

Generacja komórek dendrytycznych z monocytów krwi obwodowej chorych na przewlekłą białaczkę limfocytową przy użyciu GM-CSF, IL-4 i TNF nie indukuje ich właściwości tolerogennych

Generation of dendritic cells from peripheral blood monocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia using GM-CSF, IL-4 and TNF does not induce their tolerogenic properties

Iwona Hus¹, Magdalena Wasiak^{2,3}, Justyna Miłczek⁴, Jacek Roliński²

STRESZCZENIE

Celem przedstawionych badań była ocena właściwości tolerogennych komórek dendrytycznych generowanych *in vitro* z monocytów krwi obwodowej chorych na przewlekłą białaczkę limfocytową (PBL) przy użyciu cytokin, takich jak: GM-CSF i IL-4 i TNF. Nie wykazano istotnie większego stężenia tolerogennych cytokin IL-10 i TGF- β w nadsączach z nadhodowli dojrzałych komórek dendrytycznych chorych na PBL w porównaniu ze zdrowymi dawcami i ze stężeniem w surowicy chorych. Nie stwierdzono indukcji komórek T-regulatorowych w hodowlach zawierających autologiczne limfocyty T i wygenerowane komórki dendrytyczne. Oceniano ponadto wewnątrzkomórkową ekspresję dioksygenazy 2,3-indoleaminy (IDO) na poziomie białka w wygenerowanych komórkach dendrytycznych. IDO wpływa na hamowanie proliferacji i indukuje śmierć limfocytów efektorowych T oraz powstawanie limfocytów T regulatorowych. Nie wykazano obecności tego enzymu lub jedynie jego śladową ilość w wygenerowanych komórkach dendrytycznych oraz brak korelacji między odsetkiem limfocytów T regulatorowych, a odsetkiem komórek o fenotypie CD83+IDO+. Wyniki uzyskane w badaniach własnych wskazują, że DC generowane za pomocą GM-CSF, IL-4 i TNF z monocytów krwi obwodowej chorych na PBL nie mają właściwości tolerogennych.

Słowa kluczowe: przewlekła białaczka limfocytowa, immunoterapia komórkowa, komórki dendrytyczne, limfocyty T-regulatorowe, interleukina 10, transformujący czynnik wzrostu β , dioksygenaza 2,3-indoleaminy

SUMMARY

The aim of this study was to evaluate the tolerogenic properties of dendritic cells generated *in vitro* from peripheral blood monocytes in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) using cytokines such as GM-CSF, IL-4 and TNF. There were no significant differences in the concentration of tolerogenic cytokines, IL-10 and TGF- β in supernatants from cultures of mature dendritic cells of CLL patients and healthy donors and the concentration of mentioned cytokines in the serum of CLL patients. There was no induction of regulatory T cells in cultures containing autologous T cells and dendritic cells generated from CLL patients. We have also evaluated the intracellular expression of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) protein in generated dendritic cells. IDO inhibits proliferation and induces death of effector T cells, and induces the formation of regulatory T cells. There was no or only a trace amount of this enzyme in generated dendritic cells and the no correlation between the percentage of T regulatory cells, and the percentage of cells with phenotype CD83+IDO+. The results obtained in our study show that DC generated with GM-CSF, IL-4 and TNF have no tolerogenic properties.

Keywords: Chronic lymphocytic leukemia, Cellular immunotherapy, Dendritic cells, Regulatory T cells, Interleukin 10, Transforming growth factor β , Indoleamine 2,3-dioxygenase

© by Polskie Towarzystwo Hematologów i Transfuzjologów i Instytut Hematologii i Transfuzjologii

Acta
Haematologica
Polonica;
43 (2b): 215–221

Otrzymano: 2.04.2012
Zaakceptowano: 25.04.2012

¹ Klinika Hematoonkologii i Transplantacji Szpiku Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

Kierownik: prof. dr hab. med. Anna Dmoszyńska

² Katedra i Zakład Immunologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

Kierownik: prof. dr hab. med. Jacek Roliński

³ Klinika Otolaryngologii i Laryngologii Onkologicznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

Kierownik: prof. dr hab. med. Janusz Kłatka

⁴ Oddział Anestezjologii i Intensywnej Terapii, Dziecięcy Szpital Kliniczny im. prof. Antoniego Gębali
Kierownik: dr n. med. Witold Lesiuk

Wkład pracy autorów:

I. Hus – interpretacja danych, przygotowanie manuskryptu, opracowanie literatury, M. Wasiak – przeprowadzenie badań laboratoryjnych, analiza statystyczna, opracowanie literatury, J. Miłczek – zbieranie danych klinicznych, J. Roliński – opracowanie projektu badania, pozyskanie funduszy, nadzór nad badaniami laboratoryjnymi

Praca finansowana przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego ze środków budżetowych jako projekt rozwojowy Nr GR831

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesu

Adres do korespondencji:

Iwona Hus
Klinika Hematoonkologii i Transplantacji Szpiku
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
20-081 Lublin
ul. Staszica 11
Tel. 81 53 45 468
Fax 81 53 45 605
Email: iwonach.hus@gmail.com

Wstęp

Immunoterapia z wykorzystaniem komórek dendrytycznych (*dendritic cells*; DC) należy do nowych, eksperymentalnych metod leczenia chorób nowotworowych. Teoretyczne przesłanki wykorzystania DC w immunoterapii nowotworów wynikają z faktu, że istotną przyczyną „ucieczki” nowotworu spod kontroli układu odpornościowego jest brak skutecznej prezentacji antygenów nowotworowych, a DC są populacją komórek o najsilniejszych właściwościach prezentacji antygenów, w tym także nowotworowych. Od czasu pierwszego zastosowania szczepionki w postaci DC u chorych na chłoniaki [1] opisano ponad 200 prób klinicznych I i II fazy podjętych w ponad 20 rodzajach nowotworów, najczęściej guzów litych [2]. Niestety, w dotychczas opisanych badaniach, pomimo wykazania w większości przypadków indukcji odpowiedzi immunologicznej, jedynie w części z nich obserwowano istotną odpowiedź kliniczną. Podobnie przedstawiały się opublikowane przez nasz zespół wyniki prób klinicznych dotyczących zastosowania DC u chorych we wczesnych stadiach przewlekłej białaczki limfocytowej (PBL) [3, 4]. W ostatnich latach opublikowano interesujące dane, które mogą tłumaczyć brak oczekiwanej skuteczności immunoterapii DC. Podczas gdy wcześniejsze badania skupione były na jak najsilniejszej aktywacji układu odporności, w świetle obecnej wiedzy nie mniej ważne jest działanie skierowane na komórki i cząsteczki hamujące odpowiedź immunologiczną. Opisano bowiem populacje komórek regulatorowych o działaniu hamującym odpowiedź immunologiczną, które mogą hamować także odpowiedź przeciwnowotworową, zarówno odgrywając istotną rolę w procesach ekspansji nowotworu, jak i wpływając niekorzystnie na wyniki immunoterapii. Do najlepiej poznanych populacji komórek o działaniu supresorowym należą: limfocyty T regulatorowe (Treg), komórki supresorowe pochodzenia mieloidalnego (*myeloid-derived suppressor cells*; MDSC), makrofagi związane z nowotworem (*tumor associated macrophages*; TAM). Wykazano ponadto, że w zależności od populacji i stopnia dojrzałości również same komórki dendrytyczne mogą mieć działanie tolerogenne poprzez wydzielanie określonych cytokin, takich jak IL-10 (interleukina 10) [5] i TGF- β (*transforming growth factor* β ; transformujący czynnik wzrostu β) [6] oraz indukcję limfocytów T regulatorowych [7]. W przypadku DC generowanych w warunkach *in vitro* ważny wpływ na właściwości DC ma metoda generacji [8–10]. Niezmiernie istotne znaczenie w prowadzonych aktualnie badaniach dotyczących zwiększenia skuteczności klinicznej szczepionek przeciwnowotworowych ma zatem określenie optymalnych warunków generacji, tak aby uniknąć indukcji tolerogennych populacji DC.

Celem przedstawionych badań była próba określenia właściwości tolerogennych komórek dendrytycznych generowanych *in vitro* z monocytów krwi obwodowej chorych na przewlekłą białaczkę limfocytową przy użyciu cytokin, takich jak: GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*; czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów) i IL-4 (interleukina 4) TNF (*tumor necrosis factor*; czynnik martwicy nowotworów).

Pacjenci i metody

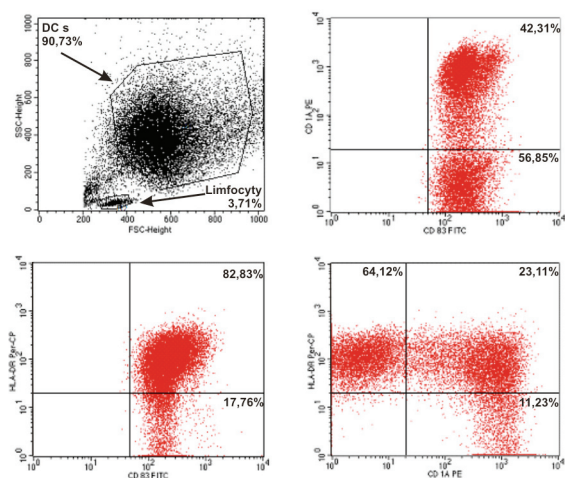
Grupę badaną stanowiło 57 chorych (30 mężczyzn i 27 kobiet) w wieku od 37 do 81 lat (mediana 68) ze świeżo rozpoznaną, nieleczoną przewlekłą białaczką limfocytową, diagnozowanych w Klinice Hematologii i Transplantacji Szpiku Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. U wszystkich chorych stwierdzono wczesne stadia kliniczne PBL (stadium 0 wg Rai'a – 31 chorych, stadium 1 – 6 chorych, stadium 2 – 20 chorych). Grupę kontrolną stanowiło 10 zdrowych dawców krwi (7 mężczyzn, 3 kobiety). Wiek dawców wahał się od 34 do 54 lat (mediana 48).

Badania wykonano zgodnie z protokołem zaakceptowanym przez Komisję Bioetyczną przy Uniwersytecie Medycznym w Lublinie.

Materiał badany stanowiła krew obwodowa pobierana w objętości 20 ml do strzykawek zawierających heparynę sodową w celu izolacji komórek jednojądrzastych w objętości 2 ml probówek z EDTA w celu oznaczenia stężenia cytokin.

Komórki jednojądrzaste izolowano z krwi obwodowej poprzez wirowanie w gradiencie gęstości przez 20 min w temperaturze 20°C i przyspieszeniu 700xg (Gradisol L, Aqua Medica, Polska). Z części uzyskanych komórek jednojądrzastych separowano monocyty do generacji komórek dendrytycznych, a pozostałą część komórek zamrażano do dalszej części badań. Komórki CD14+ do generacji komórek dendrytycznych izolowano drogą separacji magnetycznej z wykorzystaniem przeciwciał anti-CD14 sprzężonych z cząstką magnetyczną (CD14-Microbeads, Miltenyi Biotec, Niemcy) i kolumny separacyjnej umieszczonej w polu magnetycznym zestawu QuadroMACS (Miltenyi Biotec, Niemcy), według zaleceń producenta.

Hodowla komórek CD14+ prowadzona była w standardowych warunkach: w temperaturze 37°C i w atmosferze 5% CO₂. Jako medium hodowlane użyte zostało RPMI 1640 (PAA Laboratories, Austria) wzbogacone 2% albuminą ludzką (Baxter, USA) oraz antybiotykami: penicylina (100 IU/ml), streptomycyna (50 μ g/ml), neomycyna (100 μ g/ml) (Sigma, Niemcy). Do hodowanych komórek 1., 3. i 5. dnia dodawane były cytokiny rhGM-CSF w dawce 1000 IU/ml (Gentaur, Belgia) i rhIL-4 w dawce 500 IU/ml (Gentaur, Belgia). Szóstego dnia do hodowli dodawany był



Ryc. 1. Przykładowa analiza cytometryczna immunofenotypu wygenerowanych DC – ocena markerów dojrzałości
Fig. 1. Example of flow cytometry analysis of generated DC immunophenotype – assessment of maturity markers

rhTNF- α w dawce 50 ng/ml (Strathmann, Niemcy) w celu indukcji dojrzewania komórek dendrytycznych oraz lizaty z komórek białaczkowych w ilości 100 μ g białka/ml medium hodowlanego jako źródło antygenów nowotworowych. Generacja dojrzałych komórek dendrytycznych zakończona została 7. dnia hodowli.

Komórki białaczkowe zostały wyseparowane magnetycznie z komórek jednojądrzastych za pomocą zestawu QuadroMACS (Miltenyi Biotec, Niemcy) i przy użyciu odpowiednich przeciwciał anti-CD19 sprzężonych z cząstkami magnetycznymi (CD19-MicroBeads, Miltenyi Biotec, Niemcy). Lizaty komórek białaczkowych przygotowywano poprzez pięciokrotny cykl szybkiego zamrażania (-80°C) i odmrażania (37°C) zawiesiny komórek w 1 ml RPMI 1640 bez czerwieni fenolowej (PanBiotec, Niemcy). Część przefiltrowanego lizatu zamrażano (do momentu dodania do hodowli komórek dendrytycznych), a w drugiej porcji oznaczano stężenie białka. Użyto metody pomiaru absorbancji światła o długości 280 nm i spektrofotometru DU[®]530 (Beckman, USA).

Ocena immunofenotypu wygenerowanych DCs przeprowadzona przy użyciu cytometru przepływowego FACSCalibur (Becton Dickinson, USA) z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko następującym ludzkim antygenom: CD14 CD83, CD1a HLA-DR, CD86, CD80, CD83 (Ryc. 1). Komórki o immunofenotypie CD83+/CD1a+ oraz CD83-/CD1a- uznawano za komórki dojrzałe, natomiast komórki CD83-/CD1a+ za niedojrzałe komórki dendrytyczne.

Wewnątrzkomórkową ekspresjęIDO w komórkach dendrytycznych oznaczano poprzez znakowanie przeciwciałami anti-IDO CD83 FITC (izotyp IgG1) (BD Pharmingen, USA) i anti-HLA-DR (Santa Cruz

Biotechnology, USA) za pomocą Zenon[™] r-phycoerythrin rabbit IgG Labeling Kit (Life Technologies, USA), zgodnie z zaleceniami producenta.

Zdolność wygenerowanych komórek dendrytycznych do indukcji postawiania limfocytów T-regulatorowych oceniano w hodowlach zawierających limfocyty T i komórki dendrytyczne. Limfocyty T izolowano za pomocą przeciwciał anti-CD3 sprzężonych z cząstkami magnetycznymi (anti-CD3MicroBeads, Miltenyi Biotec, Niemcy) przy użyciu zestawu QuadroMACS (Miltenyi Biotec, Niemcy), zgodnie z zaleceniami producenta. Hodowlę prowadzono w temperaturze 37°C i atmosferze 5% CO₂ w pożywce zawierającej RPMI 1640 wzbogaconej 2% albuminą ludzką (Baxter, USA) oraz antybiotykami: penicylina (100 IU/ml), streptomycyna (50 μ g/ml), neomycyna (100 μ g/ml) (Sigma, Niemcy). Na płytkę hodowlaną dodawane były komórki do dwóch dołków: 1) limfocyty T CD3+; 2) limfocyty T CD3+ i komórki dendrytyczne. Hodowlę prowadzono przez 3 dni. Po odwirowaniu zbierano komórki, w których oznaczano cytometrycznie odsetek limfocytów regulatorowych.

Limfocyty T regulatorowe CD4+CD25+FoxP3+ oznaczane były przy użyciu zestawu Human Treg Flow[™] KIT (FOXP3 Alexa Fluor 488/CD4 PE-Cy5/CD25 PE) firmy BioLegend zgodnie z zaleceniami producenta.

W osoczu krwi i nadsączach z hodowli komórek dendrytycznych oznaczano stężenie IL-10 i TGF- β metodą ELISA (*enzyme linked immunoabsorbent assay*), zgodnie z zaleceniami producenta, z wykorzystaniem następujących odczynników: Quantikine[®] Human IL-10 Immunoassay (R&D System, USA), Quantikine[®] Human TGF- β Immunoassay (R&D System, USA).

Do analizy statystycznej wyników wykorzystano program komputerowy STATISTICA 7.1 PL. Zastosowano testy nieparametryczne: test U Manna-Whitneya, test kolejności par Wilcozona, test ANOVA, test korelacji rang Spaermanna. We wszystkich zastosowanych testach wartości $p < 0,05$ uznawano za istotne statystycznie. Uzyskane wyniki opisano za pomocą median oraz wartości najmniejszej (min.) i największej (maks.) szeregu statystycznego.

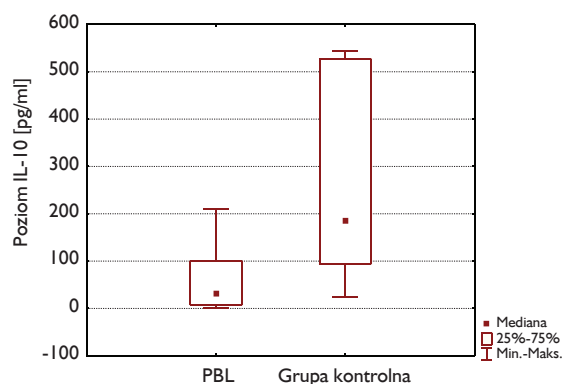
Wyniki

Po siedmiu dniach hodowli nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic między komórkami dendrytycznymi generowanymi z monocytów krwi obwodowej chorych na przewlekłą białaczkę limfocytową i od zdrowych dawców, które dotyczyłyby odsetka uzyskanych komórek dendrytycznych (65,15% vs 79,55%), ani stopnia ich dojrzałości ocenianego na podstawie odsetków komórek o fenotypie CD1a+/CD83-, CD1a+/CD83+ oraz CD1a-/CD83+

Ocena stężenia IL-10 i TGF- β w surowicy oraz w nadsącach znad hodowli niedojrzałych i dojrzałych komórek dendrytycznych

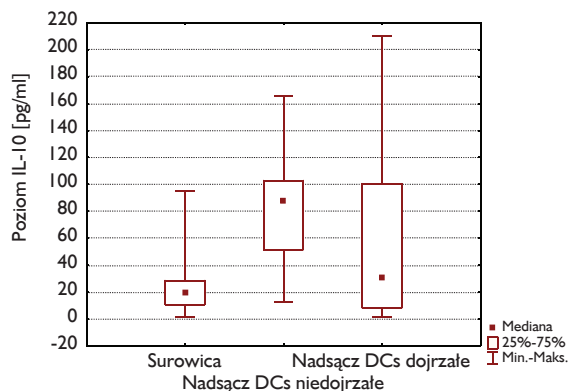
W przeprowadzonych doświadczeniach ocenione zostało stężenie IL-10 w nadsącach znad hodowli dojrzałych komórek dendrytycznych generowanych od chorych na PBL i od zdrowych dawców krwi. Otrzymane wyniki wykazały istotnie mniejsze ($p=0,007$) stężenie IL-10 u chorych na PBL w porównaniu z grupą kontrolną (Ryc. 2).

Następnie porównano stężenie IL-10 w surowicy chorych na PBL oraz w nadsącach znad hodowli niedojrzałych i dojrzałych komórek dendrytycznych. Otrzymane wyniki wykazały istotne statystycznie większe stężenie IL-10 ($p=0,017$) w nadsącu znad hodowli niedojrzałych komórek dendrytycznych w porównaniu ze stężeniem tej cytokiny w surowicy.



Ryc. 2. Ocena stężenia IL-10 w nadsącach znad hodowli dojrzałych komórek dendrytycznych generowanych od chorych na PBL i w grupie kontrolnej

Fig. 2. Evaluation of IL-10 in supernatants above the cultures of mature dendritic cells generated from CLL patients and from the control group



Ryc. 3. Stężenie IL-10 w surowicy i w nadsącach znad hodowli niedojrzałych i dojrzałych komórek dendrytycznych generowanych od chorych na PBL

Fig. 3. The concentration of IL-10 in serum and in supernatants above the cultures of immature and mature dendritic cells generated from CLL patients

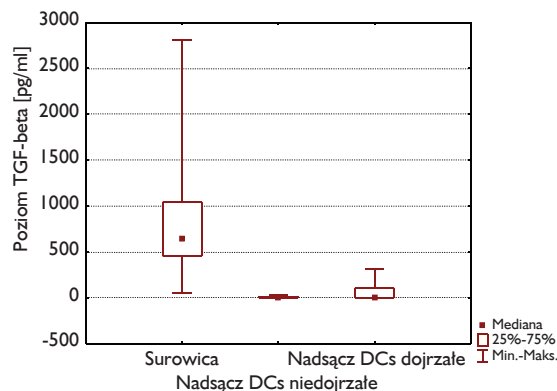
Nie odnotowano istotnych statystycznie różnic w między stężeniem tej cytokiny w nadsącu znad hodowli komórek dojrzałych DC a stężeniem w surowicy (Ryc. 3).

W przeprowadzonych doświadczeniach ocenione zostało stężenie TGF- β w nadsącach znad hodowli dojrzałych komórek dendrytycznych generowanych od chorych na PBL i od zdrowych dawców krwi. Otrzymane wyniki nie wykazały istotnych różnic w stężeniu TGF- β chorych na PBL w porównaniu z grupą kontrolną.

Dokonano również porównania stężenia TGF- β w surowicy chorych na PBL oraz w nadsącach znad hodowli niedojrzałych i dojrzałych komórek dendrytycznych stymulowanych lizatami białaczkowymi. Otrzymane wyniki wykazały istotne statystycznie większe stężenie TGF- β ($p=0,017$) w surowicy w porównaniu ze stężeniem tej cytokiny w nadsącu znad hodowli niedojrzałych komórek dendrytycznych oraz w porównaniu z poziomem TGF- β w nadsącu znad hodowli dojrzałych komórek dendrytycznych ($p=0,000035$) (Ryc. 4).

W przeprowadzonych doświadczeniach dokonano oceny odsetka limfocytów T-regulatorowych CD4+C-D25+FoxP3+ wśród limfocytów T w 3-dniowej hodowli limfocytów T CD3+ oraz w prowadzonej równolegle hodowli limfocytów CD3+ i autologicznych komórek dendrytycznych generowanych z monocytów chorych na PBL. Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w odsetkach limfocytów Treg w obu hodowlach.

Ostatnią część badań stanowiła ocena wewnątrzkomórkowej ekspresjiIDO na poziomie białka w wygenerowanych komórkach dendrytycznych. Nie wykazano obecności tego enzymu lub jedynie jego śladową ilość. Dokonano ponadto oceny zależności między odsetkiem limfocytów CD4+CD25+FoxP3+ a ekspresjąIDO w komórkach dendrytycznych w hodowli



Ryc. 4. Stężenie TGF- β w surowicy i w nadsącach znad hodowli niedojrzałych i dojrzałych komórek dendrytycznych generowanych od chorych na PBL

Fig. 4. The concentration of TGF- β in the serum and supernatants above the cultures of immature and mature dendritic cells generated from CLL patients

zawierającej limfocyty CD3+ i komórki dendrytyczne. Wykazano brak korelacji pomiędzy odsetkiem limfocytów T regulatorowych a odsetkiem komórek o fenotypie CD83+IDO+.

Omówienie

Tolerancja immunologiczna, która w warunkach fizjologicznych zapewnia bezpieczeństwo własnych komórek i tkanek organizmu przed „atakami” komórek układu odpornościowego, stanowi równocześnie jeden z ważnych mechanizmów ucieczki nowotworu spod nadzoru immunologicznego, umożliwiając niekontrolowany wzrost komórek nowotworowych. Istotną rolę w indukcji tolerancji odgrywają limfocyty T regulatorowe. Stwierdzono zwiększenie liczby limfocytów Treg, zarówno w mikrośrodowisku guza nowotworowego, jak też we krwi chorych w przypadku większości guzów litych (nowotwory przewodu pokarmowego, czerniak, nowotwory głowy i szyi, niedrobnokomórkowy rak płuca i rak jajnika) [11–14]. Wykazano także korelację między wysokim odsetkiem tych komórek i krótkim czasem przeżycia chorych [15]. Nasze wstępne badania [16] wykazały zwiększenie odsetka komórek Treg u chorych na PBL oraz korelację między ich wysokim odsetkiem i brakiem odpowiedzi na immunoterapię autologicznymi DC [4]. Najlepiej poznaną populacją limfocytów T regulatorowych są komórki o fenotypie CD4+CD25^{hi}FoxP3+, określane jako naturalnie występujące Treg. Komórki te cechuje stan anergii oraz zdolność supresji innych populacji limfocytów, limfocytów B i komórek dendrytycznych poprzez bezpośredni kontakt między komórkami [17]. Inne populacje limfocytów T regulatorowych CD4+ to komórki Tr1 i Th3, obie określane jako tzw. indukowane Treg, wywierające działanie hamujące za pośrednictwem immunosupresyjnych cytokin (IL-10 i TGF- β) [18]. Komórki dendrytyczne mogą indukować powstawanie nTreg, jak i supopulacji Tr1 i Th3 [19–22]. Wykazano, że stymulacja odpowiedzi immunologicznej zależy od wytwarzania IL-12 przez DC [23, 24], zaś indukcja tolerancji związana jest z wytwarzaniem przez nie IL-10 i TGF- β [25–28]. W badaniach własnych wykazano, że stężenie IL-10 i w nadsączach znad hodowli dojrzałych DC generowanych od chorych na PBL jest znamienne mniejsze, a stężenie TGF- β nie różni się istotnie od wyników uzyskanych w zdrowej grupie kontrolnej. Ponadto, stężenie TGF- β było istotnie mniejsze w nadsączu znad hodowli zarówno niedojrzałych, jak i dojrzałych komórek dendrytycznych w porównaniu z poziomem TGF- β w surowicy chorych. Stwierdzono natomiast istotnie statystycznie większe stężenie IL-10 w nadsączu znad hodowli niedojrzałych komórek dendrytycznych w porównaniu ze stężeniem tej cytokiny w surowicy chorych na

PBL, co jest zgodne z wcześniejszymi obserwacjami innych autorów dotyczącymi tolerogennych właściwości niedojrzałych DC [29], w tym przypadku dotyczącymi wytwarzania IL-10. W kolejnej części badań własnych oceniano wpływ DC na indukcję nTreg o fenotypie w hodowli autologicznych limfocytów T i wygenerowanych komórek dendrytycznych. Nie stwierdzono indukcji powstawania komórek T-regulatorowych przez DC, co wiąże się prawdopodobnie z brakiem zwiększonego wydzielania IL-10 i TGF, które mają wpływ na indukcję nTreg i Tr1 i Th3. Dane te wskazują, że zastosowanie cytokin (GM-CSF, IL-4) nie wpływa na indukcję tolerogennych DC. Wiadomo bowiem obecnie, że pod wpływem określonych warunków hodowli można wpłynąć na właściwości DC generowanych z monocytów krwi obwodowej, tak aby indukowały one rozwój tolerancji. Przykładem może być ciąg zjawisk zachodzących pod wpływem dodania IL-10 do hodowli niedojrzałych DC [29]. Zahamowanie dojrzewania DC pod wpływem IL-10 prowadzi do anergii limfocytów T. Anergiczne limfocyty T bezpośrednio hamują ekspresję cząsteczek MHC klasy II, CD80 i CD86 na powierzchni DC. Dodanie do hodowli TGF- β , witaminy D3 oraz kortykosteroidów także przyczynia się do rozwoju tolerogennych właściwości DC [30]. Ponadto, w zależności od metody generacji komórki dendrytyczne mogą indukować powstawanie limfocytów Treg. Zastosowanie w celu indukcji dojrzewania DC koktajlu złożonego z TNF- α , IL-1 β , IFN- α , IFN- γ , Poly-I:C przyczynia się do generacji komórek dendrytycznych o niższej ekspresji chemokiny CCL22 przyciągającej Treg w porównaniu z koktajlem TNF- α , PGE2 (prostaglandyna E2), IL-1 β , IL-6, w którym za indukcję tolerogennych DC prawdopodobnie odpowiada PGE2 [31].

Swoistym podtypem DC o właściwościach tolerogennych są tzw. IDO-DC, które cechują się ekspresją dioksygenazy 2,3-indoleaminy (IDO), enzymu katabolizującego tryptofan. Działanie IDO w warunkach *in vitro* polega na hamowaniu proliferacji i indukcji śmierci limfocytów T. Doniesienia ostatnich lat wskazują również na rolę IDO w powstawaniu limfocytów regulatorowych. Obecność IDO-DC w węzłach chłonnych drenujących guz nowotworowy może przyczyniać się do hamowania odpowiedzi przeciwnowotworowej [30]. IDO jest enzymem powszechnie występującym w komórkach organizmu, jego zwiększoną ekspresję opisano w wielu rodzajach nowotworów (m. in. rak trzustki, wątroby). W badaniach własnych oceniano wewnątrzkomórkową ekspresję IDO na poziomie białka w wygenerowanych komórkach dendrytycznych. Nie wykazano obecności tego enzymu lub jedynie jego śladową ilość oraz brak korelacji między odsetkiem limfocytów T regulatorowych a odsetkiem komórek o fenotypie CD83+IDO+. Indukcję nadekspresji IDO w MoDC (*monocyte-derived*

ved; DC) obserwowali Wobser i wsp. w u chorych na czerniaka [32] oraz Curti i wsp. u chorych na AML [33]. W obu przypadkach do stymulacji dojrzewania DCs stosowano wspomnianą wcześniej mieszaninę cytokin (IL-1 β , IL-6, TNF- α , PGE2), która, według Muthuswamy i wsp. [31], indukuje tolerogenicie DC. Potwierdzeniem tych obserwacji są badania Krause i wsp., którzy stymulowali niedojrzałe komórki dendrytyczne CD40L i PGE2 i stwierdzili, że DC stymulowane tylko sCD40L nie wykazywały ekspresjiIDO, natomiast jeśli stymulacja odbywała się w obecności PGE2, zwiększała się ekspresja zarówno IDO mRNA, jak i białka [34]. Wzrost ten zależny był od czasu trwania inkubacji DC z PGE2. Przedstawione dane dowodzą, jak istotne znaczenie mają warunki generacji, a wyniki uzyskane w badaniach własnych wskazują, że DC generowane za pomocą GM-CSF, IL-4 i TNF nie mają właściwości tolerogenicznych.

Badania kliniczne z wykorzystaniem DC prowadzone są w wielu ośrodkach na świecie, a w roku 2010 pierwsza szczepionka – sipuleucel-T (Provenge[®], Dendreon) w postaci autologicznych DC stymulowanych białkiem fuzyjnym złożonym z antygenem swoistego dla komórek raka prostaty – kwaśnej fosfatazy sterczowej (*prostate acid phosphatase*; PAP) sprzężonego z GM-CSF uzyskała rejestrację FDA (*Food and Drug Agency*; Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków) [35]. Coraz lepsze poznanie biologii komórek dendrytycznych, również tych generowanych *in vitro* oraz mechanizmów immunosupresji związanych z rozwojem nowotworu stwarzają szansę na opracowanie nowych skuteczniejszych metod immunoterapii DC i tym samym poprawę rokowania chorych na nowotwory.

Piśmiennictwo

- Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, i wsp. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1996; 2: 52–58.
- Timmerman JM, Czerwinski DK, Davis TA, i wsp. Idiotype-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients. *Blood*, 2002; 99: 1517–1526.
- Lesterhuis WJ, de Vries IJ, Adema GJ, Punt CJ. Dendritic cell-based vaccines in cancer immunotherapy: an update on clinical and immunological results. *Ann Oncol*, 2004; 15(Suppl 4): 145–151.
- Hus I, Schmitt M, Tabarkiewicz J, i wsp. Vaccination of B-CLL patients with autologous dendritic cells can change the frequency of leukemia antigen-specific CD8+ T cells as well as CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells toward an antileukemia response. *Leukemia*, 2008; 22: 1007–1017.
- Hus I, Roliński J, Tabarkiewicz J, i wsp. Allogeneic dendritic cells pulsed with tumor lysates or apoptotic bodies as immunotherapy for patients with early-stage B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 2005; 19: 1621–1627.
- Teicher BA. Transforming growth factor-beta and the immune response to malignant disease. *Clin Cancer Res*, 2007; 13: 6247–6251.
- Sato T, Terai M, Tamura Y, Alexeev V, Mastrangelo MJ, Selvan SR. Interleukin 10 in the tumor microenvironment: a target for anticancer immunotherapy. *Immunol Res*, 2011; 51: 170–182.
- Kalantari T, Kamali-Sarvestani E, Ciric B, i wsp. Generation of immunogenic and tolerogenic clinical-grade dendritic cells. *Immunol Res*, 2011; 51: 153–160.
- O'Neill DW, Bhardwaj N. Exploiting dendritic cells for active immunotherapy of cancer and chronic infections. *Mol Biotechnol*, 2007; 36: 131–141.
- Ra ch-Regué D, Naranjo-Gómez M, i wsp. Differential effects of monophosphoryl lipid A and cytokine cocktail as maturation stimuli of immunogenic and tolerogenic dendritic cells for immunotherapy. *Vaccine*, 2012; 30: 378–387.
- Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, i wsp. Regulatory CD4(+) CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res*, 2001; 61: 4766–4772.
- Sasada T, Kimura M, Yoshida Y, Kanai M, Takabayashi A. CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory T cells in disease progression. *Cancer*, 2003; 98: 1089–1099.
- Javia LR, Rosenberg SA. CD4+CD25+ suppressor lymphocytes in the circulation of patients immunized against melanoma antigens. *J Immunother*, 2003; 26: 85–93.
- Schaefer C, Kim GG, Albers A, Hoermann K, Myers EN, Whiteside TL. Characteristics of CD4+CD25+ regulatory T cells in the peripheral circulation of patients with head and neck cancer. *Br J Cancer*, 2005; 92: 913–20.
- Curiel TJ, Coukos G, Zou L, i wsp. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med*, 2004; 10: 942–9.
- Giannopoulos K, Schmitt M, Kowal M, i wsp. Characterization of regulatory T cells in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Oncol Rep*, 2008; 20: 677–82.
- Beyer M, Schultze JL. Regulatory T cells in cancer. *Blood*, 2006; 108: 804–11.
- Jonuleit H, Schmitt E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J Immunol*, 2003; 171(12): 6323–7.
- Unger WW, Laban S, Kleijwegt FS, van der Slik AR, Roep BO. Induction of Treg by monocyte-derived DC modulated by vitamin D3 or dexamethasone: differential role for PD-L1. *Eur J Immunol*, 2009; 39(11): 3147–59.
- Hamdi H, Godot V, Maillot MC, Prejean MV, Cohen N, Krzysiek R, i wsp. Induction of antigen-specific regulatory T lymphocytes by human dendritic cells expressing the glucocorticoid-induced leucine zipper. *Blood*, 2007; 110(1): 211–9.
- Tateosian NL, Reiteri RM, Amiano NO, Costa MJ, Villalonga X, i wsp. Neutrophil elastase treated dendritic cells pro-

- mote the generation of CD4(+)FOXP3(+) regulatory T cells in vitro. *Cell Immunol*, 2011; 269(2): 128–34.
22. Matsumura Y, Kobayashi T, Ichiyama K, Yoshida R, Hashimoto M, Takimoto T, i wsp. Selective expansion of foxp3-positive regulatory T cells and immunosuppression by suppressors of cytokine signaling 3-deficient dendritic cells. *J Immunol*, 2007; 179(4): 2170–9.
 23. Schendel DJ. Dendritic cell vaccine strategies for renal cell carcinoma. *Expert Opin Biol Ther*, 2007; 7(2): 221–32.
 24. Onishi H, Morisaki T, Baba E, Nakamura M, Inaba S, Kuroki H, Matsumoto K, Katano M. Long-term vaccine therapy with autologous whole tumor cell-pulsed dendritic cells for a patient with recurrent rectal carcinoma. *Anticancer Res*, 2011; 31(11): 3995–4005.
 25. Svajger U, Obermajer N, Jeras M. Dendritic cells treated with resveratrol during differentiation from monocytes gain substantial tolerogenic properties upon activation. *Immunology*, 2010; 129(4): 525–35 IL–10.
 26. Ilarregui JM, Croci DO, Bianco GA, Toscano MA, Salatino M, Vermeulen ME, Geffner JR, Rabinovich GA. Tolerogenic signals delivered by dendritic cells to T cells through a galectin-1-driven immunoregulatory circuit involving interleukin 27 and interleukin 10. *Nat Immunol*, 2009; 10(9): 981–91.
 27. Zhang X, Kedl RM, Xiang J. CD40 ligation converts TGF-beta-secreting tolerogenic CD4-8- dendritic cells into IL-12-secreting immunogenic ones. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009; 379(4): 954–8.
 28. Cools N, Van Tendeloo VF, Smits EL, Lenjou M, Nijs G, Van Bockstaele DR, i wsp. Immunosuppression induced by immature dendritic cells is mediated by TGF-beta/IL-10 double-positive CD4+ regulatory T cells. *J Cell Mol Med*, 2008; 12(2): 690–700.
 29. Wakkach A, Fournier N, Brun V, Breittmayer JP, Cottrez F, Groux H. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity*, 2003; 18(5): 605–17.
 30. Adams S, O'Neill DW, Bhardwaj N. Recent advances in dendritic cell biology. *J Clin Immunol*, 2005; 25(3): 177–88.
 31. Muthuswamy R, Urban J, Lee JJ, Reinhart TA, Bartlett D, Kalinski P. Ability of mature dendritic cells to interact with regulatory T cells is imprinted during maturation. *Cancer Res*, 2008; 68(14): 5972–8.
 32. Wobser et al. Dendritic cell based antitumor vaccination: impact of functional indoleamine 2,3-dioxygenase expression. *Cancer immunology, Immunotherapy Springer-Verlag* 2006 10.1007/s00262-006-0256-1.
 33. Curti A, Trabanelli S, Onorfi C, Aluigi M, Salvestrini V, Ocadlikova D, i wsp. Indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing leukemic dendritic cells impair a leukemia-specific immune response by inducing T regulatory cells. *Haematologica*, 2010; 95(12).
 34. Krause P, Singer E, Darley P, Klebensberger J, Groettrup M, Legler DF. Prostaglandin E2 is a key factor for monocyte-derived dendritic cell maturation: enhanced T cell stimulatory capacity despite IDO. *Journal of Leukocyte Biology*, 2007; 82: 1106–1114.
 35. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, i wsp. IMPACT Study Investigators. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med*, 2010; 363: 411–422.