, также имели высокий уровень экспрессии CCR7. При этом интересно отметить, что при ДК, для созревания которых использовался цитокиновый коктейль с добавлением poly I:C имели более низкий уровень экспрессии CCR7.

Еще одним способом стимуляции созревания ДК является воздействие бактериальным ЛПС. Данный компонент так же, как и poly I:C, выступает в роли аналога PAMP и связывается с TLR4. Взаимодействие ЛПС с TLR4 сопровождается каскадом реакций, приводящих к активации NF-κB, что наблюдается также при воздействии на ДК TNFα [Castiello, 2011]. Помимо этого, ЛПС инициирует ряд других сигнальных путей (приводящих к активации p38-MAPK, ERK1/2 и JNK) влияющих на созревание и секреторную активность ДК [Nakahara, 2004]. В то же время, есть данные, что стимуляция созревания ДК с помощью ЛПС приводит к активации генов DUSP-1 и TNFAIP3, что приводит к ингибированию активности NF-κB, p38-MAPK, ERK1/2 и JNK и создает механизм саморегулирования стимулирующей активности ЛПС в отношении ДК [Castiello, 2011]. В данной работе стимуляция ЛПС не привела к существенному увеличению экспрессии CCR7.

Таким образом, наиболее высокий уровень экспрессии CCR7 на ДК был отмечен после стимуляции созревания цитокиновым коктейлем и polyI:C. В то же время, содержащийся в цитокиновом коктейле PGE2 может оказывать ингибирующий эффект на активацию Т-лимфоцитов. Данный медиатор может ингибировать продукцию ДК хемокина CCL19, являющегося аттрактором Т-клеток [Muthuswamy, 2010]. Кроме того, PGE2 может стимулировать секрецию ДК индоламин-2,3-диоксигеназы-1

(IDO-1). Данный фермент обладает иммуносупрессивным эффектом и подавляет активацию и пролиферацию Т-клеток, с одной стороны, и стимулирует появление Т-регуляторных клеток, с другой [Trabanelli, 2015; Krause, 2007]. Также есть данные, что использование poly I:C при определенных обстоятельствах может привести к генерации толергенных ДК с относительно низким уровнем секреции IL-12 и IL-23 и высоким уровнем секреции IL-10 [Pavlovic, 2015]. В связи с этим, оценка функциональной активности ДК при различных способах стимуляции созревания требует, помимо иммунофенотипирования, проведения дополнительных исследований, в частности, оценки их секреторного профиля и способности к активации Т-лимфоцитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Burgdorf, S.K., Fischer, A., Myschetzky, P.S., Munksgaard, S.B., Zocca, M., Claesson, M.H., & Rosenberg, J. (2008). Clinical responses in patients with advanced colorectal cancer to a dendritic cell based vaccine // *Oncology Reports*, 20, 1305-1311.
2. van Gulijk M, Dammeijer F, Aerts JGJV, Vroman H. (2018). Combination Strategies to Optimize Efficacy of Dendritic Cell-Based Immunotherapy // *Front Immunol*. V.9. 2759.
3. Nestle, F.O., Farkas, A., Conrad, C. (2005). Dendritic-cell-based therapeutic vaccination against cancer // *Curr. Opin. Immunol*. 17, 163–169.
4. Weber, M., Hauschild, R., Schwarz, J., Moussion, C., de Vries, I., Legler, D.F., et al. (2013). Interstitial dendritic cell guidance by haptotactic chemokine gradients // *Science* 339, 328–332.
5. Tal, O., Lim, H.Y., Gurevich, I., Milo, I., Shipony, Z., Ng, L.G., et al. (2011). DC mobilization from the skin requires docking to immobilized CCL21 on lymphatic endothelium and intralymphatic crawling // *J. Exp. Med*. 208, 2141–2153.
6. Нехаева, Т.Л. Оптимизация технологии и стандартизация получения противоопухолевых вакцин на основе аутологичных дендритных клеток [Текст]: дисс. ... канд. мед. наук: 14.01.12 / Т.Л. Нехаева.– СПб., 2014.– 174 с.
7. Chabot, V., Martin, L., Meley, D., Sensebé, L., Baron, C.,

Lebranchu, Y., Dehaut, F., Velge-Roussel, F. (2016). Unexpected impairment of TNF- α -induced maturation of human dendritic cells in vitro by IL-4 // *Journal of translational medicine*, 14, 93.

8. Muthuswamy, R., Mueller-Berghaus, J., Haberkorn, U., Reinhart, T. A., Schadendorf, D., & Kalinski, P. (2010). PGE(2) transiently enhances DC expression of CCR7 but inhibits the ability of DCs to produce CCL19 and attract naive T cells // *Blood*, 116(9), 1454–1459. [https://doi.org/10,1182/blood-2009-12-258038](https://doi.org/10.1182/blood-2009-12-258038)

9. Matsumoto, M., Takeda, Y., Tatematsu, M., & Seya, T. (2017). Toll-Like Receptor 3 Signal in Dendritic Cells Benefits Cancer Immunotherapy // *Frontiers in immunology*, 8, 1897.

10. Castiello, L., Sabatino, M., Jin, P., Clayberger, C., Marincola, F. M., Krensky, A. M., & Stroncek, D. F. (2011). Monocyte-derived DC maturation strategies and related pathways: a transcriptional view // *Cancer immunology, immunotherapy : CII*, 60(4), 457–466.

11. Nakahara, T., Uchi, H., Urabe, K., Chen, Q., Furue, M., & Moroi, Y. (2004). Role of c-Jun N-terminal kinase on lipopolysaccharide induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells // *International immunology*, 16(12), 1701–1709.

12. Trabanelli, S., Lecciso, M., Salvestrini, V., Cavo, M., Očadlíková, D., Lemoli, R. M., & Curti, A. (2015). PGE2-induced IDO1 inhibits the capacity of fully mature DCs to elicit an in vitro antileukemic immune response // *Journal of immunology research*, 2015, 253191.

13. Krause, P., Singer, E., Darley, P. I., Klebensberger, J., Groettrup, M., & Legler, D. F. (2007). Prostaglandin E2 is a key factor for monocyte-derived dendritic cell maturation: enhanced T cell stimulatory capacity despite IDO // *Journal of leukocyte biology*, 82(5), 1106–1114.

14. Pavlović, B., Tomić, S., Đokić, J., Vasilijić, S., Vučević, D., Lukić, J., Gruden-Movsesijan, A., Ilić, N., Marković, M., & Čolić, M. (2015). Fast dendritic cells matured with Poly (I:C) may acquire tolerogenic properties // *Cytotherapy*, 17(12), 1763–1776.