

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATJA PLOJ (ROŠKAR)
MAGISTRSKA NALOGA
MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATJA PLOJ (ROŠKAR)

**PRIMERJAVA KAKOVOSTI DENDRITIČNIH CELIC, VZGOJENIH V MEDIJU
Z DODATKOM TROMBOCITNEGA LIZATA ALI V BREZ-SERUMSKEM
MEDIJU ZA NAMEN PRIPRAVE KLINIČNO UPORABNIH PROTOKOLOV**

**COMPARISON OF QUALITY OF DENDRITIC CELLS CULTURED IN
PLATELET LYSATE-CONTAINING MEDIUM AND SERUM-FREE MEDIUM
FOR PREPARATION OF CLINICALLY-APPLICABLE PROTOCOLS**

MASTER'S STUDY PROGRAMME LABORATORY BIOMEDICINE

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljala na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino pod mentorstvom doc. dr. Urbana Švajgerja, mag. farm.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju za pomoč in vodenje pri izdelavi magistrske naloge ter zaposlenim na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, ki so mi s svojimi nasveti in izkušnjami pomagali pri izvajanju poskusov: Katrini in Nataši.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Urbana Švajgerja, mag. farm. Naloga je del programa Človeške matične celice – napredno zdravljenje s celicami III, pod vodstvom Primoža Rožmana.

Katja Ploj

Vsebina

Vsebina	II
Kazalo slik	IV
Povzetek	V
Abstract.....	VI
Seznam okrajšav	VII
1 Uvod.....	1
1.1 Dendritične celice, imunost	1
1.2 Imunoterapija rakavih bolezni z dendritičnimi celicami	6
2 Načrt za delo.....	11
3 Materiali in metode	13
3.1 Priprava in gojenje CD14 ⁺ kultur.....	13
3.2 Analiza uspešnosti diferenciacije monocitov v nezrele dendritične celice.....	14
3.3 Analiza uspešnosti aktivacije in zorenja dendritičnih celic	15
3.4 Statistične metode	17
4 Rezultati	18
4.1 Morfološka analiza nezrelih dendritičnih celic	18
4.2 Izkoristek diferenciacije dendritičnih celic	18
4.3 Endocitotske sposobnosti nezrelih dendritičnih celic	19
4.4 Imunofenotipska analiza nezrelih dendritičnih celic	20
4.5 Morfološka in imunofenotipska analiza zrelih dendritičnih celic	22
4.6 Merjenje količine citokinov	25
5 Razprava.....	27
5.1 Morfološke spremembe in izkoristek diferenciacije.....	27
5.2 Endocitotske sposobnosti nezrelih dendritičnih celic	28
5.3 Imunofenotipska analiza nezrelih dendritičnih celic	28
5.4 Morfološka in imunofenotipska analiza zrelih dendritičnih celic	29

5.5	Merjenje količine citokinov	30
6	Sklep.....	33
7	Viri	34

Kazalo slik

Slika 1 Morfologija nezrelih dendritičnih celic diferenciranih iz monocitov..	18
Slika 2 Izkoristek diferenciacije monocitov v nezrele dendritične celice..	19
Slika 3 Endocitotske sposobnosti nezrelih dendritičnih celic..	20
Slika 4 Imunofenotipska analiza nezrelih dendritičnih celic.....	21
Slika 5 morfologija aktiviranih dendritičnih celic.....	22
Slika 6 Imunofenotipska analiza zrelih dendritičnih celic diferenciranih in aktiviranih v 1- odstotnem SF.....	23
Slika 7 Imunofenotipska analiza zrelih dendritičnih celic diferenciranih in aktiviranih v 10- odstotnem PL.....	24
Slika 8 Koncentracija sproščenega IL-12p70 po aktivaciji dendritičnih celic..	26

Povzetek

Dendritične celice so najpomembnejše antigene-predstavljajoče celice, ki imajo osrednjo vlogo pri regulaciji imunskega odziva. Z edinstveno sposobnostjo privzemanja in predstavljanja s tumorji povezanih antigenov limfocitom T ter proženjem antigensko-specifičnega imunskega odziva preko kostimulatornih molekul in sproščanja citokinov so tudi pomemben del proti-tumorske imunosti. To lastnost dendritičnih celic izkorišča postopek celične imunoterapije raka s cepivi na osnovi dendritičnih celic, ki temelji na izpostavitvi dendritičnih celic tumorskim antigenom izven imunosupresivnega tumorskega mikrookolja in vrnitvi tako pripravljenih dendritičnih celic nazaj v organizem bolnika, kjer aktivirajo limfocite T in sprožijo antigensko-specifičen proti-tumorski odziv. Postopek priprave cepiv na osnovi dendritičnih celic obsega tudi gojenje in zorenje dendritičnih celic v celični kulturi, za kar je po najnovejših smernicah nezaželena uporaba dodatkov živalskega izvora. Prav zaradi tega se v zadnjih letih veliko pozornosti posveča razvoju in testiranju novih celičnih medijev ter njihovih dodatkov.

V skladu z omenjenimi smernicami smo v tem raziskovalnem delu dokazali, da trombocitni lizat kot dodatek celičnemu mediju za diferenciacijo, gojenje in zorenje humanih dendritičnih celic omogoča nastanek morfološko, fenotipsko in funkcionalno ustreznih dendritičnih celic, primernih za pripravo proti-tumorskih cepiv, ter predstavlja enakovreden nadomestek dodatkom živalskega izvora. Uporabili smo postopek diferenciacije monocitov, izoliranih iz periferne krvi v dendritične celice, ob dodatku trombocitnega lizata in ugotovili, da nastale celice izražajo morfološke in fenotipske lastnosti, značilne za nezrele dendritične celice, ter izkazujejo endocitotsko aktivnost. Z nadaljnjo aktivacijo tako pripravljenih celic smo ugotovili, da trombocitni lizat omogoča popolno zorenje dendritičnih celic, ki izražajo površinske molekule, značilne za zrele dendritične celice, in so sposobne proizvajati IL-12p70, kar je ključna lastnost dendritičnih celic, nujna za uspešno imunoterapijo. Trombocitni lizat torej predstavlja dodatek neksenogenskega izvora, ki omogoča gojenje dendritičnih celic, vendar bodo šele nadaljnje raziskave pokazale, ali je njegova uporaba bolj smiselna, kakor uporaba drugih dodatkov ne-živalskega izvora.

Ključne besede: dendritične celice, imunoterapija, cepiva na osnovi dendritičnih celic, trombocitni lizat.

Abstract

Dendritic cells are the most potent antigen presenting cells in human immune system, which play a central role in regulation of immune responses to antigens. With their unique capability of capturing and presenting tumor-associated antigens to lymphocytes T and triggering antigen-specific immune response by using costimulatory molecules and release of cytokines, dendritic cells represent an important part of antitumor immunity. Cellular immunotherapy of cancer with dendritic cell vaccines exploits this feature of dendritic cells. In this approach, fully functional dendritic cells purified from patients are incubated with tumor antigens, and then injected back into the patients, where they present the tumor antigen and stimulate antitumor T cell response. Process of preparing dendritic cells vaccines require differentiation and maturation of dendritic cells in cell culture, which according to the latest guidelines should be carried out in animal component-free conditions. That is the main reason for increased focus on development and testing of new cellular media and their additives over the past few years.

In accordance with the above guidelines, in this research work, we have demonstrated that platelet lysate, as an addition to the cellular medium, allows for stable differentiation, cultivation and maturation of human dendritic cells, producing morphologically, phenotypically and functionally suitable dendritic cells for dendritic cell vaccines preparation and represents an equivalent substitute for animal products. We used the process of differentiation of peripheral blood monocytes into dendritic cells in the presence of platelet lysate and carried out analysis of generated cells. Immature dendritic cells differentiated from monocytes showed morphological characteristics and endocytotic capacity typical for immature dendritic cells along with high expression of typical phenotypic markers. By activating prepared immature dendritic cells we showed, that platelet lysate also allows dendritic cell to fully mature, develop a mature phenotype and develop the ability to produce and release IL12p70, which is a key feature of dendritic cells essential for successful immunotherapy. In conclusion, platelet lysate represents a non-xenogenic additive to cellular medium which allows for cell culture, but only further research will show whether its use is more sensible than the use of other non-animal additives.

Key words: dendritic cells, immunotherapy, dendritic cells vaccines, platelet lysate.

Seznam okrajšav

CD – cluster of differentiation; označevalec pripadnosti

CCL – CC chemokine; CC kemokin

CCR – CC chemokine receptor; CC kemokinski receptor

DPBS – Dulbecco's phosphate-buffered saline; solna raztopina fosfatnega pufra

FBS – fetal bovine serum; fetalni goveji serum

FITC – fluorescein izotiocianat

GM-CSF – granulocyte/macrophage colony stimulating factor; granulocitne/makrofagne kolonije-stimulirajoči dejavnik

HLA – human leukocyte antigens; humani levkocitni antigen; antigen poglobitnega sistema tkivne skladnosti pri človeku

IFN – interferon

IL – interlevkin

LPS – lipopolisaharid

MHC – major histocompatibility complex; poglobiten sistem tkivne skladnosti

PBMC – peripheral blood mononuclear cells; enojedrne celice, pridobljene iz periferne krvi

PE – fikoeritrin

PL – platelet lysate; trombocitni lizat

Poly I:C – Polyinosinic–polycytidylic acid sodium salt; sintetični agonist receptorjev TL3

R848 – Resiquimod; sintetični agonist receptorjev TLR7/TLR8

SF – serum-free; brez-serumski

TAA – tumor associated antigens; s tumorji povezani antigeni

TNF – tumor necrosis factor; dejavnik tumorske nekroze

1 Uvod

Človeški imunski sistem je izjemno kompleksen sistem vodotopnih molekul, celic, tkiv in organov, katerega glavna naloga je ločiti med telesu lastnim in tujim ter zagotoviti obrambo organizma tako pred tujimi antigeni kot tudi pred telesu lastnimi, spremenjenimi celicami. Imunski sistem sestavljata prirojena in pridobljena veja imunskega sistema. Evolucijsko starejša, prirojena veja imunskega sistema, obsega celice (nevtrofilci, makrofagi, mastociti itd.) in vodotopne molekule (komponente komplementa itd.), ki se na prisotnost patogena oziroma s patogeni povezane molekulske strukture odzovejo hitro in tako zagotavljajo takojšnjo nespecifično obrambo organizma. Pridobljena veja imunskega sistema in njene komponente (limfociti, protitelesa) pa so odgovorni za antigensko specifičen imunski odziv in zagotavljajo dolgotrajno, sistemsko obrambo pred patogeni. Da je imunski sistem učinkovit, morata obe veji imunskega sistema delovati usklajeno. Pri tem imajo ključno vlogo dendritične celice. Te so zaradi svoje vpletenosti v uravnavanje delovanja imunskega sistema že vrsto let osrednji del raziskav in kliničnih študij, katerih cilj je uporaba dendritičnih celic kot ključne sestavine proti-tumorskih celičnih cepiv. Postopek priprave tovrstnih celičnih produktov med drugim zahteva uporabo celičnih medijev za gojenje, ki ne vsebujejo dodatkov živalskega izvora. Tako so napor raziskovalcev v zadnjih letih usmerjeni v iskanje dodatkov, ki bi uspešno nadomestili dodatke živalskega izvora. Eno od potencialnih zamenjav predstavlja humani trombocitni lizat. V tem raziskovalnem delu smo ovrednotili uporabo trombocitnega lizata kot dodatka za gojenje, diferenciacijo in zorenje človeških dendritičnih celic.

1.1 Dendritične celice, imunost

Dendritične celice sta leta 1973 prva opisala Steinman in Cohn. Raziskovalca sta se ukvarjala s proučevanjem antigensko specifičnega imunskega odziva. Znano je bilo, da antigeni sprožijo imunski odziv, vendar niso znali razložiti mehanizma procesa. V iskanju manjkajočega člena med antigenom in zagonom imunskega odziva sta Steinman in Cohn svojo pozornost namenila limfatičnim organom, natančneje mišji vranici. Vedela sta, da se v njej nahajajo celice, brez katerih se protitelesni imunski odziv kljub prisotnosti antigena ne razvije [1]. Tako sta med proučevanjem adherentnih celic, izoliranih iz mišje vranice, opazila celice, ki so se po svoji morfologiji in tkivni porazdelitvi bistveno razlikovale od ostalih, do takrat poznanih celic. Izstopale so predvsem po svojih različno dolgih citoplazemskih izrastkih, po katerih sta jih tudi poimenovala. Celice niso bile sposobne

endocitoze, kljub izpostavitvi ustreznim pogojem. S poskusom izolacije dendritičnih celic iz različnih mišjih organov sta ugotovila, da se te nahajajo skoraj izključno v perifernih limfatičnih organih [2]. Po odkritju in morfološki opredelitvi dendritičnih celic sta Steinman in Cohn nadaljevala svoje proučevanje omenjenih celic in s funkcijskimi testi dokazala, da dendritične celice predstavljajo nov tip celic: na svoji površini ne izražajo molekul, značilnih za limfocite, ne kažejo endocitotske aktivnosti, značilne za makrofage, in nimajo funkcionalnih lastnosti drugih celic, prisotnih v limfatičnih organih. Kot se je kasneje izkazalo, je bila ugotovitev, da dendritične celice niso sposobne endocitoze, le delno resnična. Danes vemo, da imajo nezrele dendritične celice močno izraženo endocitotsko aktivnost, ki pa jo z dozorevanjem izgubijo. Ugotovitev, da novo odkrite celice niso sposobne endocitoze, je v tej fazi proučevanja služila kot ena izmed karakteristik dendritičnih celic, po kateri so jih razlikovali od makrofagov. Glavno oviro na tej stopnji proučevanja dendritičnih celic je predstavljala njihova kratka življenjska doba v *in-vitro* pogojih in omejena čistost pridobljenih populacij celic (prisotnost makrofagov). Dendritične celice so poskušali gojiti v različnih medijih, z različnimi dodatki, vendar niso preživele dlje kot 24 ur [3]. Tako eno izmed prelomnic pri proučevanju dendritičnih celic predstavlja ugotovitev, kako pridobiti čisto populacijo dendritičnih celic in celice ohraniti žive ter morfološko in funkcijsko nespremenjene več dni v *in-vitro* pogojih. To je Steinmanu in sodelavcem uspelo leta 1978. Ko so uspeli pridobiti čisto populacijo dendritičnih celic, so lahko s citotoksičnimi testi, barvanji, aglutinacijskimi testi in elektronsko mikroskopijo natančneje opredelili lastnosti dendritičnih celic in pridobili prve podatke, ki so namigovali na njihovo funkcijo. Ugotovili so, da se celice ne razmnožujejo, niti kadar so izpostavljene ustreznim pogojem, in da na svoji površini izražajo številne molekule pglavitnega sistema tkivne skladnosti (major histocompatibility complex, MHC). Slednje je nakazovalo, da imajo dendritične celice pomembno vlogo pri predstavitvi antigenov in posledično pri zagonu imunskega odziva [4]. Domnevo so potrdili s proučevanjem vpliva dendritičnih celic na proliferacijo levkocitov v primarni mešani levkocitni reakciji. Ugotovili so, da prisotnost že majhnega števila dendritičnih celic bistveno poveča proliferacijsko aktivnost levkocitov in da se ta s povečevanjem števila dendritičnih celic lahko poveča tudi do 80-krat [5]. Predpostavko, da so dendritične celice antigene predstavljajoče celice, je Steinman s svojimi sodelavci podprl v številnih sledečih študijah. Nussenzweig je dokazal, da dendritične celice predstavljajo antigene citotoksičnim limfocitom T in na tak način sprožijo njihov odziv na dani antigen. Inaba in

sod. so proučevali povezavo med celicami T pomagalkami in sintezo specifičnih protiteles ter ugotovili, da prisotnost dendritičnih celic poveča aktivnost celic T pomagalk. Da dendritične celice niso le antigene predstavljajoče celice, temveč imajo osrednjo vlogo pri zagonu imunskega odziva, sta Steinman in Inaba ugotovila med opazovanjem združevanja dendritičnih celic v skupke. V skupkih so se nahajali tudi limfociti, ki so tam proliferirali, novo nastale celice pa so skupke začele zapuščati. Vedeli so, da se imunski odziv začne v limfatičnih organih in da se dendritične celice običajno nahajajo v bližini večjega števila limfocitov T. Na osnovi teh podatkov so predpostavili mehanizem zagona imunskega odziva. Dendritične celice v limfatičnih organih pridejo v stik z limfociti T, jim predstavijo antigene in jih aktivirajo. Aktivirani limfociti T nato vstopijo v krvni obtok, dosežejo mesta, kjer se nahajajo antigeni, s katerimi so bili aktivirani, in tam sprožijo imunski odziv. Spoznali so torej, da so dendritične celice ključne v dveh stopnjah T celične imunosti: limfocitom T omogočijo prepoznavo antigena in odziv nanj [6].

Naslednje pomembno odkritje na poti razumevanja delovanja dendritičnih celic je prineslo sodelovanje Steinmana in Schulerja pri proučevanju povezave epidermalnih Langerhansovih celic in dendritičnih celic iz vranice. Raziskovalci so ugotovili, da so Langerhansove celice levkociti, ki izvirajo iz kostnega mozga in na svoji površini izražajo molekule, s katerimi lahko predstavljajo antigene limfocitom T, kar je nakazovalo na povezavo med omenjenimi celicami. Sveže izolirane Langerhansove celice so slabo stimulirale limfocite T, po nekaj dneh gojenja pa so postale celo boljši stimulatorji kot dendritične celice iz vranice. Spremembo so pripisali procesu, ki so ga poimenovali zorenje. Ker so Langerhansove celice med zorenjem po svojih morfoloških lastnostih in funkciji postale zelo podobne dendritičnim celicam, so sklepali, da so Langerhansove celice nezrele dendritične celice, specifične za kožno tkivo [7]. Iz proučevanja Langerhansovih celic izhajata še dve pomembni spoznanji: za doseganje zrelega stanja dendritičnih celic je bistven granulocitne/makrofagne kolonije-stimulirajoči dejavnik (granulocyte/macrophage colony stimulating factor, GM-CSF), na granulocitne in makrofagne kolonije-stimulirajoča dejavnika pa so celice neodzivne, kar nakazuje, da dendritične celice izhajajo iz mieloidne diferenciacijske poti [8].

Odkritje, da dendritične celice ne obstajajo le v eni zrelostni obliki, je porušilo prepričanje, da so dendritične celice sposobne zagnati imunski odziv same po sebi, kot je to na podlagi izražanja velike količine molekul MHC razreda II (MHC II) veljalo do tedaj. Da pridobijo to funkcijo, morajo dozoreti iz nezrele v zrelo obliko, njihovo zorenje pa lahko sprožijo

mikrobi ali druge, aktivirane imunske celice. V nezrelih dendritičnih celicah se molekule MHC II in antigeni nahajajo v endosomih. Med dozorevanjem se sprožijo procesi, ki znižajo pH v endosomih, kar omogoči katabolizem antigenov in invariantne verige molekul MHC II ter nastanek kompleksov med antigenskimi peptidi in molekulami MHC II, ki jih zrele dendritične celice izrazijo na svoji površini in jih ponudijo v prepoznavo limfocitom T [6]. Obstoj dendritičnih celic v dveh različnih zrelostnih stopnjah je dve leti kasneje potrdil Romani, ki je proučeval sposobnost dendritičnih celic različnih izvorov, da predstavijo antigene limfocitom T in sprožijo njihovo proliferacijo. Dendritične celice iz vranice in v kulturi gojene epidermalne Langerhansove celice so slabo predstavljale antigene limfocitom T, po drugi strani pa so močno stimulirale proliferacijo limfocitov T v mešani levkocitni reakciji. Sveže izolirane Langerhansove celice so kazale nasprotno sliko. Aktivno so predstavljale antigene limfocitom T in slabo stimulirale proliferacijo limfocitov T v mešani levkocitni reakciji. Iz tega sledi sklep: dendritične celice v nezrelem stanju aktivno privzemajo antigene in imajo močno izraženo antigen-predstavitveno funkcijo, z dozorevanjem pa sposobnost privzema antigenov izgubljajo in pridobijo sposobnost stimulacije neaktivnih limfocitov T [9]. Ugotovitev predstavlja prvi dokaz, da sta za zagon imunskega odziva potrebna dva ključna, ločena procesa, oba povezana z dendritičnimi celicami: privzem in predstavitev antigenov ter izražanje kostimulacijskih funkcij [6].

Raziskovalci so bili v začetnih letih proučevanja dendritičnih celic omejeni z majhnim številom celic, ki so jih v glavnem pridobili iz mišjih limfatičnih organov. Bistven napredek na področju predstavlja odkritje, kako vzgojiti večje število dendritičnih celic v in-vitro pogojih. Med gojenjem celic iz krvi in kostnega mozga miši, ob dodatku GM-CSF, so opazili, da celice, za katere so domnevali, da bi lahko bile nezreli predhodniki dendritičnih celic, tvorijo agregate, znotraj katerih proliferirajo in postopoma pridobivajo lastnosti značilne za dendritične celice, nastale celice pa agregate začnejo zapuščati. Po 4 do 6 dneh gojenja se je število dendritičnih celic v kulturi močno povečalo [10]. Do podobnih opažanj so prišli tudi pri proučevanju celic iz humane krvi. Ugotovili so, da lahko z dodatkom GM-CSF v celično kulturo sprožijo diferenciacijo monocitov v smeri dendritičnih celic, vendar se razvoj ustavi na stopnji makrofagov. Temu so se izognili tako, da so kulturi dodali interleukin 4 (IL-4), ki je znan zaviralec razvoja makrofagov, in tako omogočili diferenciacijo monocitov v celice z lastnostmi, ki so značilne za nezrele dendritične celice. Tako vzgojene dendritične celice so aktivno predstavljale antigene limfocitom T, ob izpostavitvi dejavniku tumorske nekroze α (tumor necrosis factor α ,

TNF- α) pa so izgubile sposobnost predstavitve antigenov in pridobile sposobnost stimulacije neaktivnih limfocitov T [11]. Z nadaljevanjem izvajanja poskusov v tej smeri je leto kasneje Federica Sallusto ugotovila, da so dendritične celice, vzgojene iz monocitov ob dodatku GM-CSF in IL-4, sposobne makropinocitoze in privzema antigenov preko manoznih receptorjev, kar jim omogoča koncentriranje antigenov v znotrajceličnih razdelkih, bogatih z molekulami MHC II. Z izpostavitvijo na tak način vzgojenih celic različnim zunanjim dejavnikom, kot so bakterijski lipopolisaharid (LPS), TNF- α , ligand CD40 in IL-1, je sprožila njihovo zorenje in nedvoumno pokazala, da dendritične celice z višanjem stopnje zrelosti izgubljajo sposobnost privzemanja antigenov; nezrele dendritične celice privzemajo in procesirajo antigene, dokler ne naletijo na dejavnik, ki sproži njihovo zorenje, kar povzroči njihovo migracijo v lokalne bezgavke, kamor prispejo kot zrele celice, ki so izgubile sposobnost privzemanja antigenov, pridobile pa sposobnost stimulacije limfocitov T [12].

Dolgo časa po odkritju dendritičnih celic, je na podlagi ugotovitev, ki so jih prinesli začetni poskusi, veljalo, da je najpomembnejša funkcija dendritičnih celic aktivacija limfocitov T in zagotavljanje ustrezne antigensko specifične T-celične imunosti. Proučevanje dendritičnih celic v *in vivo* pogojih, ko se nahajajo v nezreli obliki oz. tako imenovanem "steady state" stanju, pa je prineslo spoznanje, da imajo dendritične celice pomembno vlogo tudi pri vzpostavitvi sistemske in periferne tolerance na lastne antigene [13]. Ob odsotnosti vnetnih dejavnikov ali infektivnih mikroorganizmov dendritične celice vzorčijo svojo okolico, procesirajo telesu lastne antigene in jih vezane na molekule MHC I in MHC II predstavljajo neaktivnim limfocitom T, vendar niso sposobne sprožiti njihove diferenciacije v efektorske ali spominske celice. Dendritične celice v opisanem stanju ravno nasprotno izzovejo nastanek regulatornih limfocitov T, povzročijo delecijo avto-reaktivnih limfocitov T in razvoj tolerance. Ko pridejo v stik z antigenom oz. dražljajem iz okolja, ki sproži njihovo zorenje, se zvrstijo številni procesi, ki spremenijo tako fenotipske kot funkcijske lastnosti dendritičnih celic. Aktivirane dendritične celice s povečevanjem stopnje zrelosti izgubljajo sposobnost privzema antigenov in pridobivajo sposobnost aktivacije limfocitov. Sprememba je posledica zmanjšanja izražanja površinskih molekul, ki sodelujejo pri privzemanju antigenov, in povečanja izražanja kostimulacijskih molekul CD80, CD86, CD40 in citokinov, ki so nujni za nastanek efektorskih limfocitov T. Izražati začnejo tudi kemokinske receptorje, kot je CC kemokinski receptor 7 (CCR7), ki usmerijo njihovo migracijo v limfatične organe, kjer pridejo v stik z naivnimi limfociti T. V

odvisnosti od dejavnika, ki aktivira zorenje dendritičnih celic, okolja, v katerem do aktivacije pride, in kot posledica interakcije med receptorjem CD40 na dendritičnih celicah in ligandom CD40 na aktiviranih limfocitih T, začnejo dendritične celice proizvajati citokine, ki usmerijo imunski odziv in sprožijo proliferacijo za antigen specifičnih CD4⁺ celic T pomagalk tipa 1 (type 1 helper T cell, Th1) ali 2 (type 2 helper T cell, Th2) in CD8⁺ citotoksičnih limfocitov T (CTL). Za uspešen imunski odziv so torej potrebni trije signali, ki jih zagotovijo dendritične celice: predstavitev antigena preko molekul MHC, interakcija med kostimulacijskimi molekulami CD80/CD86 na dendritičnih celicah in CD28 na limfocitih T ter izločanje citokinov, ki usmerijo potek imunskega odziva [14].

1.2 Imunoterapija rakavih bolezni z dendritičnimi celicami

Zaradi svoje vloge v regulaciji imunskega odziva so postale dendritične celice zanimive in vedno pogostejše uporabljene pri izdelavi terapevtskih cepiv za zdravljenje tumorskih bolezni. Večina s tumorji povezanih antigenov (tumor-associated antigens, TAA) ne sproži imunskega odziva, kar je posledica pomanjkanja funkcionalnih dendritičnih celic v tumorskem okolju. Dendritične celice, ki se nahajajo v okolju tumorja ali znotraj tumorskih mas, pogosto na svoji površini ne izražajo kostimulatornih molekul CD80 in CD86, zato tudi ne morejo uspešno aktivirati limfocitov T. Poleg tega tumorske celice sproščajo imunosupresivne molekule, kot sta IL-10 in TGF- β , ki zavirajo razvoj in funkcijo dendritičnih celic ter posledično predstavljajo zaščito tumorja pred imunskim sistemom.

S poskusi na živalih so ugotovili, da tumorsko spremenjene celice na svoji površini izražajo TAA, ki jih je imunski sistem sposoben prepoznati in takšne celice uničiti, vendar ti antigeni *in vivo* niso imunogeni in ne sprožijo imunskega odziva. Osnovali so hipotezo, da je vzrok za toleranco na tumorsko spremenjene celice neustrezen predstavitev TAA limfocitom T. Ker so dendritične celice glavne in najbolj učinkovite antigene predstavljajoče celice, so z vrsto poskusov dokazali, da ob ustrezni izpostavitvi avtolognih dendritičnih celic tumorskim antigenom *in-vitro* ter vrnitvi tako pripravljenih dendritičnih celic v organizem živali s tumorjem sprožijo močan proti-tumorski odziv, ki vodi v zmanjšanje števila metastaz in izboljša preživetje živali. Ugotovitve predstavljajo prve dokaze o pomanjkljivem predstavljanju tumorskih antigenov *in vivo* ter preobratu, ki sledi injiciranju dendritičnih celic, obremenjenih s TAA, nazaj v organizem. Postopek izpostavitve dendritičnih celic TAA *in-vitro* omogoča, da se izognemo težavi, ki nastane *in vivo*, kjer dendritične celice zaradi imunosupresivnega delovanja tumorsko spremenjenih

celic niso zmožne aktivirati specifičnega proti-tumorskega odziva [15]. Ugotovitve so skupaj z razvojem metod, ki omogočajo pridobivanje in gojenje dendritičnih celic v velikem številu, postavile temelje za začetek imunoterapije raka na osnovi dendritičnih celic.

Cepivo za zdravljenje raka na osnovi dendritičnih celic je definirano kot cepivo, ki vsebuje dendritične celice, naložene s TAA, ki ob injiciranju v organizem bolnika sprožijo antigensko specifičen T-celični proti-tumorski odziv. Da je cepivo na osnovi dendritičnih celic učinkovito, morajo dendritične celice preko svojih molekul MHC predstavljati antigene, proti katerim želijo sprožiti imunski odziv. Raziskovalci so razvili več postopkov, s katerimi so omogočili vezavo antigenov na molekule MHC v *in-vitro* pogojih. Najpogosteje uporabljeni so: inkubacija dendritičnih celic s peptidi, ki se neposredno vežejo na molekule MHC I in MHC II, inkubacija dendritičnih celic s tumorskim lizatom ali rekombinantnimi peptidi, ki jih celice z endocitozo privzamejo, procesirajo in vezane na molekule MHC izpostavijo na svoji površini, ter transfekcija dendritičnih celic z molekulami RNA, ki kodirajo TAA, kar vodi v sintezo TAA znotraj dendritičnih celic. Prednost slednjega postopka je, da nastajajo antigeni, kodirani z edinstveno mutiranimi geni, ki se nahajajo znotraj tumorsko spremenjenih celic, kar omogoča večjo specifičnost proti-tumorskega odziva, slabost pa predstavlja nevarnost nastanka neznanega števila avtoantigenov, kar lahko vodi v razvoj avtoimunskih bolezni [17]. Prva generacija cepiv je vsebovala nezrele ali delno zrele dendritične celice, ki so sicer na svoji površini izražale TAA, vezane na molekule MHC, vendar so bile zaradi pomanjkanja kostimulatornih molekul in sposobnosti izločanja citokinov dovzetne za imunosupresivne učinke tumorskega mikrookolja in so v najslabšem primeru celo povzročile nastanek regulatornih limfocitov T, kar je proti-tumorski odziv še dodatno oslabilo. V kliničnih študijah se je izkazalo, da tako pripravljena celična cepiva le v manjši meri aktivirajo tumorsko specifične efektorske celice in je zato regresija tumorja omejena, vseeno pa izboljšajo preživetje bolnikov, saj zaradi nastanka spominskih celic zmanjšajo možnost ponovnega pojava tumorja ali nastanka metastaz po odstranitvi primarnega tumorja. V nasprotju z nezreliimi, zrele dendritične celice pod vplivom imunosupresivnega delovanja tumorja ne povzročijo nastanka regulatornih limfocitov T in imajo bistveno večjo sposobnost aktivacije specifičnih proti-tumorskih Th1 in CTL odzivov, zato je bilo vloženega veliko truda v razvoj postopkov pridobivanja zrelih dendritičnih celic. V ta namen so razvili številne sintezne agoniste receptorjev TLR (toll-like receptors), kot sta poly I:C in R848

(obe sintetični RNA molekuli, ki delujeta kot mimetika mikrobov), ki so jih v kombinaciji z različnimi citokini dodali nezrelim dendritičnim celicam in tako sprožili njihovo zorenje. Cilj tega postopka je pridobiti zrele dendritične celice z visokim izražanjem kostimulatornih molekul in kemokinskih receptorjev CCR7 odzivnih na kemokina CCL19 in CCL21, ki sprožita migracijo dendritičnih celic v sekundarne limfatične organe, ter visoka produkcija vnetnih citokinov, predvsem IL-12, ki dodatno povečajo sposobnost dendritičnih celic, da aktivirajo tumorsko-specifičen imunski odziv in nastanek imunskega spomina [16].

Od leta 1996, ko so izvedli prvo klinično študijo, v kateri so testirali uporabo cepiva na osnovi dendritičnih celic za zdravljenje raka, so se zvrstile številne študije, katerih cilj je bil in še vedno ostaja optimizacija postopka priprave cepiv. Zgodnje klinične študije so sicer pokazale, da so cepiva na osnovi dendritičnih celic učinkovita, varna, dostopna in imajo v primerjavi s kemoterapijo ali obsevanjem bistveno manj toksičnih učinkov, vendar so bile te študije pogosto površno načrtovane in niso vsebovale pomembnih podatkov o načinu priprave in aktivacije dendritičnih celic, njihovih fenotipskih lastnostih ali načrta zagotavljanja kakovosti uporabljenih pripravkov. Tako so leta 2004 ob upoštevanju smernic dobre proizvodne prakse (good manufacturing practice, GMP), ki med drugim zahtevajo uporabo brez-serumskih medijev z dodanim minimalnim deležem humanega seruma, oblikovali merila, katerim morajo ustrezati dendritične celice za uporabo v cepivih. Merila obsegajo pogoje gojenja, aktivacije in dozorevanja dendritičnih celic ter opredelitev morfoloških in fenotipskih lastnosti dendritičnih celic (preglednica 1). Glavni namen standardizacije postopka priprave cepiv na osnovi dendritičnih celic je zagotoviti ustrezno kakovost in ponovljivost priprave [17].

Preglednica 1: Merila, ki jih morajo izpolnjevati dendritične celice, diferencirane iz monocitov, za uporabo v cepivih (povzeto po Figdor CG, De Vries JM, Lesterhuis WJ, Melief CJ. Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nature Medicine*. 2004; 10: 475–480).

	Nezrele dendritične celice	Zrele dendritične celice
MORFOLOGIJA	Nepravilne oblike z nekaj tankimi citoplazemskimi izrastki. Celice se pritrujejo na podlago.	Nepravilne oblike z dolgimi citoplazemskimi izrastki. Celice se v glavnem ne pritrujejo na podlago in tvorijo skupke.

FENOTIP	CD14 ⁻ / ^{niz} CD83 ⁻ CD80 ⁻ / ^{niz} CD86 ^{niz} MHC I ⁺ MHCII ⁺	CD83 ⁺ CD80 ⁺ CD86 ⁺ MHC I ⁺ MHC II ⁺ CCR7 ⁺
----------------	--	---

Za gojenje celic v in-vitro pogojih se uporabljajo celični mediji z dodatkom seruma, ki je vir prenašalnih proteinov, mineralov, elementov v sledovih, nizkomolekularnih hranilnih snovi, hormonov in rastnih faktorjev, potrebnih za preživetje, proliferacijo in diferenciacijo celic, poleg tega pa je nujen tudi za vzdrževanje ustreznega pH v gojišču. V preteklosti se je kot serumski dodatek uporabljal fetalni goveji serum (fetal bovine serum, FBS). Danes se njegovi uporabi zaradi etičnih in znanstvenih zadržkov izogibamo. Dokazali so, da je FBS lahko vir antigenov, ki jih dendritične celice med gojenjem privzamejo in predstavijo na svoji površini, kar lahko ob aplikaciji cepiva na osnovi tako pripravljenih celic sproži neželene imunske reakcije pri prejemniku. Nevarnost predstavlja tudi potencialen prenos virusnih in prionskih bolezni iz živali na človeka [18]. Na podlagi teh podatkov in upoštevanju GMP smernic so začeli raziskovalci pri gojenju dendritičnih celic uporabljati brez-serumske celične medije z dodatkom avtolognega ali alogenskega AB seruma. Tudi uporaba teh nadomestkov je lahko problematična, saj so v humanem serumu prav tako prisotni številni proteini, ki lahko nepredvidljivo spremenijo lastnosti dendritičnih celic med gojenjem in vplivajo na rezultat zdravljenja bolnikov s tako pripravljenimi cepivi. Prav zaradi tega brez-serumski celični mediji vsebujejo minimalne količine serumskih dodatkov [19]. Z željo po odkritju učinkovitih nadomestkov serumskih dodatkov pri gojenju celic so raziskovalci v preteklosti vložili veliko truda v identifikacijo molekul seruma, ki stimulirajo in omogočijo rast celic v in-vitro pogojih. Velik napredek na področju predstavlja ugotovitev, da so najbolj potentni serumski mitogeni pravzaprav produkti aktiviranih trombocitov. Na podlagi te ugotovitve so izvedli številne raziskave, v katerih so dokazali, da trombocitni lizat omogoča rast in diferenciacijo različnih celičnih linij v in-vitro pogojih [20]. Uporaba trombocitnega lizata kod dodatka celičnemu mediju za diferenciacijo dendritičnih celic iz monocitov ter njihovo nadaljnjo aktivacijo je še razmeroma slabo opredeljena. Prva objavljena raziskava, v kateri so ovrednotili uporabo celičnega medija z dodatkom trombocitnega lizata za gojenje dendritičnih celic, je bila izvedena šele pred enim letom. V omenjeni raziskavi so ugotovili, da so morfološke, fenotipske in funkcijske lastnosti dendritičnih celic, diferenciranih iz monocitov v

celičnem mediju z dodatkom trombocitnega lizata, primerljive s celicami, pripravljenimi v celičnem mediju z dodatkom enakega deleža FBS ali humanega AB seruma [21].

2 Načrt za delo

Na podlagi pregledane literature smo se odločili ovrednotiti uporabo trombocitnega lizata kot dodatka za gojenje, diferenciacijo in zorenje človeških dendritičnih celic. Uporabili bomo *in-vitro* model diferenciacije monocitov v nezrele dendritične celice in nato še v zrele dendritične celice, pri čemer bomo uporabili dva različna medija za gojenje in diferenciacijo človeških dendritičnih celic: medij z dodatkom trombocitnega lizata in brez-serumski medij. Ker je brez-serumski medij že dokazano učinkovit dodatek za gojenje humanih dendritičnih celic namenjenih za pripravo celičnih cepiv, bo v našem raziskovalnem delu služil kot referenca. Osnovali smo hipotezo, da so lastnosti dendritičnih celic, vzgojenih iz monocitov ter stimuliranih z GM-CSF in IL-4, v obeh medijih primerljive in hkrati ustrezne za pridobitev kakovostnega proti-tumorskega cepiva. Lastnosti dendritičnih celic, na katere se bomo osredotočili, so: morfologija diferenciranih dendritičnih celic, endocitotske sposobnosti nezrelih dendritičnih celic, fenotipske značilnosti nezrelih dendritičnih celic, fenotipske značilnosti zrelih dendritičnih celic in sposobnost izločanja IL-12p70 (aktivna oblika IL-12) po diferenciaciji v zrele dendritične celice. Ob tem bomo spremljali še izkoristek gojenja dendritičnih celic v obeh medijih.

Pričakujemo, da bodo morfološke lastnosti dendritičnih celic, vzgojenih iz monocitov ob dodatku GM-CSF in IL-4 v mediju z dodatkom trombocitnega lizata, primerljive z lastnostmi dendritičnih celic, vzgojenih v brez-serumskem mediju. Morfološke lastnosti celic bomo analizirali z invertnim mikroskopom.

Endocitotske sposobnosti nezrelih dendritičnih celic bomo ocenili s pretočnim citometrom. Nezrele dendritične celice so zelo dobri fagociti, ki neprestano privzemajo svojo okolico. Z *in-vitro* modelom, ob dodatku fluorescentnega reagenta, bomo posnemali dogajanje v tkivih, kjer nezrele dendritične celice opravljajo svojo endocitotsko funkcijo, in nato s pretočnim citometrom analizirali količino privzetega fluorescentnega reagenta.

Dendritične celice, namenjene pripravi celičnih cepiv, morajo dosegati stroga merila, ki vključujejo tudi natančno opredelitev njihovih fenotipskih lastnosti, na podlagi katerih lahko sklepamo na njihovo zrelostno stopnjo. V ta namen bomo z imunofenotipizacijo opredelili nezrel in zrel fenotip diferenciranih dendritičnih celic.

Ker se za pripravo cepiv na osnovi dendritičnih celic uporabljajo zrele dendritične celice, bomo testirali uporabo različnih kombinacij aktivatorjev in citokinov, namenjenih stimulaciji dozorevanja dendritičnih celic. S poskusom bomo opredelili optimalen način aktivacije dendritičnih celic, vzgojenih v mediju z dodatkom 10-odstotnega trombocitnega

lizata. Uspešnost aktivacije dendritičnih celic bomo opredelili z imunofenotipsko analizo zrelih celic in z merjenjem koncentracije IL-12p70.

3 Materiali in metode

Vso delo smo izvajali v aseptičnih pogojih. V obeh medijih vzgojene celice smo obravnavali pod enakimi pogoji in pri tem uporabljali enake metode. Za delo je bilo pridobljeno soglasje Komisije za medicinsko etiko (številka odločbe: 0120-279/2017-3).

3.1 Priprava in gojenje CD14⁺ kultur

Biološki vir za izolacijo PBMC smo dnevno svež pridobili od zdravih, odraslih krvodajalcev, v okviru rednih krvodajalskih akcij na Zavodu za transfuzijsko medicino Republike Slovenije. Kri so pred uporabo v raziskovalnem laboratoriju s postopki predelave ločili na posamezne komponente in z zbiranjem frakcije na vrhu sedimentiranih eritrocitov pobrali plast bogato z levkociti, imenovano »buffy-coat«. Za nadaljnjo obdelavo smo uporabili po 50 mL tako pripravljene krvi, bogate z levkociti.

Izolacija PBMC iz plasti, bogate z levkociti. Iz plasti, bogate z levkociti, smo z uporabo Lympholyte-H (Cedarlane), s katerim smo med centrifugiranjem ustvarili gostotni gradient, izolirali enojedrne celice. Kri smo razredčili s pufrom DPBS (Gibco) iz 50 mL na 120 mL. Posebej smo pripravili 4 centrifugirke z volumnom 50 mL ter vanje odpipetirali 11,5 mL Lympholyte-H in 1 mL DPBS ter pustili, da se je zmes ogrela na sobno temperaturo. V vsako centrifugirko smo previdno in počasi odpipetirali 25 mL razredčene krvi, tako da se kri in Lympholyte-H nista premešala, nato pa centrifugirali 15 minut pri 950g. Po centrifugiranju smo iz po dveh centrifugirk s pipeto pobrali plast, bogato s PBMC, ki je nastala med plastjo Lympholyte-H in plazmo, ter jo v novi centrifugirki razredčili z DPBS na 50 mL in centrifugirali 10 minut pri 660g. Supernatante smo zavrgli, celice obeh sedimentov resuspendirali v DPBS, združili resuspendirane celice iz obeh centrifugirk v eno in dopolnili z DPBS do volumna 50 mL. Tako pripravljeno celično suspenzijo smo centrifugirali 10 minut pri 300g in s spiranjem nadaljevali, dokler nismo dobili bistrega supernatanta. Po končanem spiranju smo celice resuspendirali v 10 mL DPBS in jih prešteli na celičnem števcu Vi-CELL (Beckman Coulter). Za nadaljnjo izolacijo CD14⁺ monocitov smo uporabili 500×10^6 PBMC.

Izolacija CD14⁺ monocitov iz PBMC. CD14⁺ frakcijo smo izolirali s postopkom pozitivne imunomagnetne selekcije z uporabo CD14 MicroBeads (Miltenyi Biotec) in LS kolone za imunomagnetno separacijo (Miltenyi Biotec). Na tej stopnji smo uporabljali pufer DPBS, z dodatkom 0,5-odstotnega FBS (Gibco), ohlajen na 4 °C. Ustresen

volumen celične suspenzije iz prejšnjega koraka (500×10^6 PBMC) smo centrifugirali 10 minut pri 300g, s pipeto popolnoma odstranili supernatant, sediment resuspendirali v 300 μ L pufra in celično suspenzijo inkubirali 20 minut na 4 °C. Nato smo dodali 75 μ L CD14 MicroBeads protiteles in celično suspenzijo inkubirali 15 minut na 4 °C. Po inkubaciji smo celično suspenzijo razredčili s pufrom na 20 mL in centrifugirali 10 minut pri 300g. Supernatant smo zavrgli, sediment pa resuspendirali v 950 μ L pufra. Med centrifugiranjem smo pripravili MidiMACS separator z LS kolono za imunomagnetno separacijo: kolono smo ekvilibrirali z 2 mL pufra nato pa nanegli pripravljeno celično suspenzijo. Eluirano frakcijo smo zavrgli in kolono sprali najprej z 1 mL, nato pa še dvakrat s po 3 mL pufra. Po spiranju smo kolono odstranili iz separatorja, nanegli 3 mL pufra in eluirano CD14⁺ frakcijo zbrali v centrifugirki.

Priprava CD14⁺ celične kulture. Za gojenje celic smo uporabljali dva celična medija: brez-serumski CellGro z dodanim 1-odstotnim AB serumom (1% SF) (50 mL celičnega medija CellGro (CellGenix) smo dodali 500 μ L humanega AB seruma in 50 μ L gentamicina (koncentracije 50 mg/mL) (Sigma Aldrich)) in RPMI 1640 z dodanim 10-odstotnim trombocitnim lizatom (10% PL) (500 mL RPMI 1640 (Lonza) smo dodali 50 mL humanega trombocitnega lizata, 5 mL GlutaMAX (Gibco) in 500 μ L gentamicina). CD14⁺ monocite za gojenje smo pripravili v koncentraciji 5×10^6 celic na 8 mL celičnega medija. Tako celicam, gojenim v cCellGro kot v cRPMI, smo dodali GM-CSF (PeproTech) v končni aktivnosti 800 U/mL in IL-4 (Miltenyi Biotec) v končni aktivnosti 1000 U/mL. 2. dan po nasaditvi smo celicam zamenjali medij tako, da smo odstranili polovico obstoječega medija in ga nadomestili s svežim ter dodali začetne količine GM-CSF in IL-4. Celice smo gojili 5 dni pri 37 °C.

3.2 Analiza uspešnosti diferenciacije monocitov v nezrele dendritične celice

Morfološka analiza nezrelih dendritičnih celic. 5 dni po nasaditvi monocitov smo analizirali morfologijo v obeh celičnih medijih diferenciranih dendritičnih celic z invertnim svetlobnim mikroskopom (Nikon Eclipse Ti-S).

Izkoristek diferenciacije. Za analizo izkoristka diferenciacije monocitov v dendritične celice smo 5 dni po nasaditvi monocitov nezrele dendritične celice, ločeno za vsak medij, sprali iz plošče za celične kulture z uporabo DPBS ter jih s centrifugiranjem 5 minut pri

500g dvakrat sprali. Po drugem spiranju smo celice v sedimentu resuspendirali v 1 mL DPBS in jih po navodilih proizvajalca prešteli z uporabo celičnega števca Vi-CELL XR (Beckman Coulter). Iz števila monocitov, ki smo jih nasadili, in števila nezrelih dendritičnih celic smo izračunali izkoristek diferenciacije za vsak celični medij posebej.

Endocitotske sposobnosti. Za preverjanje endocitotskih sposobnosti smo pripravili nezrele dendritične celice v koncentraciji 300 000 celic/300 μ L cRPMI z dodanim FBS. Reagent FITC-dextran (Sigma Aldrich) smo pripravili po navodilih proizvajalca v koncentraciji 2 mg/mL in ga dodali celični suspenziji v razmerju 1 : 1, 1 : 2 in 1 : 10. Negativno kontrolo smo pripravili tako, da smo celice postavili na led in jim dodali reagent, ohlajen na 4 °C v razmerju 1 : 1. S tem smo metabolizem v celicah toliko upočasnili, da smo preprečili endocitozo. Celice smo inkubirali v temi 1 h na 37 °C oz. na ledu, nato pa smo jih dvakrat sprali z DPBS in centrifugiranjem 3,5 minute pri 500g. Celice smo resuspendirali v 200 μ L DPBS in količino z endocitozo privzetega FIT-dextrana izmerili s pretočnim citometrom FACSCalibur (Becton Dickinson).

Imunofenotipska analiza nezrelih dendritičnih celic. Celice za imunofenotipsko analizo smo pripravili v številu 100 000–300 000 celic/100 μ L PBS. Celicam smo po navodilih proizvajalca dodali s fluorokromi konjugirana monoklonska protitelesa. Uporabili smo: s fluorescein izotiocianatom (FITC) označena anti-CD1c (Biolegend), anti-CD14 (Miltenyi Biotec), anti-CD16 in anti-HLA I (oba Invitrogen) protitelesa, z Alexa Fluor 488 označena anti-CD1a (Biolegend) protitelesa ter s fikoeritrinom (PE) označena anti-CD11b, anti-11c, anti-DC-SIGN (vsi Biolegend) in anti-HLA II (Miltenyi Biotec) protitelesa. Celice smo inkubirali v temi 20 minut na sobni temperaturi, nato pa smo jih sprali z DPBS in centrifugiranjem 3,5 minute pri 500g. Supernatant smo odstranili in celice resuspendirali v 200 μ L DPBS. Celice smo analizirali s pretočnim citometrom.

3.3 Analiza uspešnosti aktivacije in zorenja dendritičnih celic

Aktivacija nezrelih dendritičnih celic. 5 dni po nasaditvi CD14⁺ monocitov smo nezrele dendritične celice, ločeno za vsak medij, sprali iz plošče za celične kulture z uporabo DPBS. Po centrifugiranju 5 minut pri 500g smo celice resuspendirali v 10 mL DPBS in ponovno centrifugirali pod istimi pogoji. Supernatant smo odstranili in celice resuspendirali v ustreznem svežem mediju (1-odstotnem SF ali 10-odstotnem PL) v koncentraciji $0,5 \times 10^6$ – 1×10^6 celic/mL medija. Mediju smo dodali GM-CSF v končni

aktivnosti 800 U/mL nato pa celice nasadili na ploščo za celične kulture. Uporabili smo tri načine aktivacije, tako da smo celicam dodali različne kombinacije aktivatorjev in citokinov: 1. LPS v končni koncentraciji 20 ng/mL (Sigma Aldrich) / IFN- γ v končni aktivnosti 1000 U/mL (PeproTech); 2. TNF- α (PeproTech) v končni aktivnosti 1000 U/mL / IFN- α (PeproTech) v končni aktivnosti 3000 U/mL / poly I:C (Sigma Aldrich) v končni koncentraciji 20 μ g/mL; in 3. poly I:C v končni koncentraciji 20 μ g/mL / R848 (Sigma Aldrich) v končni koncentraciji 2,5 μ g/mL. Kot negativno kontrolo smo uporabili celice, ki jih nismo aktivirali. Celice smo gojili 24 h na 37 °C, nato pa smo jih ločeno (za vsak način aktivacije in oba medija) sprali iz plošče za celične kulture z uporabo DPBS, jih zbrali v centrifugirkah z volumnom 15 mL in analizirali z imunofenotipizacijo.

Imunofenotipska analiza zrelih dendritičnih celic. Celice za imunofenotipsko analizo smo pripravili v številu 100 000–300 000 celic/100 μ L DPBS in jim po navodilih proizvajalca dodali s fluorokromi konjugirana monoklonska protitelesa. Uporabili smo: s FITC označena anti-CD83 (Biolegend) in anti-CD86 (Miltenyi Biotec) protitelesa ter s PE označena anti-CD40, anti-CD80, anti-HLA II (vsi Miltenyi Biotec) in anti-CCR7 (Biolegend) protitelesa. Celice smo inkubirali v temi 20 minut na sobni temperaturi, nato pa smo jih sprali z DPBS in centrifugiranjem 3,5 minute pri 500g. Supernatant smo odstranili, celice resuspendirali v 200 μ L DPBS in jih analizirali s pretočnim citometrom.

Merjenje koncentracije IL-12p70. Za merjenje koncentracije IL-12p70 smo uporabili na zgoraj opisan način aktivirane dendritične celice. 24 h po aktivaciji smo pobrali 20 μ L supernatanta pri vsakem izmed načinov aktivacije dendritičnih celic, ga razredčili na končni volumen 200 μ L z DPBS in zamrznili na -20 °C do analize. Za merjenje koncentracije IL-12p70 smo uporabili reakcijski komplet CBA Kit (BD Biosciences). Po navodilih proizvajalca smo v epruvete odpipetirali 10 μ L vzorca, 10 μ L lovilnih protiteles in 10 μ L detekcijskega reagenta ter vzorce inkubirali v temi 3 h na sobni temperaturi. Po inkubaciji smo vzorce sprali z DPBS in centrifugiranjem 5 minut pri 200g. Supernatant smo odstranili s pipeto, tako da je v vsaki epruveti ostalo 100 μ L tekočine, nato pa dodali 150 μ L pufra iz reakcijskega kompleta. Vzorce smo analizirali s pretočnim citometrom in iz umeritvene krivulje, ki smo jo pripravili z analizo standardov, izračunali koncentracijo IL-12p70.

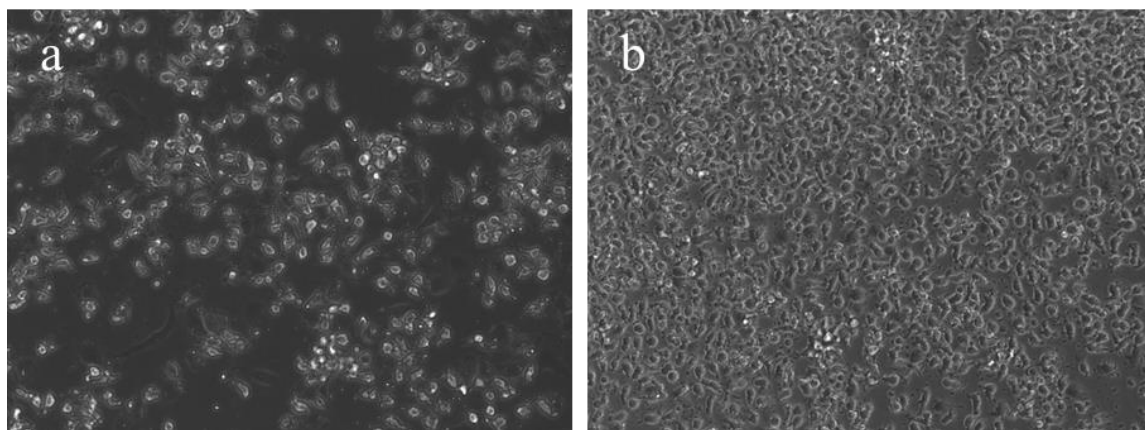
3.4 Statistične metode

Numerične rezultate smo statistično obdelali s programom Microsoft Office Excel 2010 ali s programom GraphPad Prism 7.04. Povprečne vrednosti in standardni odklon pridobljenih podatkov smo izračunali v programu Microsoft Office Excel 2010. Obstoje statističnih razlik med rezultati, pridobljenimi s poskusi na celicah, vzgojenih v 1-odstotni SF in 10-odstotni PL, smo preverili z neparnim Studentovim t-testom z izračunom p vrednosti v programu GraphPad Prism 7.04 (kadar je $p < 0,05$ pomeni, da obstajajo statistične razlike). Primerjali smo pare rezultatov iz posameznih poskusov (rezultate iz 1-odstotne SF in 10-odstotne PL).

4 Rezultati

4.1 Morfološka analiza nezrelih dendritičnih celic

Po 5 dneh gojenja so CD14⁺ monociti ob prisotnosti GM-CSF in IL-4 diferencirali v nezrele dendritične celice, kar je bilo razvidno iz morfoloških sprememb, ki smo jih opazili pod invertnim mikroskopom. Monocite okrogle oblike so nadomestile celice različnih nepravilnih oblik, ki so se začele pritjevati na podlago. Pridobile so tudi številne tanke citoplazemske izrastke. Iz slike 1 je razvidno, da je prišlo do spremembe v morfologiji tako pri celicah, diferenciranih v 1-odstotni SF (slika 1a), kot v 10-odstotni PL (slika 1b).

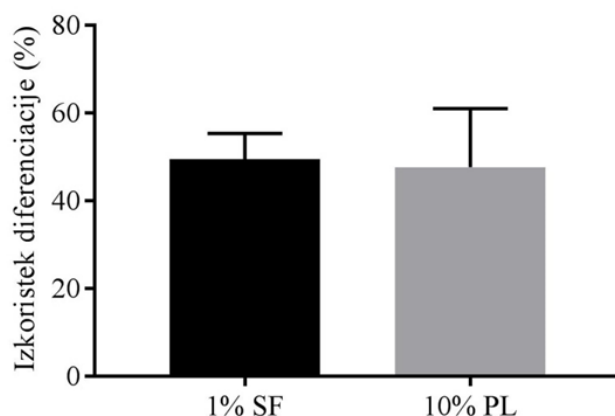


Slika 1: Morfologija nezrelih dendritičnih celic, diferenciranih iz monocitov. Sliki prikazujeta nezrele dendritične celice 5 dni po nasaditvi monocitov. Dendritične celice so bile diferencirane iz monocitov ob prisotnosti GM-CSF in IL-4 v brez-serumskem mediju CellGro z dodanim 1-odstotnim AB serumom (a) in mediju RPMI 1640 z dodanim 10-odstotnim trombocitnim lizatom (b).

4.2 Izkoristek diferenciacije dendritičnih celic

Za diferenciacijo monocitov v nezrele dendritične celice tako v 1-odstotni SF kot v 10-odstotni PL smo nasadili 10×10^6 monocitov v koncentraciji 5×10^6 celic/8 mL celičnega medija. Izkoristek diferenciacije dendritičnih celic v 1-odstotnem SF je bil $49,5 \pm 5,9$ %, izkoristek diferenciacije dendritičnih celic v 10-odstotnem PL pa $47,7 \pm 13,4$ %.

Z neparnim Studentovim t-testom smo izračunali p vrednost in dokazali, da ni statistične razlike med izkoristkom diferenciacije dendritičnih celic v enem in drugem mediju.

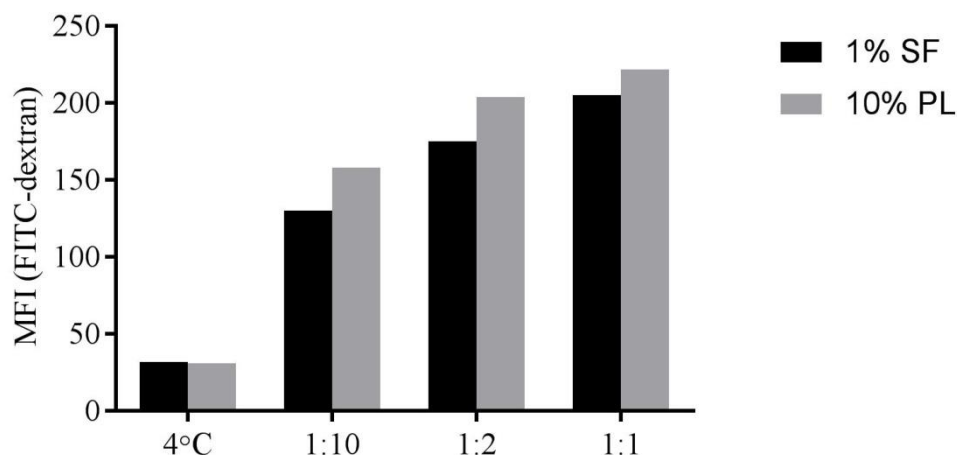


Slika 2: Izkoristek diferenciacije monocitov v nezrele dendritične celice. Prikazano je povprečje izkoristkov 6 ponovitev z izračunanim standardnim odklonom.

4.3 Endocitotske sposobnosti nezrelih dendritičnih celic

Ena izmed ključnih karakteristik nezrelih dendritičnih celic je njihova sposobnost aktivne endocitoze. S testiranjem endocitotskih sposobnosti nezrelih dendritičnih celic smo preverjali morebitne razlike v kakovosti diferenciacije monocitov v nezrele dendritične celice v 1-odstotni SF in 10-odstotni PL. Nezrele dendritične celice v obeh kulturah so aktivno endocitirale FITC-dextran, katerega količino smo izmerili s pretočnim citometrom. Rezultati so prikazani na sliki 3 kot srednje vrednosti intenzitete fluorescence (mean fluorescence intensity, MFI). Z večanjem koncentracije narašča tudi količina privzetega FITC-dextrana.

Z neparnim Studentovim t-testom smo dokazali, da ni statistične razlike v endocitotskih sposobnostih nezrelih dendritičnih celic diferenciranih v 1-odstotni SF ali 10-odstotni PL pri kateri koli redčitvi reagenta, vendar je zanesljivost tega podatka omejena, saj izračun temelji le na dveh ponovitvah poskusa.



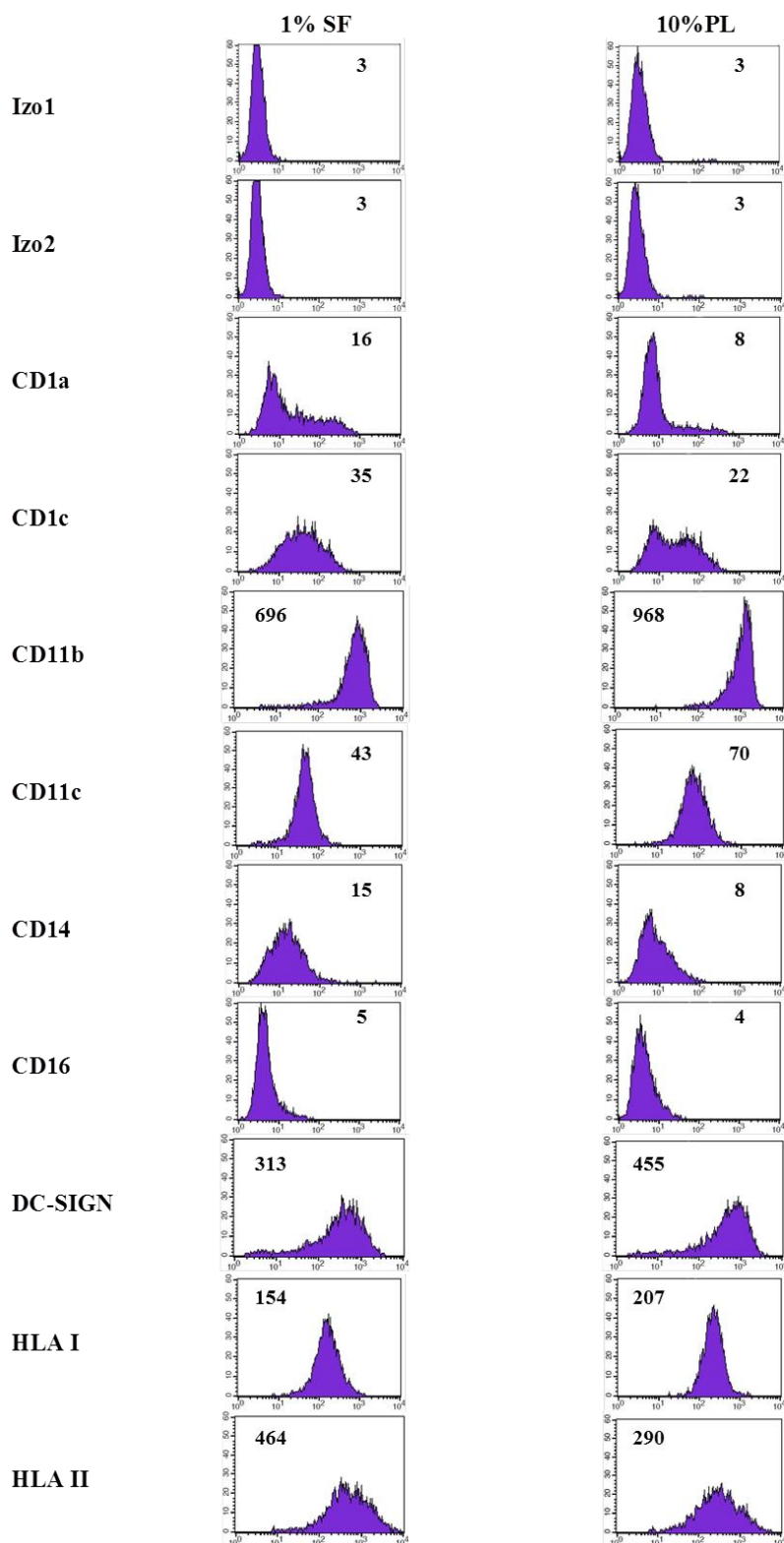
Slika 3: Endocitotske sposobnosti nezrelih dendritičnih celic. Slika prikazuje rezultate reprezentativne ponovitve poskusa, izražene kot MFI pri različnih redčitvah reagenta FITC-dextran (1 : 10, 1 : 2 in 1 : 1) v primerjavi z negativno kontrolo (4 °C).

4.4 Imunofenotipska analiza nezrelih dendritičnih celic

Za oceno uspešnosti diferenciacije dendritičnih celic iz monocitov smo primerjali fenotipske lastnosti nezrelih dendritičnih celic, diferenciranih v 1-odstotni SF ali 10-odstotni PL. Osredotočili smo se na površinske molekule, ki v kombinaciji omogočajo zanesljivo opredelitev nezrelih dendritičnih celic in njihovo razlikovanje od monocitov: CD1a, CD1c, CD11b, CD11c, CD14, CD16, DC-SIGN, HLA I in HLA II. Histogrami, ki predstavljajo rezultate imunofenotipske analize celic na pretočnem citometru, so prikazani na sliki 4.

Dendritične celice tekom diferenciacije iz monocitov začnejo v manjši meri izražati površinske molekule, značilne za monocite (CD14 in CD16), poveča pa se izražanje površinskih molekul, ki imajo pomembno vlogo pri funkciji dendritičnih celic in so zato bolj ali manj specifične za to celično vrsto (CD11c, DC-SIGN, molekule HLA). Iz histogramov na sliki 4 je razvidno, da dendritične celice, diferencirane iz monocitov, tako v 1-odstotni SF kot 10-odstotni PL izražajo nizke količine CD16, medtem ko je izražanje CD14 nekoliko višje. Izražanje vseh ostalih analiziranih površinskih molekul je po pričakovanjih visoko in primerljivo med celicami, vzgojenimi v obeh medijih.

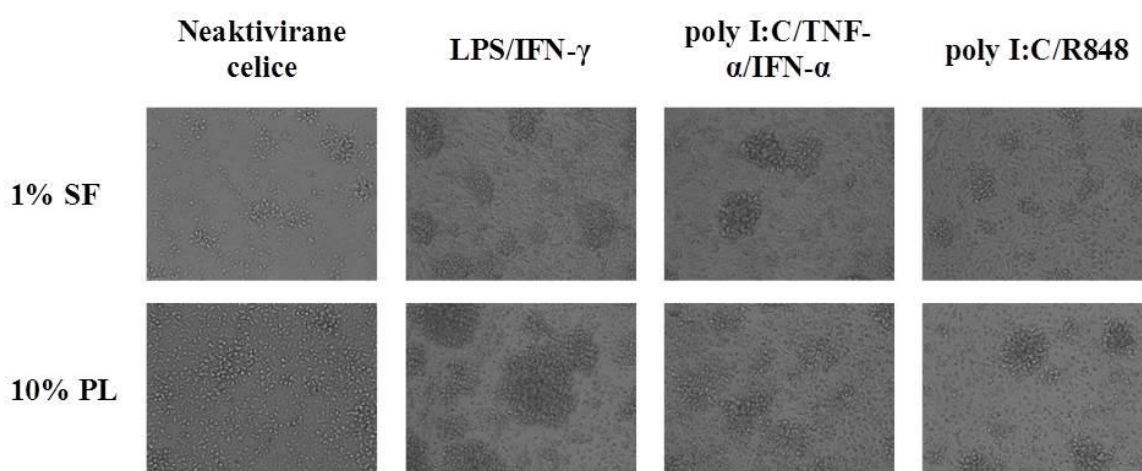
Pridobljene rezultate smo analizirali z neparnim Studentovim t-testom in z izračunom p vrednosti dokazali, da ni statističnih razlik v fenotipskih lastnostih nezrelih dendritičnih celic, ki so bile diferencirane v 1-odstotni SF ali 10-odstotni PL.



Slika 4: Imunofenotipska analiza nezrelh dendritičnih celic. Histogrami prikazujejo porazdelitev števila nezrelh dendritičnih celic v odvisnosti od intenzitete fluorescence konjugiranega protitelesa za posamezno površinsko molekulo. Pri vsakem histogramu je pripisana tudi vrednost MFI. Izo1 in Izo2 predstavljata izotipsko (neoznačeno) populacijo za oba kanala, ki smo ju uporabili za detekcijo protiteles (Izo1 – kanal za detekcijo protiteles, konjugiranih s FITC, in Izo2 – kanal za detekcijo protiteles, konjugiranih s PE).

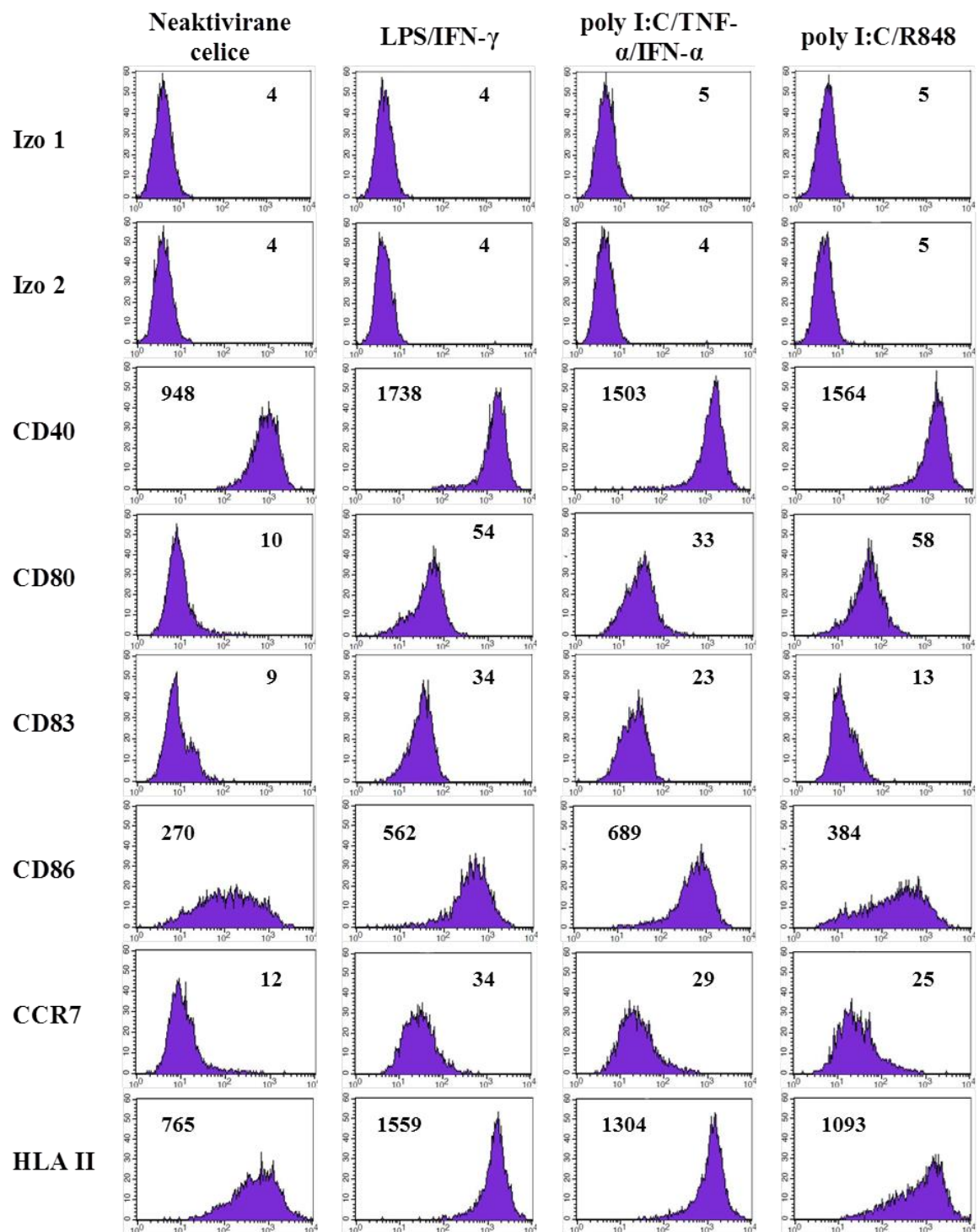
4.5 Morfološka in imunofenotipska analiza zrelih dendritičnih celic

Nezrele dendritične celice diferencirane iz monocitov smo 5. dan po nasaditvi monocitov aktivirali z uporabo treh različnih kombinacij aktivatorjev zorenja in citokinov ter dodatno 24-urno inkubacijo na 37 °C. Uspešnost dozorevanja dendritičnih celic v odvisnosti od načina aktivacije in uporabljenega celičnega medija (1-odstotni SF ali 10-odstotni PL) smo 24 h po aktivaciji analizirali z opazovanjem sprememb njihovih morfoloških lastnosti pod invertnim mikroskopom (slika 5) ter z merjenjem količine površinskih molekul, ki so značilne za zrele dendritične celice: CD40, CD80, CD83, CD86, CCR7 in HLA II. Na slikah 5, 6 in 7 so prikazani rezultati reprezentativne ponovitve poskusa.

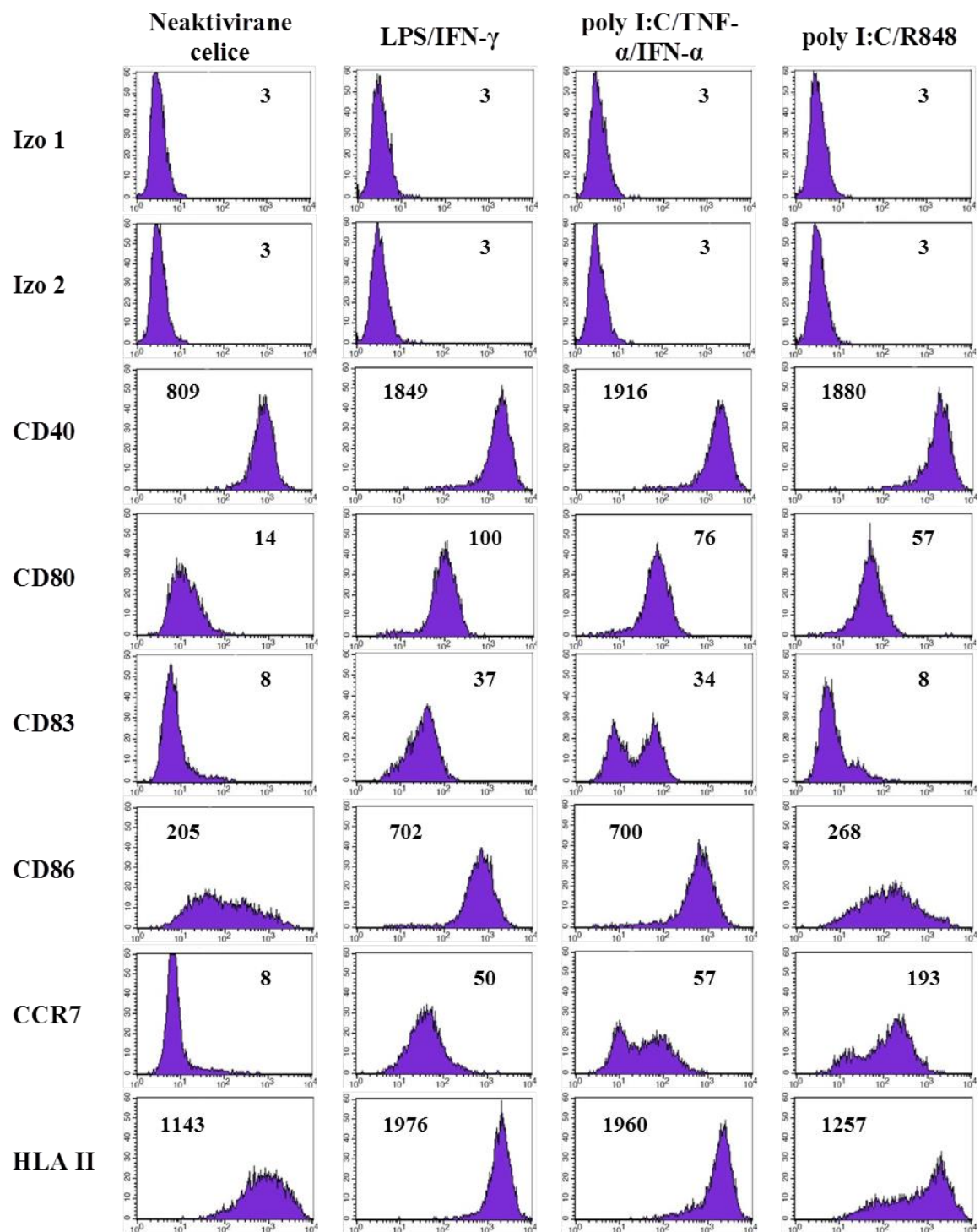


Slika 5: Morfologija aktiviranih dendritičnih celic. Nezrele dendritične celice, diferencirane iz monocitov, smo aktivirali na tri različne načine in pri tem uporabili dva različna celična medija – 1-odstotni SF in 10-odstotni PL. V vsakem izmed medijev smo gojili tudi populacijo dendritičnih celic, ki jih nismo aktivirali in so služile kot negativna kontrola (neaktivirane celice). Slike smo pridobili z uporabo invertnega mikroskopa.

Kot je vidno na sliki 5, so se aktivirane celice 24 h po aktivaciji odlepile od podlage in začele tvoriti skupke, kar je značilno za proces dozorevanja dendritičnih celic v *in-vitro* pogojih. Vidni so bili tudi številni vretenasti citoplazemski izrastki. Pri kontrolni, neaktivirani populaciji, so ostale celice v večji meri pritrjene na podlago in niso tvorile skupkov. Morfološke spremembe, značilne za zrele dendritične celice, smo opazili tako pri celicah, aktiviranih v 1-odstotni SF, kot v 10-odstotni PL.



Slika 6: Imunofenotipska analiza zrelih dendritičnih celic, diferenciranih in aktiviranih v 1-odstotni SF. Nezrele dendritične celice, diferencirane iz monocitov v 1-odstotni SF, smo aktivirali na tri različne načine in analizirali fenotip aktiviranih celic v primerjavi s kontrolno, neaktivirano populacijo. Pri vsakem histogramu je pripisana vrednost MFI za posamezno površinsko molekulo. Izo 1 in Izo 2 predstavljata izotipsko (neoznačeno) populacijo.

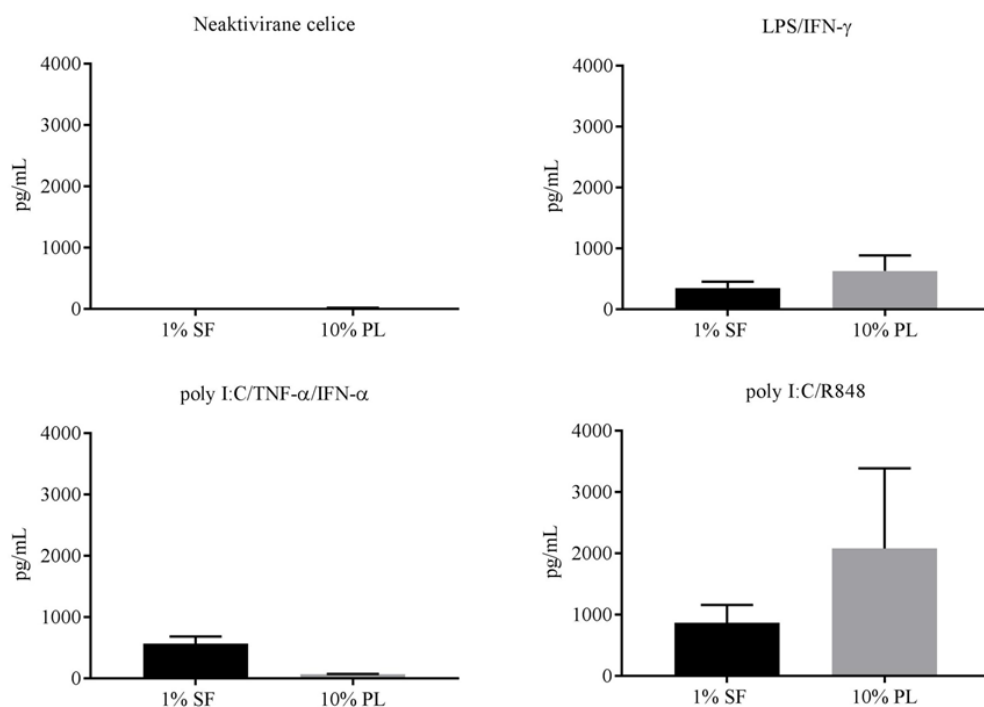


Slika 7: Imunofenotipska analiza zrelih dendritičnih celic, diferenciranih in aktiviranih v 10-odstotni PL. Nezrele dendritične celice, diferencirane iz monocitov v 1-odstotni SF, smo aktivirali na tri različne načine in analizirali fenotip aktiviranih celic v primerjavi s kontrolno, neaktivirano populacijo. Pri vsakem histogramu je pripisana vrednost MFI za posamezno površinsko molekulo. Izo 1 in Izo 2 predstavljata izotipsko (neoznačeno) populacijo.

Z imunofenotipsko analizo zrelih dendritičnih celic smo ugotovili, da dendritične celice, diferencirane in aktivirane v 10-odstotni PL, na svoji površini izražajo molekule, ki jih povezujemo z zrelim fenotipom v enaki meri kot celice, vzgojene v 1-odstotni SF. V primerjavi z nezrelimi dendritičnimi celicami (neaktivirane celice) se je količina vseh analiziranih površinskih molekul tako pri dendritičnih celicah iz 1-odstotne SF kot 10-odstotne PL povečala pri vseh načinih aktivacije, razen količina CD83 na celicah, aktiviranih s poly I:C/R848 v obeh celičnih medijih. Rezultati kažejo, da 10-odstotni PL v enaki meri kot 1-odstotni SF omogoča nastanek zrelih dendritičnih celic z ustreznim fenotipskim profilom ne glede na način aktivacije

4.6 Merjenje količine citokinov

Sposobnost sinteze in izločanja vnetnih citokinov je ena izmed ključnih lastnosti zrelih dendritičnih celic, na katero je vezana tudi uspešnost imunoterapije raka s cepivi na osnovi dendritičnih celic. Iz tega razloga je opredelitev sposobnosti dendritičnih celic, diferenciranih in aktiviranih v 10-odstotni PL, da izločajo citokine, temeljni del našega raziskovalnega dela. V ta namen smo v supernatantih, zbranih 24 h po aktivaciji nezrelih dendritičnih celic, izmerili koncentracijo IL-12p70, ki je med vnetnimi citokini najpomembnejši pri proti-tumorskem imunskem odzivu, saj je glavni citokin, ki inducira Th1 T-celični odziv. Nezrele dendritične celice, diferencirane iz monocitov v 1-odstotni SF ali 10-odstotni PL, smo aktivirali na tri različne načine in kot negativno kontrolo uporabili neaktivirano populacijo celic iz vsakega celičnega medija. Rezultati, izraženi kot koncentracije IL-12p70, so prikazani na sliki 8.



Slika 8: Koncentracija sproščenega IL-12p70 po aktivaciji dendritičnih celic. Z dodatkom treh različnih kombinacij aktivatorjev zorenja (LPS/IFN- γ , poly I:C/TNF- α /IFN- α in poly I:C/R848) smo stimulirali nezrele dendritične celice diferencirane iz monocitov v 1-odstotni SF ali 10-odstotni PL in v supernatantih, pobranih 24 h po aktivaciji, izmerili koncentracijo IL-12p70. Kot kontrolno populacijo smo uporabili celice, ki jim nismo dodali aktivatorjev zorenja (neaktivirane celice). Prikazane so povprečne vrednosti koncentracij IL-12p70 dveh ponovitev z izračunanimi standardnimi odkloni.

Kot je razvidno iz slike 8 je koncentracija IL-12p70 v primerjavi z negativno kontrolo narastla v vseh vzorcih, kar pomeni, da smo v postopku diferenciacije in aktivacije dendritičnih celic tako v 1-odstotni SF kot 10-odstotni PL pridobili funkcionalne, zrele celice, sposobne sinteze in izločanja citokinov. Sicer vidimo, da so prisotne razlike v koncentraciji proizvedenega IL-12p70 med različnimi kombinacijami uporabljenega celičnega medija in načina aktivacije nezrelih dendritičnih celic, vendar je zaradi majhnega števila ponovitev poskusa težko opredeliti, ali so te razlike statistično pomembne. Na podlagi pridobljenih rezultatov smo z neparnim Studentovim t-testom dokazali statistično razliko v koncentraciji IL-12p70 le v enem primeru: med dendritičnimi celicami, diferenciranimi in aktiviranimi v 1-odstotni SF in 10-odstotni PL s poly I:C/TNF- α /IFN- α . Kot že omenjeno, pa je zaradi majhnega števila ponovitev moč uporabljenega testa majhna.

5 Razprava

Dendritične celice že od odkritja njihove vloge pri regulaciji delovanja imunskega sistema predstavljajo pomemben člen v razvoju pripravkov, namenjenih imunoterapiji rakavih bolezni s cepivi na osnovi dendritičnih celic. Pomemben del razvoja tovrstnih celičnih pripravkov je protokol njihove priprave, kamor sodijo tudi pogoji gojenja in natančna opredelitev lastnosti celic, ki se bodo uporabile za pripravo celičnih cepiv. Osnova za učinkovito in varno celično cepivo je priprava zadostnega števila morfološko in funkcionalno ustreznih dendritičnih celic. Danes se za pripravo dendritičnih celic uporabljajo predvsem postopki diferenciacije monocitov v dendritične celice ob dodatku GM-CSF in IL-4, prihaja pa do razlik v uporabi celičnih medijev in njihovih dodatkov. Ker najnovejše smernice priprave celičnih cepiv zahtevajo izogibanje dodatkom živalskega izvora, je v procesu testiranja veliko dodatkov, s katerimi se želimo pri uspešnosti gojenja morfološko in funkcionalno ustreznih celic približati FBS. Eden izmed teh je tudi humani trombocitni lizat, za katerega se je v že izvedenih študijah izkazalo, da omogoča proliferacijo in diferenciacijo različnih celičnih vrst ter ne vsebuje molekul (predvsem proteinov, kot npr. serum), ki bi lahko vplivale na lastnosti gojenih celic. V našem raziskovalnem delu smo opredelili kakovost dendritičnih celic diferenciranih in aktiviranih v 10-odstotni PL v primerjavi z že uveljavljenim 1-odstotnim SF.

5.1 Morfološke spremembe in izkoristek diferenciacije

10-odstotni PL ob dodatku GM-CSF in IL-4 omogoča diferenciacijo monocitov v nezrele dendritične celice s tipičnimi morfološkimi značilnostmi. Poskus, v katerem smo na ploščo za celične kulture nasadili monocyte ob uporabi 1-odstotnega SF in 10-odstotnega PL in dodatku GM-CSF in IL-4 smo ponovili desetkrat in v vseh primerih prišli do enakih opažanj. Tako monociti, nasajeni v 1-odstotni SF, kot tisti v 10-odstotni PL, so v 5 dneh gojenja na 37 °C diferencirali v dendritične celice, pri čemer se je značilno spremenila njihova morfologija. Okrogla oblika monocitov je postopoma prešla v nepravilno »krompirjasto« obliko dendritičnih celic s številnimi tankimi citoplazemskimi izrastki. Celice v obeh medijih so bile v enakem deležu pritrjene na podlago in enakomerno razporejene po celotnem gojišču. Tudi izkoristek diferenciacije dendritičnih celic iz monocitov je bil v obeh pogojih gojenja podoben in ponovljiv.

5.2 Endocitotske sposobnosti nezrelih dendritičnih celic

Ena izmed glavnih nalog nezrelih dendritičnih celic je privzemanje in procesiranje tujih in telesu lastnih antigenov, ki jih pozneje v sekundarnih limfatičnih organih predstavljajo naivnim limfocitom. Sposobnost endocitoze je tako temeljna lastnost uspešno diferenciranih funkcionalnih nezrelih dendritičnih celic. Kot je prikazano na sliki 3, so imele v obeh celičnih medijih diferencirane nezrele dendritične celice močno izraženo endocitotsko sposobnost in so tudi pri visoki redčitvi reagenta privzele bistveno večje količine fluorescentnega barvila kot celice, ki smo jih uporabili kot negativno kontrolo in jih v ta namen inkubirali na ledu. Dokazali smo, da ni statističnih razlik v endocitotskih sposobnostih med dendritičnimi celicami, diferenciranimi v 1-odstotni SF ali 10-odstotni PL, kljub temu pa je za namen našega raziskovalnega dela zanimivo opažanje, da so celice, diferencirane v 10-odstotni PL, izkazale v povprečju 16 % večjo endocitotsko aktivnost kot celice, diferencirane v 1-odstotni SF.

5.3 Imunofenotipska analiza nezrelih dendritičnih celic

Po morfološki opredelitvi in analizi funkcionalnosti nezrelih dendritičnih celic, diferenciranih iz monocitov ob prisotnosti trombocitnega lizata, smo ocenili še njihove fenotipske lastnosti. Na osnovi pregledane literature smo za analizo izbrali površinske molekule, za katere je značilno, da so oz. niso izražene na površini nezrelih dendritičnih celic. V obeh medijih diferencirane celice so izražale zelo podoben fenotipski profil. Po pričakovanjih so bile na celicah, diferenciranih tako v 1-odstotni SF kot 10-odstotni PL, le v majhni meri izražene molekule, značilne za monocite, CD14 in CD16, izmerili pa smo visoko izražanje molekul CD11b, CD11c, DC-SIGN, HLA I in HLA II. Količina CD1a je bila pri celicah, diferenciranih v obeh medijih, nizka. Razlog za to je lahko v enoti krvi, ki smo jo uporabili za izolacijo monocitov, iz katerih smo diferencirali dendritične celice. Monociti lahko kljub izpostavitvi enakim pogojem diferencirajo v dva podtipa dendritičnih celic, ki se razlikujeta v prisotnosti CD1a molekule ($CD1a^{+}$ in $CD1a^{-}$ populacija dendritičnih celic), razmerje med obema podtipoma pa lahko variira med posamezniki (delež $CD1a^{+}$ dendritičnih celic lahko variira od 36 % do 81 %) [22]. Drug, bolj verjeten razlog za nizko izražanje CD1a, pa je izbira gojitvenega medija. Znano je, da je CD1a visoko izražen na dendritičnih celicah, vzgojenih v RPMI z dodatkom 10-odstotnega FBS, v brez-serumskih medijih pa je izražanje nižje [21]. Možno je, da dendritične celice, vzgojene v mediju z dodatkom trombocitnega lizata, podobno kot tiste, vzgojene v brez-

serumskih medijih, izražajo nizke količine CD1a. Da bi bili povsem prepričani o razlogu za nizko izmerjeno količino CD1a, bi morali pri nadaljnjih ponovitvah poskusa narediti še primerjavo s celicami, vzgojenimi v RPMI z dodatkom 10-odstotnega FBS.

Na osnovi pridobljenih rezultatov morfološke analize, preverjanja endocitotskih sposobnosti in opredelitve fenotipa nezrelih dendritičnih celic, diferenciranih iz monocitov ob prisotnosti trombocitnega lizata, lahko sklepamo, da trombocitni lizat omogoča nastanek morfološko, funkcionalno in fenotipsko ustreznih nezrelih dendritičnih celic, ki dosegajo predlagana merila za uporabo v cepivih oz. so primerni kandidati za nadaljnjo obravnavo v postopku priprave proti-tumorskih cepiv.

5.4 Morfološka in imunofenotipska analiza zrelih dendritičnih celic

Ker za izdelavo cepiv na osnovi dendritičnih celic uporabljajo zrele dendritične celice, smo v naslednjem koraku naših poskusov analizirali optimalen način aktivacije dendritičnih celic. V ta namen smo zrele dendritične celice, diferencirane iz monocitov v 1-odstotni SF ali 10-odstotni PL, aktivirali na tri različne načine, in sicer z uporabo različnih kombinacij aktivatorjev, za katere je znano, da sprožijo zorenje dendritičnih celic in vnetnih citokinov: LPS/IFN- γ , poly I:C/TNF- α /IFN- α in poly I:C/R848. Uspešnost aktivacije in dozorevanja dendritičnih celic smo ocenili na tri načine: z oceno morfologije zrelih dendritičnih celic, z imunofenotipsko analizo površinskih molekul in merjenjem sposobnosti izločanja IL-12p70.

Ko smo 24 h po stimulaciji nezrelih dendritičnih celic pod invertnim svetlobnim mikroskopom analizirali morfologijo nastalih celic, smo opazili bistvene razlike med celicami, ki smo jih aktivirali, in celicami, ki smo jih uporabili kot kontrolno populacijo in jim nismo dodali aktivatorjev. V obeh celičnih medijih so celice, ki smo jim dodali aktivatorje, tvorile skupke, ki so bili slabo ali pa sploh ne pritrjeni na podlago gojišča. Slabo pritrjeni skupki, ki so značilni za proces zorenja dendritičnih celic, so bili vidni pri vseh načinih aktivacije, zato samo na podlagi opazanj pod invertnim svetlobnim mikroskopom nismo uspeli oceniti najuspešnejšega načina aktivacije dendritičnih celic.

Poskus smo nadaljevali z imunofenotipsko analizo površinskih molekul zrelih dendritičnih celic, katere namen je bil opredeliti, ali diferencirane in pozneje aktivirane dendritične celice ob prisotnosti trombocitnega lizata izražajo molekule, ki ustrezajo fenotipskemu profilu zrelih dendritičnih celic. Ločeno smo določili fenotip na različne načine aktiviranih celic in tako analizirali primernost trombocitnega lizata za nastanek dendritičnih celic z

ustreznimi fenotipskimi lastnostmi v povezavi z načinom aktivacije, ki omogoči najuspešnejšo dozorevanje dendritičnih celic (sliki 6 in 7). Porast količine površinskih molekul tekom dozorevanja smo analizirali v primerjavi z dendritičnimi celicami, ki smo jih ohranili v nezrelem stanju. Ugotovili smo, da dodatek trombocitnega lizata omogoča dozorevanje dendritičnih celic in nastanek zrelih dendritičnih celic s popolnoma izraženim zrelim fenotipom v enaki meri kot humani AB serum. Različni načini aktivacije so sicer vodili v nastanek zrelih dendritičnih celic z minimalnimi razlikami v količini površinsko izraženih molekul, vsi pa so omogočili popolno dozorevanje celic. Najmanjši porast v količini izražanja površinskih molekul glede na nezrele dendritične celice smo izmerili pri določanju CD83 na celicah, aktiviranih s poly IC/R848 v obeh celičnih medijih. CD83 je površinska molekula, ki je v majhni meri prisotna tudi na nezrelih dendritičnih celicah, tekom dozorevanja pa se njeno izražanje močno poveča. Rezultati raziskav kažejo, da ima CD83 na površini zrelih dendritičnih celic pomembno vlogo pri stimulaciji proliferacije CD4⁺ in CD8⁺ limfocitov T ter pri stimulaciji sproščanja IFN- γ iz tumorje infiltrirajočih limfocitov (tumor-infiltrating lymphocytes, TIL). Majhna količina ali odsotnost CD83 na površini dendritičnih celic vodi v zmanjšanje stimulacije limfocitov T, zmanjšanje sproščanja IFN- γ iz TIL in zmanjšano aktivnost specifičnih CTL [23]. Ker želimo za pripravo celičnih cepiv uporabiti dendritične celice, ki bodo aktivno stimulirale limfocite T in sprožile močan proti-tumorski odziv, bi bilo bolje uporabiti celice, aktivirane z LPS/IFN- γ ali poly I:C/TNF- α /IFN- α , ki v večji meri izražajo CD83. Gledano na celotno sliko so tudi ostale analizirane površinske molekule v nekoliko večji meri izražene na površini dendritičnih celic, stimuliranih na omenjena načina. Pomemben podatek, razviden iz rezultatov poskusa, je tudi visoko izražanje kostimulatornih molekul CD80 in CD86, brez katerih dendritične celice ne morejo aktivirati limfocitov T. Izražanje CD80 in CD86 je na dendritičnih celicah, vzgojenih in na različne načine aktiviranih v 10-odstotni PL, enako ali celo višje kot na celicah iz 1-odstotne SF. Najvišje količine omenjenih kostimulatornih molekul na dendritičnih celicah, vzgojenih v 10-odstotni PL, smo izmerili v primeru, ko smo celice aktivirali z LPS/IFN- γ , zato sklepamo, da je ta način aktivacije dendritičnih celic najprimernejši.

5.5 Merjenje količine citokinov

Sposobnost izločanja vnetnih citokinov, ki predstavljajo tretji signal pri aktivaciji limfocitov T in usmerijo imunski odziv bodisi v Th1 ali Th2 smer, je temeljna lastnost

zrelih dendritičnih celic, ki jo morajo imeti tudi kadar pripravljamo cepiva na osnovi dendritičnih celic. Pri proti-tumorskem imunskem odzivu je ključen IL-12p70, ki je glavni stimulator Th1 celičnega odziva in zato ključen citokin, ki ga dendritične celice, injicirane v organizem v obliki cepiva, sproščajo v tumorskem okolju. S predhodnimi poskusi smo dokazali, da ob prisotnosti trombocitnega lizata nastanejo ustrezne nezrele dendritične celice, ki jih lahko aktiviramo in dosežemo nastanek morfološko ter fenotipsko primernih dendritičnih celic. Da bi dokončno opredelili, ali je trombocitni lizat primeren dodatek celičnemu mediju, ki omogoča nastanek ne le fenotipsko ustreznih, temveč tudi popolnoma funkcionalnih dendritičnih celic, smo v supernatantih celičnih medijev, v katerih smo aktivirali dendritične celice z dodatkom treh različnih kombinacij aktivatorjev zorenja in citokinov, izmerili koncentracije IL-12p70, ki so ga proizvedle dendritične celice med dozorevanjem po 24 urah. Porast koncentracije IL-12p70 pri različnih načinih aktivacije smo ponovno analizirali glede na koncentracijo IL-12p70, proizvedenega iz strani nezrelih dendritičnih celic, ki smo jih uporabili kot negativno kontrolno populacijo. Opazili smo večje razlike v koncentraciji IL-12p70 glede na uporabljen celični medij in način aktivacije. V obeh celičnih medijih so največ citokina proizvedle celice, aktivirane s poly I:C/R848, in sicer celice, diferencirane in aktivirane v 10-odstotni PL, kar dvakrat več kot celice iz 1-odstotne SF. Najnižjo koncentracijo IL-12p70 smo izmerili v supernatantu celic, diferenciranih v 10-odstotni PL ter aktiviranih s poly I:C/TNF- α /IFN- α , in sicer desetkrat nižjo kot v supernatantu na enak način aktiviranih dendritičnih celic v 1-odstotnem SF. Dendritične celice, aktivirane z LPS/IFN- γ v obeh medijih, so proizvedle primerljive koncentracije IL-12p70, spet pa je bila koncentracija citokina pri celicah iz 10-odstotnega PL približno dvakrat višja kot pri celicah iz 1-odstotnega SF. Dodatek trombocitnega lizata torej omogoča nastanek zrelih dendritičnih celic, sposobnih sinteze in izločanja IL-12p70 v podobnem obsegu kot humani AB serum, le da celic zaradi nizke koncentracije IL-12p70 ne smemo aktivirati s poly I:C/TNF- α /IFN- α . Intenzivnost sproščanja IL-12p70 je v organizmu močno pod vplivom interakcije med receptorjem CD40 na površini dendritičnih celic in ligandom CD40 na površini aktiviranih limfocitov T. Smiselno bi bilo analizirati sproščanje IL-12p70 iz zrelih dendritičnih celic po izpostavitvi ligandu CD40, da bi imeli boljšo predstavbo o tem, kako se bodo dendritične celice odzvale, ko bodo po injiciranju nazaj v bolnika prišle v stik z ligandom CD40 na limfocitih T. To smo tudi poskusili, vendar so bile vse ponovitve poskusa neuspešne. Po sistematičnem izločanju potencialnih razlogov za neuspeh, kot je npr. neučinkovitost reagenta zaradi pretečenega roka uporabe

ali človeška napaka pri izvajanju poskusa, smo pozornost usmerili v iskanje vzrokov v sami populaciji dendritičnih celic. Primerjali smo fenotipske lastnosti nezrelih dendritičnih celic, ki smo jih kasneje aktivirali in uporabili za restimulacijo z ligandom CD40 ter ugotovili, da smo pri kar dveh ponovitvah delali s populacijo celic, ki je izražala majhno količino CD1a, CD1a⁺ populacija dendritičnih celic pa je tista, ki jo povezujemo z visoko produkcijo IL-12p70 [22]. Kljub temu pa ne moremo zaključiti, da je neuspel poskus oz. nizka izmerjena koncentracija citokina posledica izbrane populacije celic, saj obstajajo poročila, ki kažejo, da tudi celice z nizkim izražanjem molekule CD1a sproščajo visoke količine IL-12p70 [24]. Najverjetnejši razlog za neuspehi poskus tiči v tehnični izvedbi poskusa. Reagent za restimulacijo dendritičnih celic z ligandom CD40 je sestavljen iz dveh komponent: rekombinantnega humanega liganda CD40 in protiteles, ki omogočajo nastanek multipleksov liganda CD40, kar poveča učinkovitost reagenta. Obe komponenti smo hranili po navodilih proizvajalca (protitelesa na 4 °C, ligand CD40 v zamrzovalniku), kljub temu pa lahko dolgotrajno hranjenje in pogosto odmrzovanje ter ponovno zamrzovanje privede do zmanjšane učinkovitosti reagenta ter posledično neuspešne restimulacije dendritičnih celic, kar vodi v nizko produkcijo citokinov. Da bi preverili, ali je neuspehi poskus posledica neučinkovitosti reagenta zaradi predolgega shranjevanja in prepogostega odmrzovanja/zamrzovanja, bi morali poskus ponoviti pod popolnoma enakimi pogoji, le da bi uporabili svež reagent.

6 Sklep

Trombocitni lizat omogoča uspešno diferenciacijo monocitov v nezrele dendritične celice s specifičnimi morfološki značilnostmi in izraženimi površinskimi molekulami, ki ustrezajo fenotipskemu profilu nezrelih dendritičnih celic ter kažejo visoke endocitotske sposobnosti. Omogoča tudi nadaljnjo aktivacijo nezrelih dendritičnih celic in njihovo popolno zorenje do nastanka zrelih dendritičnih celic z izraženimi molekulami, ki sodelujejo pri predstavitvi antigenov (HLA), kemokinskimi receptorji, ki v organizmu usmerijo dendritične celice v sekundarne limfatične organe (CCR7), kostimulacijskimi molekulami, ki so nujne za aktivacijo limfocitov T (CD80, CD83, CD86) ter molekulami, ki jim v organizmu omogočajo komunikacijo z drugimi celicami (CD40). Sposobne so sinteze in sproščanja IL-12p70, vendar je koncentracija sproščenega citokina odvisna od načina aktivacije. Trombocitni lizat je serumski dodatek ne-ksenogenskega izvora, ki je popolnoma enakovreden humanemu AB serumu in omogoča nastanek dendritičnih celic z lastnostmi, ki ustrezajo merilom za uporabo v cepivih na osnovi dendritičnih celic. Vsebuje številne rastne dejavnike, ki ugodno vplivajo na diferenciacijo in zorenje dendritičnih celic, ki jih humani AB serum ne vsebuje in podobno kot pri humanem AB serumu lahko do neke mere standardiziramo postopek njegove priprave. Popolna standardizacija zaradi biološke variabilnosti med darovalci tako pri pripravi humanega AB seruma kot trombocitnega lizata ni mogoča, lahko pa se ji približamo in tako dosežemo boljšo ponovljivost med posameznimi ponovitvami. Do sedaj izvedene raziskave o uporabi trombocitnega lizata kot dodatka mediju za gojenje dendritičnih celic, namenjenih pripravi proti-tumorskih cepiv, so prinesle spodbudne rezultate, vendar na njihovi osnovi še ne moremo sklepati, ali je njegova uporaba bolj smiselna, kakor uporaba AB seruma. Trenutno še ne znamo izkoristiti polnega potenciala dendritičnih celic v terapevtske namene. Šele z natančno opredelitvijo funkcionalnih lastnosti dendritičnih celic v povezavi z njihovimi morfološki in fenotipski lastnostmi ter poznavanjem vseh faktorjev in dejavnikov, ki vplivajo na njihovo diferenciacijo iz monocitov ter zorenje v zrele dendritične celice, bomo lahko optimizirali postopek njihove priprave in ugotovili, kateri dodatek k mediju za gojenje dendritičnih celic omogoča razvoj za imunoterapijo najbolj primernih dendritičnih celic.

7 Viri

- [1] Steinman RM. Dendritic cells: Understanding Immunogenicity. *European Journal of Immunology*. 2007; 37: 53–60
- [2] Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *Journal of Experimental Medicine*. 1973; 137: 1142–62.
- [3] Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *Journal of Experimental Medicine*. 1974; 139: 380–97.
- [4] Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. V. Purification of Spleen Dendritic Cells, New Surface Markers, and Maintenance In Vitro. *Journal of Experimental Medicine*. 1979; 149: 1–16.
- [5] Steinman RM, Witmer MD. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1978; 75: 5132–5136.
- [6] Steinman RM. Decisions About Dendritic Cells: Past, Present and Future. *Annual Review of Immunology*. 2012; 30: 1–22.
- [7] Schuler G, Steinman RM. Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *Journal of Experimental Medicine*. 1985; 161: 526–46.
- [8] Witmer-Pack MD, Olivier W, Valinsky J, Schuler G, Steinman RM. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor is essential for the viability and function of cultured murine epidermal Langerhans cells. *Journal of Experimental Medicine*. 1987; 166: 1484–98.
- [9] Romani N, Koide S, Crowley M, Witmer-Pack M, Livingstone AM, Fathman CG, Inaba K, Steinman RM. Presentation of exogenous protein antigens by dendritic cells to T cell clones. Intact protein is presented best by immature, epidermal Langerhans cells. *Journal of Experimental Medicine*. 1989; 169: 1169–78.
- [10] Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, Muramatsu S, Steinman RM. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *Journal of Experimental Medicine*. 1992; 176: 1693–702.

- [11] 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. *Journal of Experimental Medicine*. 1994; 179: 1109–18.
- [12] Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *Journal of Experimental Medicine*. 1995; 182: 389–400.
- [13] Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998; 392: 245–52.
- [14] Fujii S, Liu K, Smith C, Bonito AJ, Steinman RM. The Linkage of Innate to Adaptive Immunity via Maturing Dendritic Cells In Vivo Requires CD40 Ligation in Addition to Antigen Presentation and CD80/86 Costimulation. *Journal of Experimental Medicine*. 2004; 199: 1607–1618.
- [15] Schuler G, Steinman RM. Dendritic Cells as Adjuvants for Immune-mediated Resistance to Tumors. *Journal of Experimental Medicine*. 1997; 186: 1183–1187.
- [16] Ahmed MS, Bae YS. Dendritic cell-based therapeutic cancer vaccines: past, present and future. *Clinical and Experimental Vaccine Research*. 2014; 3: 113–116.
- [17] Figdor CG, De Vries JM, Lesterhuis WJ, Melief CJ. Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nature Medicine*. 2004; 10: 475–480.
- [18] Toldbod HE, Agger R, Bolund L, Hokland M. Potent Influence of Bovine Serum Proteins in Experimental Dendritic Cell-Based Vaccination Protocols. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2003; 58: 4–50.
- [19] Tarte K, Fiol G, Rossi JF, Klein B. Extensive characterization of dendritic cells generated in serum-free conditions: regulation of soluble antigen uptake, apoptotic tumor cell phagocytosis, chemotaxis and T cell activation during maturation in vitro. *Leukemia*. 2000; 14: 2182–2192.
- [20] Rauch C, Feifel E, Amann EM, Spotl HP, Schennach H, Pfaller W, Gstraunthaler G. Alternatives to the Use of Fetal Bovine Serum: Human Platelet Lysates as a Serum Substitute in Cell Culture Media. *ALTEX*. 2011; 28: 305–16.
- [21] Švajger U. Human platelet lysate is a successful alternative serum supplement for propagation of monocyte-derived dendritic cells. *Cytotherapy*. 2017; 19: 486–499.

- [22] Cernadas M, Lu J, Watts G, Brenner MB. CD1a expression defines an interleukin-12 producing population of human dendritic cells. *Clinical & Experimental Immunology*. 2009; 155: 52–533.
- [23] Aerts-Toegaert C, Heirman C, Tuyaerts S, Corthals J, Aerts JL, Bonehill A, Thielemans K, Breckpot K. CD83 expression on dendritic cells and T cells: Correlation with effective immune responses, *European Journal of Immunology*. 2007; 37: 686–95.
- [24] Muller-Berghaus J, Olson WC, Moulton RA, Knapp WT, Schadendorf D, Storkus WJ. IL-12 Production by Human Monocyte-Derived Dendritic Cells Looking at the Single Cell. *Journal of Immunotherapy*. 2005; 28: 306–13.