

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ STRUKTURNE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Katja ZEME

**OPTIMIZACIJA KLINIČNEGA PROTOKOLA GOJENJA
DENDRITIČNIH CELIC ZA IZDELAVO PROTITUMORSKIH CEPIV**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

**CLINICAL PROTOCOL OPTIMIZATION FOR DENDRITIC CELLS
GENERATION USED FOR ANTI-TUMOR VACCINES
DEVELOPMENT**

M. Sc. thesis
Master study programmes

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključno delo študija 2. stopnje Strukturne in funkcionalne biologije na Biotehniški fakulteti, Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo v laboratoriju Centra za razvoj naprednih zdravljenj na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje na Oddelku za biologijo je za mentorja magistrskega dela imenovala doc. dr. Urbana Švajgerja in za recenzentko doc. dr. Nado Žnidaršič.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Rok KOSTANJŠEK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: doc. dr. Nada ŽNIDARŠIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Urban ŠVAJGER
Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino

Datum zagovora: 12. 11. 2015

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Katja Zeme

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

- ŠD Du2
- DK UDK 632.938:612(043.2)=163.6
- KG protitumorska cepiva/brezserumski medij/monociti/citokini/nezrele dendritične celice/zrele dendritične celice/citotoksični limfociti T
- AV ZEME, Katja, diplomirana biologinja (UN)
- SA ŠVAJGER, Urban (mentor)/ŽNIDARŠIČ, Nada (recenzentka)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij strukturne in funkcionalne biologije
- LI 2015
- IN OPTIMIZACIJA KLINIČNEGA PROTOKOLA GOJENJA DENDRITIČNIH CELIC ZA IZDELAVO PROTITUMORSKIH CEPIV
- TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)
- OP XI, 61 str., 7 pregl., 13 sl., 79 vir.
- IJ SI
- JI sl/en
- AI Z novimi odkritji na področju tumorske imunologije lahko imunoterapijo tumorjev uporabimo tudi v klinični praksi. Dendritične celice (DC) imajo izjemno sposobnost predstavitve antigenov ter aktivacije celic specifične imunosti, kot so citotoksični limfociti T, ki lahko proti tumorskim antigenom sprožijo močne citotoksične odzive ter odstranijo tumorske celice. Pridobitev DC za uporabo v protitumorskih cepivih mora biti izvedena pod strogimi pogoji, ki ustrezajo predpisom GMP (angl. *Good manufacturing practice*), kamor sodi tudi uporaba brezserumskih medijev z dodanim minimalnim deležem človeškega seruma. Za pridobitev DC smo uporabili monocite iz periferne venske krvi, ki smo jih od ostalih mononuklearnih celic (MNC) ločili z adherenco na plastiko ali imunomagnetno selekcijo. Cilj dela je bil primerjati vpliv brezserumskih medijev CellGro® in X-vivo15™ z dodanim 1 % človeškim AB-serumom na izkoristek gojenja, kvaliteto diferenciacije in kvaliteto zorenja DC. Kvaliteto diferenciacije in zorenja DC smo določili na podlagi povprečnih vrednosti intenzitete fluorescences površinskih molekul, izraženih na nezrelih (iDC) in zrelih DC (mDC). Pri MNC, gojenih v CellGro®, smo preverjali vpliv različnih kombinacij citokinov na izkoristek in kvaliteto diferenciacije DC iz prisotnih monocitov ter izražanje CD4, T-bet in GATA-3 po aktivaciji T-celičnih receptorjev (TCR) v ko-kulturah z limfociti T. V primeru monocitov, izoliranih z adherenco na plastiko in imunomagnetno izolacijo, so diferencirane DC, gojene v CellGro®, razvile bolj kvaliteten fenotip, značilen za iDC. Pri zorenju DC tako v primeru izolacije monocitov z adherenco na plastiko in nadaljnjo diferenciacijo DC, kot v primeru imunomagnetne izolacije monocitov in nadaljnjo diferenciacijo DC, ni statistično značilnih razlik v izražanju fenotipa, značilnega za mDC. Pri dendritičnih celicah diferenciranih iz MNC so pri gostoti 10×10^6 MNC/1 ml medija, pri kombinaciji citokinov GM-CSF + IL-4 celice razvile najbolj kvaliteten fenotip značilen za iDC, prav tako je bil delež živih celic v tem primeru najvišji. Najvišji izkoristek gojenja in delež živih celic, ter najbolj kvalitetno izražen fenotip značilen za iDC, se je pri gosti 20×10^6 MNC/1 ml medija izkazal ob prisotnosti GM-CSF + IL-4 + IFN α . Pri limfocitih iz ko-kulture z MNC smo po aktivaciji TCR v vseh celičnih kulturah izmerili izražanje CD4 ter višje vrednosti T-bet kot GATA-3.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

- DN Du2
- DC UDC 632.938:612(043.2)=163.6
- CX anti-tumor vaccines/serum free medium/cytokines/monocytes/immature dendritic cells/mature dendritic cells/cytotoxic lymphocytes T
- AU ZEME, Katja
- AA ŠVAJGER, Urban (supervisor)/ŽNIDARŠIČ Nada (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Academic Study Programme of Structural and functional biology
- PY 2015
- TI CLINICAL PROTOCOL OPTIMIZATION FOR DENDRITIC CELLS GENERATION USED FOR ANTI-TUMOR VACCINES DEVELOPMENT
- DT M. Sc. Thesis (Master Study Programme)
- NO XI, 61 p., 7 tab., 13 fig., 79 ref.
- LA SI
- AL sl/en
- AB Dendritic cells (DC) have an above-average capability to capture and present antigens and the ability to activate cells of adaptive immunity and induce strong cytotoxic responses against tumor cells. Acquiring DCs for DC-based therapeutic cancer vaccines needs to be concluded under strict conditions following good manufacturing practice which requires the use of serum-free media with the addition of human serum. The immature DCs (iDCs) were generated from plastic adherence and Magnetic Activated Cell Sorting Methods (MACS) isolated monocytes from peripheral blood in the presence of GM-CSF and IL-4. The goal was to compare the influence of the serum-free media CellGro® and X-vivo15™ with adding 1% of the human AB-serum on the cell yield and the quality of the DC generation and maturation. The quality of the DC generation and maturation was measured based on the mean fluorescence intensity (MFI) of the surface molecules' fluorescence. We compared the influence of different combinations of cytokines on the cell yield, cell viability and the quality of DC generation in the MNC culture. After the activation of T-cell receptors (TCR) on the present T lymphocytes in co-cultures, we measured the expression of CD4, T-bet and GATA-3. Immature DC generated from plastic adherence and MACS isolated monocytes cultivated in CellGro® developed a higher quality phenotype characteristic for iDCs in comparison to the DCs generated in X-vivo15™. Mature DC generated from plastic adherence isolated monocytes and DC generated from MACS isolated monocytes showed no statistically significant differences in the expression of the mature DC markers between cells in CellGro® and X-vivo15™. The highest percentage of cell yield and cell viability was observed with DCs generated from MNCs in the cell culture 20×10^6 MNC in 1 ml of medium in combination with cytokines GM-CSF + IL-4 + IFN α , as the quality of the phenotype developed in immature DC respectively. In the cell culture 10×10^6 MNC in 1 ml of medium in combination with cytokines GM-CSF + IL-4 cells developed the highest quality of the phenotype in immature DC, as the highest cell viability was observed. All the lymphocytes from the MNC culture after TCR activation expressed CD4, while the expression of T-bet in activated lymphocytes was higher compared to GATA-3.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PREGLEDNIC	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
SLOVARČEK	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 OBRAMBA TELESA	3
2.1.1 Prirojena imunost	3
2.1.2 Pridobljena imunost	5
2.2 DENDRITIČNE CELICE	5
2.2.1 Tipi dendritičnih celic	6
2.2.1.1 Plazmacitoidne dendritične celice	6
2.2.1.2 Klasične oz. mileoidne dendritične celice	6
2.2.2 Zorenje dendritičnih celic	8
2.2.3 Aktivacija citotoksičnih limfocitov T CD8⁺	8
2.2.4 Mehanizmi citotoksičnosti	10
2.3 CEPIVA	11
2.3.1 Protitumorska cepiva	11
2.3.1.1 Preventivna oz. profilaktična cepiva, ki preprečijo nastanek raka pri zdravih ljudeh	11

2.3.1.2	Terapevtska cepiva, ki so namenjena zdravljenju raka	11
2.3.2	Protitumorska cepiva na osnovi dendritičnih celic	13
2.3.3	Stranski učinki protitumorskih cepiv	16
2.4	DOBRA PROIZVODNA PRAKSA	16
2.5	BREZSERUMSKI MEDIJI.....	17
3	MATERIAL IN METODE	19
3.1	PRIPRAVA DENDRITIČNIH CELIC	19
3.1.1	Izolacija mononuklearnih celic (MNC)	19
3.1.2	Štetje celic z Bürker – Türkovo komoro	20
3.2	IZOLACIJA MONOCITOV IZ MNC	21
3.2.1	Izolacija monocitov z adherenco na plastiko.....	21
3.2.2	Izolacija monocitov z imunomagnetno selekcijo.....	22
3.3	DIFERENCIACIJA DENDRITIČNIH CELIC IZ MONOCITOV	23
3.3.1	Diferenciacija dendritičnih celic iz monocitov izoliranih z adherenco na plastiko.....	23
3.3.2	Diferenciacija DC iz monocitov po imunomagnetni izolaciji	24
3.3.3	Izkoristek diferenciacije monocitov v dendritične celice (angl. <i>Cell yield</i>)	24
3.3.4	Diferenciacija dendritičnih celic iz celokupnih mononuklearnih celic periferne venske krvi.....	25
3.3.5	Preverjanje uspešnosti diferenciacije monocitov v dendritične celice.....	26
3.4	ZORENJE DENDRITIČNIH CELIC	27
3.5	PREVERJANJE USPEŠNOSTI ZORENJA DENDRITIČNIH CELIC	27
3.6	AKTIVACIJA T-CELIČNIH RECEPTORJEV.....	28
3.7	PREVERJANJE IZRAŽANJA KOSTIMULACIJSKE MOLEKULE CD4 TER TRANSKRIPCIJSKIH FAKTORJEV T-BET IN GATA-3	29
3.8	ANALIZA S PRETOČNO CITOMETRIJO	29

3.9	STATISTIČNE METODE	30
4	REZULTATI.....	31
4.1	IZOLACIJA MONONUKLEARNIH CELIC IZ PERIFERNE VENSKE KRVI	31
4.2	DIFERENCIACIJA IN ZORENJE DENDRITIČNIH CELIC PO IZOLACIJI MONOCITOV Z ADHERENCO NA PLASTIKO.....	32
4.2.1	Diferenciacija dendritičnih celic.....	32
4.2.2	Zorenje dendritičnih celic	33
4.2.3	Primerjava izražanja površinske molekule CD83 med iDC in mDC	34
4.3	DIFERENCIACIJA IN ZORENJE DENDRITIČNIH CELIC PO IZOLACIJI MONOCITOV Z IMUNOMAGNETNO SELEKCIJO	34
4.3.1	Diferenciacija dendritičnih celic.....	35
4.3.2	Izkoristek diferenciacije monocitov v dendritične celice	36
4.3.3	Zorenje dendritičnih celic	36
4.3.4	Primerjava izražanja površinske molekule CD83 med iDC in mDC	37
4.4	DIFERENCIACIJA DENDRITIČNIH CELIC IZ CELOKUPNIH MONONUKLEARNIH CELIC	38
4.5	AKTIVACIJA T - CELIČNIH RECEPTORJEV.....	41
5	RAZPRAVA.....	43
6	SKLEPI.....	52
7	POVZETEK.....	53
8	VIRI	55

KAZALO SLIK

Sl. 1: Aktivacija citotoksičnih limfocitov T CD8 ⁺ ..	9
Sl. 2: Dendritične celice v imunoterapiji raka..	15
Sl. 3: Razporeditev fikola in krvnih komponent pred in po centrifugiranju.....	19
Sl. 4: Izguba monocitov po spiranju s pufrom DPBS po ločbi z gostotno gradientnim medijem.	31
Sl. 5: Izražanje površinskih molekul na iDC po izolaciji monocitov z adherenco na plastiko.....	32
Sl. 6: Izražanje površinskih molekul na mDC diferenciranih iz monocitov, ki smo jih izolirali z adherenco na plastiko.	33
Sl. 7: Primerjava izražanja molekule CD83	34
Sl. 8: Izražanje površinskih molekul na iDC, ki so se diferencirale iz monocitov izoliranih z imunomagnetno selekcijo.	35
Sl. 9: Primerjava izkoristka diferenciacije monocitov v DC med celičnimi kulturami iz X-vivo15 TM in CellGro®.	36
Sl.10: Izražanje površinskih molekul na mDC diferenciranih iz monocitov, ki smo jih izolirali z imunomagnetno selekcijo	37
Sl. 11: Primerjava izražanja molekule CD83	37
Sl. 12: Izražanje CD4 in transkripcijskih faktorjev T-bet in GATA-3 po stimulaciji TCR na limfocitih T v celičnih kulturah 10 x 10 ⁶ MNC/1 ml medija	41
Sl. 13: Izražanje CD4 in transkripcijskih faktorjev T-bet in GATA-3 po stimulaciji TCR na limfocitih T v celičnih kulturah 20 x 10 ⁶ MNC/1 ml medija.	42

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Značilnosti in vloga celic vključenih v naravnost odpornost.....	4
Pregl. 2: Merila, katerim morajo ustrezati DC za uporabo v cepivh	13
Pregl. 3: Opis nekaterih površinskih molekul, katerih izražanje se preverja pri določanju kvalitete diferenciacije in zorenja DC.....	14
Pregl. 4: Kombinacije citokinov uporabljene pri različnih gostotah celic v primeru diferenciacije CD iz celokupnih MNC.....	25
Pregl.5: Uspešnost diferenciacije DC iz MNC v celičnih kulturah 10×10^6 celic/1 ml medija z različnimi kombinaciji citokinov.....	38
Pregl. 6: Uspešnost diferenciacije DC iz MNC v celičnih kulturah 20×10^6 celic/1 ml medija z različnimi kombinaciji citokinov.....	39
Pregl. 7: Uspešnost diferenciacije DC iz MNC v celičnih kulturah 10×10^6 in 20×10^6 celic/1 ml medija z različnimi kombinacijami citokinov.....	40

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

APC	antigen predstavitvene celice
CD	označevalec pripadnosti (angl. <i>Cluster of Differentiation</i>)
DC	dendritične celice
DPBS	Dullbecco's fosfatni pufer s soljo (angl. <i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>)
iDC	nezrele dendritične celice (angl. <i>Immature Dendritic Cells</i>)
FBS	goveji serumski albumin (angl. <i>Fetal Bovine Serum</i>)
FITC	fluorescein izotiocianat
GM CSF	granulocitne in makrofagne kolonije spodbujajoči faktor (angl. <i>Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor</i>)
HLA DR	humani poglavitni histokompatibilnostni antigen razreda II
IFN	interferon
IL	interlevkin
LPS	lipopolisaharid
mDC	zrele dendritične celice (angl. <i>Mature Dendritic Cells</i>)
MFI	srednja vrednost intenzitete fluorescence (angl. <i>Mean Fluorescence Intesity</i>)
MHC	poglavitni kompleks tkivne skladnosti (angl. <i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MNC	mononuklearne celice
PBMC	mononuklearne celice periferne venske krvi
PAMP	patogenom pridruženi molekularnimi vzorci (angl. <i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>)
PE	fikoeritrin
PFA	paraformalaldehid
PRR	receptorji za prepoznavo molekularnih vzorcev (angl. <i>Pattern Recognition Receptors</i>)
Tc	citotoksični limfocit T
TCR	T-celični receptor
Th	celica T pomagalka

SLOVARČEK

- Antigeni** Antigeni so določeni kot snovi, ki sprožijo imunski odziv. Mednje sodijo proteini, ogljikovi hidrati, lipidi in nukleinske kisline (Lydyard in sod., 2011).
- CD** Sistem za enotno označitev antigenov površine celic (predvsem levkocitov) z monoklonskimi protitelesi (IUIS-WHO, 1984).
- Citokini** Topne beljakovine, ki delujejo kot medcelični mediatorji. Izločajo jih imunske celice in nekatere druge celice (SMS, 2015).
- Interlevkini** Vrsta citokinov, ki jih primarno izločajo mononuklearni fagociti ter pospešujejo proliferacijo limfocitov (SMS, 2015).
- Interferon** Protein ali glikoprotein, ki ga izdelujejo celice po stiku ali okužbi z virusi, bakterijami, endotoksini, polisaharidnimi makromolekulami ter drugimi kemičnimi induktorji in učinkuje nespecifično protivirusno, imunoregulatorno, včasih tudi protitumorsko (SMS; 2015).
- MHC I** Molekule poglobitnega kompleksa tkivne skladnosti razreda I, ki jih izražajo vse celice z jedri in predstavljajo peptide citotoksičnim limfocitom T (Lydyard in sod., 2011).
- MHC II** Molekule poglobitnega kompleksa tkivne skladnosti razreda II, ki jih izražajo antigen predstavitvene celice in z njimi predstavljajo peptide celicam pomagalkam (Lydyard in sod., 2011).

1 UVOD

Dendritične celice (DC) imajo izjemno sposobnost predstavitve antigenov ter sodijo med najpomembnejše celice imunskega sistema in predstavljajo pomembno vez med prirojeno ter pridobljeno imunostjo (Steinman, 2012).

Napredek na področju tumorske imunologije in imunoterapije nam v zadnjih letih omogoča uspešen prenos znanja s področja celičnih tumorskih cepiv v klinično prakso (Urruticoechea in sod., 2010). Za zdravljenje raka z imunskimi celicami kot so limfociti T, naravne celice ubijalke in gensko manipulirane celice, je zdravljenje raka s cepivi na osnovi dendritičnih celic do danes edino cepivo na celični osnovi, ki je odobreno s strani Agencije za hrano in zdravila (angl. *Food and Drug Administration*, FDA) (Herman in Jeras, 2011; Kantoff in sod., 2010). Tumorske celice slabo predstavljajo antigene, zato je predstavitev tumorskih antigenov odvisna predvsem od DC, ki s predstavitvijo teh antigenov aktivirajo celično posredovane imunske odzive, kamor sodi tudi aktivacija citotoksičnih limfocitov T, ki učinkovito odstranijo tumorske celice (Buonaguro in sod., 2011).

Pridobitev DC za uporabo v protitumorskih cepivih mora biti izvedena pod strogimi pogoji, ki ustrezajo predpisom dobre proizvodne prakse (angl. *Good manufacturing practice*, GMP). Ti zagotavljajo, da dosegajo medicinski izdelki predpisane standarde in so primerni za klinično uporabo. Eden izmed pogojev je uporaba brezserumskih medijev brez dodatnega živalskega seruma; dodan je le manjši odstotek avtolognega seruma bolnika ali človeškega AB- seruma (WHO, 2015). Brezserumski mediji tako različnih proizvajalcev, kakor tudi mediji, katerim dodajamo različne koncentracije serumov, vodijo v različne lastnosti pridobljenih celic za celične terapije. Dendritične celice, ki jih v mediju diferenciramo iz perifernih monocitov, se lahko tako razlikujejo v izražanju membranskih molekul, kvaliteti zorenja, izražanju kostimulacijskih molekul in sposobnosti stimulacije odzivnih limfocitov (Tarte in sod., 2000). V primeru uporabe živalskega seruma lahko serumski proteini izzovejo močne imunske odzive (Mackensen in sod., 2000). V primeru gojenja DC v brezserumskih medijih *ex vivo* zagotovimo stabilen fenotip teh celic ter so lahko na podlagi priprave v nadzorovanih okoliščinah primerne za uporabo v klinične namene (Tarte in sod., 2000).

1.1 NAMEN DELA

Namen dela je preizkusiti dva brezserumska medija različnih proizvajalcev ter izbrati optimalne pogoje za pripravo dendritičnih celic, ki bi se lahko v okviru GMP uporabili pri pripravi protitumorskih cepiv. Zanima nas izkoristek gojenja, kvaliteta diferenciacije in zorenja dendritičnih celic pri gojenju v različnih brezserumskih medijih ter pri različnih kombinacijah citokinov.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Pri ločbi mononuklearnih celic (MNC) iz periferne venske krvi z gostotno gradientnim medijem bo tekom spiranja MNC prišlo do izgube monocitov.
- Brezserumska medija X-vivo15™ in CellGro® z dodanim 1 % AB- serumom imata različen vpliv na kvaliteto diferenciacije DC iz monocitov ter kvaliteto zorenja DC.
- Pri različnih kombinacijah citokinov bo prišlo do razlik v kvaliteti diferenciacije DC iz celokupnih MNC, izkoristku gojenja in viabilnosti celic.

2 PREGLED OBJAV

2.1 OBRAMBA TELESA

Obrambo telesa tvorita dve vrsti obrambe, prirojena (naravna) in specifična (pridobljena). Telo varujeta pred patogenimi organizmi kot so bakterije, virusi, glive ter pred rakavimi celicami (Warrington in sod., 2011).







2.1.1 Prirojena imunost

Prirojena imunost predstavlja prvi odziv telesa pred tujki ter vključuje fizične, kemične in celične pregrade. Je nespecifična, od antigenov neodvisna in zelo odzivna oblika imunosti, saj se odziv na tujek sproži v nekaj minutah oz. urah po aktivaciji ter povzroči akutne vnetne odzive (Warrington in sod., 2011). Patogenim mikroorganizmom ali parazitom v prvi liniji obrambe telesa preprečujejo vstop fizične pregrade kot so koža ter epitelne celice respiratornega, genitourinarnega in gastrointestinalnega trakta. Epitelne celice lahko izločajo mukus, medtem ko ciliarne epitelne celice, ki se nahajajo v respiratornem traktu tujke odstranjujejo s cilijami. Pomembno vlogo pri obrambi telesa imajo izločki žlez solznic v očeh, žlez lojnic v ušesih, slina v ustih, žleze znojnice in žleze lojnice v koži ter prebavni sokovi v želodcu. Ti izločki vsebujejo encime, protitelesa in maščobne kisline, ki delujejo protibakterijsko in preprečujejo vstop ter naselitev mikroorganizmov. V primeru, da patogeni mikroorganizmi prečkajo fizične pregrade, jih zaustavijo fagociti.

Fagocitne celice, kamor sodijo nevtrofilci, monociti in makrofagi, z receptorji za prepoznavo molekularnih vzorcev (angl. *Pattern Recognition Receptors*, PRR), prepoznajo molekule, ki jih izražajo patogeni mikroorganizmi. Med PRR sodijo toll podobni («toll-like») receptorji TLR (angl. *Toll-Like receptors*), znotrajcelični NOD podobni («NOD-like») receptorji (angl. *NOD like receptors*, NLR) in lektini tipa C. Ti receptorji prepoznajo patogenom pridružene molekularne vzorce (angl. *Pathogen Associated Molecular Patterens*, PAMP), ki se skozi evolucijo niso bistveno spreminjali in so skupni večjim skupinam patogenih mikroorganizmov. Aktivacija PRR receptorjev na fagocitih sproži fagocitozo, fagocitne celice pričnejo izločati vnetne mediatorje ter citokine, aktivira se komplementni sistem, makrofagi potujejo v lokalne bezgavke, kjer predelane antigene

predstavijo limfocitom T in sprožijo sekundarne imunske odzive (Alberts in sod., 2002; Lydyard in sod., 2011).

Preglednica 1: Značilnosti in vloga celic vključenih v naravnost odpornost (prirejeno po Warrington in sod., 2011: 2).

CELICE	SLIKA	% PRI ODRASLIH	JEDRO	VLOGA	ŽIVLJENJSKA DOBA	TARČA
Makrofagi*		Različno	Različno	Fagocitoza Antigen predstavitvene celice (APC)	Meseci, leta	Različno
Nevtrofilci		40–75 %	Segmentirano	Fagocitoza Degranulacija (izločanje hidrolitičnih encimov in fagosomov)	6 ur – nekaj dni	Bakterije Glive
Eozinofilci		1–6 %	Dvodelno	Degranulacija Izločanje encimov, rastnih faktorjev, citokinov	8-12 dni (po krvi krožijo 4-5 ur)	Paraziti
Bazofilci		<1 %	Dvo- ali trodelno	Degranulacija Izločanje histamina, encimov, citokinov	Nekaj ur do nekaj dni	Različno
Limfociti (celice T)		20–40 %	okroglo	Celice pomagalke CD4 ⁺ : uravnavajo odzive imunske sistema Citotoksični limfociti T CD8 ⁺ : citotoksičnost, celična smrt	Meseci do leta	Celice T pomagalke: Znotrajcelič ne bakterije Citotoksični limfociti T: Celice okužene z virusi, tumorske celice
Monociti		2–6 %	ledvičasto	Diferenciacija v makrofage in dendritične celice Sprožijo imunski odziv	Ure - dnevi	Različno

*Makrofagi v različnih tkivih: alveolarni makrofagi (pljuča), histiociti (vezivno tkivo), Kupferjeve celice (jetra), mikroglia celice (živčno tkivo), epiteloidne celice, osteoklasti (kosti), mezanglialne celice (ledvica).

2.1.2 Pridobljena imunost

Pridobljena imunost je odvisna od antigenov ter je za antigene specifična, kar po ponovnem stiku z že poznanim antigenom omogoča hitrejši in burnejši odziv. Sproži se takrat, ko prva linija obrambe ni dovolj učinkovita. Ključna vloga pridobljene veje imunosti je, da na tuje antigene razvije t. i. imunski spomin. Nosilci celične pridobljene imunosti so limfociti T, ki jih aktivirajo antigen predstavitvene celice (APC) kot so makrofagi, dendritične celice in določene epidermalne celice. Limfociti B so s tvorbo protiteles nosilci humoralnega odziva.

Antigen predstavitvene celice predelajo in vgradijo antigen v molekulo poglavitnega kompleksa tkivne skladnosti (angl. *Major Histocompatibility kompleks*, MHC) ter ga predstavijo T celičnim receptorjem (TCR) na limfocitih T. MHC II molekule aktivirajo TCR na CD4⁺ limfocitih T, ki naprej narekujejo Th1 ali Th2 imunski odziv ter aktivacijo in razmnoževanje limfocitov B in nastanka specifičnih protiteles. Antigen, ki je vgrajen v kompleks MHC I, aktivira TCR na limfocitih Tc CD8⁺ (citotoksični limfociti T), v tem primeru aktivacija TCR sproži celično smrt tarčnih celic (Lydyard in sod., 2011; Warrington in sod., 2011).

Pridobljena veja imunosti potrebuje za učinkovit odziv nekaj tednov, spominske celice in protitelesa nato ostanejo v telesu več let ali do smrti. Ob ponovnem stiku s poznanim antigenom se preoblikujejo v efektorske celice in sprožijo imunski odziv (limfociti Tc CD8⁺ s citotoksično reakcijo, limfociti B z izločanjem protiteles) (Lydyard in sod., 2011; Warrington in sod., 2011).

2.2 DENDRITIČNE CELICE

V 70-ih letih prejšnjega stoletja sta Ralph Steinman in Zanvil Cohn prva opisala pomen dendritičnih celic, za odkritje je leta 2011 Steinman prejel Nobelovo nagrado za fiziologijo in medicino. Dendritične celice (z izjemo Langerhansovih celic) so kratko živeča skupina celic hematopoetskega izvora, med katere sodijo celice s podobnimi morfološkimi lastnostmi. Vse izražajo molekule HLA-DR (angl. *Human leukocyte antigen class II*) in potujejo skozi tkiva. S sposobnostjo predstavitve antigenov imajo ključno vlogo pri

uravnavanju od antigenov odvisnega imunskega odziva. Sodelujejo pri uravnavanju tolerance do lastnih antigenov ter predstavljajo vez med prirojeno in pridobljeno imunostjo (Hart in sod., 2001; Merad in sod., 2013; Steinman, 2012).

Glede na vlogo DC v imunskih odzivih se obeta njihova uporaba v terapevtske namene, med katere sodi zdravljenje okužb, ki jih povzročijo patogeni organizmi, zdravljenje tumorjev in avtoimunskih bolezni (Merad in sod., 2013).

2.2.1 Tipi dendritičnih celic

Dendritične celice so potomke krvotvornih matičnih celic. Od makrofagov se razlikujejo po manjšem številu lizosomov, zrele DC slabo fagocitirajo in za razliko od makrofagov ne vsebujejo številnih encimov (Repnik in sod., 2004). Med seboj se dendritične celice razlikujejo po izražanju površinskih molekul (MHC, kostimulacijskih, adhezijskih in receptorskih), vrsti citokinov, ki jih izločajo ter vrsti imunskega odziva, ki ga sprožijo (Hart in sod., 2011).

2.2.1.1 Plazmacitoidne dendritične celice

Predstavljajo majhen del dendritičnih celic, ki so v krvi in limfatičnih organih. Za to skupino DC je značilno, da je nivo izražanja molekul MHC II, kostimulacijskih molekul ter integrina CD11c nizek. Prav tako izražajo ozek nabor receptorjev povezanih s patogenostjo. Ko prepoznajo tuje nukleinske kisline, pričnejo v zgodnjih fazah imunskega odziva v velikih količinah izločati interferone tipa I (odziv proti virusom) in predstavljati tuje antigene limfocitom T CD4⁺ (Merad in sod., 2013).

2.2.1.2 Klasične oz. mileoidne dendritične celice

Ta vrsta DC je večinoma v limfatičnih (predvsem vranici) in ostalih tkivih. Za razliko od plazmacitoidnih DC, je za mileoidne DC značilen visok nivo izražanja molekul MHC II. Mileoidne DC imajo visoko sposobnost zaznavanja poškodb tkiva in antigenov iz okolja, kakor tudi lastnih celičnih antigenov ter sodelujejo v imunskih odzivih proti bakterijam. Antigene prevzamejo s fagocitozo, pinocitozo ali receptorsko posredovano endocitozo. Po privzemu antigene razgradijo ter vgradijo v MHC molekule. Tako jih predstavijo naivnim

limfocitom T v parakorteksu bezgavk ter sprožijo imunski odziv (Celia in sod., 1997; Merad in sod., 2013).

Na podlagi ontogenetskih in fizioloških lastnosti delimo mileoidne dendritične celice v več podskupin:

▪ **Dendritične celice v nelimfatičnih tkivih**

Predstavljajo 1–5 % vseh celic v vezivnem tkivu, respiratornem, gastrointestinalnem in urogenitalnem traktu ter mišicah. Na podlagi izražanja integrina CD11b jih ločimo v dve podskupini CD103⁺CD11b⁻ in CD11b⁺ (Merad in sod. 2013).

▪ **Epidermalne Langerhansove celice**

V epidermisu kože predstavljajo 3–5 % epidermalnih celic. V primerjavi z ostalimi mileoidnimi DC izražajo nižji nivo MHC II molekul, primerljive vrednosti molekul CD11c ter visok nivo lektina tipa C Langerina (CD207), ki je pomemben za tvorbo intracitoplazemskih Birbekovih granul (Merad in sod., 2008).

▪ **Tkivne migracijske dendritične celice**

Ta vrsta DC se nahaja v perifernih bezgavkah in sodijo med nelimfatične tkivne dendritične celice, ki so pripotovale v bezgavke. Večina teh celic v bezgavkah umre, medtem ko preživele potujejo v krvni obtok, kjer aktivirajo tkivne imunске odzive oz. jih zavrejo (Randolph in sod., 2005).

▪ **Dendritične celice limfatičnih organov**

Ta vrsta DC se v limfatičnih organih diferencira ter v njih ostane vse življenje. Delimo jih na 2 podskupini:

- a) **CD8⁺ dendritične celice:** V vranici in bezgavkah jih je 20–40 %. Za razliko od tkivnih migracijskih DC, ki že zrele pripotujejo v bezgavke, DC CD8⁺ dozoriijo šele, ko jih aktivirajo mikrobní antigeni.
- b) **CD11b⁺ dendritične celice:** So prevladujoče DC limfatičnih organov (razen v timusu) in ne izražajo CD8 molekul (Merad in sod., 2013).

2.2.2 Zorenje dendritičnih celic

Dendritične celice se nahajajo v dveh temeljnih oblikah, in sicer nezrele DC, ki uravnava toleranco do lastnih antigenov ter zrele DC, ki sprožijo imunski odziv na tuje antigene.

Nezrele dendritične celice potujejo v periferiji in sprejemajo signale iz okolja, kot so mikrobnimi antigeni ter vnetni citokini. Signale zaznavajo z membranskimi receptorji PRR, med katere sodijo toll receptorjem podobni (»toll-like«) receptorji, lektini tipa C ter znotrajcelični NOD podobni (»NOD-like«) receptorji. Antigene prevzamejo z endocitozo, fagocitozo ali mikropinocitozo. Po privzemu antigenov le-te razgradijo znotrajcelične proteaze in peptidaze, in nato razgrajene peptide vgradijo v molekule MHC I ali MHC II ter jih predstavijo na svoji površini.

Potem ko nezrele DC prevzamejo antigene, potujejo do sekundarnih limfnih organov in dozoriijo v zrele DC. V tem času izgubijo sposobnost fagocitoze ter procesiranja in predstavljanja novih antigenov. Zrele dendritične celice pričnejo sintetizirati velike količine MHC molekul razredov I in II, adhezijskih in kostimulacijskih molekul kot so molekule CD40, CD80, CD83 in CD86 ter izločati citokine kot so interleukin-12 (IL-12), interleukin-18 (IL-18), interferon α (IFN α) in tumor nekrotizirajoči faktor α (TNF α), ki aktivirajo limfocite T in naravne celice ubijalke (NK) (Haart, 1997; Sousa, 2006; Steinman, 2012).

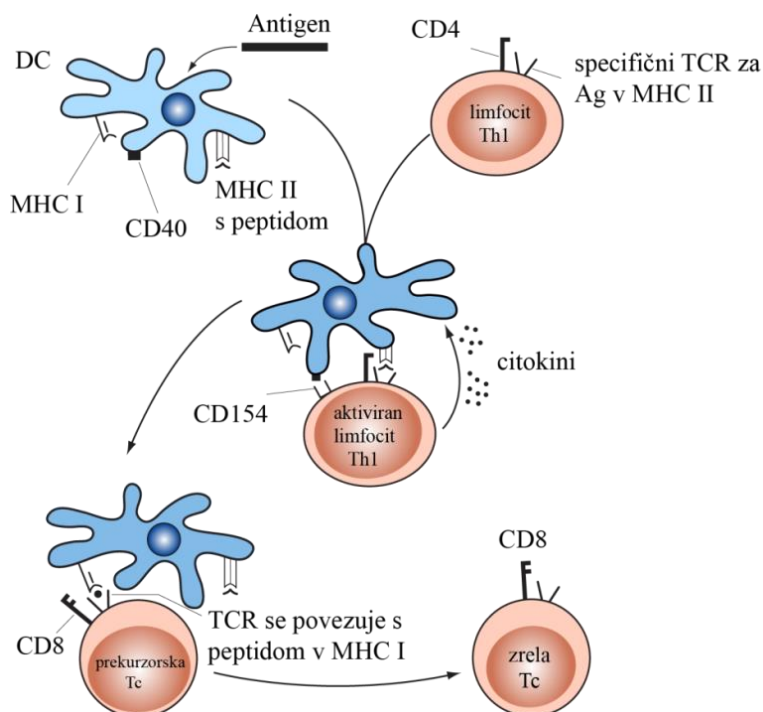
2.2.3 Aktivacija citotoksičnih limfocitov T CD8⁺

Potem ko zrele DC pripotujejo v limfatične vozle, predstavijo peptide antigenov vgrajenih v MHC II kompleks naivnim limfocitom T CD4⁺.

Na membrani limfocitov T se nahajajo T-celični receptorji (antigen specifični receptorji), iz $\alpha\beta$ oz. $\gamma\delta$ dimera, ki so povezani s signalnim kompleksom CD3 (iz $\gamma\delta\epsilon$ in ζ verig). Kompleks CD3 uravnava vez med TCR in MHC molekulami. Ko pridejo naivni limfociti T CD4⁺ v stik z antigenom na dendritičnih celicah, pričnejo izražati kostimulacijske molekule. Molekule CD40L (CD154) na naivnih limfocitih T CD4⁺ se povežejo s kostimulacijskimi molekulami CD40 na DC; prav tako se molekule CD28, prisotne na naivnih limfocitih T CD4⁺ povežejo z molekulami CD80/86 na DC. Naivni limfociti T

CD4⁺ pričnejo izločati citokine, ki spodbudijo DC, da predstavijo molekulo MHC I z vgrajenim antigenom prekuzorskim celicam citotoksičnih limfocitov T (Lydyard in sod., 2011; Haart, 1997).

Citotoksični limfociti T (Tc) delujejo citotoksično na tumorske ter z virusi okužene celice. Na svoji površini izražajo molekule CD8⁺, ki se povežejo z molekulami MHC I in omogočijo Tc, da prepoznajo antigene vgrajene v MHC I, ki jih predstavljajo DC. Za aktivacijo Tc je potreben dvojni signal, in sicer povezava med MHC I in TCR ter vez med kostimulacijskimi molekulami CD28 (na prekuzorski celici Tc) in CD80/86 (na DC). Medcelične adhezijske molekule ICAM-1, prisotne na DC, se povežejo z LFA-1 na limfocitih, medtem ko molekule LFA-3 (angl. *Lymphocyte function-associated antigens*) na DC, ki se povežejo s CD2 na limfocitih, vez med DC in limfociti T stabilizirajo. Povezava kostimulacijskih molekul CD28 in CD80/86 sproži sintezo limfokinov in citokinov, ki povečajo izražanje kostimulacijskih molekul ter aktivacijo in proliferacijo Tc. Prekuzorske celice Tc dozori v citotoksične limfocite T CD8⁺, ki vsebujejo litične granule z grancimi in perforini (Lydyard in sod., 2011).



Slika 1: Aktivacija citotoksičnih limfocitov T CD8⁺. Dendritične celice predstavijo Ag vgrajen v MHC II molekulo naivnim limfocitom CD4⁺. Aktivacija naivnih limfocitov T CD4⁺ sproži izločanje citokinov, ki aktivirajo DC, da predstavijo molekulo MHC I z antigenom TCR na prekuzorski celici Tc, aktivirana prekuzorska celica nato dozori v zrelo Tc (prirejeno po Lydyard in sod. 2011: 146).

2.2.4 Mehanizmi citotoksičnosti

Ko s pomočjo limfocitov Th1 citotoksični limfociti Tc dozoriijo, ti vsebujejo citotoksične granule, ki lahko sprožijo celično smrt tumorskih ali z virusi okuženih celic. To se zgodi na dva načina:

1. Z izločanjem litičnih granul, ki vsebujejo perforine in grancime, kateri vstopijo v tarčno celico

Tako kot naravne celice ubijalke, vsebujejo Tc velike citolitične granule z encimi proteaze, grancim A in grancim B ter perforin. Ob stiku s tumorsko ali z virusi okuženo celico se granule pomaknejo bližje proti celični membrani do mesta stika s tarčno celico. Granule se zlijejo z membrano in iz njih se najprej izloči perforin, ki na tarčni celici ustvari pore skozi katere vstopijo proteaze. Ti encimi povzročijo denaturacijo celičnih proteinov, kar v tarčnih celicah sproži programirano celično smrt (Lydyard in sod., 2011).

2. Stik med FasL na Tc in Fas na tarčni celici

Efektorske celice T na svoji površini izražajo ligand FasL (CD179), receptor Fas (CD95) na svoji površini izražajo tarčne celice. Fas pripada družini receptorjev tumor nekrotizirajočih faktotorjev I, medtem ko je FasL homolog citokinu TNF in pripada družini II. Okužene oz. nenormalne somatske celice z jedri povečajo izražanje Fas (CD95), medtem ko aktivirani Tc povečajo izražanje FasL (CD179). Molekuli se povežeta v kompleks FADD (angl. *Fas-associated death domain*). Kompleks FADD nato aktivira prokaspaze 8 ali 10, ki se aktivirajo tekom avtoproteolize. To vodi do nastanka molekulskega kompleksa DISC (angl. *Death-inducing signaling complex*), ki je ključen pri sprožitvi od receptorjev posredovane apoptoze. Z delovanjem kaspaze 8 pride do okvar mitohondrijev, kar sproži apoptozo oz. programirano celično smrt (Lydyard in sod., 2011).

Apoptoza je pomembna, da se okužene oz. škodljive celice s fagocitozo čim prej odstranijo iz telesa, pri tem pa ne sprožijo vnetnih odzivov (Chávez-Galán in sod., 2009).

2.3 CEPIVA

Cepiva sodijo med biološka zdravila, ki spodbudijo imunski sistem, da zaščiti telo pred dejavniki, ki lahko povzročijo bolezen. Preko cepiva telo sprejme antigene, proti katerim se imunski sistem odzove, jih odstrani ter proti njim razvije imunski spomin. Na podlagi s cepivom pridobljenega imunskega spomina se imunski sistem ob ponovnem stiku s poznanim antigenom hitro odzove (NCI, 2015).

Cepiva proti okužbam z virusi in bakterijami so poznana že več stoletji, medtem ko je uporaba cepiv za stimulacijo imunskega sistema pri odstranjevanju poškodovanih, okuženih in nenormalnih celic, kot so npr. tumorske, še v fazah raziskav (NCI, 2015).

2.3.1 Protitumorska cepiva

2.3.1.1 Preventivna oz. profilaktična cepiva, ki preprečijo nastanek raka pri zdravih ljudeh

Delujejo preventivno proti okužbam z virusi ali bakterijami, katerih okužba prispeva k razvoju raka. Cepiva temeljijo na antigenih virusov oz. bakterij, tako da jih imunski sistem zlahka prepozna ter proti njim sproži odziv (Frazer in sod., 2007).

Do sedaj so v uporabi cepiva proti okužbi s humanim papiloma virusom (HPV) in hepatitisom B (HPB). Okužba s HPV prispeva k razvoju raka na materničnem vratu, vaginalnih in analnih tumorjev, raku penisa ter žrela (Parkin, 2006). Kronična okužba z virusom hepatitisa B lahko vodi do nastanka raka na jetrih. Cepivo proti hepatitisu B je bilo odobreno leta 1981 in je prvo preventivno cepivo proti raku (NIH, 2015). Poleg okužb z omenjenima virusoma naj bi rakotvorno delovale tudi okužbe z virusom hepatitisa C, Epstein-Barr virusom, humanim herpesvirusom 8, humanim T-celičnim limfotropnim virusom, okužbe z bakterijo *Helicobacter pylori* ter okužbe s parazitoma *Schistosoma hematobium* in *Opisthorchis viverrini* (Parkin, 2006).

2.3.1.2 Terapevtska cepiva, ki so namenjena zdravljenju raka

Terapevtska cepiva sodijo med aktivno obliko imunoterapije in so namenjena zdravljenju že razvitih rakavih obolenj. Poznamo celična cepiva na osnovi imunskih celic, cepiva z

oslabljenimi ali mrtvimi tumorskimi celicami, cepiva, ki vsebujejo umetno pripravljene s tumorji povezane antigene (angl. *Tumor-associated antigens*, TAA) in cepiva, ki vsebujejo DNA ali RNA z zapisom za TAA (Buonaguro in sod., 2011; Nemunaitis in Edelman, 2002; Herman in Jeras, 2011; Parmiani in sod., 2007). Ta cepiva aktivirajo bolnikov lastni imunski sistem, da prepreči nadaljnjo rast tumorjev, zmanjša tumorje ali prepreči, da bi se rakavo obolenje ponovilo (Rivoltini in sod., 2005).

Da so protitumorska cepiva učinkovita, morajo izpolnjevati naslednje zahteve:

1. Stimulirati morajo učinkovite odzive proti ustreznim tarčam (TAA).
2. Morajo biti dovolj učinkovita, da obvladajo pregrade, ki jih uporabljajo tumorske celice, ki preprečujejo odziv limfocitov B in citotoksičnih limfocitov T (Parmiani in sod., 2007).

Rakave celice na svoji površini poleg telesu lastnih antigenov izražajo tudi TAA. Izražanje teh antigenov se lahko spreminja oz. TAA delujejo imunosupresivno, kar je razlog, da se lahko rakave celice izognejo imunskemu odzivu ter se delijo še naprej (Rivoltini in sod., 2005). Antigeni, ki se uporabljajo pri izdelavi protitumorskih cepiv so pridobljeni iz rakavih celic, lahko so tudi umetno pripravljene ter izzovejo močnejše imunske odzive kot bi jih sicer. Ti antigeni so iz beljakovin, ogljikovih hidratov, glikoproteinov ali glikopeptidov oz. gangliozidov. V cepivih so lahko uporabljene tudi oslabljene ali mrtve rakave celice, ki nosijo specifične antigene, ali spremenjene imunske celice, ki izražajo tumorske antigene. Te celice so lahko avtologne ali alogene (Buonaguro in sod., 2011; Parmiani in sod., 2007).

Obstajajo tudi protitumorska cepiva, ki vsebujejo deoksiribonukleinsko kislino (DNA) ali ribonukleinsko kislino (RNA) z genetskim zapisom za TAA. Takšna DNA ali RNA se lahko uporabi v obliki »goli« cepiv in se vbrizga v bolnika, oz. je prenesena v telo z neškodljivim virusom. Potem ko je DNA ali RNA prenesena v telo, jo prevzamejo celice in pričnejo izdelovati TAA, proti katerim se sprožijo močni imunski odzivi (Nemunaitis in Edelman, 2002). Do sedaj je odkritih že veliko TAA, med katerimi se jih mnogo uporablja v študijah za eksperimentalna protitumorska cepiva (Renkvist in sod., 2001) .

2.3.2 Protitumorska cepiva na osnovi dendritičnih celic

Zrele DC so najučinkovitejše antigen predstavitvene celice ter lahko aktivirajo celice T pomagalke, citotoksične limfocite T, limfocite B in naravne celice ubijalke, kar je izjemno pomembno pri aktivaciji protitumorskega odziva (Herman in Jeras, 2011). Tumorske celice šibko predstavljajo lastne antigene, zato je predstavitev TAA odvisna predvsem od DC. Cilj protitumorskih cepiv je, da sprožijo odziv tumorsko specifičnih efektorskih limfocitov T, da zmanjšajo tumorje in razvijejo imunski spomin (Palucka in Banchereau, 2012).

Dendritične celice s TAA dobimo na več načinov, in sicer:

- Dendritične celice odvzete pacientom gojimo *ex vivo* z dodanimi TAA in adjuvansi (ki sprožijo zorenje DC) ter zrele DC vrnemo v bolnika.
- Spodbudimo DC, da privzemajo TAA *in vivo* (TAA in adjuvanse vbrizgamo v bolnika) (Palucka in Banchereau, 2012).

Za uporabo DC v cepivih, morajo DC ustrezati določenim merilom, ki so predstavljeni v preglednici št. 2:

Preglednica 2: Merila, katerim morajo ustrezati DC za uporabo v cepivih (povzeto po Figdor in sod., 2004: 478).

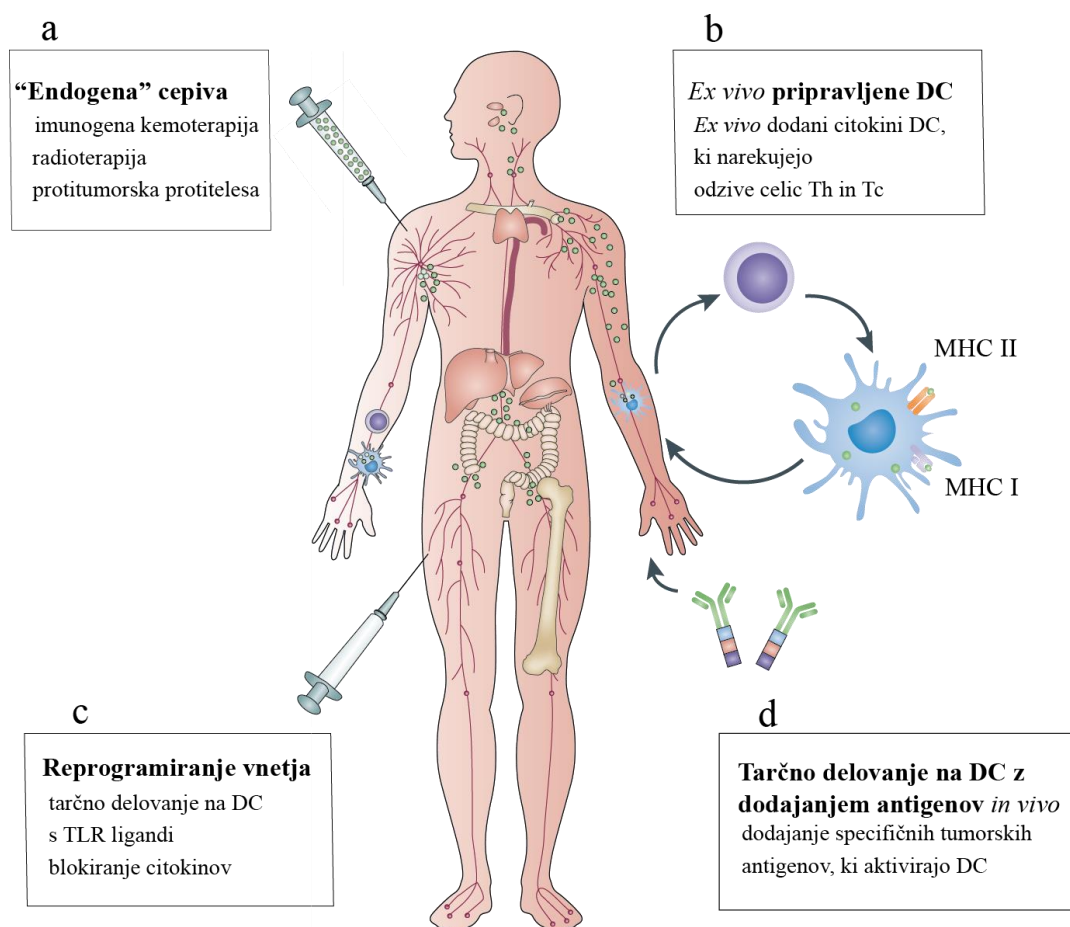
MIKROBIOLOŠKE ANALIZE		Negativne za prisotnost bakterij in gliv	
	Nezrele DC (iDC)	Zrele DC (mDC)	
MORFOLOGIJA	Celice se deloma pritrjajo na podlago. So okrogle oblike z nekaj izrastki.	Celice se slabo oz. se ne pritrjajo na podlago. Imajo izrastke	
FENOTIP	Dendritične celice diferencirane iz monocitov:		
	CD14 ⁻ /niz.	CD80 ⁺	
	CD80 ⁻ /niz.	CD83 ⁺	
	CD83 ⁻	CD86 ⁺	
	MHC I ⁺	MHC I ⁺	
	MHC II ⁺	MHC II ⁺	
VIABILNOST CELIC	CCR7 ⁺		
	> 70 % (določeno po barvanju s tripanskim modrilom).		
STABILNOST FENOTIPA	DC morajo ostati žive še vsaj 2 dni po zorenju v mediju z ali brez citokinov ter morajo ohraniti morfologijo in fenotip značilen za mDC.		

Znak – pomeni, da molekule niso izražene, niz. molekule so slabo izražene, + molekule so dobro izražene.

Preglednica 3: Opis nekaterih površinskih molekul, katerih izražanje se preverja pri določanju kvalitete diferenciacije in zorenja DC.

MOLEKULA	OPIS	VIR
CD1a	Protein, ki se izraža na površini Langerhansovih celic, timocitov in določenih podskupinah DC. Sodeluje pri predstavitvi lipopeptidnih antigenov limfocitom T.	Brigl in Brenner, 2004
CD14	Membranski receptor za LPS na površini monocitov, makrofagov, nevtrofilcev in Langerhansovih celic.	Wang in sod., 2014
CD80	Kostimulacijska molekula na aktiviranih limfocitih B, makrofagih in DC, ki sodeluje pri aktivaciji naivnih limfocitov T.	Linsley in Ledbetter, 1993
CD83	Površinska molekula na aktiviranih limfocitih B in T, DC ter Langerhansovih celicah, pomemben pokazatelj kvalitete zorenja DC.	Prazma in sod., 2007
CD86	Kostimulacijska molekula na APC, skupaj s CD80 je pomembna pri aktivaciji T-celičnih odzivov.	Melichar in sod., 2000).
CD209 (DC-SIGN)	Adhezijska molekula in lektinski receptor tipa C, ki se selektivno izraža na DC. Ligande, ki se povezujejo z DC-SIGN, DC razgradijo ter nato predstavljajo celicam T CD4+.	Švajger in sod., 2010
CD207	Lektinski receptor tipa C za endocitozo, na površini Langerhansovih celic.	Valladeau in sod., 2000
HLA-DR	Predstavlja peptide limfocitom T CD4+. Na površini antigen predstavitevni celic in aktiviranih limfocitov T.	Jendro, 1991

Cilj terapevtskih protitumorskih cepiv je spodbuditi tumorsko specifične CD8⁺ T celične odzive, ki učinkovito in dolgoročno delujejo protitumorsko. Za tak odziv morajo biti aktivirane celice T pomagalka CD4⁺, medtem ko mora biti delovanje regulatornih limfocitov T zavrt. Prav tako mora biti porušeno ravnovesje v tumorskem mikrookolju, ki deluje imunosupresivno. V takšnem okolju potem ko dendritične celice predstavijo tumorske antigene limfocitom T pomagalkam, te naprej sprožijo diferenciacijske signale od tumorjev specifičnim citotoksičnim limfocitom T CD8⁺. Pride do njihove ekspanzije in nastanka spominskih celic (Palucka in Banchereau, 2012).



Slika 2: Dendritične celice v imunoterapiji raka. A: Naključno tarčno delovanje na DC z »endogenimi« cepivi, je posledica sproščanja tumorskih antigenov iz mrtvih tumorskih celic *in vivo* po kemoterapiji, radioterapiji ali imunomodulaciji limfocitov T. B: Cepiva na osnovi *ex vivo* pripravljenih DC, gojenimi s tumorskimi antigeni in nato vrnjenimi v bolnika. C: Tarčno delovanje na DC *in vivo* s kompleksi protiteleso-antigen. D: Tarčno delovanje na DC v tumorskem mikrookolju s himernimi proteini, ki jih tvorijo protitelesa specifična za receptorje DC (DC SIGN, DEC-205) in tumorski antigeni. MHC - molekula poglavitnega kompleksa tkivne skladnosti, TLR – toll podobni (»toll-like«) receptorji (Prirejeno po Palucka in Banchereau, 2012: 274).

Leta 2010 je bilo do danes s strani FDA odobreno edino cepivo za zdravljenje raka na osnovi APC, in sicer za zdravljenje napredovalega raka prostate Sipuleucel-T (Provenge®, Dendreon). Cepivo stimulira imunski odziv proti prostatični kisli fosfatazi (PAP), ki je antigen, prisoten na večini rakavih celicah prostate. Pripravljeno je za vsakega bolnika posebej, pri čemer iz bolnikove krvi z levkoferezo ločijo DC. Te celice nato gojijo s proteinom PAP-GM-CSF, to je protein PAP vezan na granulocitne in makrofagne kolonije spodbujajoči faktor (GM-CSF), ki aktivira imunski sistem ter ojača predstavitev antigenov. Nato so celice z avtotransfuzijo vrnjene v bolnika in sprožijo imunski odziv proti PAP (Kantoff in sod. 2010).

Poleg protitumorskih cepiv za zdravljenje raka prostate so v teku še številne študije za razvoj cepiv namenjenih zdravljenju raka na mehurju, možganskih tumorjev, raka dojke, raka materničnega vratu, Hodgkingovega in Ne-Hodgkingovega limfoma, levkemije, raka na ledvicah, melanoma in multiplega mieloma, pljučnega raka, raka na trebušni slinavki ter trdnih tumorjev (NCI, 2015).

2.3.3 Stranski učinki protitumorskih cepiv

Med najpogostejše stranske učinke uporabe protitumorskih cepiv sodi vnetje na mestu vbizganja cepiva (rdečina, bolečina, otekanje, topla koža, srbenje in občasno izpuščaj). Lahko se pojavijo simptomi podobni gripi (povišana telesna temperatura, mraženje, splošna oslabelelost, navzveja/bruhanje, bolečine v mišicah, utrujenost, glavobol), lahko tudi težave z dihanjem in krvnim tlakom. Pri zelo redkih bolnikih so se pojavili zelo resni stranski učinki kot so astma, vnetje slepiča, pelvična vnetna bolezen ter določena avtoimuna obolenja kot so artritis ali sistemski lupus eritematosus. Kot vsa zdravila, ki delujejo tarčno na imunski sistem, lahko sprožijo življenjsko ogrožujoče odzive kot je npr. huda preobčutljivostna reakcija na določene sestavine v cepivu (NCI, 2015).

2.4 DOBRA PROIZVODNA PRAKSA

Dobra proizvodna praksa zajema zbirko priporočil predpisanih s strani Svetovne zdravstvene organizacije (angl. *World health organisation*, WHO), ki zagotavljajo, da so medicinski izdelki dosledno proizvedeni in dosegajo predpisane standarde, da so primerni za uporabo. Mednje sodijo predpisi, ki zagotavljajo kakovost tako proizvodnje kot nadzora kvalitete izdelkov. Ti določajo, da so vsi postopki proizvodnje in nadzora kakovosti natančno določeni, potrjeni, pregledani in dokumentirani. Osebe mora biti primerno usposobljeno in prostori primerno urejeni. Materiali morajo ustrezati vsem predpisom, da so lahko uporabljeni v proizvodnji farmacevtskih in bioloških izdelkov, vključno s cepivi. Prav tako GMP zajema pravne predpise za distribucijo, pogodbeno proizvodnjo in testiranje izdelkov ter ravnanje v primeru reklamacije izdelka. Za sterilna farmacevtska in biološka zdravila je predpisana dodatna zbirka priporočil, ki sodijo k splošnim priporočilom GMP (WHO, 2015).

Osnutek predpisov GMP s strani Svetovne zdravstvene organizacije (WHO) je bil sprejet leta 1968, nato so leta 1975 smernice GMP potrdile še članice Organizacije Združenih Narodov, OZN. Priloga smernic za biološka zdravila (cepiva, kri in krvne pripravki, antigene, celična in tkivna zdravila ter biofarmaceutске pripravke) je bila leta 1991 potrjena s strani ECBS (angl. *Expert Committee on Biological Standardization*) in vzpostavlja splošni pristop k nadzoru kakovosti bioloških zdravil (WHO, 2015).

V Sloveniji je izvajanje GMP pod nadzorom Javne agencije Republike Slovenije za zdravila in medicinske pripomočke, ki je pooblaščen za izdajo dovoljenj za opravljanje dejavnosti preskrbe s tkivi in celicami, namenjenimi za zdravljenje ter za nadziranje izvajanja določb Zakona o kakovosti in varnosti človeških tkiv in celic, namenjenih za zdravljenje (Uradni list RS, št. 61/2007) ter njemu podrejenih predpisov (JAZMP, 2015).

2.5 BREZSERUMSKI MEDIJI

Za razvoj DC, z namenom uporabe v protitumorskih cepivih, je v okviru GMP zahtevana uporaba brezserumskih medijev. Serumski proteini iz govejega serumskega albumina (angl. *Bovine Serum Albumin*, BSA), ki se dodaja serumskim medijem, lahko izzovejo močne imunske odzive, ki v primeru uporabe DC v protitumorskih cepivih niso usmerjeni proti tumorskim celicam, ampak proti serumskim proteinom oz. je težko natančno predvideti vrsto imunskega odziva (Toldbod in sod., 2003). Prav tako ni priporočena uporaba medijev z dodano alogeno ali avtogeno človeško plazmo ali z dodanim človeškim serumom. V primeru dodanega avtogenega seruma so prisotni številni proteini, še posebej protitelesa, ki lahko vplivajo na privzem in predstavitev antigenov ter nadaljnjo vrsto imunskega odziva, ki ga sprožijo (Tarte in sod., 2000). Pri uporabi cepiv na osnovi DC, gojenih v serumskem mediju, so poročali tudi o anafilaktičnem šoku bolnika (Mackensen in sod., 2000).

Brezserumski medij je gojišče, ki nima dodanega živalskega seruma in je primerno za rast specifične vrste celic. Prednost uporabe brezserumskega medija je gojenje celic v karseda nadzorovanih okoliščinah, celice izražajo bolj homogen in stabilen fenotip, gojenje celic v brezserumskih medijih omogoča ponovljivost poskusov, medtem ko je ključnega pomena,

da v mediju niso prisotni ksenogeni, alogeni ali avtologni proteini, ki bi sprožili nespecifičen imunski odziv na tumorske antigene (Tarte in sod., 2000).

Kljub temu je za uspešno diferenciacijo, rast in vzdrževanje metabolizma tako človeških kot živalskih celic v mikrookolju *ex vivo* potrebno zagotoviti kar se da podobne pogoje, katerim so celice izpostavljene *in vivo*. Z uporabo BSA ali človeškega AB- seruma v brezserumskih medijih celicam zagotovimo vsa potrebna hranila za celični metabolizem, rast in proliferacijo. Mednje sodijo serumski proteini, transportni proteini, pritrjevalni faktorji, encimi, hormoni, rastni faktorji in citokini, maščobne kisline in lipidi, vitamini in elementi v sledeh, ogljikovi hidrati ter neproteinski nitrogeni (Brunner in sod., 2010).

Zaradi negativnih vplivov uporabe BSA ali človeškega AB seruma se jih v brezserumske medije dodaja le minimalni delež (1–10%) (Tarte in sod., 2000), saj večina raziskovalcev, kljub negativnim vplivom serumov, priporoča dodajanje le-teh v medije, da se celice optimalno razvijejo (Figdor in sod., 2004; Pullakart in sod., 2002; Loudovaris in sod., 2001).

3 MATERIAL IN METODE

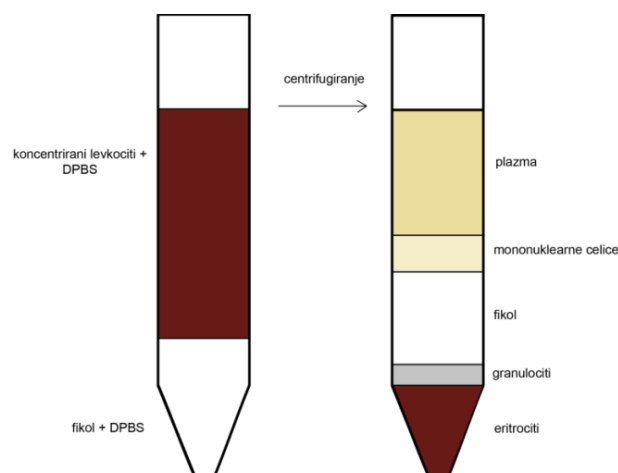
3.1 PRIPRAVA DENDRITIČNIH CELIC

3.1.1 Izolacija mononuklearnih celic (MNC)

Prvi korak pri pripravi DC je izolacija MNC iz človeške periferne krvi z gostotno gradientnim medijem, ki temelji na razlikah v gostoti MNC in gostoti ostalih elementov krvi. Omogoča hitro in učinkovito izolacijo celic, pri čemer ne pride do sprememb fenotipa in funkcije izoliranih mononuklearnih celic (Boyum, 1968; Kaplan in sod., 1982).

Mononuklearne celice (MNC) smo izolirali iz periferne venske krvi odvzete zdravim prostovoljnim krvodajalcem na Zavodu RS za transfuzijsko medicino. Spol in starost krvodajalcev sta za namene naših raziskav nepomembna.

Delo je potekalo pri sobni temperaturi v aseptični komori z laminarnim pretokom zraka (Iskra Pio, Slovenija). Krvne celice smo prejeli v obliki koncentriranega pripravka levkocitov (angl. *Buffy coat*), katerega smo razredčili s pufrom DPBS brez Ca^{2+} in Mg^{2+} (Dulbecco's PBS (1x) without Ca and Mg, PAA Laboratories GmbH, Avstrija) do končnega volumna 150 ml. Predhodno smo v šest 50 ml centrifugirk (Sarsted, Nemčija) pripravili 11,5 ml gostotno gradientnega medija Lympholite-H (Cedarlane Laboratories, Kanada) in 1 ml pufru DPBS ter premešali na vibracijskem mešalniku MS2 minishaker IKA[®] (IKA, Nemčija) pri 1800 obratih. V razmerju 2 : 1 smo dodali koncentriran pripravek levkocitov in centrifugirali v centrifugi Jouan CR4i (Thermo Scientific, MA, ZDA) pri 4 °C, 950 x g, 15 min, s pospeškom in zavoro 1.



Slika 3: Razporeditev fikola in krvnih komponent pred in po centrifugiranju.

Po centrifugiranju smo plast MNC ločili s Pasteurjevo pipeto ter zavrgli preostale celice, plazmo in fikol. Mononuklearne celice iz treh centrifugirk smo združili v novi centrifugirki in jo z DPBS dopolnili do 50 ml. Ponovno smo centrifugirali, in sicer pri 4 °C, 660 x g, s pospeškom in zavoro 5. Po centrifugiranju smo odlili supernatant, celice resuspendirali z 10 ml DPBS ter jih združili v 1 centrifugirko, dopolnili z DPBS do 50 ml in ponovno centrifugirali pri 4 °C, 300 x g, pospeškom in zaviranjem 5. Pred vsakim centrifugiranjem smo odvzeli 500 µl celične suspenzije za analizo s pretočnim citometrom, da smo dobili podatek o številu mononuklearnih celic (monocitov), eritrocitov in trombocitov v vzorcu. Spiranje smo ponavljali dokler se supernatant ni zbistril (najmanj 3-krat, do največ 5-krat), saj so bili po ločbi s fikolom še vedno prisotni trombociti, limfociti, plazma in fikol. Po končanem spiranju smo pelet celic resuspendirali z DPBS do končnega volumna 1000 µl.

3.1.2 Štetje celic z Bürker – Türkovo komoro

Bürker – Türkova komora (Sigma-Aldrich, MO, ZDA) oz. števna ploščica s površino števnih kvadratov 0,0025 mm² se uporablja za štetje krvnih celic.

Glede na ocenjeno gostoto celic smo 20 µl celične suspenzije razredčili v 20 µl, 80 µl ali 180 µl 0,4 % tripanskega modrila (Gibco[®], Thermo Fischer Scientific, ZDA). To barvilo je primerno za določanje viabilnosti celic, saj živih celic ne obarva, medtem ko pri mrtvih celicah vstopa preko celične membrane in jih obarva modro (Strober, 2001). Celice, ki smo jih razredčili v tripanskem modrilu (TM), smo nanесли na predhodno razkuženo Bürker – Türkovo komoro, pokrili s krovnim steklom ter šteli pod svetlobnim mikroskopom Eclipse Ti – S (Nikon, Japonska). Celice smo šteli v 25 kvadratih mreže, in sicer smo vključili celice, ki so ležale na levem in zgornjem robu števnega kvadrata ter glede na faktor redčenja izračunali število celic po naslednji formuli:

$$N = \left(\frac{n}{fr}\right) \times V (ml) \times 10^6 \quad \dots (1)$$

Pri čemer predstavlja:

n...število prešteti celic

V...celoten volumen vzorca

fr...faktor redčenja

N...število celic* v vzorcu (*MNC, monocitov ali iDC)

fr 10 = 180 µl TM : 20 µl celic

fr 20 = 80 µl TM : 20 µl celic

fr 50 = 20 µl TM : 20 µl celic

3.2 IZOLACIJA MONOCITOV IZ MNC

Monocite smo od ostalih MNC ločili na 2 načina:

- Z adherenco na plastiko,
- Z imunomagnetno selekcijo.

3.2.1 Izolacija monocitov z adherenco na plastiko

Na podlagi lastnosti monocitov, da se pritrjajo na podlago, so že pred leti Pawlowski in sodelavci (1983) opisali študijo, kjer so z adherenco na plastiko monocite ločili od limfocitov in bazofilcev. Takšen način izolacije monocitov smo uporabili tudi v našem primeru.

Glede na delež monocitov v vzorcu (analizo smo opravili na pretočnem citometru v laboratoriju za pregled krvi krvodajalcev na Zavodu RS za Transfuzijsko medicino), smo določili gostoto celic za gojenje. Po protokolu uporabe medija za pritrjanje monocitov (PromoCell, 2014) smo v primeru, če je v vzorcu $\geq 25\%$ monocitov, gojili 1×10^6 MNC/cm² ter v primeru, da je celic $< 25\%$, $1,5 \times 10^6$ MNC/cm².

Ker smo celične kulture v naslednjih korakih gojili v dveh različnih brezserumskih medijih, smo ločena medija uporabili tudi pri izolaciji monocitov. Uporabili smo brezserumski medij X-vivo15™ (Lonza, Švica) ter brezserumski medij CellGro® (CellGenix, Nemčija). Vsakemu brezserumskemu mediju smo dodali 1 % človeškega AB-seruma.

V gojilne posode s površino 75 cm² smo dodali 10 ml medija in glede na delež monocitov v vzorcu izračunan volumen MNC. Celice smo inkubirali 1 h pri 37 °C in 5 % CO₂ v inkubatorju *Heraeus HeraCell™* (Thermo Scientific, MA, ZDA). Po končani inkubaciji smo odstranili medij z nepritrjenimi celicami ter po potrebi spirali z DPBS. Tako so nam na dnu gojilne posode ostali pritrjeni monociti, ki smo jih v naslednjem koraku diferencirali v iDC.

3.2.2 Izolacija monocitov z imunomagnetno selekcijo

Pri imunomagnetni selekciji se na želeno vrsto celic iz mešane populacije celic s protitelesi ali lektinom pritrđijo majhni magnetni delci ter se te celice izpostavi močnemu magnetnemu polju. Celice s pritrjenimi delci se obdržijo v magnetnem polju, medtem ko lahko ostale celice odstranimo – pozitivna selekcija (Clarke in Davies, 2001). Za namene naših raziskav smo uporabili sistem MACS MicroBeads® (Miltenyi Biotec, Nemčija) izolacijski kit, ki temelji na pozitivni selekciji. Vsebuje magnetne nanodelce, prevlečene s protitelesi proti CD14, ki je specifičen označevalec monocitov, tako so nam v magnetnem polju ostali le monociti. Ti delci so tako majhni, da ne aktivirajo celic oz. se ne vežejo na površinske epitope celic (MACS MicroBeads, 2015).

Delo je potekalo pri 4 °C, da smo zmanjšali fagocitno aktivnost in druge metabolne procese celic ter da smo preprečili nespecifično vezavo protiteles na celice.

Pelet predhodno izoliranih MNC smo resuspendirali z ohlajenim 0,5 % pufrom FBS (150 µl govejega serumskega albumina in 30 ml pufr DPBS), tako da smo dobili homogeno zmes celic, ki smo jih nato 10 min inkubirali pri 4 °C. Po inkubaciji smo dodali MACS MicroBeads® označevalce ter celice ponovno inkubirali 20 minut pri 4 °C. Po inkubaciji smo dodali 20 ml na 4 °C ohlajenega pufr DPBS ter centrifugirali 7 minut, 400 x g, s pospeškom in zaviranjem 5. Medtem smo pripravili magnetno stojalo MidiMACS™ (Miltenyi Biotec GmbH, Nemčija), na katerega smo postavili kolono LD (Miltenyi Biotec GmbH, Nemčija) in jo sprali z 2 ml 0,5 % FBS. V tem času se je končalo centrifugiranje označenih celic. Odstranili smo supernatant in označene celice resuspendirali z 0,5 % pufrom FBS ter nanegli na kolono, potem ko sta skozi že stekla 2 ml 0,5 % pufr FBS. Ko so skozi kolono stekle neoznačene celice, smo kolono še enkrat sprali z 1 ml pufr DPBS in nato še dvakrat s 5 ml pufr DPBS. Po izteku zadnjega spiranja smo pod kolono nastavili novo centrifugirko, kolono napolnili s 3 ml pufr DPBS (ogretega na sobno temperaturo), ter s priloženim batom iztislili označene celice iz kolone. Tako smo v centrifugirki zbrali CD14 pozitivne celice (monocite).

3.3 DIFERENCIACIJA DENDRITIČNIH CELIC IZ MONOCITOV

Uporaba brezserumskega medija X-vivo15™ je že več let zelo razširjena pri kliničnih študijah (Romani in sod., 1996). Opravljene so bile tudi raziskave, kjer so primerjali vpliv serumskih medijev ter brezserumskih medijev X-vivo15™ in CellGro® brez dodanega ali z dodanim 2 % človeškim serumom na diferenciacijo in zorenje DC (Napoletano in sod., 2007; Kolanowski in sod., 2014). Ker še ni podatkov o vplivu brezserumskih medijev X-vivo15™ in CellGro® z dodanim 1 % človeškim AB- serumom na kvaliteto diferenciacije in zorenja DC smo pri naših poskusih izvedli tovrstne analize.

Dendritične celice smo iz monocitov diferencirali na 3 načine:

1. Iz monocitov izoliranih z adherenco na plastiko, v medijih X-vivo15™ in CellGro® s kombinacijo citokinov GM-SCF + IL-4. Natančno število monocitov v tem primeru ni znano, saj so ostali pritrjeni na dnu gojilne posode.
2. Iz monocitov izoliranih z imunomagnetno selekcijo, v medijih X-vivo15™ in CellGro® s kombinacijo citokinov GM-SCF + IL-4. V vsakem mediju posebej smo diferencirali 10×10^6 monocitov.
3. Neposredno iz mononuklearnih celic periferne venske krvi v mediju CellGro®, uporabili smo različne gostote celic (1×10^6 MNC/1 ml medija in 2×10^6 MNC/1 ml medija) z različnimi kombinacijami citokinov GM-CSF, IL-4, IFN α , TNF α in IL-15.

3.3.1 Diferenciacija dendritičnih celic iz monocitov izoliranih z adherenco na plastiko

V predhodnih korakih smo celice inkubirali v dveh različnih medijih, tako smo nadaljevali tudi diferenciacijo monocitov v DC. Celični kulturi smo gojili v 15 ml brezserumskega medija X-vivo15™ in v 15 ml brezserumskega medija CellGro®, v obeh primerih z dodanim 1 % človeškim AB- serumom.

Za diferenciacijo monocitov v DC smo dodali hematopoetski rastni faktor GM-CSF (800 U/ml) in citokin IL-4 (1000 U/ml) (oba PeproTech, NY, ZDA).

Prvi citokin, GM-CSF aktivira znotrajcelične signalne module ter igra pomembno vlogo pri diferenciaciji, preživetju in proliferaciji prekursorjskih celic DC ter posledično pri razvoju DC (Van de Laar in sod., 2012). Interlevkin-4 je v kombinaciji z GM-CSF sprožilec diferenciacije DC iz monocitov (Hiasa in sod., 2009).

Celični kulturi smo inkubirali 5 dni pri 37 °C s 5 % CO₂. Po 48 h inkubacije smo menjali polovico medija ter dodali začetni koncentraciji GM-CSF in IL-4.

3.3.2 Diferenciacija DC iz monocitov po imunomagnetni izolaciji

Pri imunomagnetni izolaciji monocitov smo celice zbrali v 3 ml pufru DPBS ter jih šteli v Bürker – Türkovi komori (opisano v poglavju 3.1.2). V posamezni kulturi (v X-vivo15™ in CellGro®) smo gojili 10 milijonov celic, in sicer v ploščah s šestimi vdolbinami (Sarsted, Nemčija). Volumen medija (μl) v posamezni vdolbini smo določili po formuli:

$$V \text{ medija } (\mu\text{l}) = 1,6 \times \text{št. celic} \quad \dots (2)$$

Tako kot je opisano v prejšnjem poglavju, smo celični kulturi inkubirali 5 dni v X-vivo15™ in CellGro® z dodanim 800 U/ml GM-CSF in 1000 U/ml IL-4.

3.3.3 Izkoristek diferenciacije monocitov v dendritične celice (angl. *Cell yield*)

V primeru imunomagnetne izolacije monocitov smo gojili natančno določeno število monocitov v posamezni kulturi. Po 5-ih dneh diferenciacije smo celice ponovno šteli (opisano v poglavju 3.1.2) ter dobili podatek o izkoristku diferenciacije.

Izkoristek diferenciacije smo izračunali po formuli:

$$\text{Izkoristek diferenciacije} = \frac{Dc}{Mo} \times 100 (\%) \quad \dots (3)$$

pri čemer DC predstavlja število DC po diferenciaciji in Mo število monocitov pred diferenciacijo.

3.3.4 Diferenciacija dendritičnih celic iz celokupnih mononuklearnih celic periferne venske krvi

Tako v primeru izolacije monocitov z adherenco na plastiko, kot pri imunomagnetni selekciji monocitov, ti postopki terjajo določen čas ter še posebej pri imunomagnetni selekciji drage reagente. Temu smo se izognili v primeru diferenciacija DC iz celokupnih MNC periferne venske krvi, saj smo preskočili korak izolacije monocitov. S temi poskusi smo preverjali vpliv različnih kombinacij rastnega faktorja in citokinov pri različnih gostotah MNC na diferenciacijo DC v mediju CellGro®.

Po izolaciji MNC smo celice prešteli (opisano v poglavju 3.1.2) ter določili način gojenja:

Preglednica 4: Kombinacije citokinov uporabljene pri različnih gostotah celic v primeru diferenciacije CD iz celokupnih MNC

Medij	CellGro®	CellGro®
Gostota MNC	1 x 10 ⁶ / ml medija	2 x 10 ⁶ /ml medija
Citokini (vsi proizvajalca PeproTech EC, NJ, ZDA)	kontrola	kontrola
	800 U/ml GM-CSF	800 U/ml GM-CSF
	800 U/ml GM-CSF + 1000 U/ml IL-4	800 U/ml GM-CSF + 1000 U/ml IL-4
	800 U/ml GM-CSF + 1000 U/ml IFN α	800 U/ml GM-CSF + 1000 U/ml IFN α
	800 U/ml GM-CSF + 1000 U/ml TNF α	800 U/ml GM-CSF + 1000 U/ml TNF α
	800 U/ml GM-CSF + 1000 U/ml IL-4 + 1000 U/ml IFN α	800 U/ml GM-CSF + 1000 U/ml IL-4 + 1000 U/ml IFN α
	/	800 U/ml GM-CSF + 20 ng/ml IL-15

Poleg rastnega faktorja GM-CSF in citokina IL-4 smo uporabili še citokine IFN α , TNF α ter IL-15. Inreferon α sodi v družino tipa I interferonov ter pomembno vpliva na diferenciacijo monocitov v DC (Paquette in Hsu, 2002). Naslednjega v kombinaciji z GM-CSF smo uporabili TNF α . To je vnetni citokin, ki ga izločajo predvsem makrofagi. Ima pomembno vlogo pri diferenciaciji DC ter nadaljnjih Th1 imunskih odzivih (Iwamoto in sod., 2007). Kot zadnjega v kombinaciji z GM-CSF smo uporabili citokin IL-15, ki ga izločajo keratinociti iz epidermisa ali mukoznega epitela. V kombinaciji z GM-CSF, IL-15 vpliva na diferenciacijo monocitov v nezrele Langerhansove celice (Berard in sod., 2001).

Diferenciacija je potekala 5 dni. Celični kulturi smo inkubirali pri 37 °C, 5 % CO₂. Po 2 dneh inkubiranja smo menjali polovico začetnega medija ter dodali začetne koncentracije rastnega faktorja in citokinov.

3.3.5 Preverjanje uspešnosti diferenciacije monocitov v dendritične celice

Po 5-ih dneh diferenciacije monocitov v DC smo s pufrom DPBS celice sprali iz gojilne posode oz. plošč s 6 vdolbinami, zbrali v centrifugirki, centrifugirali 7 minut, 400 x g, s pospeškom in zavoro 5. Odlili smo supernatant ter nezrele dendritične celice (iDC) resuspendirali s pufrom DPBS v končni volumen 1000 µl. Število celic v vzorcu smo določili s štetjem z Bürker – Türkovo komoro (opisno v poglavju 3.1.2).

Tekom diferenciacije monocitov v DC se zmanjšuje izražanje molekul CD14, ki so značilne za monocite, hkrati se pri iDC pričnejo izražati molekule CD1a in CD83 (Zhou in Teeder, 1996). Prav tako sta pomembni pokazatelj diferenciacije monocitov v iDC molekula CD207, ki se izraža izključno na DC ter molekula CD209, ki se izraža pri Langerhansovih celicah (Švajger in sod., 2010; Valladeau in sod., 2000).

Na podlagi teh podatkov in meril, ki jih morajo iDC dosegati za uporabo v cepivih (Pregl. 2), smo preverjali uspešnost diferenciacije monocitov v iDC z izražanjem omenjenih površinskih molekul.

Za preverjanje posameznega membranskega označevalca s pretočno citometrijo smo potrebovali vsaj 100 000 celic. Iz posamezne celične kulture smo tako skupaj odvzeli 500 000 oz. pri diferenciaciji DC iz MNC 600 000 celic. Odvzetim celicam smo dodali pufer DPBS do končnega volumna 550 µl ter od tega v vsako epruveto odvzeli 100 µl celične suspenzije. Dodali smo monoklonska protitelesa konjugirana s fluorescentnim barvilom fikoeritrin (PE) ali fluorescein izotiocianatom (FITC) proti-CD1a (FITC), proti-CD14 (FITC), proti-CD83 (PE), proti-CD209 (PE) (vsi proizvajalca Biolegend, CA, ZDA). Preverjanje izražanja CD207 z monoklonskim protitelesom konjugiranim s fluorescentnim barvilom PE proti-CD207 (Biolegend, CA, ZDA) smo izvedli le v primeru diferenciacije DC iz MNC v celičnih kulturah 20×10^6 MNC/1 ml medija pri vseh kombinacijah

citokinov, razen pri diferenciaciji DC ob prisotnosti GM-CSF + IL-4 + IFN α in GM-CSF+TNF α .

Celice z dodanimi protitelesi smo inkubirali v temi pri sobni temperaturi, 20 minut. Po pretečenem času smo jih sprali z 2 ml DPBS, centrifugirali 3 minute in pol pri 2300 obratih/minuto, s pospeškom in zaviranjem 5, odlili supernatant ter celice fiksirali v 2 % raztopini paraformalaldehida PFA (Sigma-Aldrich, MO, ZDA) ter izvedli meritve na pretočnem citometru.

3.4 ZORENJE DENDRITIČNIH CELIC

Nezrele DC smo zoreli v dveh primerih, in sicer iz nezrelih DC diferenciranih iz monocitov izoliranih z adherenco na plastiko ter nezrelih DC diferenciranih iz monocitov, ki smo jih izolirali z imunomagnetno selekcijo. V vsakem primeru smo iDC zoreli v kontrolni in tretirani skupini. Kontrolni kulturi smo dodali 800 U/ml GM-CSF, medtem ko smo tretirani kulturi dodali 800 U/ml GM-CSF, 20 ng/ml LPS (lipopolisaharid) in 1000 U/ml IFN γ (interferon γ), vsi proizvajalca Sigma-Aldrich, MO, ZDA.

Tako v kontrolni kot tretirani skupini smo v posamezni celični kulturi gojili 2×10^6 celic/3,2 ml medija. Nezrele dendritične celice smo zoreli 2 dni v inkubatorju pri pogojih 37 °C in 5 % CO₂.

3.5 PREVERJANJE USPEŠNOSTI ZORENJA DENDRITIČNIH CELIC

Po 2 dneh zorenja iDC v zrele dendritične celice (mDC) smo celice s pufrom DPBS sprali iz gojilne posode oz. plošč s 6 vdolbinami, zbrali v centrifugirki, centrifugirali 7 minut, 400 x g, s pospeškom in zavoro 5. Odlili smo supernatant ter mDC resuspendirali s pufrom DPBS do končnega volumna 1000 μ l. Število celic v vzorcu smo določili s štetjem z Bürker – Türkovo komoro (opisno v poglavju 3.1.2).

Na podlagi meril, katerim morajo ustrezati zrele DC za uporabo v cepivih (Pregl. 2), smo preverili izražanje površinskih molekul CD80, CD83, CD86 ter HLA-DR.

Preverjanje izražanja membranskih molekul značilnih za mDC je potekalo po istem postopku kot preverjanje izražanja membranskih molekul na površini iDC (opisno v

poglavju 3.3.4), le da smo v tem primeru uporabili protitelesa proti-CD80 (FITC) in proti-CD83 (FITC), proti-CD86 (PE) in proti-HLA-DR (PE) (vsi Biogeneral, KA, ZDA).

3.6 AKTIVACIJA T-CELIČNIH RECEPTORJEV

S temi poskusi smo želeli preveriti širši spekter aktivacije limfocitov T. Ker lahko DC v ko-kulturi aktivirajo limfocite T le do določene mere, smo z reagentom za aktivacijo TCR želeli doseči poliklonsko aktivacijo limfocitov T.

Po 5-ih dneh inkubacije MNC (opisano v poglavju 3.2.3) smo del celic porabili za preverjanje uspešnosti diferenciacije MNC v DC, medtem ko smo iz preostalega dela MNC, med katerimi so bili prisotni tudi limfociti, uporabili za aktivacijo T-celičnih receptorjev (TCR).

Za aktivacijo T-celičnih receptorjev smo uporabili komplet reagentov za aktivacijo limfocitov T (MACS Miltenyi Biotec GmbH, Nemčija) ter poskus opravili v skladu z navodili proizvajalca. Tretirali smo 300 000 celic v 300 μ l medija v posamezni skupini (v ploščah s 96 vdolbinami (Sarsted, Nemčija)). Uporabili smo celične kulture, ki smo jih predhodno gojili izključno v mediju CellGro® ob prisotnosti citokina GM-CSF (800 U/ml) ter kombinacijami GM-CSF (800 U/ml) + IL-4 (1000 U/ml), GM-CSF (800 U/ml) + IFN α (1000 U/ μ l) pri gostoti celic 10×10^6 MNC/ 1 ml medija in pri gostoti celic 20×10^6 MNC/ 1 ml medija. Kombinacijo citokinov GM-CSF (800 U/ml) + TNF α (1000 U/ μ l) smo uporabili le pri gostoti 10×10^6 MNC/ 1 ml medija, medtem ko smo kombinaciji GM-CSF (800 U/ml) + IL-4 (1000 U/ml) + IFN α (1000 U/ μ l) in GM-CSF (800 U/ml) + IL-15 (20 ng/ml) uporabili le pri gostoti celic 10×10^6 MNC/ 1 ml medija.

Pri vseh kombinacijah citokinov smo celične kulture gojili v vzporednih skupinah. Eno skupino smo tretirali z reagentom za aktivacijo limfocitov T, druga skupina je bila kontrolna. Celične kulture smo inkubirali 3 dni pri 37 °C in 5 % CO₂.

3.7 PREVERJANJE IZRAŽANJA KOSTIMULACIJSKE MOLEKULE CD4 TER TRANSKRIPCISKIH FAKTORJEV T-BET IN GATA-3

Po inkubaciji tretiranih limfocitov T z reagentom za aktivacijo limfocitov T smo celice fiksirali z 2 % PFA in jih s pufrom DPBS sprali s plošč, zbrali v centrifugirki in centrifugirali 5 minut, 550 x g, s pospeškom in zavoro 5. Potem ko smo odpipetirali supernatant, smo s celicami delali na ledu. Celice smo resuspendirali s 500 μ l MetOH (0 °C) in inkubirali 10 minut, da smo denaturirali celično membrano. Nato smo dodali 5 ml pufru DPBS ogretega na sobno temperaturo in ponovno centrifugirali 5 minut, 550 x g, s pospeškom in zavoro 5. Postopek smo ponovili, nato smo celice resuspendirali v 400 μ l 3 % pufru FBS in inkubirali 30 minut pri sobni temperaturi. Iz vsake skupine tretiranja smo za posamezno označevanje potrebovali 100 μ l celične suspenzije. Dodali smo fluorescenčno označena protitelesa (1 μ l protiteles/100 μ l celične suspenzije) proti-CD4, proti T-bet in proti GATA-3 (vsi proizvajalca Biolegend, CA, ZDA) ter v temi inkubirali 45 minut. Po inkubaciji celic s protitelesi smo celice sprali z 2 ml pufru DPBS, centrifugirali pri 2300 obratih na minuto, 3 minute in pol, s pospeškom in zaviranjem 5, odlili supernatant in dodali 300 μ l 2 % PFA ter celice shranili pri 4 °C do izvedbe meritev na pretočnem citometru.

3.8 ANALIZA S PRETOČNO CITOMETRIJO

Vrednosti izražanja membranskih označevalcev in transkripcijskih faktorjev smo merili s pretočno citometrijo. Celice smo označili z monoklonalnim protitelesom konjugiranim s fluorescentnim barvilom fikoeritrin (PE) ali fluorescein izotiocianatom (FITC) za iskane označevalce in faktorje po postopkih opisanih v poglavjih 3.3.4, 3.4.1 in 3.6. Pri tem smo vrednosti izražanja posameznega označevalca primerjali z izotipsko kontrolo, ki smo jo opravili pri vsakem poskusu. Za analizo izražanja iskanega protitelesa smo potrebovali vsaj 100 000 celic resuspendiranih v 300 μ l 2 % PFA. Rezultati analize na pretočni citometriji so bili prikazani v obliki diagrama FSC-H/SSC-H, pri čemer je položaj vsake točke odvisen od velikosti celice (parameter FSC, angl. *Forward Scatter*) ter znatosti celice (parameter SSC, angl. *Side Scatter*). Posamezno skupino celic smo označili in nato opazovali lastnosti celic v izbranem »oknu« glede na lastnosti njihovih fluorescenčnih parametrov (fluorescenca FITC, ki sveti zeleno in fluorescenca PE, ki sveti rdeče) (Kotnik

in sod., 2010). Iz dobljenih rezultatov nas je zanimala srednja vrednost intenzitete fluorescence iskanega protitelesa (angl. *Mean fluorescence intensity*, MFI).

3.9 STATISTIČNE METODE

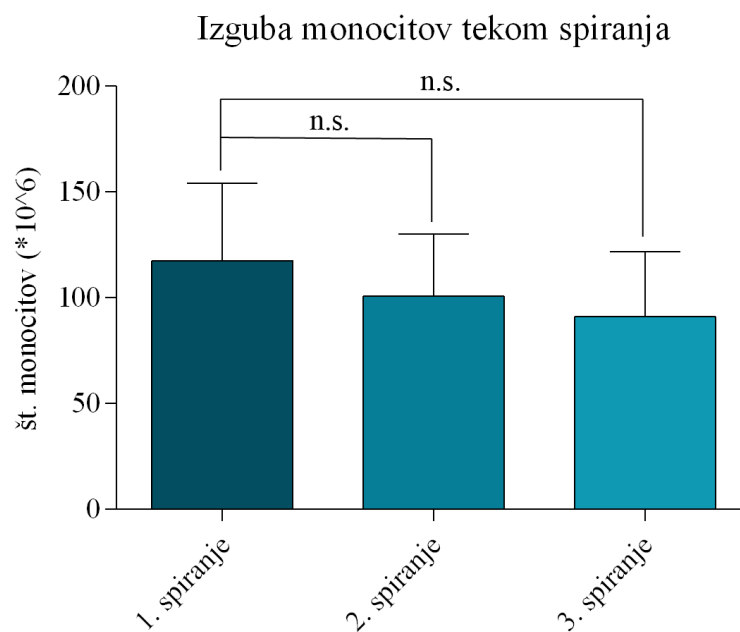
Dobljene rezultate smo statistično obdelali s programom Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft, Corp., ZDA) ter s programom GraphPad Prism verzije 6 (GraphPad Software, Inc., ZDA). Povprečne vrednosti ter standardni odklon (SD) pridobljenih podatkov smo izračunali v programu Microsoft Office Excel 2010, medtem ko smo neparni Studentov t-test za določitev statistično pomembnih razlik med dvema skupinama podatkov z izračunom vrednosti p (s prikazom oznak z^* , če je $p \leq 0,05$; z^{**} če je $p < 0,01$ in z^{***} , če je $p < 0,001$ in n.s., če ni statistično pomembnih razlik) izračunali v programu GraphPad Prism 6.

4 REZULTATI

4.1 IZOLACIJA MONONUKLEARNIH CELIC IZ PERIFERNE VENSKE KRVI

Mononuklearne celice (MNC) smo izolirali iz svežega koncentriranega levkocitnega pripravka (angl. *Buffy coat*). Meritve smo opravili pri 5 ponovitvah izolacije MNC, pri čemer smo MNC po ločbi z gostotno gradientnim medijem trikrat spirali.

Izmed vseh MNC nas je zanimala izguba monocitov tekom spiranja. Povprečno število monocitov po prvem spiranju je bilo $117,6 (SD \pm 36,6) \times 10^6$, po drugem spiranju $100,7 (SD \pm 29,5) \times 10^6$ ter po zadnjem spiranju $91 (SD \pm 30,8) \times 10^6$.



Slika 4: Izguba monocitov po spiranju s pufrom DPBS po ločbi z gostotno gradientnim medijem. Z neparnim Studentovim t-testom smo določili vrednost p med vzorcema 1. in 2. ter 1. in 3. spiranje ter z n.s. označili, če med vzorcema ni statistično pomembnih razlik ($p > 0,05$).

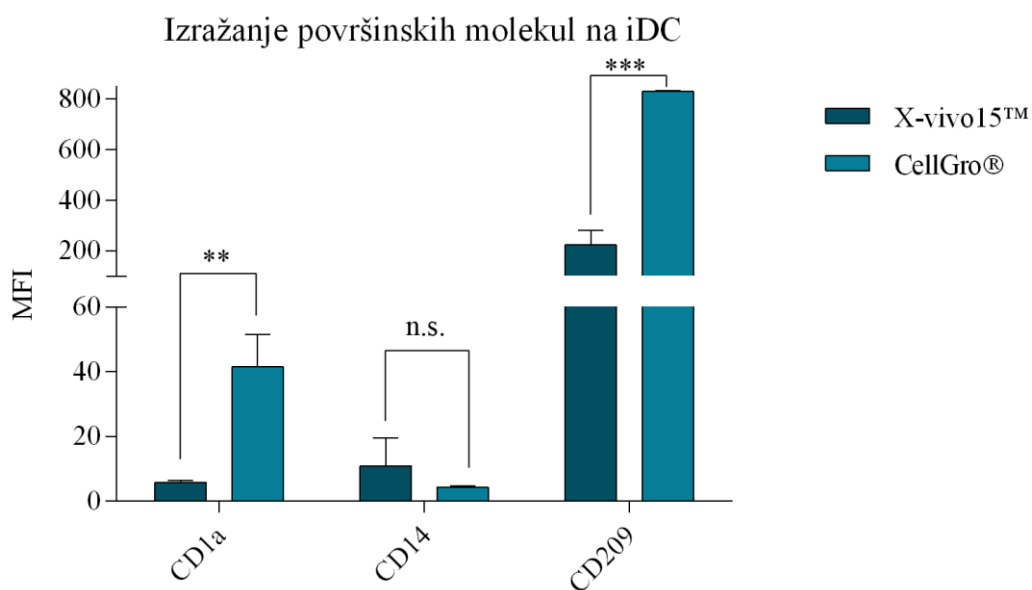
Rezultati prikazujejo, da tekom spiranja MNC ni prišlo do statistično pomembnih razlik pri izgubi monocitov.

4.2 DIFERENCIACIJA IN ZORENJE DENDRITIČNIH CELIC PO IZOLACIJI MONOCITOV Z ADHERENCO NA PLASTIKO

Celične kulture smo v primeru, če je bil delež monocitov v kulturi $MNC \geq 25\%$, gojili 1×10^6 MNC/cm^2 in v primeru, da je delež monocitov v kulturi $MNC < 25\%$, gojili $1,5 \times 10^6$ MNC/cm^2 .

4.2.1 Diferenciacija dendritičnih celic

Zanimalo nas je, če brezserumska medija X-vivo15™ (Lonza, Švica) in CellGro® (CellGenix, Nemčija) z dodanim 1 % človeškim AB-serumom različno vplivata na diferenciacijo monocitov v dendritične celice. Z uporabo konjugiranih fluorescenčnih protiteles smo preverjali uspešnost diferenciacije, in sicer nas je zanimalo izražanje površinskih molekul na iDC.

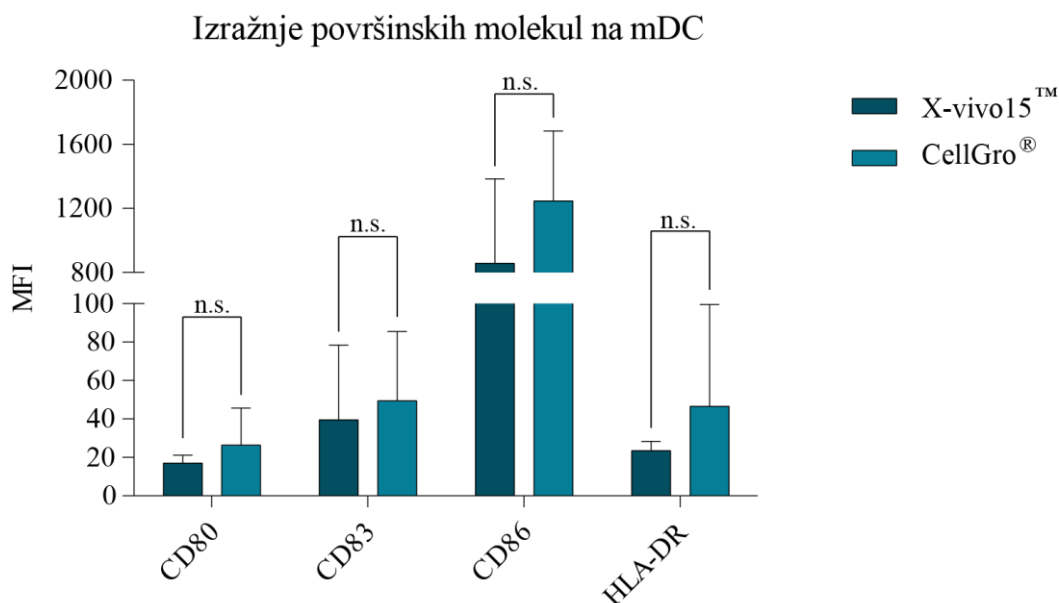


Slika 5: Izražanje površinskih molekul na iDC po izolaciji monocitov z adherenco na plastiko. Graf prikazuje srednje vrednosti intenzitete fluorescence (MFI) za posamezno molekulo ter standardni odklon, izračunan na podlagi treh meritev. Z neparnim Studentovim t-testom smo določili vrednost p . Statistično pomembno razliko smo prikazali z **, če je $p < 0,01$, z ***, če je $p < 0,001$, medtem ko n.s. pomeni, da med vzorčema ni statistično značilnih razlik.

Medija X-vivo15™ in CellGro® statistično značilno različno vplivata na izražanje površinskih molekul na nezrelah dendritičnih celicah CD1a ($p = 0,0034$) in CD209 ($p = 0,0001$), medtem ko v primeru izražanja CD14 ni statistično pomembnih razlik ($p = 0,3$).

4.2.2 Zorenje dendritičnih celic

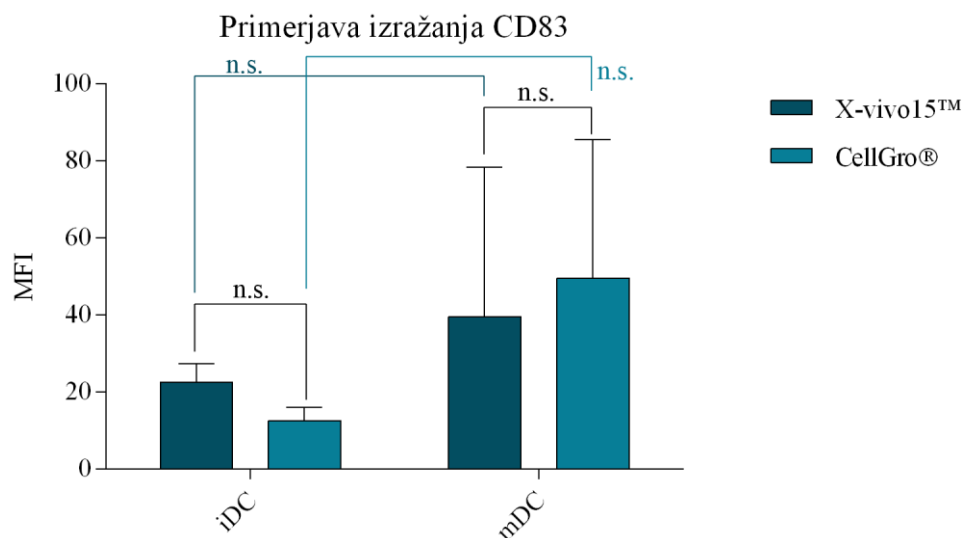
Diferenciranim DC smo dodali LPS in IFN γ ter jih še v 2 dni zoreli pri pogojih opisanih v poglavju 3.4. Z uporabo konjugiranih fluorescentnih protiteles smo preverili kvaliteto zorenja DC glede na izražanje površinskih molekul značilnih mDC.



Slika 6: Izražanje površinskih molekul na mDC diferenciranih iz monocitov, ki smo jih izolirali z adherenco na plastiko. Graf prikazuje srednje vrednosti intenzitete fluorescence (MFI) za posamezno molekulo ter standardni odklon, izračunan na podlagi dveh meritev. S parnim studentovim t-testom smo izračunali vrednosti p , pri čemer n.s. predstavlja vrednost $p \geq 0,05$.

Pri primerjavi srednjih vrednosti intenzitete fluorescence za površinske molekule CD80, CD83, CD86 in HLA-DR pri celicah iz celičnih kultur v CellGro® in X-vivo15™, se ne kažejo statistično značilne razlike v izražanju.

4.2.3 Primerjava izražanja površinske molekule CD83 med iDC in mDC



Slika 7: Primerjava izražanja molekule CD83 med celicami gojenimi v X-vivo15™ in CellGro® ter primerjava izražanja CD83 med iDC in mDC gojenih v X-vivo15™ in primerjava izražanja CD83 med iDC in mDC gojenih v CellGro®. Oznaka n.s. predstavlja vrednosti $p > 0,05$.

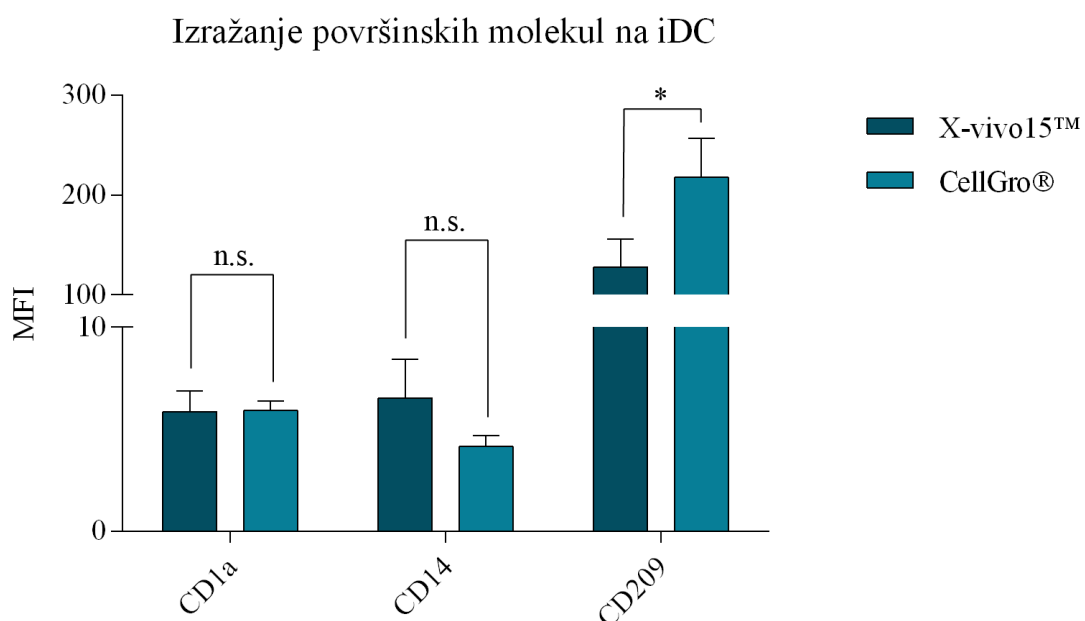
V primeru diferenciacije DC se ne kažejo statistično pomembne značilne razlike v izražanju CD83 med medijema ($p = 0,06$), prav tako pri zrelih DC ni statistično značilnih razlik v izražanju CD83 med celicami gojenimi v X-vivo15™ in CellGro® ($p = 0,8$). Pri primerjavi izražanja CD83 na iDC in mDC gojenih v X-vivo15™ se ne kažejo statistično pomembne razlike ($p = 0,6$), prav tako ni statistično pomembnih razlik v izražanju CD83 med iDC in mDC gojenih v CellGro® ($p = 0,3$).

4.3 DIFERENCIACIJA IN ZORENJE DENDRITIČNIH CELIC PO IZOLACIJI MONOCITOV Z IMUNOMAGNETNO SELEKCIJO

Pri imunomagnetni izolaciji monocitov smo od ostalih MNC monocite ločili na podlagi pozitivne selekcije, opisano v poglavju 3.2.2. Pri vsaki izolaciji smo povprečno izolirali $75,5 \pm 31,2 \times 10^6$ monocitov. Z imunomagnetno izolacijo smo pridobili čisto suspenzijo monocitov; posledično smo lahko v poskusu uporabili njihovo natančno določeno število.

4.3.1 Diferenciacija dendritičnih celic

Pri ugotavljanju vpliva brezserumskih medijev X-vivo15™ ter CellGro® z dodanim 1 % človeškim AB- serumom na diferenciacijo monocitov v dendritične celice po imunomagnetni izolaciji monocitov, smo v posameznem mediju gojili 10×10^6 celic. Diferenciacija je potekala 5 dni z dodanim GM-CSF in IL-4 pri pogojih opisanih v poglavju 3.3.2. Tako kot je opisano v poglavju 3.3.4, smo z barvanjem površinskih molekul s konjugiranimi fluorescenčnimi protitelesi preverjali uspešnost diferenciacije.

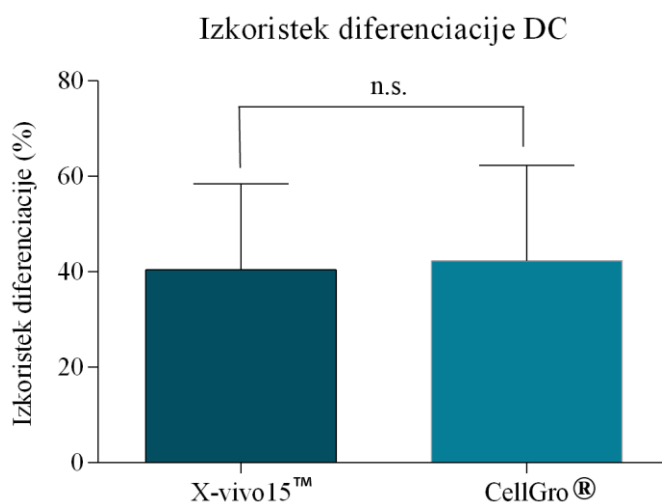


Slika 8: Izražanje površinskih molekul na iDC, ki so se diferencirale iz monocitov izoliranih z imunomagnetno selekcijo. Graf prikazuje srednje vrednosti intenzitete fluorescence (MFI) za posamezno molekulo ter standardni odklon, izračunan na podlagi treh meritev. Z neparnim Studentovim t-testom smo določili vrednost p . Statistično značilne razlike smo prikazali z *, če je $p \leq 0,05$ in z n.s. v primeru, da med vzorcema ni statistično pomembnih razlik.

Na izražanje CD1a, CD14 vrsta medija ni statistično vplivala. Izražanje molekule CD209 (DC-SIGN) je pri celicah iz celične kulture v CellGro® statistično značilno različno ($p < 0,05$) od izražanja CD209 pri celicah iz celične kulture v X-vivo15™.

4.3.2 Izkoristek diferenciacije monocitov v dendritične celice

Za diferenciacijo monocitov v dendritične celice smo tako v celični kulturi gojeni v X-vivo15™ kot v celični kulturi, ki smo jo gojili v mediju CellGro® diferenciarli 10×10^6 celic. V primeru diferenciacije monocitov v DC v X-vivo15™ je bil izkoristek diferenciacije $40,4 \pm 18,1$ % ter pri diferenciaciji v CellGro® $42,4 \pm 19,9$ %.

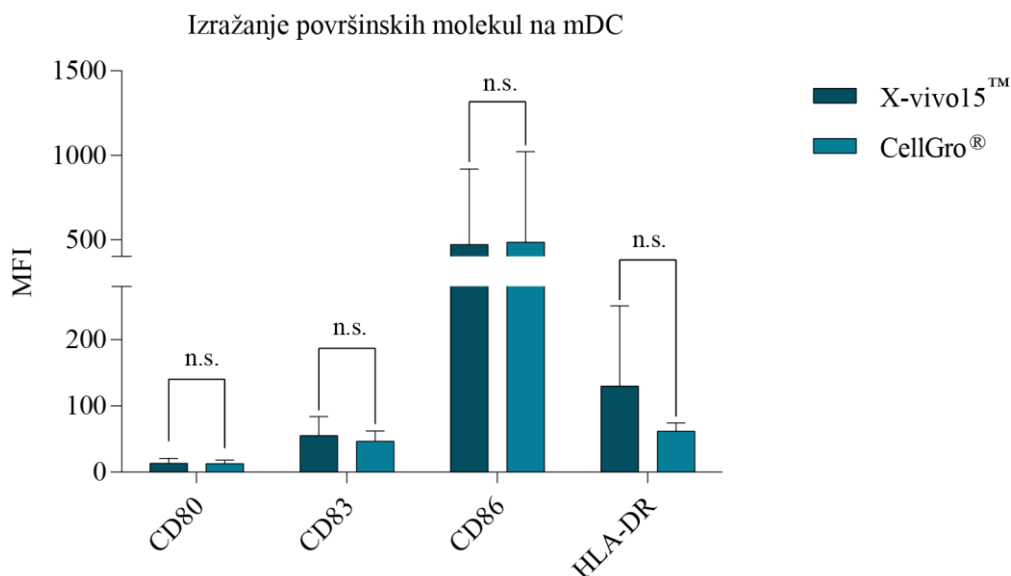


Slika 9: Primerjava izkoristka diferenciacije monocitov v DC med celičnimi kulturami iz X-vivo15™ in CellGro®. Prikazano je povprečje petih meritev z izračunano SD. Z neparnim Studentovim t-testom smo določili vrednost p . V primeru, da med vzorcema ni statistično pomembnih razlik, smo vrednost p označili z n.s.

Z neparnim Studentovim t-testom nismo določili statistično pomembne razlike v izkoristku diferenciacije med medijema.

4.3.3 Zorenje dendritičnih celic

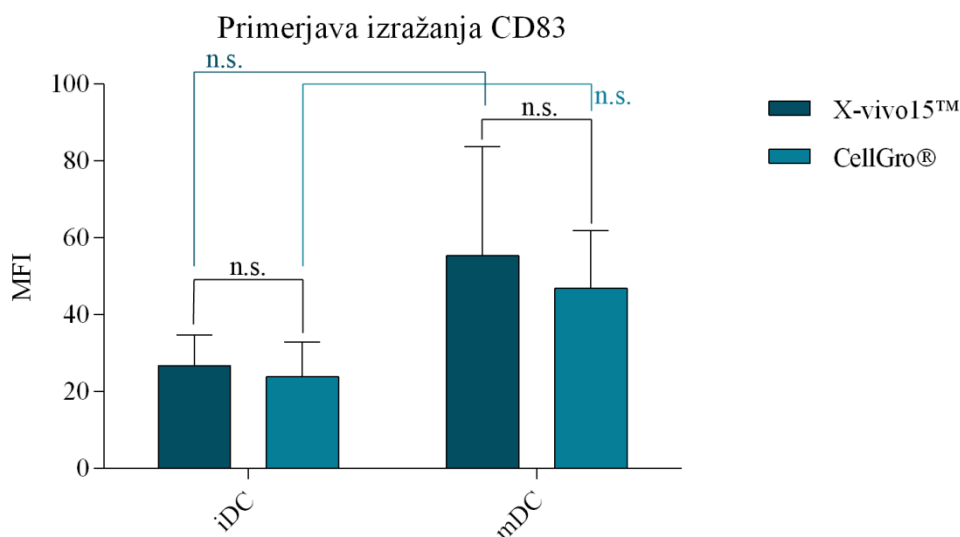
Dendritične celice smo zoreli ob prisotnosti LPS in IFN γ pri pogojih opisanih v poglavju 3.3. Glede na izražanje kostimulacijskih molekul CD80 in CD86 ter molekul CD83 in HLA-DR smo preverili kvaliteto zorenja DC.



Slika 10: Izražanje površinskih molekul na mDC diferenciranih iz monocitov, ki smo jih izolirali z imunomagnetno selekcijo. Graf prikazuje srednje vrednosti intenzitete fluorescence (MFI) za posamezno molekulo ter standardni odklon, izračunan na podlagi treh meritev. Z neparnim Studentovim t-testom smo določili vrednost p , pri čemer n.s. predstavlja, da med vzorcema ni statistično pomembnih razlik.

Med celičnimi kulturami gojenimi v X-vivo15™ in CellGro® ni statistično pomembnih razlik v izražanju srednjih vrednosti intenzitete fluorescence površinskih molekul izraženih na mDC.

4.3.4 Primerjava izražanja površinske molekule CD83 med iDC in mDC



Slika 11: Primerjava izražanja molekule CD83 med celicami gojenimi v X-vivo15™ in CellGro® ter primerjava izražanja CD83 med nezrelimi in zrelimi DC gojenimi v X-vivo15™ in primerjava izražanja CD83 molekule med nezrelimi in zrelimi DC gojenimi v CellGro®. Oznaka n.s. predstavlja vrednosti $p > 0,05$.

V primeru diferenciacije DC se ne kažejo statistično pomembne značilne razlike v izražanju CD83 med medijema ($p = 0,2$), prav tako pri zrelih DC ni statistično značilnih razlik v izražanju CD83 med celicami gojenimi v X-vivo15TM in CellGro[®] ($p = 0,6$). Pri primerjavi izražanja CD83 na iDC in mDC gojenih v X-vivo15TM se ne kažejo statistično pomembne razlike ($p = 0,1$), prav tako ni statistično pomembnih razlik v izražanju CD83 med iDC in mDC gojenih v CellGro[®] ($p = 0,06$).

4.4 DIFERENCIACIJA DENDRITIČNIH CELIC IZ CELOKUPNIH MONONUKLEARNIH CELIC

V tem primeru nas je zanimal vpliv različnih kombinacij citokinov na uspešnost diferenciacije DC iz celokupnih MNC. Celice smo gojili v brezserumskem mediju CellGro[®] z dodanim 1 % človeškim AB-serumom v različnih kulturah, in sicer 10×10^6 MNC/1 ml medija in 20×10^6 MNC/1 ml medija. Diferenciacija je potekala pri pogojih opisanih v poglavju 3.3.3.

Preglednica 5: Uspešnost diferenciacije DC iz MNC v celičnih kulturah 10×10^6 celic/1 ml medija z različnimi kombinaciji citokinov.

Medij	Citokini	Izkoristek gojenja (%)	Viabilnost (%)	srednje vrednosti intenzitete fluorescence (MFI) \pm SD			
				CD1a	CD14	CD83	CD209
CellGro [®]	kontrola	93	90,5	0,68 \pm 0,5	84,7 \pm 4,8	4,3 \pm 1,5	41,4 \pm 12,6
	GM-CSF	79	88,3	10,2 \pm 10,2 n.s.	41,2 \pm 37,8 n.s.	11,5 \pm 7,3 n.s.	59,6 \pm 19,8 n.s.
	GM-CSF + IL-4	77,5	93,3	25,6 \pm 6,3 ***	4 \pm 1,9 ***	11,9 \pm 2,9 ***	91,1 \pm 3,1 ***
	GM-CSF + IFN α	79	96,6	19,7 \pm 16,8 n.s.	30,9 \pm 10,3 ***	30,6 \pm 6,2 ***	81,9 \pm 13,9 **
	GM-CSF + TNF α	67	88,9	4,5 \pm 3,0 n.s.	46,5 \pm 8,6 ***	27,4 \pm 17,8 n.s.	30,1 \pm 11,6 n.s.

Preglednica 5 prikazuje izkoristek gojenja DC glede na začetno število celic (izraženo v %) ter viabilnost celic glede na število celic po diferenciaciji (izraženo v %). Za posamezno površinsko molekulo so prikazane srednje vrednosti intenzitete fluorescence (MFI) ter standardni odklon, izračunan na podlagi treh meritev. Z neparnim Studentovim t-testom smo določili vrednost p pri primerjavi kontrolne skupine s skupinami tretiranimi z GM-CSF, GM-CSF + IL-4, GM-CSF + IFN α in GM-CSF + TNF α . Statistično značilne razlike smo prikazali z *, če je $p \leq 0,05$; z ** če je $p < 0,01$ in ***, če je $p < 0,001$, n.s. pomeni, da med vzorcema ni statistično pomembnih razlik.

Izkoristek gojenja celic je bil v kontrolni skupini najvišji (93 %) ter najnižji pri kombinaciji citokinov GM-CSF + TNF α (67 %). Viabilnost celic je bila najvišja pri kombinaciji citokinov GM-CSF + IFN α (96,6 %) ter najnižja pri gojenju ob prisotnosti GM-CSF (88,3 %). Pri diferenciaciji DC so celice iz celične kulture z dodanim GM-CSF + IL-4 glede na kontrolno skupino izražale statistično značilno različne vrednosti ($p < 0,001$) površinskih molekul CD1a, CD14, CD83 in CD209. Izražanje površinskih molekul CD14, CD83 je pri kombinaciji citokinov GM-CSF + IFN α glede na kontrolno skupino statistično značilno različno za vrednost $p < 0,001$, medtem ko se izražanje CD209 statistično značilno razlikuje za vrednost $p < 0,01$. Pri celicah iz celične kulture tretirane z GM-CSF + TNF α se kaže statistično značilna razlika v izražanju molekul CD14 z vrednostjo $p < 0,05$. Celice iz celične kulture z dodanim GM-CSF ne kažejo statistično značilnih razlik v izražanju površinskih molekul glede na kontrolno skupino.

Preglednica 6: Uspešnost diferenciacije DC iz MNC v celičnih kulturah 20×10^6 celic/1 ml medija z različnimi kombinaciji citokinov.

Medij	Citokini	Izkoristek gojenja (%)	Viabilnost (%)	srednje vrednosti intenzitete fluorescence (MFI) \pm SD				
				CD1a	CD14	CD83	CD209	CD207*
CellGro®	kontrola	61,9	82,7	5,5 \pm 4,5	67,3 \pm 4,5	9,8 \pm 2,0	16,51 \pm 4,0	4,1
	GM-CSF	60,5	89,6	16,2 \pm 9,6 n.s.	64,6 \pm 7,7 n.s.	15,7 \pm 6,1 n.s.	42,6 \pm 7,5 *	7,9
	GM-CSF + IL-4	64,4	93,8	19,1 \pm 8,3 n.s.	5,7 \pm 3,0 ***	15,5 \pm 1,4 n.s.	91,4 \pm 5,8 **	6,3
	GM-CSF + IFN α	87,5	93,6	21,7 \pm 5,5 n.s.	42,1 \pm 38,9 n.s.	28,2 \pm 0,6 **	24,5 \pm 1,3 n.s.	4,7
	GM-CSF + IL-4 + IFN α	92	94,9	42,3 \pm 4,5 *	2,6 \pm 2,1 **	16,4 \pm 7,1 n.s.	92,6 \pm 4,3 **	/

Preglednica 6 prikazuje izkoristek gojenja DC glede na začetno število celic (izraženo v %) ter viabilnost celic glede na število celic po diferenciaciji (izraženo v %). Za posamezno površinsko molekulo so prikazane srednje vrednosti intenzitete fluorescence (MFI) ter standardni odklon, izračunan na podlagi treh meritev. Z neparnim Studentovim t-testom smo določili vrednost p pri primerjavi kontrolne skupine s skupinami tretiranimi z GM-CSF, GM-CSF + IL-4, GM-CSF + IFN α in GM-CSF + TNF α . Statistično značilne razlike smo prikazali z *, če je $p \leq 0,05$; z ** če je $p < 0,01$ in ***, če je $p < 0,001$, n.s. pomeni, da med vzorcema ni statistično pomembnih razlik. * Na podlagi ene meritve je z MFI prikazana prisotnost transmembranskega proteina Langerina (CD207).

V celični kulturi 20×10^6 celic/1 ml medija s kombinacijo citokinov GM-CSF + IL-4 + IFN α sta bila izkoristek gojenja (92 %) in viabilnost celic (94,9 %) najvišja. Najslabši izkoristek gojenja DC je bil ob prisotnosti GM-CSF (60,6 %), medtem ko je bila viabilnost celic najslabša v kontrolni skupini. Ob prisotnosti citokinov GM-CSF + IL-4 + IFN α so iDC glede na kontrolno skupino izražale statistično značilno različno visoke MFI vrednosti molekul CD1a in CD209 ($p \leq 0,05$ in $p < 0,01$) ter statistično značilno nižje vrednosti CD14 ($p < 0,01$). Pri celicah iz celične kulture z dodanim GM-CSF ni statistično značilnih razlik v izražanju površinskih molekul glede na kontrolno skupino. Pri celicah iz celične kulture z dodanim GM-CSF + IFN α glede na kontrolno skupino se za vrednost $p < 0,01$ statistično različno bolj izraža molekula CD83. Kombinacija citokinov GM-CSF + IL-4 je vplivala na statistično različno nižje izražanje molekule CD14 ($p < 0,001$) ter na statistično značilno višje izražanje molekule CD209 ($p < 0,01$) glede na kontrolno skupino. Z eno meritvijo smo preverili izražanje Langerina (molekula CD209), ki se je najbolj izražal pri celicah, ki smo jih gojili ob prisotnosti GM-CSF.

Preglednica 7: Uspešnost diferenciacije DC iz MNC v celičnih kulturah 10×10^6 in 20×10^6 celic/1 ml medija z različnimi kombinacijami citokinov.

Medij	Način gojenja	Citokini	Izkoristek gojenja (%)	Viabilnost (%)	srednje vrednosti intenzitete fluorescence (MFI)				
					CD1a	CD14	CD83	CD209	CD207
CellGro®	10×10^6 celic/1 ml medija	GM-CSF + IL-4 + IFN α	82,5	92,3	23,5	5,4	16,4	92,8	/
	20×10^6 celic/1 ml medija	GM-CSF + TNF α	74,9	91,5	12,9	51,5	27,4	19,4	/
		GM-CSF + IL-15	/	/	0,8	3,4	13,3	15,7	3,3

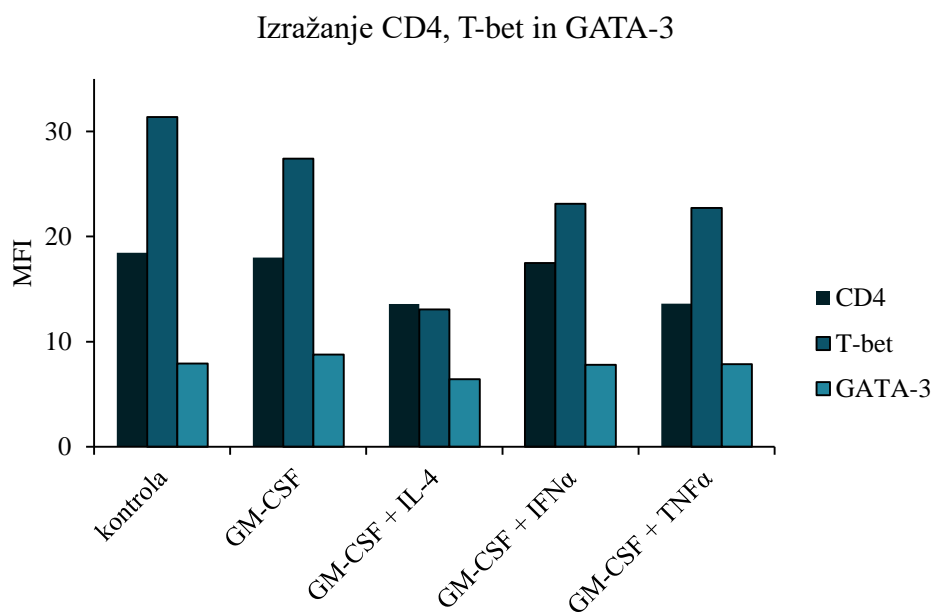
Preglednica 7 prikazuje izkoristek gojenja MNC glede na začetno število celic (izraženo v %), ter viabilnost celic glede na število celic po diferenciaciji (izraženo v %). Za posamezen označevalec diferenciacije DC so prikazane srednje vrednosti intenzitete fluorescence (MFI), v tem primeru so podatki prikazani za eno meritvev.

Pri celični kulturi 10×10^6 celic/1 ml medija je kombinacija citokinov GM-CSF + IL-4 + IFN α vplivala na visok izkoristek gojenja DC (82,5 %) in viabilnost celic (92,3 %). Med površinskimi molekulami se CD209 izraža najbolj, medtem ko je vrednost MFI za CD14 najnižja. V celični kulturi 20×10^6 celic/1 ml medija celice gojene z dodanim GM-CSF +

TNF α najbolj izražajo molekulo CD14, ostale površinske molekule so manj izražene. Celice iz kulture z dodanim IL-15 šibko izražajo vse površinske molekule.

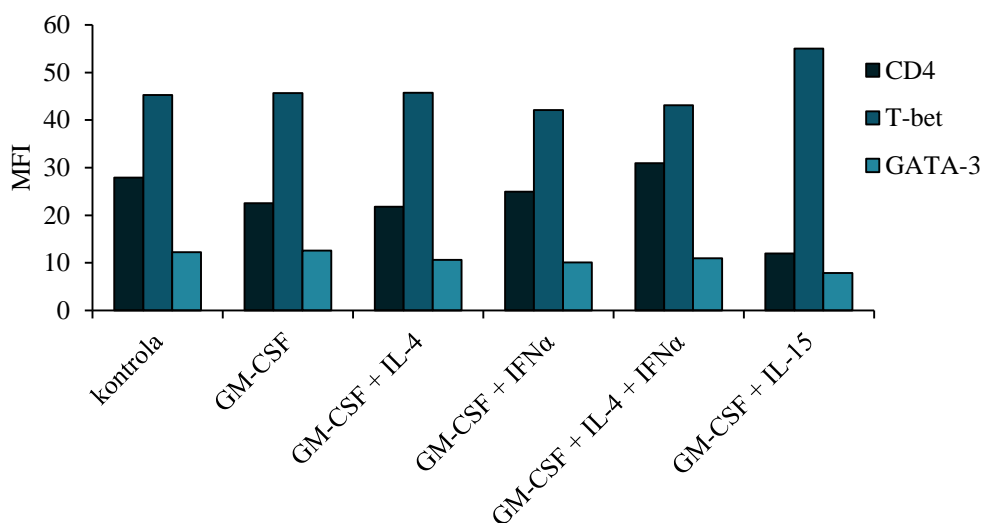
4.5 AKTIVACIJA T - CELIČNIH RECEPTORJEV

Z reagentom za aktivacijo TCR, ki oponašajo delovanje APC smo dosegli poliklonsko aktivacijo TCR (opisano v poglavju 3.5). Aktivacijo TCR smo primerjali med limfociti iz kontrolne skupine ter med limfociti iz različnih celičnih kultur v mediju CellGro® z dodanimi različnimi kombinacijami citokinov. Zanimalo nas je izražanje molekule CD4 ter transkripcijskih faktorjev T-bet in GATA-3 pri gostah celic 10×10^6 MNC/1 ml medija in 20×10^6 MNC/1 ml medija.



Slika 12: Izražanje CD4 in transkripcijskih faktorjev T-bet in GATA-3 po stimulaciji TCR na limfocitih T v celičnih kulturah 10×10^6 MNC/1 ml medija. Prikazano je izražanje fluorescence (MFI) CD4, T-bet in GATA-3 na limfocitih T, ki so bili predhodno gojenih pri različnih kombinacijah citokinov.

Izražanje CD4, T-bet in GATA-3



Slika 13: Izražanje CD4 in transkripcijskih faktorjev T-bet in GATA-3 po stimulaciji TCR na limfocitih T v celičnih kulturah 20×10^6 MNC/1 ml medija. Prikazano je izražanje fluorescence (MFI) CD4, T-bet in GATA-3 na limfocitih T, ki so bili predhodno gojenih pri različnih kombinacijah citokinov.

Po aktivaciji CD3/CD28 na limfocitih T v celični kulturi 10×10^6 celic/1 ml medija je bilo opazno najvišje izražanje CD4 v kontrolni skupini (Sl. 12), medtem ko je pri gostoti 20×10^6 celic/1 ml medija opazno najvišje izražanje CD4 pri limfocitih iz celične kulture z dodanimi GM-CSF + IL-4 + IFN α (Sl. 13). Izmerjene vrednosti CD4 so pri aktiviranih limfocitih v prvem primeru najnižje pri kombinaciji citokinov GM-CSF + IL-4, medtem so pri celicah iz celične kulture 20×10^6 celic/1 ml medija najnižje pri kombinaciji citokinov GM-CSF + IL-15 (Sl. 13). Najvišje vrednosti transkripcijskega faktorja T-bet pri celicah gojenih v kulturah 10×10^6 celic/1 ml medija smo po aktivaciji CD3/CD28 na limfocitih T izmerili v kontrolni skupini (Sl. 12), medtem ko so najnižje vrednosti izmerjene pri kombinaciji citokinov GM-CSF + IL-4 (Sl. 13).

V primeru gojenja 20×10^6 celic/1 ml medija so opazne najvišje vrednosti izražanje T-bet pri kombinaciji citokinov GM-CSF + IL-15 in najnižje pri celicah iz celične kulture z IFN α in GM-CSF (Sl. 13). Pri celicah iz celične kulture z dodanim GM-CSF je opazno najvišje izražanje transkripcijskega faktorja GATA-3, medtem ko se pri celicah gojenih v celični kulturi gojeni z GM-CSF + IL-4 izraža najmanj (Sl. 13). Tudi v primeru gojenja 20×10^6 celic/1 ml medija le ob prisotnosti GM-CSF je opazno najvišje izražanje GATA-3 ter najšibkejšo ob prisotnosti citokinov GM-CSF + IL-15 (Sl. 13).

5 RAZPRAVA

S poskusi v okviru magistrskega dela smo spremljali izgube monocitov tekom izolacije iz periferne venske krvi ter izkoristek gojenja celic po imunoagnetni selekciji monocitov iz MNC. Osredotočili smo se na izražanje fenotipa nezrelih in zrelih DC iz celičnih kultur gojenih v mediju X-vivo15™ in CellGro® z dodanim 1 % človeškim AB- serumom. Preverjali smo vpliv različnih kombinacij citokinov na diferenciacijo DC iz celokupnih mononuklearnih celic. Zanimalo nas je tudi, kako različne kombinacije citokinov v mediju vplivajo na vrsto polarizacije aktiviranih limfocitov Th.

Na podlagi dejstev, ki jih opisujejo Boyum (1968) ter Kaplan in sodelavci (1982), da omogoča izolacija MNC z gostotno gradientnim medijem hitro in učinkovito izolacijo celic, pri čemer ne pride do sprememb fenotipa in funkcije izoliranih mononuklearnih celic, smo se odločili za to vrsto izolacije MNC. Pri tem je izkoristek izolacije mononuklearnih celic iz periferne krvi odvisen od deleža granulocitov, trombocitov ter eritrocitov, ki so še vedno prisotni po ločbi (Kanof in sod., 1996). Da bi se temu izognili, smo po centrifugiranju plast MNC ločili od ostalih plasti ter MNC večkrat spirali s pufrom DPBS. Pri tem smo spremljali izgube monocitov, kjer je bilo po 3. spiranju povprečno število monocitov za 26 milijonov nižje od povprečnega začetnega števila monocitov. Z analizo s Studentovim t-testom nismo določili statistično značilnih razlik v izgubi monocitov, saj je bila SD zaradi precejšnje razpršenosti podatkov velika (Sl. 4).

Iz pridobljenih MNC smo za nadaljnje poskuse potrebovali izključno monocite, ki smo jih izolirali z adherenco na plastiko, oziroma smo monocite od ostalih levkocitov ločili na podlagi imunomagnetne selekcije.

Metodo pri kateri se na podlagi adherence na plastiko loči monocite od limfocitov in bazofilcev, so že leta 1983 opisali Pawlowski in sodelavci ter je pogosto v uporabi še danes. Kot navajajo Pullakarp in sodelavci (2002) obstaja pri tej metodi precejšnje tveganje za okužbo celične kulture, poleg tega je bila v našem primeru slaba stran te metode, da po izolaciji nismo poznali natančnega števila monocitov, ki so se diferencirali v DC, saj jih zaradi pritrjenosti na dno gojilne posode ni bilo mogoče prešteti.

Poleg izolacijske metode aderenca na plastiko, postaja v zadnjih letih imunomagnetno ločevanje celic ena pomembnejših tehnik izolacije želenega tipa celic. Thiel in sodelavci (1998) opisujejo kot prednosti te metode, da lahko izoliramo čiste suspenzije celic z visokim deležem preživetja. S to tehniko pridobljene celice so učinkovite za uporabo v celičnih terapijah ter v diagnostiki.

Ker smo imeli po izolaciji čisto suspenzijo monocitov, smo lahko v DC diferencirali njihovo poznano število. V posamezni celični kulturi (v X-vivo15™ in CellGro®) smo gojili 10×10^6 monocitov in po 5-ih dneh diferenciacije določili izkoristek diferenciacije. Pri celičnih kulturah gojenih v X-vivo15™ je bil povprečen izkoristek diferenciacije $40,4 \% \pm 18,1 \%$ ter pri celičnih kulturah gojenih v CellGro® $42,4 \% \pm 19,9 \%$ (Sl. 9). Razlike v izkoristku diferenciacije med medijema niso statistično značilne, zato lahko zaključimo, da sta medija X-vivo15™ in CellGro® primerljiva glede na izkoristek diferenciacije monocitov v DC. Ti rezultati so primerljivi z rezultati Kufnerja in sodelavcev (2005), kjer prav tako ni prišlo do razlik v izkoristku diferenciacije DC med medijema X-vivo15™ in CellGro®, vendar so v njihovem primeru izvedli diferenciacijo DC iz MNC ob prisotnosti $\pm 10 \%$ avtologne plazme.

Pri raziskavah kjer so primerjali vpliv serumskih medijev ter brezserumskih medijev X-vivo15™ in CellGro® brez dodanega, ali z dodanim 2 % človeškim serumom, so ugotovili, da se DC gojene v serumskem mediju razvijejo optimalno glede na DC iz brezserumskih medijev, ter da pri primerjavi brezserumskih medijev X-vivo15™ in CellGro®, DC iz medija CellGro® izražajo boljši fenotip značilen za DC v primerjavi z DC iz X-vivo15™ (Napoletano in sod., 2007; Kolanowski in sod., 2014). Številni avtorji priporočajo uporabo človeškega seruma pri pripravi DC, da se le-te optimalno razvijejo (Figdor in sod., 2004; Pullakart in sod., 2002; Loudovaris in sod., 2001), vendar lahko zaradi številnih proteinov, ki jih vsebuje, ti proteini vplivajo na privzem in predstavitev antigenov ter nadaljnjo vrsto imunskega odziva, ki ga sprožijo (Tarte in sod., 2000). Na podlagi teh podatkov smo se zato pri naših poskusih odločili za uporabo minimalnega deleža (1 %) človeškega AB- seruma, pri čemer nas je zanimala primerjava vpliva medijev X-vivo15™ in CellGro® na diferenciacijo in kvaliteto zorenja DC.

Diferenciacijo monocitov v DC smo izvedli v treh različnih poskusih, in sicer iz monocitov izoliranih z adherenco na plastiko, iz monocitov izoliranih z imunomagnetno izolacijo ter z diferenciacijo DC iz celokupnih mononuklearnih celic.

V prvih dveh primerih smo diferenciacijo monocitov v DC spodbudili z dodatkom citokinov GM-CSF in IL-4, pri čemer IL-4 vpliva na vrsto imunskega odziva saj lahko sproži razvoj celic Th2 iz Th0 ter lahko zavira imunske odzive tipa Th1 (Lydyard in sod., 2011). Maroof in sodelavci (2006) opisujejo, da lahko DC, ki so se iz monocitov diferencirale ob prisotnosti IL-4, povečajo izločanje IL-4, povečano izločanje IL-4 se nato nadaljuje tudi pri zrelih DC, ki so zorele ob prisotnosti IL-4 ter tako delujejo avtokrino. Tako bi lahko v primeru uporabe DC v protitumorskih cepivih namesto do želenega imunskega odziva tipa 1 in aktivacije citotoksičnih limfocitov T, prišlo do aktivacije imunskega odziva tipa 2.

Po izolaciji monocitov z adherenco na plastiko in pri imunomagnetni selekciji monocitov, so se monociti diferencirali v DC. Kot navajata Zhou in Teeder (1996), se pri iDC zmanjša izražanje molekul CD14, ter iDC pričnejo izražati molekule CD1a. Pri obeh poskusih so iDC izražale visoke vrednosti CD209 (Sl. 5 in Sl. 8), ki se izraža izključno pri DC (Švajger in sod., 2010) ter nižje MFI vrednosti CD14, ki se pri obeh poskusih med celicami gojenimi v X-vivo15™ in CellGro® statistično ne razlikujejo. V primeru iDC diferenciranih iz monocitov, ki smo jih izolirali z adherenco na plastiko, se kažejo statistično značilne razlike v izražanju CD1a in CD209, ki so pri celicah iz kulture v CellGro® močno povečane (Sl. 5), medtem, ko v primeru imunomagnetne izolacije monocitov in nadaljnji diferenciaciji v DC, ni statistično značilnih razlik v izražanju površinske molekule CD1a (Sl. 8). Vendar je tudi v tem primeru izražanje molekule CD209 statistično značilno različno (v prid CellGro®) (Sl. 8).

Na podlagi tega lahko zaključimo, da so tako v primeru izolacije monocitov z adherenco na plastiko kot v primeru imunomagnetne selekcije monocitov in nadaljnji diferenciaciji DC, celice razvile kvalitetnejši fenotip značilen za iDC v mediju CellGro® v primerjavi z X-vivo15™. To je v skladu s pričakovanji, saj v predhodnih študijah prav tako opisujejo, da je medij CellGro® optimalen za pridobitev DC v primerjavi z X-vivo15™ (Napoletano in sod., 2007; Kolanowski in sod., 2014).

Pri preverjanju izražanja membranskega glikoproteina CD83 na iDC so bile pri obeh poskusih izmerjene nizke MFI vrednosti, vendar se izražanje na iDC med medijema statistično značilno ne razlikuje. Prav tako se ne kažejo statistično pomembne razlike v izražanju CD83 med iDC in mDC gojenimi v X-vivo15™, ter pri primerjavi izražanja med iDC in mDC pri celicah gojenih v mediju CellGro® tako pri DC diferenciranih iz monocitov, ki smo jih izolirali z aderenco na plastiko (Sl. 7), kot pri DC diferenciranih iz monocitov, ki smo jih pridobili na podlagi imunomagnetne selekcije (Sl. 11). Molekula CD83 je pomembna za delovanje mDC ter pokazatelj uspešnosti zorenja DC (Lechmann in sod., 2002). Vendar je po opisih Kruseejeve in sodelavcev (2000) nizko izražanje CD83 na površini nezrelih DC pričakovano. Po merilih fenotipa iDC za uporabo v cepivih zaradi prisotnosti CD83 te celice niso primerne, za natančnejše rezultate morali preveriti še izražanje molekul CD80, MHC I in II ter CCR7 (Figdor in sod., 2004).

Glede na predhodne rezultate smo diferenciacijo DC iz celokupnih MNC periferne venske krvi izvedli le v mediju CellGro® z dodanim 1 % AB- človeškim serumom. Primerjali smo kvaliteto diferenciacije DC pri različnih gostotah celic in kombinacijah citokinov (GM-CSG, IL-4, IFN α , TNF α ter IL-15).

Langerin (CD207) se je pri naših poskusih ne glede na kombinacijo citokinov zelo slabo izražal (Pregl. 5 in Pregl. 6), prav tako IL-15 v kombinaciji z GM-CSF ni imel pozitivnega vpliva na diferenciacijo DC (Pregl. 7). Dendritične celice diferencirane iz monocitov so izjemno šibko izražale površinske molekule (Pregl. 7), kar se sklada z odkritjem Berarda in sodelavcev (2001), da DC diferencirane iz monocitov ob prisotnosti GM-CSF in IL-15 izražajo drugačen fenotip kot DC diferencirane ob prisotnosti GM-CSF in IL-4.

V celičnih kulturah 10×10^6 MNC/1 ml medija se je za diferenciacijo DC optimalno izkazala kombinacija citokinov GM-CSF + IL-4, saj so celice izražale najbolj značilen fenotip za iDC glede na celice iz kontrolne skupine (Pregl. 5). Kot navaja Hiasa s sodelavci (2009), je kombinacija citokinov GM-CSF + IL-4 sprožilec diferenciacije DC iz monocitov ter se pogosto uporablja za pridobitev DC iz monocitov. Prav tako so celice razvile kvaliteten fenotip značilen za iDC ob prisotnosti citokinov GM-CSF + IFN α , kjer je bila tudi viabilnost celic zelo visoka (96,6 %) (Pregl. 5). V raziskavi, kjer so monocite za kratek čas izpostavili GM-CSF + IFN α , so se diferencirale dendritične celice z visoko

sposobnostjo aktivacije CD8 + T celičnih odzivov (Lapenta in sod, 2006), kar je ključen odziv pri odstranjevanju rakavih celic. Glede na merila po Figdorju in sodelavcih (2004) je viabilnost celic za uporabo v cepivih ustrezna tako pri kombinaciji citokinov GM-CSF + IL-4 kot pri GM-CSF + IFN α (> 70 %), vendar kljub šibkemu izražanju CD14, zaradi prisotnosti molekule CD83 že pri nezrelih DC, celice niso primerne za uporabo v cepivih. Pri kombinaciji citokinov GM-CSF + TNF α so se monociti zelo slabo diferencirali v DC (Pregl. 5). Iwamoto in sodelavci (2007) so ugotovili, da monociti CD14+ po gojenju v mediju z dodanim GM-CSF + TNF α še vedno močno izražajo molekule CD14, ter slabo izražajo CD1a. Te celice se še vedno pritrjajo na podlago in imajo slabo sposobnost stimulacije limfocitov T CD4+. To smo potrdili v celični kulturi 10×10^6 MNC/1 ml medija (Pregl. 5) ter podobne vrednosti izmerili tudi pri celični kulturi 20×10^6 MNC/1 ml medija (Pregl. 7). Poleg visokega izražanja CD14 in nizkega izražanja CD1a in CD209 (Pregl. 5 in Pregl. 7) je bil v obeh primerih tudi izkoristek gojenja celic nizek, saj so celice najverjetneje ostale pritrjene na dno gojilne posode.

Pri diferenciaciji monocitov v DC ob prisotnosti izključno GM-CSF, diferenciacija ni potekla, vendar je bila viabilnost celic visoka. Po navedbah Van de Laarja in sodelavcev (2012), igra GM-CSF pomembno vlogo pri diferenciaciji, preživetju ali proliferaciji prekursorskih celic DC ter posledično pri razvoju DC, vendar na diferenciacijo DC vplivajo še drugi dejavniki (npr. prisotnost citokina IL-4) (Hiasa in sod., 2009).

Izmed celičnih kultur z gostoto 20×10^6 MNC/1 ml medija, so najbolj značilen fenotip za iDC razvile celice iz kulture z dodano kombinacijo citokinov GM-CSF + IL-4 + IFN α . V tem primeru so iDC izražale nizke MFI vrednosti CD14, višje vrednosti CD1a in visoke vrednosti CD209 (Pregl. 6). Pri tej kombinaciji sta bila glede na kontrolno skupino tudi izkoristek gojenja in viabilnost celic najvišja. To kombinacijo citokinov smo uporabili še pri celični kulturi 10×10^6 MNC/1 ml medija (Pregl. 7), kjer je bil opazen visok izkoristek diferenciacije in viabilnosti celic. Pri celicah je opazen fenotip značilen za iDC, vendar smo v tem primeru izvedli le eno meritev. Po merilih Figdorja in sodelavcev (2004), celice iz kulture 20×10^6 MNC/1 ml medija pri kombinaciji citokinov GM-CSF + IL-4 + IFN α glede na zelo nizko izražanje CD14 (MFI = $2,6 \pm 2,1$) ter zelo visoko viabilnost celic (94,9 %) ustrezajo uporabi v cepivih, vendar je bilo tudi pri teh celicah

izražanje CD83 že prisotno ($MFI = 16,4 \pm 7,1$) (Pregl. 6). Dauer in sodelavci (2003) opisujejo, da so v primeru diferenciacije monocitov v DC pri kombinaciji citokinov GM-CSF + IL-4 + IFN α , iDC normalno izražale fenotip, medtem ko je bila tekom vnetnega odziva sinteza IL-12 zmanjšana, kar lahko posledično vpliva na slabšo aktivacijo limfocitov Th ter citotoksičnih odzivov. Tako kljub uspešno diferenciranim DC ni nujno, da bodo te celice optimalno delovale pri citotoksičnih protitumorskih odzivih.

Tako kot v primeru celične kulture z gostoto 10×10^6 MNC/1 ml medija pri kombinaciji citokinov GM-CSF + IL-4, so tudi celice iz kulture 20×10^6 MNC/1 ml medija pri tej kombinaciji citokinov razvile fenotip značilen za iDC z nizkim izražanjem CD14 ($5,7 \pm 3,0$) ter visokim izražanjem CD209 ($91,4 \pm 5,8$) in visokim deležem živih celic (93,8 %) (Pregl. 6). Glede na prisotnost CD83 ($15,5 \pm 6,1$), tudi te celice ne ustrezajo merilom Figdorja in sodelavcev (2004) za uporabo v cepivih. Nasprotno od vpliva kombinacije citokinov GM-CSF + IFN α na celice v kulturi 10×10^6 MNC/1 ml medija, je ta kombinacija citokinov slabo vplivala na celice iz kulture 20×10^6 MNC/1 ml medija. Kljub visokemu deležu živih celic, so te celice izražale zelo nizke vrednosti CD209 in visoke vrednosti CD14 (Pregl. 6). To lahko povežemo z ugotovitvami Dauerja in sodelavcev (2003), ki so s poskusi *in vitro* odkrili, da IFN α skupaj z GM-CSF ne vpliva na diferenciacijo monocitov v DC, saj so celice po 5-dnevni inkubaciji ohranile tako prvoten fenotip kot tudi citokinski profil. Vendar je to odkritje v nasprotju z zaključki raziskave, kjer so se monocite ob prisotnosti GM-CSF + IFN α diferencirali v dendritične celice z visoko sposobnostjo aktivacije CD8 + T celičnih odzivov (Lapenta in sod., 2006).

Potem ko so monociti uspešno diferencirani v iDC, so potrebni še dodatni signali, da dendritične celice dozoriijo in so sposobne optimalne predstavitve antigenov limfocitom T. Ti signali sodijo med interferone, citokine iz družine tumor nekrotizirajočih faktorjev (TNF) in ligande CD40L (Hertz in sod., 2001).

Nezrele DC diferenciarne iz monocitov, ki so bili pridobljeni z adherenco na plastiko in imunomagnetno selekcijo, smo zoreli ob prisotnosti LPS in IFN γ , pri čemer smo v obeh primerih primerjali kvaliteto zorenja DC med medijema X-vivo15™ ter CellGro® ob prisotnosti 1 % AB- seruma.

Receptorji iz družine TLR, natančneje toll receptorjem podobni (»toll-like«) receptorji tipa 4 (TLR4) na iDC, prepoznajo LPS, ki je prisoten pri po Gramu negativnih bakterijah. Njihova aktivacija sproži signalno kaskado, ki sproži zorenje DC ter aktivacijo imunskih odzivov proti po Gramu negativnim bakterijam (Brightbill in sod., 1999; Granucci in sod., 1999). Hertz in sodelavci (2001) navajajo, da so DC, ki so dozorele ob prisotnosti LPS, močno izražale kostimulacijske molekule CD80 in CD86 ter molekule CD83 in MHC II. Prisotnost LPS pri zorenju DC poveča privzem peptidov antigenov in njihovo vgradnjo v MHC II, kar poveča sposobnost aktivacije limfocitov T. Poleg tega zrele DC povečajo izločanje IFN γ . Interferon γ sodi v skupino II interferonov in ima pomembno vlogo pri zorenju DC, saj stimulira iDC, da dozori v mDC (He in sod., 2007). Za DC, ki so zorele ob prisotnosti LPS in IFN γ hkrati, je značilno povečano izražanje molekul CD80, CD83, CD86 in HLA DR (Han in sod., 2009). Pri poskusih *in vitro*, kjer so zreli DC ob prisotnosti IFN γ , se je izkazalo, da DC učinkovito stimulirajo limfocite T CD8⁺, ki so pomembni za celične odzive pri protitumorskih terapijah (He in sod., 2007), vendar lahko pri visokih koncentracijah IFN γ deluje na DC imunosupresivno (Švajger in Jeras, 2014).

Pri naših poskusih so zrele DC iz monocitov izoliranih z adherenco na plastiko tako v mediju X-vivo15™ kot CellGro® izražale fenotip značilen za mDC (Sl. 6), pri tem se srednje vrednosti intenzitet fluorescenc molekul CD80, CD83, CD86 in HLA-DR med celicami iz celičnih kultur X-vivo15™ in CellGro® statistično značilno ne razlikujejo. Prav tako dendritične celice, ki smo jih diferencirali iz monocitov pridobljenih z imunomagnetno selekcijo in jih zreli ob prisotnosti LPS in IFN γ , med medijema X-vivo15™ in CellGro® ne kažejo statistično pomembnih razlik v izražanju MFI površinskih molekul značilnih za mDC (Sl. 9). V obeh primerih mDC ustrezajo merilom Figdorja in sodelavcev (2004) za uporabo celic v cepivih, saj celice izražajo molekule CD80, CD83, CD86 in HLA-DR (Pregl. 3). Kljub temu naši rezultati, da celice med medijema ne kažejo statistično pomembnih razlik v izražanju kvalitete fenotipa, niso v skladu s pričakovanji. Na podlagi predhodnih študij, kjer so primerjali medija X-vivo15™ in CellGro® pri vplivu na diferenciacijo in zorenje DC (Napoletano in sod., 2007; Kolanowski in sod., 2014) smo pričakovali, da bo prišlo do razlik v kvaliteti zorenja med medijema v prid CellGro.

Pomembno vlogo pri imunskih odzivih igrajo limfociti T, ki jih med drugim aktivirajo DC. V okviru naših poskusov smo želeli preveriti širši spekter aktivacije limfocitov T, saj lahko DC v ko-kulturi aktivirajo limfocite T le do določene mere. Da smo dosegli poliklonsko aktivacijo limfocitov T, smo uporabili reagentom za aktivacijo TCR. Po aktivaciji nas je zanimalo izražanje površinskega označevalca celic T pomagalk $CD4^+$ ter izražanje transkripcijskih faktorjev T-bet in GATA-3.

Membranski glikoprotein CD4 na svoji površini izražajo celice T pomagalk (Zhu in sod., 2012). V okviru naših poskusov je bilo izražanje te molekule prisotno na limfocitih v vseh celičnih kulturah (10×10^6 MNC/1 ml medija (Sl. 12) in 20×10^6 MNC/1 ml medija (Sl. 11), ki smo jih predhodno gojili ob prisotnosti različnih kombinacij citokinov. Pri celičnih kulturah 10×10^6 MNC/1 ml medija so bile najvišje MFI vrednosti CD4 izmerjene na limfocitih gojenih v samem mediju (Sl. 13), medtem ko so bile pri celičnih kulturah 20×10^6 MNC/1 ml medija opazne najvišje vrednosti izražanja CD4 ob prisotnosti citokinov GM-CSF + IL-4 + IFN α (Sl. 13).

Lydyard in sodelavci (2011) navajajo, da se naivni limfociti $CD4^+$ v prisotnosti IL-4 diferencirajo v celice pomagalk Th tipa 2, ki z izločanjem IL-4 zavrejo proliferacijo limfocitov Th1 ter sintezo IFN γ . Nasprotno deluje IFN α , ki spodbuja delovanje limfocitov Th1 ter odzive citotoksičnih limfocitov T. Tako za aktivirane limfocite $CD4^+$ ob prisotnosti GM-CSF + IL-4 + IFN α ne moremo predvideti ali bodo sprožili imunski odziv v smeri Th1 ali Th2 polarizacije limfocitov, za protitumorsko terapijo pa so najbolj učinkoviti Th1 celični odzivi z delovanjem citotoksičnih limfocitov T.

V naslednjem poskusu smo pri aktiviranih limfocitih preverjali izražanje transkripcijskega faktorja T-bet. To je pomemben transkripcijski faktor pri diferenciaciji limfocitov T pomagalk (Th1) in njihovi sintezi IFN γ ter je ključnega pomena pri uravnavanju imunskega odziva tipa 1 (Lazarevic in sod., 2013, Zhu in sod., 2012). Pri celicah iz kultur 10×10^6 celic/1 ml medija so njegove MFI vrednosti izražanja izmerjene med 13,06 (pri GM-CSF + IL-4) in 31,37 (medij brez citokinov) (Sl. 12). Višje MFI vrednosti izražanja T-bet so bile izmerjene celicah gojenih z gostoto 20×10^6 celic/1 ml medija, ki se gibljejo od 42,12 (GM-CSF + IFN α) do 55,03 (GM-CSF + IL-15) (Sl. 13).

Kot že opisano, citokin IL-4 zavre proliferacijo limfocitov Th1 (Lydyard in sod. 2011), zato najnižje izmerjene vrednosti izražanja T-bet ob prisotnosti GM-CSF + IL-4 niso presenetljive. Predhodne študije opisujejo, da IL-15, ki ga izločajo keratinociti, monociti in še nekatere celice, stimulira rast aktiviranih limfocitov T, sproži citolizo efektorskih celic, vpliva na kostimulacijo in proliferacijo limfocitov B ter tvorbo protiteles. V optimalnih koncentracijah sproži proliferacijo spominskih limfocitov T CD4⁺ in CD8⁺ ter naivnih limfocitov T CD8⁺, medtem ko na proliferacijo naivnih limfocitov CD4⁺ ne vpliva (Kanegane in Tosato, 1996). Glede na opisano, so najvišje vrednosti MFI pri limfocitih T iz celične kulture gojene ob prisotnosti IL-15 pričakovane. Kot navaja Lazarevic s sodelavci (2013), je T-bet pomemben transkripcijski faktor pri diferenciaciji limfocitov Th1 ter je ključnega pomena pri uravnavanju imunskega odziva tipa 1. Za namene protitumorskih cepiv, ki temeljijo na delovanju citotoksičnih limfocitov T (CD8⁺) je tako kombinacija GM-CSF s citokinom IL-15, ki vpliva na polarizacijo limfocitov v smeri Th1 imunskih odzivov, s tega vidika optimalna.

Kot zadnjega smo po aktivaciji limfocitov T preverjali izražanje GATA-3. To je transkripcijski faktor, ki je ključnega pomena pri uravnavanju diferenciacije limfocitov tipa 2 (Th2), saj sproži izražanje genov, ki nosijo zapis za sintezo citokinov, katere izločajo limfociti Th2 in ostalih genov specifičnih za Th2 celice (Sasaki in sod., 2013).

V primeru izražanja GATA-3 na limfocitih T iz celičnih kultur z gostoto 10 x 10⁶ celic/1 ml medija se izmerjene MFI vrednosti gibajo od 6,42 (pri GM-CSF + IL-4) do 8,77 (pri GM-CSF) (Sl. 12), ter na limfocitih T iz celičnih kultur z gostoto 20 x 10⁶ celic/1 ml medija od najmanj 7,88 (pri GM-CSF + IL-15) do največ 12,58 (pri GM-CSF) (Sl. 13).

Te vrednosti so precej nižje od izmerjenih MFI vrednosti izražanja transkripcijskega faktorja T-bet. Glede na to, da je GATA-3 transkripcijski faktor pomemben za diferenciacijo Th2 limfocitov (Sasaki in sod., 2013), bi bile visoke vrednosti njegovega izražanja pričakovane pri limfocitih Th2. V našem primeru smo izvedli le orientacijski poskus, s katerim na podlagi ene meritve ne moremo sklepati, ali so se limfociti polarizirali v smeri Th1 ali Th2.

6 SKLEPI

- Po ločbi mononuklearnih celic iz periferne venske krvi z gostotno gradientnim medijem s pufrom DPBS je prišlo do izgube monocitov, vendar pri izgubi nismo dokazali statistično pomembnih razlik.
- Tako v primeru izolacije monocitov z adherenco na plastiko, kot pri imunomagnetni izolaciji monocitov ter njihovi nadaljnji diferenciaciji v DC, so celice razvile fenotip značilen za iDC. Celice gojene v CellGro® so razvile bolj kvaliteten fenotip značilen za iDC v primerjavi s celicami gojenimi v X-vivo15™.
- Pri diferenciaciji monocitov iz celokupnih MNC periferne venske krvi, so DC iz celične kulture v CellGro® pri gostoti 10×10^6 celic/1 ml medija ob prisotnosti citokinov GM-CSF + IL-4, izražale najbolj kvaliteten fenotip značilen za iDC glede na kontrolno skupino, pri tej kombinaciji je bil tudi delež živih celic najvišji. Pri gostoti 20×10^6 celic/1 ml medija so najbolj kvaliteten fenotip značilen za iDC razvile celice v kulturi z dodanim GM-CSF + IL-4 + IFN α , kjer sta bila tudi izkoristek gojenja in delež živih celic najvišja.
- Tako pri zrelih DC diferenciranih iz monocitov pridobljenih z adherenco na plastiko, kot pri DC diferenciranih iz monocitov, ločenih od ostalih MNC z imunomagnetno izolacijo, so DC razvile fenotip značilen za mDC. Medija CellGro® in X-vivo15™ nista vplivala na statistično značilne razlike v izražanju fenotipa značilnega za mDC.
- Po aktivaciji T-celičnih receptorjev na limfocitih T iz ko-kulture celokupnih MNC, so limfociti iz celičnih kultur pri vseh kombinacijah citokinov ohranili izražanje molekule CD4. V primeru izražanja transkripcijskega faktorja T-bet smo izmerili tako v celični kulturi 10×10^6 MNC/1 ml medija kot v celični kulturi 20×10^6 MNC/1 ml medija višje MFI vrednosti izražanja T-bet od MFI vrednosti izražanja transkripcijskega faktorja GATA-3. Višje MFI vrednosti T-bet od GATA-3 so bile izmerjene pri vseh kombinacijah citokinov (GM-CSF, GM-CSF + IL-4, CSF + IL-15, CSF + IFN α , GM-CSF + IL-4 + IFN α in GM-CSF + TNF α).

7 POVZETEK

Z novimi odkritji na področju tumorske imunologije in imunoterapije lahko imunoterapijo tumorjev uporabimo tudi v klinični praksi. Zdravljenje raka z imunskimi celicami vključuje zdravljenje z dendritičnimi celicami (DC), limfociti T, naravnimi celicami ubijalkami, imunohibridomi in gensko manipuliranimi celicami. Tumorske celice so slabe antigen predstavitvene celice, zato je predstavitev tumorskih antigenov odvisna predvsem od DC, ki imajo izjemno sposobnost predstavitve antigenov ter aktivacije celično posredovanih imunskih odzivov na tumorske antigene z aktivacijo citotoksičnih limfocitov T, ki učinkovito odstranijo tumorske celice.

Pridobitev DC za uporabo v protitumorskih cepivih mora biti izvedena pod strogimi pogoji, ki ustrezajo predpisom GMP (angl. *Good manufacture practice*). Ti zagotavljajo, da so medicinski izdelki dosledno proizvedeni in dosegajo predpisane standarde, da so primerni za klinično uporabo. Eden izmed pogojev je uporaba brezserumskih medijev brez dodatnega živalskega seruma; dodan je le manjši odstotek avtolognega seruma bolnika ali človeškega AB- seruma.

Za pridobitev dendritičnih celic (DC) smo uporabili monocite iz periferne venske krvi, ki smo jih od ostalih mononuklearnih celic ločili z adherenco na plastiko ali imunomagnetno izolacijo.

Cilj raziskave je bil izbrati optimalne pogoje za pripravo dendritičnih celic, ki bi se v okviru GMP lahko uporabili pri pripravi protitumorskih cepiv. Zanimala sta nas izkoristek gojenja ter kvaliteta diferenciacije in zorenja dendritičnih celic pri gojenju v brezserumskih medijih CellGro® in X-vivo15™ z dodanim 1 % človeškim AB- serumom. Kvaliteto diferenciacije in zorenja DC smo merili s pretočnim citometrom na podlagi povprečnih vrednosti intenzitete fluorescence površinskih molekul izraženih na nezrelih in zrelih DC. Pri mononuklearnih celicah periferne venske krvi gojenih v CellGro® z dodanimi različnimi kombinacijami citokinov, smo s štejetjem celic v Bürker – Türkovi komori pred in po diferenciaciji DC določili izkoristek gojenja ter viabilnost celic. Po aktivaciji T-celičnih receptorjev (TCR) na limfocitih T v ko-kulturi, smo merili povprečno intenziteto fluorescence molekul CD4, T-bet in GATA-3.

Ugotovili smo, da je po ločbi mononuklearnih celic iz periferne venske krvi z gostotno gradientnim medijem prišlo do izgube monocitov, vendar zaradi velike razpšenosti podatkov, razlike v izgubi niso statistično značilne. Pri preverjanju izražanja fenotipa so tako v primeru monocitov izoliranih z adherenco na plastiko kot monocitov izoliranih z imunomagnetno izolacijo, ter nadaljnji diferenciaciji v DC, dendritične celice gojene v CellGro® razvile bolj kvaliteten fenotip značilen za nezrele DC kot tiste, ki smo jih gojili X-vivo15™. Pri zorenju DC tako po izolaciji monocitov z adherence na plastiko in nadaljnjo diferenciacijo v DC kot po imunomagnetni izolaciji monocitov, ni bilo statistično značilnih razlik v izražanju fenotipa značilnega za zrele DC med celicami gojenimi v X-vivo15™ in CellGro®.

Pri preverjanju vpliva različnih kombinacij citokinov na diferenciacijo DC iz celokupnih MNC gojenih v CellGro®, je bil delež živih celic v celične kulture pri gostoti 10×10^6 celic/1 ml medija ob prisotnosti citokinov GM-CSF + IL-4, najvišji. Pri tej kombinaciji citokinov so celice izražale najbolj kvaliteten fenotip značilen za iDC glede na kontrolno skupino. V primeru gojenja 20×10^6 celic/1 ml medija so najbolj kvaliteten fenotip značilen za iDC, razvile celice v kulturi z dodanim GM-CSF + IL-4 + IFN α , kjer sta bila tudi izkoristek gojenja in delež živih celic najvišja.

Limfociti iz kulture MNC so po aktivaciji TCR v vseh celičnih kulturah izražali CD4. Pri teh limfocitih so bile izmerjene višje vrednosti T-bet kot GATA-3 tako pri gostoti 10×10^6 celic/1 ml medija, kot pri gostoti 20×10^6 celic/1 ml medija pri vseh kombinacijah citokinov (GM-CSF, GM-CSF + IL-4, CSF + IL-15, CSF + IFN α , GM-CSF + IL-4 + IFN α in GM-CSF + TNF α).

8 VIRI

- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. New York, Garland Science: 1462 str.
- Boyum A. 1968. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*, 21: 77–89
- Brightbill H. D., Libraty D. H., Krutzik S. R., Yang R.-B., Belisle J. T., Bleharski J. R., Maitland M., Norgard M. V., Plevy S. E., Smale S. T., Brennan P. J., Bloom B. R., Godowski P. J., Modlin R. L., 1999. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through Toll-like receptors. *Science*, 285, 5428: 732–736
- Brigl M., Brenner M.B. 2004. CD1: antigen presentation and T cell function. *Annual Review of Immunology*. 22: 817–890
- Brunner D., Frank J., Appl H., Schöffl H., Pfaller W., Gstraunthaler G. 2010. Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database. *Altex*, 27,1: 53–62
- Buonaguro L., Petrizzo A., Tornesello M. L., Buonaguro F. M. 2011. Translating tumor antigens into cancer vaccines. *Clinical and Vaccine Immunology*, 18, 1: 23–34
- Celia M., Sallusto F., Lanzavecchia A. 1997. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Current Biology*, 9: 10–16
- Chávez-Galán L., Arenas-Del Angel M.C., Zenteno E., Chávez R., Lascrain R. 2009. Cell Death Mechanism Induced by Cytotoxic Lymphocytes. *Cellular & Molecular Immunology*, 6, 1: 15–25
- Clarke C., Davies S. 2001. Immunomagnetic cell separation. *Metastasis Research Protocols Methods in Molecular Medicine*, 58: 17–23
- Dauer M., Pohl K., Obermaier B., Meskendahl T., Robe J., Endres S., Eigler A. 2003. Interferon- α disables dendritic cell precursors: dendritic cells derived from interferon- α treated monocytes are defective in maturation and T-cell stimulation. *Immunology*, 110: 38–47
- Figdor C.G., De Vries I.J.M., Lesterhuis W.J., Melief J.M. 2004. Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nature Medicine*, 10: 47–480
- Frazer I.H., Lowy D.R., Schiller J.T. 2007 Prevention of cancer through immunization: Prospects and challenges for the 21st century. *European Journal of Immunology*, 37, 1: 148–155

- Geginat J., Sallusto F., Lanzavecchia A. 2001. Cytokine-driven Proliferation and Differentiation of Human Naive, Central Memory, and Effector Memory CD4⁺ T Cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 194, 12: 1711–1720
- Granucci F., Ferrero E., Foti M., Aggujaro D., Vettoretto K., Ricciardi-Castagnoli P. 1999. Early events in dendritic cell maturation induced by LPS. *Microbes and Infection*, 1, 13: 1079–1084
- Hart N.J. 1997. Dendritic Cells: Unique Leukocyte Populations Which Control the Primary Immune Response. *The Journal of the American Society of Hematology*, 90, 9: 3245–3287
- Hart N.J., MacDonald K., Vuckovic S., Clark G.J. 2001. Phenotypic characterization of dendritic cells. *Dendritic Cells. Biology and clinical applications*. 2nd ed. London: Academic Press: 794 str.
- Han T.H., Jin P., Ren J., Slezak S., Marincola F.M., Stroncek D.F. 2009. Evaluation of Three Clinical Dendritic Cell Maturation Protocols Containing Lipopolysaccharide and Interferon-gamma. *Journal of Immunotherapy*, 32, 4: 399–407
- Hiasa M., Abe M., Nakano A., Oda A., Amou H., Kido S., Takeuchi K., Kagawa K., Yata K., Hashimoto T., Ozaki S., Asaoka K., Tanaka E., Moriyama K., Matsumoto T. 2009. GM-CSF and IL-4 induce dendritic cell differentiation and disrupt osteoclastogenesis through M-CSF receptor shedding by up-regulation of TNF-alpha converting enzyme (TACE). *Blood*, 114, 20: 4517–4526
- He T., Tang C., Xu S., Moyana T., Xiang J. 2007. Interferon γ Stimulates Cellular Maturation of Dendritic Cell Line DC2.4 Leading to Induction of Efficient Cytotoxic T Cell Responses and Antitumor Immunity. *Cellular & Molecular Immunology*, 4, 2: 105–111
- Herman A., Jeras M. 2011. Zdravljenje raka z imunskimi celicami. *Farmacevtski vestnik*, 62: 123–188
- Hertz C.J., Kiertscher S.M., Godowski P.J., Bouis A.D., Norgard M.V., Roth M.D., Modlin L.R. 2001. Microbial Lipopeptides Stimulate Dendritic Cell Maturation Via Toll-Like Receptor 2. *The Journal of Immunology*, 166, 4: 2444–2450
- IUIS-WHO Nomenclature Subcommittee. 1984. Nomenclature for clusters of differentiation (CD) of antigens defined on human leukocyte populations. *Bulletin of the World Health Organization*, 62, 5: 809–815
- Iwamoto S., Iwai S., Tsujiyama K., Kurahashi C., Takeshita K., Naoe M., Masunaga A., Ogawa Y., Oguchi K., Miyazaki A. 2007. TNF- α Drives Human CD14⁺ Monocytes to Differentiate into CD70⁺ Dendritic Cells Evoking Th1 and Th17 Responses. *The Journal of Immunology*, 179, 3: 1449–1457

- JAZMP: Javna agencija RS za zdravila in medicinske pripomočke. Preskrba s tkivi in celicami. Ljubljana.
http://www.jazmp.si/preskrba_s_tkivi_in_celicami/ (13. maj 2015)
- Jendro M., Goronzy J.J., Weyand C.M. 1991. Structural and functional characterization of HLA-DR molecules circulating in the serum. *Autoimmunity*, 8, 4: 289–296
- Kanegane H., Tosato G. 1996. Activation of naive and memory T cells by interleukin-15. *Blood*, 1, 88: 230–235
- Kanof M.E., Smith P. D., Zola H. 1996. Preparation of human mononuclear cell populations and subpopulations. *Current Protocols in Immunology*: 7 str.
- Kantoff P. W., Higano C.S., Shore N.D., Berger R., Small E. J., Penson D. F., Redfern C. H., Ferrari A. C., Dreicer R., Sims R. B., Xu Y., Frohlich M. W., Schellhammer P.F. 2010. Sipuleucel-T Immunotherapy for Castration-Resistant Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*, 363, 5: 2373–2383
- Kaplan J., Nolan D., Ree A. 1982. Altered lymphocyte markers and blastogenic responses associated with 24 hour delay in processing of blood samples. *Journal of Immunological Methods*, 50: 187–191
- Kolanowski S.T., Sritharan L., Lissenberg-Thunnissen S.N1, Van Schijndel G.M., Van Ham S.M., ten Brinke A. 2014. Comparison of media and serum supplementation for generation of monophosphoryl lipid A/interferon- γ -matured type I dendritic cells for immunotherapy. *Cyotherapy*, 6: 826–834
- Kotnik V., Čurin Šerbec V., Hartman Pretnar K., Ihan A., Kopitar A N., Jeras M., Simčič S., Stopinšek S., Skvarč M., Vidan Jeras B., Vraber B. 2010. *Imunološki priročnik*. Ljubljana. Medicinska fakulteta: 194 str.
- Kruse M., Rosorius O., Krätzer F., Bevec D., Kuhnt C., Steinkassere A., Schuler G., Hauber J. 2000. Inhibition of CD83 Cell Surface Expression during Dendritic Cell Maturation by Interference with Nuclear Export of Cd83 mRNA. *The journal of experimental medicine*, 191, 9: 1581–1590
- Kufner S., Zitzelsbeger H., Kroell T., Pelka-Fleisher R., Salem A., de Valle F., Schmid C., Schweiger C., Kolb H.J., Schmetzer H.M. 2005. Leukaemia-derived dendritic cells can be generated from blood or bone marrow cells from patients with myelodysplasia: a methodological approach under serum-free culture conditions. *Scandinavian journal of immunology*, 62, 1: 75–85
- Lapenta C., Santini S.M., Spaada M., Donati S., Urbani F., Accapezzato D., Franceschini D., Andreotti M., Barnaba M., Belardelli F. 2006. IFN-alpha-conditioned dendritic cells are highly efficient in inducing cross-priming CD8(+) T cells against exogenous viral antigens. *European Journal of Immunology*, 8: 2046–2060

- Lazarevic V, Glimcher L.H., 2013. T-bet: a bridge between innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*, 13, 11: 777–789
- Lechmann M., Berchtold S., Hauber J., Steinkasserer A. 2002. CD83 on dendritic cells: more than just a marker for maturation. *Trends in Immunology*, 23, 6: 273–275
- Linsley P.S. in Ledbetter J.A. 1993. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annual Review in Immunology*, 11: 191–212
- Loudovaris M., Hansen M., Suen Y., Lee M.S., Casing P., Bender J.G. 2001. Differential effects of autologous serum on CD34 + or monocyte-derived dendritic cells. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research*, 10, 4: 569–578
- Lydyard P., Whelan A., Fanger M. 2011. *Immunology*. 3rd ed. New York, Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC: 358 str.
- Mackensen A., Dräger R., Schleiser M., Mertelsmann R., Lindemann A. 2000. Presence of IgE antibodies to bovine serum albumin in a patient developing anaphylaxis after vaccination with human peptide-pulsed dendritic cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 49, 3: 152–156
- MACS®. 2015. MicroBeats. Details, Bergisch Gladbach, Germany. Miltenyi Biotec GmbH.
http://www.miltenyibiotec.com/en/products-and-services/macscell-separation/macstechnology/microbeads_dp.aspx (12. maj 2015)
- Maroof A., Penny M., Kingston R., Murray C., Islam S., Bedford A.P., Knight S.C. 2006. Interleukin-4 can induce interleukin-4 production in dendritic cells. *Immunology*, 117, 2: 271–279
- Mohamadzadeh M., Berard F., Essert G., Chalouni C., Pulendran B., Davoust J., Bridges G., Palucka A.K., Banchereau J. 2001. Interleukin 15 skews monocyte differentiation into dendritic cells with features of Langerhans cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 194, 7: 1013–1020
- Melichar B., Nash M.A., Lenzi R., Platsoucas C.D., Freedman R.S. 2000. Expression of costimulatory molecules CD80 and CD86 and their receptors CD28, CTLA-4 on malignant ascites CD3+ tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) from patients with ovarian and other types of peritoneal carcinomatosis. *Clinical and Experimental Immunology*, 119, 1: 19–27
- Merad M., Sathe P., Helft J., Miller J., Mortha A. 2013. The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting. *Annual Review of Immunology*, 31: 563–604

- Merad M., Ginhoux F., Collin M. 2008. Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nature Reviews. Immunology*, 8, 12: 935–947
- Napoletano C., Pinto D., Bellati F., Taurino F., Rahimi H., Tomao F. 2007. A comparative analysis of serum-free media for generation of clinical grade DCs. *Journal of Immunotherapy*, 30, 5: 567–576
- NCI: National Cancer Institute. 2011. Cancer vaccines. Maryland, USA.
<http://www.cancer.gov/about-nci/overview> (12. maj 2015)
- Nemunaitis J., Edelman J. 2002. Selectively replicating viral vectors. *Cancer Gene Therapy*, 9, 12: 987–1000
- Palucka K., Banchereau J. 2012. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nature Reviews. Cancer*, 12, 4: 265–277
- Parmiani G., Russo V., Marrari A., Cutolo G., Casati C., Pilla L., Maccalli C., Rivoltini L., Castelli C. 2007. Universal and stemness-related tumor antigens: potential use in cancer immunotherapy. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 13, 19: 5675–5679
- Parkin D.M. 2006. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *International Journal of Cancer*, 118, 12: 3030–3044
- Paquette R.I., Hsu N. 2002. Interferon- α induces dendritic cell differentiation of CML mononuclear cells in vitro and in vivo. *Leukemia*, 16, 8: 1484–1489
- Pawlowski N. A., Kaplan G., Hamill A. L., Cohn, Z. A., Scott W. A. 1983. *Journal of Experimental Medicine*, 158: 393–412
- Prazma C.M., Yazawa N., Fujimoto Y., Tedder F. T. 2007. CD83 Expression is a sensitive marker of activation required for B cell and CD4⁺ T cell longevity in vivo. *The Journal of Immunology*, 179, 7: 4550–4562
- PromoCell. 2014. Monocyte Attachment Medium. Instruction manual. Heidelberg, Germany. PromoCell GmbH.
<http://www.promocell.com/fileadmin/promocell/PDF/C-28051.pdf> (12. maj 2015)
- Pullakart V., Lau R., Lee S.M., Bender J. G., Weber S.J. 2002. Large-scale monocyte enrichment coupled with a closed culture system for the generation of human dendritic cells. *Journal of Immunological Methods*, 267: 173–183
- Renkvist N., Castelli C., Robbins P. F., Parmiani G. 2001. A listing of human tumor antigens recognized by T cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 50, 1: 3–15

- Repnik U., Bergant M., Jeras M., 2004. Lastnosti in možnosti uporabe dendritičnih celic, antigensko specifičnih modulatorjev imunskega odziva. *Zdravniški vestnik*, 73: 69–72
- Rivoltini L., Canese P., Huber V., Iero M., Pilla L., Valenti R., Fais S., Lozupone F., Casati C., Castelli C., Parmiani G. 2005. Escape strategies and reasons for failure in the interaction between tumour cells and the immune system: how can we tilt the balance towards immune-mediated cancer control? *Expert Opinion on Biological Therapy*, 5, 4: 463–476
- Romani N., Reider D., Heuer M., Ebner S., Kämpgen E., Eibl B., Niederwiesser D., Schuler G. 1996. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *Journal of Immunological Methods*, 196, 2: 137–151
- Sasaki T, Onodera A., Hosokawa H., Watanabe Y., Horiuchi S., Yamashita J., Tanaka H., Ogawa Y., Suzuki Y., Nakayama T. 2013. Genome-Wide Gene Expression Profiling Revealed a Critical Role for GATA3 in the Maintenance of the Th2 Cell Identity. *PLoS ONE*, 8, 6: 1–11
- SMS: Slovenski medicinski slovar. 2015. Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta.
<http://www.termania.net/slovarji/95/slovenski-medicinski-slovar> (16. junij 2015)
- Steinman, R. M. 2012. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annual Review of Immunology*, 30: 1–22
- Strober W. 2001. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current protocols in immunology*: 3 str.
- Švajger U., Anderluh M., Jeras M., Obermajer N. 2010. C-type lectin DC-SIGN: An adhesion, signalling and antigen uptake molecule that guides dendritic cells in immunity. *Cellular signalling*, 10: 1397–1405
- Švajger U., Obermajer N., Jeras M. 2010. Tolerogene dendritične celice pridobljene z visokimi odmerki interferona-gama. Urad RS za intelektualno lastnino P-201000129: 9 str.
- Tarte K., Fiol G., Rossi J.F., Klein B. 2000: 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*, 14: 2182–2192
- Thiel A., Scheffold A., Radbruch A. 1998. Immunomagnetic cell sorting—pushing the limits. *Immunotechnology*, 4, 2: 89–96
- Toldbod H. E., Agger R., Bolund L., Hokland M. 2003. Potent influence of bovine serum proteins in experimental dendritic cell-based vaccination protocols. *Scandinavian Journal of Immunology*, 581: 43–50

- Urruticoechea A., Alemany R., Balart J., Villanueva A., Viñals F., Capellá G. 2010. Recent advances in cancer therapy: an overview. *Current pharmaceutical design*, 16, 1: 3–10
- Valladeau J., Ravel O., Dezutter-Dambuyant C., Moore K., Kleijmeer M., Liu Y., Duvert-Frances V., Vincent C., Schmitt D., Davoust J., Caux C., Lebecque S., Saeland S. 2000. Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity*, 12: 71–81
- Van de Laar L., Coffier P.J., Woltman A.M. 2012. Regulation of dendritic cell development by GM-CSF: molecular control and implications for immune homeostasis and therapy. *Blood*, 119, 15: 3383–3393
- Zakon o kakovosti in varnosti človeških tkiv in celic, namenjenih za zdravljenje. 2007. Uradni list Republike Slovenije, 61: 8529
- Zhou L.J., Tedder T. 1996. CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Immunology*, 93: 2588–2592
- Zhu J., Yamane H., Paul W.E. 2010. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. *Annual Review of Immunology*, 28: 445–489
- Wang J., Guo X., Yu S., Zhang J., Cao Z., Wang J., Liu M., Dong W. 2014. Association between CD14 Gene Polymorphisms and Cancer Risk: A Meta-Analysis. *Plos One*. 9, 6: 1-9
- Warrington R., Watson, W, Kim H. L., Antonetti F. 2011. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 7, 1: 8 str.
- WHO: World Health Organisation. 2015. Good Manufacturing Practices. Switzerland. http://www.who.int/biologicals/vaccines/good_manufacturing_practice/en/ (14. maj 2015)

ZAHVALA

Zahvaljujem se doc. dr. Urbanu Švajgerju za mentorstvo pri izdelavi magistrske naloge ter članoma komisije doc. dr. Nadi Žnidaršič in prof. dr. Roku Kostanjšku za hiter in natančen pregled naloge ter koristne nasvete.

Hvala Marjani, ker je vedno vedela, kje se skrivajo stvari v laboratoriju in Tadeju, za lepe spomine in vso pomoč pri delu.

Mojim sošolcem tekom vseh let študija, brez vas študentska leta ne bi bila najlepša, vsem prijateljem, ki ste me bodrili tekom študija in pri pisanju naloge. Hvala vsem, ki ste si vzeli čas in prebrali nalogo, Jožetu za lektoriranje in Aleksandri za pregled prevoda.

In seveda hvala mojim najdražjim, moji družini in mojemu Tilnu, hvala ker ste me podpirali tekom študija in nikoli podvomili vame.