

ВЛИЯНИЕ PGE₂ И ЛИГАНДОВ TOLL-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ НА ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЗРЕЛЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК, АССОЦИИРУЕМЫЕ С ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Г. В. Гудков¹, Е. Ф. Филиппов¹, А. В. Пивень², М.Л. Золотавина², Н. В. Ким¹

¹ ГБОУ ВПО КубГМУ Минздрава России

² ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет»

Поступила в редакцию 09.08.2018 г.

Аннотация. Дендритные клетки, действуя как профессиональные антигенпрезентирующие клетки, способны индуцировать опухолеспецифический Т-клеточный иммунитет, что обуславливает не угасающий интерес к использованию их в иммунотерапии рака, несмотря на то, что клиническая эффективность таких протоколов остается ограниченной. Состав и концентрация компонентов коктейля для созревания ДК имеет решающее значение для их будущих характеристик. "Золотым стандартом" можно считать комбинацию цитокинов, включающую TNF α , IL-1 β , IL-6 и PGE₂. Данный коктейль в небольших вариациях состава применялся в большинстве клинических исследований, где в качестве адаптивной иммунотерапии применяли зрелые ДК. Однако в условиях созревания ДК, включающих данную комбинацию цитокинов, не продуцируется IL-12p70 имеющий особое значение для поляризации иммунного ответа в направлении Th1, который в наибольшей степени необходим для эффективной реакции против опухолевых клеток. Ключевую роль в этом негативном эффекте играет PGE₂, который блокирует выработку IL-12p70 и параллельно индуцирует продукцию антагониста IL-12R – гомодимера IL-12p40. Рассмотренный в данном исследовании коктейль цитокинов для созревания ДК *in vitro*, включающий интерфероны и лиганды Toll-подобных рецепторов, обеспечивает формирование зрелого фенотипа ДК, преобладание костимуляторных молекул над коингибиторными, и высокий уровень секреции IL-12p70, в ответ на CD40L-стимуляцию, что отличает его от протоколов, включающих в состав цитокинового коктейля PGE₂, который оказывает подавляющее влияние на пролиферацию Т-клеток. Однако парадоксальным оказался факт, что PGE₂ способствует усилению экспрессии CCR7, что в свою очередь усиливает хемотаксис ДК в ответ на хемокины CCL19 и CCL21. В настоящем исследовании предпринята попытка объяснить парадоксальное свойство PGE₂ вызывать повышенную экспрессию CCR7 на поверхности sDC и одновременно снижать продукцию CCL19 и создать протокол созревания ДК, который позволит получить культуру α DC1, клетки которой одновременно сочетают в себе все необходимые, и зачастую противоречивые, свойства, предъявляемые к противоопухолевым вакцинам.

Ключевые слова: дендритные клетки, противоопухолевые вакцины, Th1-клетки, миграция, PGE₂, CCL19, CCL21, CCR7, IL-12

Впервые дендритные клетки (ДК) были идентифицированы и выделены в 1973 году [1, 2]. Действуя как профессиональные антигенпрезентирующие клетки (АПК), они стимулируют наивные Т-клетки и Т-клетки памяти. Из-за способности ДК индуцировать опухолеспецифические Т-клетки, их используют в иммунотерапии рака уже более 20 лет [3, 4]. Однако несмотря на то, что антигенспецифический иммунный ответ был

выявлен у большинства пациентов, клиническая эффективность остается ограниченной [5, 6].

В большинстве исследований для создания ДК-вакцин используют аутологичные моноциты периферической крови, прошедшие двухэтапный процесс дифференцировки и созревания [7, 8]. Состав и концентрация компонентов коктейля созревания имеет решающее значение для характеристики будущих ДК. "Золотым стандартом" можно считать комбинацию TNF α , IL-1 β , IL-6 и PGE₂ [9, 10], однако в литературе можно встретить большое разнообразие вариантов комбинаций состава

© Гудков Г. В., Филиппов Е. Ф., Пивень А. В., Золотавина М.Л., Ким Н.В. 2019

цитокинов для созревания ДК [11, 12]. Этот протокол был разработан для повышения экспрессии маркеров созревания, усиления миграционных и иммуностимулирующих свойств ДК. Именно такой коктейль в небольших вариациях состава применялся в большинстве клинических исследований, где в качестве адаптивной иммунотерапии применяли зрелые ДК.

IL-12p70 имеет особое значение для поляризации в направлении Th1 иммунного ответа, который в наибольшей степени необходим для эффективной реакции против опухолевых клеток [13, 14]. Однако биоактивный IL-12p70 не продуцируется ДК в условиях созревания, включающих комбинацию цитокинов: TNF α , IL-1 β , IL-6 и PGE $_2$. Ключевую роль в этом негативном эффекте играет PGE $_2$, который блокирует выработку ДК IL-12p70 и параллельно индуцирует продукцию антагониста IL-12R – гомодимера IL-12p40 [15, 16]. Кроме того, PGE $_2$ селективно нарушает продукцию Т-клетками IL-2 и IFN γ , а также ингибирует активацию Т-клеток в ответ на Th1-цитокины такие как IL-2 и IL-12p70. Недавно было показано, что PGE $_2$ способствует появлению у ДК способности привлекать регуляторные Т-клетки (Treg), а также непосредственно стимулировать CD4 $^+$ Т-клетки к дифференцировке в направлении Treg [17, 18]. В тоже время, при наличии очевидной супрессорной активности, PGE $_2$ проявляет синергизм с фактором некроза опухоли (TNF α) и способствует созреванию ДК экспрессирующих CCR7. Это обеспечивает реакцию ДК на хемокины CCL19 и CCL21 (оба лиганды CCR7) и активную миграцию ДК в лимфатические узлы [19, 20].

Таким образом, целью настоящего исследования было изучение различных схем генерации ДК, с использованием PGE2 и лигандов Toll-подобных рецепторов, которые за счет экспрессии паттерна костимулирующих молекул и секретируемых цитокинов могли бы обеспечить оптимальные иммунологические свойства и функциональное влияние этих сигналов на активацию миграции ДК и их способность привлекать Т-клетки.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Получение ДК и выделение наивных CD4 $^+$ Т-клеток.

Реагенты: гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF, Нео-стим, Россия), интерлейкин-4 (IL-4, Thermo Fisher Scientific), интерлейкин-1 β (IL-1 β , Беталейкин, Россия), интерлейкин-6 (IL-6, Thermo Fisher Sci-

entific), интерферон- α 2 (IFN α , Роферон-А, Roche, Швейцария), интерферон- γ (IFN γ , Ингарон, Россия), липополисахарид (LPS, *E. coli* 0111:B4, Sigma-Aldrich), простагландин-E2 (PGE $_2$, Sigma-Aldrich), фактор некроза опухоли – α (TNF α , Life Technologies), полиинозиновая-полицитидиловая кислота (poly-I:C, Sigma-Aldrich), резиквимод (R848, Sigma-Aldrich).

Для культивирования ДК от 14 условно здоровых доноров (возраст от 25 до 37 лет) получали образцы периферической гепаринизированной венозной крови в объеме до 20 мл, которую обрабатывали не позднее 6 часов после забора. Периферические мононуклеарные клетки (ПМК) выделяли по стандартному протоколу центрифугирования на градиенте плотности Histopaque-1077 (плотность 1.077 г/мл, Sigma-Aldrich). Моноциты получали из фракции ПМК методом адгезии к пластику с последующим культивированием в течение 6 суток в безсывороточной питательной среде Panserin 413 (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Germany), содержащей 15% заменителя сыворотки Panexin basic (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Germany) и рекомбинантные человеческие цитокины (GM-CSF – 50 нг/мл и IL-4 – 25 нг/мл), в увлажненной атмосфере с 5% CO $_2$ при 37 $^{\circ}$ C в инкубаторе (Sanyo, MCO-19M, Japan). Асептические условия культивирования поддерживались работой в стерильном боксе, в ламинарно-поточном шкафу 2 класса биологической безопасности (Kojair Tech Oy, BioWizard Golden GL-170, Finland) и добавлением в среды антибиотика (гентамицин) и антимикотика (флуконазол). На 6-й день в течении 48 часов использовали различную комбинацию провоспалительных интерлейкинов, интерферонов и лигандов TLR для индукции созревания двух популяций ДК: стандартные ДК (standard DCs – sDC): TNF α (50 нг/мл), IL-1 β (12 нг/мл), IL-6 (25 нг/мл) и PGE $_2$ (1 мкг/мл); поляризованные ДК индуцирующие 1-й тип иммунного ответа Т-хелперов (α DC1): TNF α (50 нг/мл), IL-1 β (12 нг/мл), IL-6 (25 нг/мл), IFN α (3000 ед/мл), IFN γ (1000 ед/мл), LPS (2.5 мкг/мл), poly-I:C (20 мкг/мл) и R848 (3 мкг/мл). Зрелые культуры ДК дважды отмывали и использовали для дальнейших исследований.

Для изучения стимулирующих и поляризующих влияний различных популяций ДК (sDC и α DC1) на аутологичные наивные CD4 $^+$ Т-клетки в условиях смешанной культуре лимфоцитов последние выделяли из суспензии неадгезивной фракции ПМК, обедненной моноцитами, методом

отрицательной иммуномагнитной сепарации, с использованием набора EasySep CD4⁺ (StemCell Technologies) в соответствии с протоколом изготовителя.

Проточную цитометрию с использованием меченных моноклональных антител (BD Biosciences) и соответствующих изотипических контролей проводили для фенотипирования ДК – CD14 (FITC, M5E2), CD83 (APC, HB15e), HLA-DR (PerCP, L243), CD80 (FITC, L307), CD86 (PE, 233), CD274 (APC, MIN1), CCR7 (FITC, 3D12), CCL19 (PE, T50-867).

Секрецию IL-12p70 и IL-10 дендритными клетками стимулировали в ходе 24 часовой инкубации в нейтральной среде (без цитокинов) при помощи CD40L. В качестве последнего использовали MEGACD40L[®] Protein (Enzo Life Sciences Inc.), который представляет собой олигомерную конструкцию, эффективно имитирующую мембран-ассоциированную агрегацию CD40L, наблюдаемую *in vivo*. Стимуляция при помощи CD40L моделирует взаимодействие ДК с наивными CD4⁺ Т-клетками, экспрессирующими рецептор CD40. Концентрацию IL-12p70 и IL-10 в супернатанте измеряли при помощи технологии xMAP (см. выше).

Хемотаксис ДК и наивных Т-клеток *in vitro* проводили на базе набора Migratest (Glycotope Biotechnology) с использованием 24-луночных планшетов, снабженных мембранами с диаметром пор 3 мкм. Нижнюю камеру заполняли средой с хемокином CCL21 (Thermo Fisher Scientific) в объеме 350 мкл, а в верхнюю вносили 100 мкл суспензии ДК (5×10^4), после чего планшет инкубировали в течение 2 часов при 37°C. Хемотаксис наивных CD4⁺ Т-клеток исследовали в аналогичных 24-луночных планшетах с мембранами. В верхнюю камеру вносили суспензию наивных CD4⁺ Т-клетки (2×10^5) в объеме 100 мкл, а нижнюю камеру заполняли супернатантом из культуры ДК (5×10^5 ДК в 1 мл нейтральной среды, стимулированные CD40L в течение 24 часов), после чего планшет инкубировали в течение 3 часов при 37°C. Для изучения CCR7-зависимого компонента миграции наивных CD4⁺ Т-клеток в течение 30 минут до проведения хемотаксиса их инкубировали с блокирующими немечеными анти-CCR7 антителами (Purified, 3D12, BD Biosciences).

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета прикладных программ "Statistica 6.0 для Windows". Для выявления значимых различий сравниваемых показателей ис-

пользовали непараметрический U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0.05$.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Миграционная активность ДК

ДК моноцитарного происхождения, созревающие в присутствии (sDC) или в отсутствие PGE₂ (αDC1), представляют собой два типа зрелых ДК, которые обычно культивируют в безсывороточных средах для клинического использования. Несмотря на то, что протоколы созревания ДК с использованием PGE₂ ассоциируются с супрессией продукции ими IL-12p70, способность PGE₂ усиливать экспрессию CCR7 и соответственно миграционную активность ДК в ответ на хемокины CCL19 и CCL21 (лиганды рецептора CCR7, привлекающие ДК в лимфоузлы) обосновывает использование PGE₂ в стандартных протоколах созревания ДК (sDC) при создании клеточных вакцин.

В противоположность sDC использование другого протокола созревания, включающего интерфероны и лиганды TLR, приводит к образованию зрелых поляризованных ДК (αDC1) способных секретировать высокий уровень IL-12 и индуцировать *in vitro* опухоль-специфические цитотоксические Т-лимфоциты (CTL). Однако αDC1 характеризуются низкой миграционной активностью *in vitro* в ответ на хемокины связывающиеся с CCR7 (CCL19 и CCL21).

В соответствие с полученными данными (рис. 1), ДК, созревшие в присутствии PGE₂ (sDC), демонстрировали не только статистически достоверный более высокий уровень экспрессии CCR7, чем αDC1, но также и высокую миграционную активность в ответ на CCL21. Однако даже значительные различия в экспрессии CCR7 у sDC и αDC1 клеток быстро исчезали после пересева из среды созревания в нейтральную среду, содержащую только GM-CSF. Такое выравнивание различий в экспрессии CCR7 после переноса в нейтральную среду закономерно отражалось и в исчезновении различий миграционной активности у sDC и αDC1.

Для анализа причин различий в экспрессии CCR7 в двух типах ДК (sDC и αDC1) сравнивали уровни его поверхностной и внутриклеточной экспрессии. Неожиданным оказалось, что несмотря на выраженное преобладание поверхностной экспрессии CCR7 у sDC, определение общего содержания этого рецептора (поверхностного и внутриклеточ-

ного) не показало значимых различий между двумя типами ДК. Учитывая данные о существовании механизма лиганд-индуцируемой интернализации CCR7, была исследована возможность нивелирования различий в уровнях поверхностной экспрессии данного рецептора у sDC и α DC1 за счет добавления экзогенного CCL19 (известно, что CCL21 не влияет на интернализацию).

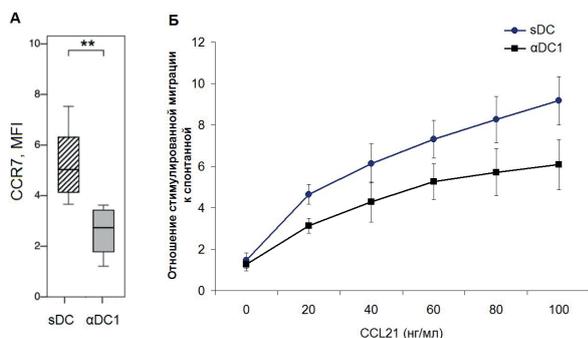


Рис. 1. Экспрессия CCR7 (А) и миграционная способность *in vitro* в ответ на хемокин CCL21 (Б) в двух типах популяций ДК (sDC и α DC1)

Согласно полученным данным, добавление экзогенного CCL19 (100 нг/мл) значительно снижало уровень поверхностной экспрессии CCR7 только в культуре α DC1, которая исходно активно экспрессировала CCR7 в силу условий своего созревания без добавления PGE₂. В то же время, в обеих культурах ДК (sDC и α DC1) общий уровень экспрессии CCR7 (поверхностный и внутриклеточный) не изменялся под влиянием экзогенного CCL19.

PGE₂ – мощный ингибитор продукции CCL19 ДК (sDC)

Учитывая селективное повышение поверхностной (но не общей) экспрессии CCR7 в культуре ДК, созревающей в присутствии PGE₂ (sDC), а также способность экзогенного CCL19 ее устранять, сравнивали влияние PGE₂ на эндогенную продукцию CCL19 в культурах ДК (рис. 2).

С учетом того, что CCL19 может влиять на интенсивность интернализации CCR7 нами был выявлен значительно более высокий уровень эндогенной секреции CCL19 в культуре зрелых α DC1 по сравнению с sDC. С учетом того, что *in vivo* источником хемокина CCL21 являются клетки лимфатического эндотелия нами не обнаружена его значительная секреция в обоих типах культур ДК. Анализ факторов индуцирующих созревание ДК и их влияния на регуляцию продукции CCL19 в культурах sDC и α DC1 показал, что главными индукторами CCL19 являются TNF α , IFN α , ро-

ly-I:C (TLR3-лиганд), LPS (TLR4-лиганд) и R848 (TLR7/8-лиганд), в то время как PGE₂ оказывает мощный ингибиторный эффект на секрецию данного хемокина. Кроме того, PGE₂ также супрессирует продукцию CCL19, первоначально индуцированную LPS (лиганд TLR4).

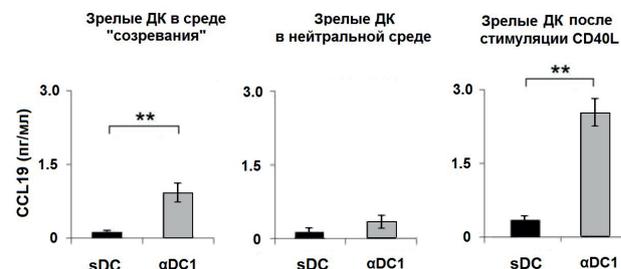


Рис. 2. Секреция CCL19 популяциями ДК (sDC и α DC1) в разных условиях инкубации: в среде для созревания; в нейтральной среде; в нейтральной среде после реактивации при помощи CD40L (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$)

Стабильность секреции CCL19 обеими популяциями зрелых ДК оценивали после переноса их в нейтральную среду (без стимулирующих факторов), а также в присутствии стимулятора CD40L. Несмотря на то, что после переноса в нейтральную среду секреция CCL19 по завершению 24 часовой инкубации резко снижалась в обеих популяциях, по-разному созревших ДК, она восстанавливалась в значительно большей степени после их реактивации при помощи CD40L. Популяция sDC, в отличие от α DC1, несмотря на отсутствие в среде PGE₂, слабо секретировала CCL19 как в нейтральной среде, так и после CD40L-стимуляции. Полученные данные свидетельствуют о том, что условия созревания ДК играют решающее значение в их способности секретировать CCL19 в нейтральном окружении. Посредством данного хемокина ДК способны привлекать к себе рециркулирующие в дренирующие лимфоузлы Т-клетки (наивные и центральной памяти), которые экспрессируют соответствующий рецептор (CCR7).

Для определения функциональности хемокина CCL19, секретлируемого α DC1, оценивали способность sDC и α DC1 привлекать наивные CD4⁺ Т-клетки экспрессирующие CCR7. Для более показательной оценки вклада именно CCR7-пути в процесс миграции наивных Т-клеток использовали блокирующие моноклональные антитела против CCR7. В то время как большое число наивных CD4⁺ Т-клеток мигрировало в направлении супернатанта α DC1, способность супернатанта sDC вызывать миграцию наивных CD4⁺ Т-клеток

не превышала контрольный уровень, соответствующий чистой среде. Ожидается, миграционная активность наивных CD4⁺ Т-клеток полностью исчезала в присутствии блокирующей антител против CCR7.

Профиль костимулирующих молекул

В конце этапа созревания обе популяции ДК (sDC и αDC1) демонстрировали зрелый фенотип, что проявлялось в значительной экспрессии таких маркеров как CD83 и HLA-DR на фоне исчезновения CD14. Однако анализ экспрессии костимулирующих и ингибирующих маркеров (CD40, CD80 = B7-1, CD86 = B7-2, CD274 = PD-L1) выявил значительные различия между ними (рис. 3).

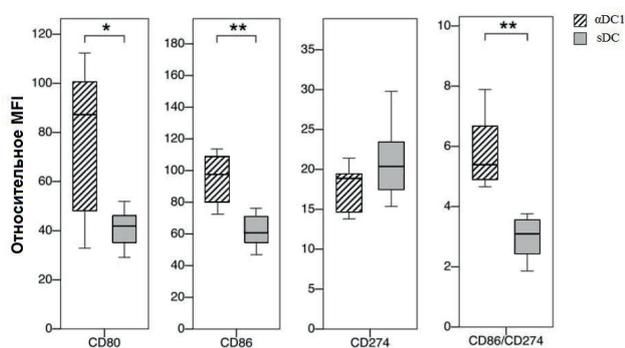


Рис. 3. Профиль экспрессии костимулирующих молекул популяциями дендритных клеток sDC и αDC1 (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$)

Так, в популяции αDC1 уровень экспрессии CD40, более чем в 2 раза превышал соответствующую величину (MFI) для sDC. Экспрессия молекул костимуляции CD80 и CD86 проявлялась самыми высокими значениями MFI в обеих популяциях ДК, однако значительное ее преобладание наблюдали у αDC1 – 87.2 и 97.6 соответственно (против 41.9 и 60.8 соответственно в популяции sDC). Экспрессия ингибиторного маркера CD274 была выше в популяции sDC (17.1 против 23.4), при этом отношение MFI CD86/CD274, характеризующее степень позитивного потенциала костимуляции, достоверно преобладало в популяции αDC1 (5.4 против 3.1; $p = 0.005$).

Секреция IL-12p70

Анализ супернатанта, полученного после 24 часовой стимуляции ДК при помощи CD40L в условиях нейтральной среды показал высокое содержание IL-12p70 (2.5×10^3 пг/мл) в популяции αDC1, в то время как в супернатанте sDC его концентрация была крайне низкой (38 пг/мл, $p = 0.005$) и немногим превышала детектируемый порог (рис. 4).

Результат измерения концентрации IL-10 оказался на границе детектируемого уровня и не пре-

вышал 8 пг/мл в супернатантах обеих популяций ДК. Различия в секреции данных интерлейкинов в двух популяциях ДК более показательно отражает отношение концентраций IL-12p70 / IL-10 ($p = 0.007$).

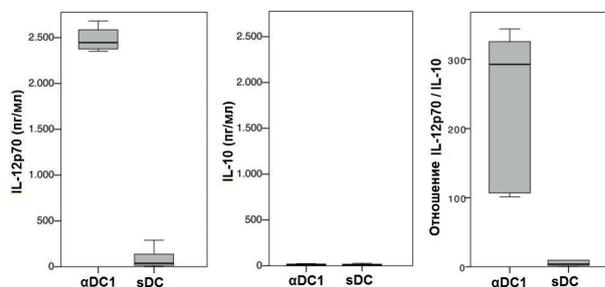


Рис. 4. Концентрации IL-12p70 и IL-10 в супернатанте после 24 часовой стимуляции sDC и αDC1 при помощи CD40L в условиях нейтральной среды

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Попытка улучшить способность ДК индуцировать противоопухолевый ответ привела к созданию протокола безсывороточной культивации ДК в условиях оптимизированной цитокиновой среды, позволяющей добиться ключевых необходимых для высокой эффективности ДК-вакцин свойств: полностью зрелый статус ДК; высокая экспрессия IL-12p70; респонсивность к хемокинам вторичных лимфоидных органов.

Для привлечения и взаимодействия ДК с субпопуляциями Т-клеток (наивными и центральной памяти) большое значение имеет стабильность продукции CCL19 созревшими на периферии ДК после их миграции в регионарные лимфоузлы. Полученные данные продемонстрировали, что PGE₂ выступает в качестве мощного ингибитора продукции хемокина CCL19 в культуре sDC. В то же время, способность к повышенной продукции CCL19 в популяции αDC1 быстро исчезала, как только ее переносили из среды созревания в нейтральную среду. Однако в ответ на CD40L-стимуляцию αDC1, в отличие от sDC, получали повторные хемокин-индуцирующие сигналы, которые приводили ко второй волне повышенной продукции CCL19.

Показано, что PGE₂ подавляет пролиферацию Т-клеток, прямо и косвенно влияет на секрецию провоспалительных и противоопухолевых цитокинов, а также способствует взаимодействию ДК с регуляторными Т-клетками, усиливая их пролиферацию. Однако парадоксальным оказался тот факт, что PGE₂ способствует усилению экспрессии CCR7 и тем самым хемотаксис ДК в ответ на хе-

мокины CCL19 и CCL21. Последние обеспечивают направленную миграцию праймированных антигенами ДК в дренирующие лимфатические узлы, где они взаимодействуют с Т-клетками (наивными и клетками центральной памяти). Это привлекательное свойство PGE₂ обосновывает включение его в состав стандартных цитокиновых коктейлей для созревания дендритноклеточных вакцин.

В настоящем исследовании предпринята попытка объяснить данное парадоксальное свойство PGE₂ вызывать повышенную экспрессию CCR7 на поверхности sDC и одновременно снижать продукцию CCL19. Известно, что в высоких концентрациях CCL19 индуцирует лиганд-зависимую интернализацию CCR7 и исчезновение его с поверхности клетки. По этой причине добавление экзогенного CCL19 к культуре sDC приводило к резкому снижению поверхностной экспрессии CCR7. Однако влияние экзогенного CCL19 не изменяло уровень общей (поверхностной и внутриклеточной) экспрессии CCR7 в популяции sDC. По-видимому, PGE₂ угнетает секрецию CCL19 и как следствие лиганд-зависимую интернализацию рецептора CCR7, что объясняет его повышенную поверхностную экспрессию на sDC. Важно отметить, что различия в поверхностной экспрессии CCR7 на sDC и αDC1 быстро исчезали после их переноса из созревающей среды в нейтральную.

Слабая миграционная способность αDC1 *in vitro* была обусловлена низкой экспрессией CCR7, поскольку в условиях созревающей среде они активно секретируют CCL19, что приводит к интернализации данного рецептора. Однако миграционная активность αDC1 быстро восстанавливалась, до уровня не ниже чем у sDC, после их переноса в нейтральную среду, не содержащую CCL19.

Полученные результаты не отменяют возможные преимущества использования PGE₂, которые были показаны в большом числе других исследований. В любом случае, наличие потенциальных преимуществ использования PGE₂ негативно сказывается на способности ДК секретировать CCL19 необходимого для привлечения Т-клеток. Кроме того, PGE₂ способен локально программировать ДК для предпочтительного взаимодействия с Трег, что в совокупности может объяснять генерализованную иммуносупрессию ассоциированную с хроническим воспалением и опухолевым процессом.

Использование в составе коктейля для созревания интерферонов и лигандов TLR (LPS, poly-I:C, R848) обеспечило не только зрелый фенотип ДК, но и преобладание костимуляторных

молекул на коингибиторными, высокий уровень секреции IL-12p70, но не IL-10, в ответ на CD40L-стимуляцию и активную направленную миграцию в ответ на хемокины (лиганды CCR7). В противовес стандартным вакцинам на основе ДК, которые основаны на использовании либо недостаточно зрелых ДК (высоко продуктивных по IL-12, но с низкой миграционной и стимулирующей активностью), либо зрелых ДК (с высокой миграционной и стимулирующей активностью, но со сниженной продукцией IL-12), разработанный в настоящем исследовании протокол позволяет получить культуру αDC1, все клетки которой одновременно сочетают в себе все необходимые, зачастую противоречивые, свойства предъявляемые противоопухолевым вакцинам.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Назаркина Ж.К., Лактионов П.П. // Биомедицинская химия. 2015. Т. 61. №. 1. С. 30-40.
2. Apetoh L, Locher C, Ghiringhelli F, Kroemer G, Zitvogel L. // *Semin Immunol*, 2011. Vol. 23, pp. 42–49.
3. Hansen M., Hjortø G.M., Donia M, Met Ö, Larsen N.B., et al. // *Vaccine*, 2013. Vol. 31, pp. 639-46.
4. Wang Y, Fan K.T., Li J.M., Waller E.K. // *Front Biosci (Schol Ed)*, 2012. Vol. 4, pp. 888-99.
5. Eksioglu EA, Eisen S, Reddy V. // *Front Biosci*. 2010. № 15, pp. 321–347.
6. Apetoh L, Locher C, Ghiringhelli F, Kroemer G, Zitvogel L. // *Semin Immunol*. 2011. № 23, pp. 42–49.
7. Dauer M, Obermaier B, Hertel J, Haerle C, Pohl K, et al. // *J Immunol*. 2003. Vol. 170, pp. 4069-4076.
8. Napolitani G., Rinaldi A., Bertonni F., Sallusto F., Lanzavecchia A. // *Nat Immunol*, 2005. Vol. 6, pp. 769–776.
9. Skalova K, Mollova K, Michalek J // *Vaccine*. 2010. № 28, pp. 5153–5160.
10. Boullart A.C., Aarntzen E.H., Verdijk P., Jacobs J.F., Schuurhuis D.H., et al. // *Cancer Immunol Immunother*, 2008. Vol. 57, pp. 1589–1597.
11. Lichtenegger F.S., Mueller K., Otte B., Beck B., Hiddemann W., et al. // *PLOS ONE*. 2012. Vol. 7, № 9, pp. 1-9. e44266
12. Upchurch K.C. Boquin J.R., Yin W., Xue Y., Joo H., et al. // *Immun. Letters*, 2015. Vol. 168, pp. 89–97.
13. Spranger S., Javorovic M, Bürdek M, Wilde S, Mosetter B, et al. // *J Immunol*, 2010. Vol. 185, pp. 738–747.
14. Dohnal A.M., Witt V., Hügel H., Holter W., Gadner H., et al. // *Cytherapy*, 2007. Vol. 9, pp. 755–770.

15. Seillet C, Belz GT // *Adv Immunol.* 2013. Vol. 120, pp. 185-210.
16. Zhang L, Kerkar SP, Yu Z, Zheng Z, Yang S. [et al.] // *Mol Ther.*, 2011. Vol. 19, pp. 751-759
17. Chung DJ, Rossi M, Romano E, Ghith J, Yuan J, et al. // *Blood.* 2009. Vol. 114, pp. 555–563.
18. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ // *Nat Rev Immunol.* 2008. № 8, pp. 523–532.
19. Muthuswamy R., Mueller-Berghaus J.,2 Haberkorn U., Reinhart T.A., Schadendorf D., et al. // *Blood.* 2010. Vol. 116, № 9, pp. 1454- 1459.
20. Gupta S., Termini J.M., Kanagavelu S, Stone G.W. // *Immunol Res.*, 2013. Vol. 57, pp. 303-310.

ГБОУ ВПО КубГМУ Минздрава России

Гудков Г. В., д.м.н., профессор, кафедра клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС

E-mail: pol_09@mail.ru

Филиппов Е. Ф., д.м.н., профессор, кафедра клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС

E-mail: filippovef@mail.ru

ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет»

Пивень А. В. Биолог

E-mail: alexander_piven@mail.ru

Золотавина М.Л. к.б.н., доцент

E-mail: zolotavina_m@mail.ru

Ким Н.В. врач-клд

E-mail: mea_terra@list.ru

GBOU VPO KubGMU

Gudkov G. V., M.D., full professor, Department of clinical immunology, Allergology and laboratory diagnostics

E-mail: pol_09@mail.ru

Filippov E. F., M.D., full professor, Department of clinical immunology, Allergology and laboratory diagnostics

E-mail: filippovef@mail.ru

FBOU VO «Kuban State University» Krasnodar, Russia

Piven A. V., Biologist

E-mail: alexander_piven@mail.ru

Zolotavina M. L., Cand.Biol.Sci. docent

E-mail: zolotavina_m@mail.ru

Kim N. V., doctor cld

E-mail: mea_terra@list.ru

INFLUENCE OF PGE2 AND LIGANDS OF TOLL-LIKE RECEPTORS ON THE IMMUNOLOGICAL PROPERTIES OF THE MATURE DENDRITIC CELLS ASSOCIATED WITH THEIR ANTITUMOR ACTIVITY

G. V. Gudkov¹, E. F. Filippov¹, A. V. Piven², M. L. Zolotavina², N. V. Kim¹

¹*GBOU VPO KubGMU*

²*FBOU VO «Kuban State University»*

Abstract. Dendritic cells, acting as professional antigen-presenting agents, are capable of inducing tumor-specific T-cell immunity, which causes a continuing interest in their use in cancer immunotherapy, despite the fact that the clinical efficacy of such protocols remains limited. The composition and concentration of the components of the cocktail for the maturation of DC is crucial for their future characteristics. The "gold standard" can be considered a combination of cytokines, including TNF α , IL-1 β , IL-6 and PGE2. This cocktail in small variations of the composition was used in most clinical studies, where mature DCs were used as adaptive immunotherapy. However, in terms of the maturation of DCs, including this combination of cytokines, IL-12p70 is not produced, which is of particular importance for the polarization of the immune response in the direction of Th1, which is most needed for an effective response against tumor cells. A key role in this negative effect is played by PGE2, which blocks the production of IL-12p70 and simultaneously induces the production of an antagonist of IL-12R, an IL-12p40 homodimer. The cytokine cocktail for maturation of DCs in vitro, including interferons and ligands of Toll-like receptors, considered in this study,

ensures the formation of a mature DC phenotype, the predominance of costimulatory molecules over the co-inhibitory molecules, and a high level of IL-12p70 secretion, in response to CD40L stimulation, which is different from protocols that include the PGE2 cytokine cocktail, which has an overwhelming effect on the proliferation of T-cells. However, paradoxical was the fact that PGE2 enhances the expression of CCR7, which in turn enhances the chemotaxis of DC in response to the chemokines CCL19 and CCL21. In the present study, an attempt was made to explain the paradoxical property of PGE2 to induce increased expression of CCR7 on the sDC surface and simultaneously reduce the production of CCL19 and create a protocol for the maturation of DC, which will make it possible to obtain a culture of α DC1, whose cells simultaneously combine all the necessary and often contradictory properties shown to anticancer vaccines

Keywords: dendritic cells, antitumor vaccines, th1- cell, migration, pge2, ccl19, ccl21, ccr7, il-12

REFERENCES

1. Nazarkina Zh.K., Laktionov P.P., Biological chemistry, 2015, Vol. 61, No 1, pp. 30-40.
2. Apetoh L, Locher C, Ghiringhelli F, Kroemer G, Zitvogel L., *Semin Immunol*, 2011, Vol. 23, pp. 42–49.
3. Hansen M., Hjortø G.M., Donia M, Met Ö, Larsen N.B., et al., *Vaccine*, 2013, Vol. 31, pp. 639-46.
4. Wang Y, Fan K.T., Li J.M., Waller E.K., *Front Biosci (Schol Ed)*, 2012, Vol. 4, pp. 888-99.
5. Eksioglu EA, Eisen S, Reddy V., *Front Biosci*, 2010, No 15, pp. 321–347.
6. Apetoh L, Locher C, Ghiringhelli F, Kroemer G, Zitvogel L., *Semin Immunol*, 2011, No 23, pp. 42–49.
7. Dauer M, Obermaier B, Herten J, Haerle C, Pohl K, et al., *J Immunol*, 2003, Vol.170, pp. 4069-4076.
8. Napolitani G., Rinaldi A., Bertoni F., Sallusto F., Lanzavecchia A., *Nat Immunol*, 2005, Vol. 6, pp. 769–776.
9. Skalova K, Mollova K, Michalek J., *Vaccine*, 2010, No 28, pp. 5153–5160.
10. Boullart A.C., Aarntzen E.H., Verdijk P., Jacobs J.F., Schuurhuis D.H., et al., *Cancer Immunol Immunother*, 2008, Vol. 57, pp. 1589–1597.
11. Lichtenegger F.S., Mueller K., Otte B., Beck B., Hiddemann W., et al., *PLOS ONE*, 2012, Vol. 7, No 9, pp. 1-9. e44266
12. Upchurch K.C. Boquin J.R., Yin W., Xue Y., Joo H., et al., *Immun. Letters*, 2015, Vol. 168, pp. 89–97.
13. Spranger S., Javorovic M, Bürdek M, Wilde S, Mosetter B, et al., *J Immunol*, 2010, Vol. 185, pp. 738–747.
14. Dohnal A.M., Witt V., Hügel H., Holter W., Gadner H., et al., *Cytotherapy*, 2007, Vol.9, pp.755–770.
15. Seillet C., Belz G.T., *Adv Immunol*, 2013, Vol. 120, pp. 185-210.
16. Zhang L, Kerkar S.P, Yu Z, Zheng Z, Yang S., et al., *Mol Ther.*, 2011, Vol. 19, pp. 751-759.
17. Chung DJ, Rossi M, Romano E, Ghith J, Yuan J, et al., *Blood*, 2009, Vol. 114, pp. 555–563.
18. Vignali D.A., Collison L.W., Workman C.J., *Nat Rev Immunol*, 2008, No 8, pp. 523–532.
19. Muthuswamy R., Mueller-Berghaus J., Haberkorn U., Reinhart T.A., Schadendorf D., et al., *Blood*, 2010, Vol. 116, No 9, pp. 1454- 1459.
20. Gupta S, Termini J.M., Kanagavelu S, Stone G.W., *Immunol Res.*, 2013, Vol. 57, pp. 303-310.