



<https://doi.org/10.15407/cryo35.01.023>

УДК 611.018.46.085.1:57.086.13:612.017.1:616-097

А.М. Гольцев*, Ю.О. Гаєвська, Т.Г. Дубрава,

М.О. Бондарович, М.В. Останков

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України

*cryopato@gmail.com

РЕЖИМИ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ МОНОНУКЛЕАРІВ КІСТКОВОГО МОЗКУ ОБУМОВЛЮЮТЬ ФОРМУВАННЯ ІМУННИХ ДЕНДРИТНИХ КЛІТИН

Одним з інноваційних напрямків у терапії онкологічних захворювань є використання вакцин на основі імунних дендритних клітин (іДК). У роботі представлено результати отримання *in vitro* іДК із кріоконсервованих за різними режимами мононуклеарів (МНК) кісткового мозку з застосуванням кріолізату клітин аденокарциноми Ерліха. Для формування іДК у середовище культивування вносили гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор, інтерлейкін-4 та кріолізат клітин аденокарциноми Ерліха як індуктора созрівання дендритних клітин (ДК). Доведено, що незрілі ДК, отримані з нативних або кріоконсервованих МНК, по-різному відповідали на додавання індукторів формування іДК. Кріолізат виявився більш потужним індуктором іДК, ніж ліпополісахарид, що маніфестувалося підвищенням рівня експресії усіх досліджуваних маркерів (CD83, CD11c, CD80, CD86). При цьому кріолізат максимально стимулював експресію маркерів зрілості (CD11c, CD83) на іДК, які були сформовані з кріоконсервованих МНК за режимом 1 зі швидкістю 1 град/хв до -80°C з подальшим зануренням у рідкий азот. Одержані результати свідчать про можливість отримання *in vitro* іДК із кріоконсервованих за певних умов МНК з використанням кріолізату клітин аденокарциноми Ерліха для подальшого застосування в імунотерапії онкопатології.

Ключові слова: кріоконсервування, мононуклеари кісткового мозку, імунні дендритні клітини, кріолізат клітин, аденокарцинома Ерліха.

ГКГ II — головний комплекс гістосумісності класу II

ГМ-КСФ — гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор

ДК — дендритні клітини

ДМСО — диметилсульфоксид

ЕТС — ембріональна теляча сироватка

іДК — імунні дендритні клітини

ІЛ — інтерлейкін

КЛ — кріолізат

КМ — кістковий мозок

КріоДК — дендритні клітини, отримані з кріоконсервованих мононуклеарів

КріоМНК — кріоконсервовані мононуклеари

ЛПС — ліпополісахарид

МНК — мононуклеари

НатДК — дендритні клітини, отримані з нативних мононуклеарів

НатМНК — нативні мононуклеари

P1, P2 — режими кріоконсервування 1, 2

Hsp70 — білок теплового шоку з молекулярною масою 70 кДа

NF- κ B — ядерний фактор-каппа В

PI — пропідій йодид

TLR-4 — толл-подібний рецептор 4

Цитування: Гольцев А.М., Гаєвська Ю.О., Дубрава Т.Г., Бондарович М.О., Останков М.В. Режими кріоконсервування мононуклеарів кісткового мозку обумовлюють формування імунних дендритних клітин *Проблеми кріобіології і кріомедицини*. 2025; (1): 23–32. <https://doi.org/10.15407/cryo35.01.023>

© Видавець ВД «Академперіодика» НАН України, 2024. Стаття опублікована на умовах відкритого доступу за ліцензією CC BY-NC-ND license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

Лікування онкопатологій залишається актуальною проблемою медицини. На сьогодні визначається чітка тенденція до розширення спектра методів лікування онкохворих, заснованих на даних взаємодії пухлинних клітин з імунною системою пухлиноносіїв [27, 34, 41]. Результати досліджень з оцінки терапевтичної ефективності вакцин на основі імунних дендритних клітин (іДК) показали можливість індукції специфічної імунної відповіді на пухлинні антигени за різних типів раку [11, 17, 37]. Протипухлинна імунна відповідь дендритних клітин (ДК) реалізується через поглинання, процесування та презентування антигенів на молекулах головного комплексу гістосумісності класу II (ГКГ II), що забезпечує созрівання та активацію ДК. Внаслідок цього у ДК знижується здатність до фагоцитозу, збільшується експресія ГКГ II і коstimулюючих молекул, підвищується продукція прозапальних цитокінів, необхідних для активації Т-клітин [15, 18]. Зазвичай для ініціювання активації наївних Т-клітин завдяки експресії хемокінового рецептора 7 (CCR7) на мембрані іДК останні транспортують пухлинні антигени до лімфатичних вузлів. Суттєвими механізмами протипухлинної дії іДК є рекрутинг Т-клітин у мікрооточення пухлини хемотаксичними факторами, що продукуються ДК, і подальша їх взаємодія *in situ* з ефекторними Т-клітинами [27]. Унікальна здатність іДК активувати CD4⁺ Т-хелпери та CD8⁺ цитотоксичні Т-лімфоцити забезпечує ініціацію адаптивної імунної відповіді [15]. Цей факт важливий для створення протипухлинних вакцин. При цьому в якості джерела попередників іДК передбачається використання як мононуклеарів (МНК) кісткового мозку (КМ), так і моноцитів периферичної або кордової крові [11, 14, 42].

Загальноприйнятим способом отримання іДК *ex vivo* є двоетапна стимуляція МНК [35] (37). На першому етапі з МНК КМ або периферичної крові за допомогою культивування з гранулоцитарно-макрофагальним колоніестимулюючим фактором (ГМ-КСФ) та інтерлейкіном-4 (ІЛ-4) одержують незрілі ДК [19, 22]. На другому етапі «навантажують» незрілі ДК пухлинними антигенами, які визначають специфічність протипухлинної дії отриманих іДК [30].

Аутологічні пухлинні клітини вважаються ефективним джерелом одержання пухлинних антигенів для вакцинотерапії на основі іДК [13]. Пухлинні клітини містять повний набір індивідуальних пухлиноасоційованих антигенів пухлиноносія, які мають вирішальне значення для активації імунної відповіді та руйнування пухлини [12]. Широкий антигенний «репертуар» лізатів пухлинних клітин, отриманих різними шляхами, у тому числі у процесі багаторазового заморожування-відтавання, забезпечує збалансовану активацію усіх ланок імунної системи пухлиноносія, зокрема формування цитотоксичних ефекторних клітин, а також гуморальних факторів протипухлинного захисту [6]. Більше 50 років тому з'явилися перші повідомлення відносно впливу ультранизьких температур на пухлинні тканини, модифікації їхньої структури і особливої здатності активувати протипухлинну імунну відповідь [5]. Крім здатності підвищувати імуногенні властивості клітин, ультранизькі температури широко використовуються для довгострокового зберігання біоматеріалу. Відомо, що кріоконсервування — невід'ємний етап біотехнологічного процесу перед застосуванням іДК у клінічній практиці. Для успішного отримання іДК із кріоконсервованих клітин-попередників було запропоновано їх повільне заморожування зі швидким відігріванням [8, 18, 29, 33, 36]. Традиційно ембріональна теляча сироватка (ЕТС) у концентрації 20–90 % є обов'язковим складовим компонентом кріосередовища для заморожування МНК [18, 20]. Однак згідно з даними G. F. Silveira та співавт. [36], ДК, що отримані з кріоконсервованих МНК периферичної крові, зберігають незрілий фенотип з обмеженою можливістю дозрівання в присутності індукторів, зокрема ліпополісахариду (ЛПС). Це може бути обумовлене інгібіцією експресії на сформованих ДК рецепторів до ГМ-КСФ (CD116) та ІЛ-4 (CD124) поряд з низьким рівнем експресії толл-подібних рецепторів-4 (TLR-4), що акцептують ЛПС [28, 40]. З огляду на вищевикладене залишаються важливими питання розробки та апробації експериментально обґрунтованих режимів кріоконсервування МНК з подальшою оцінкою отриманих із них іДК.

Мета роботи — вивчення можливості отримання імунних дендритних клітин *in vitro*

з кріоконсервованих за різними режимами мононуклеарів кісткового мозку.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Експерименти виконані на 6-місячних самицях мишей лінії BALB/c, які утримувались в стандартних умовах віварію Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (ІПКіК НАН України, м. Харків). Проведення досліджень узгоджено з вимогами Комітету з біоетики ІПКіК НАН України відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (3447-IV від 21.02.2006 р.) та положення «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

Отримання клітин кісткового мозку. Аспірат КМ отримували зі стегових кісток мишей та ресуспендували у середовищі RPMI-1640 (Biowest, Франція) з додаванням 3 % ЕТС (Biowest) і 2 % цитрату натрію (далі в тексті — робоче середовище) та пропускали через нейлоновий фільтр з діаметром пор 100 мкм (Falcon, США), центрифугували (200g, 10 хв) і ресуспендували отриманий осад у робочому середовищі.

Виділення мононуклеарів з кісткового мозку. Мононуклеари виділяли центрифугуванням суспензії КМ у градієнті щільності (1,077 г/мл) препарату «Тразограф» (Юнік Фармасьютикал Лабораторіз, Індія) [2].

Кріоконсервування мононуклеарів. Для кріоконсервування МНК використовували розчин, до складу якого входило середовище RPMI-1640 із 20 % ЕТС і 20 % диметилсульфоксиду (ДМСО) (Артеріум, Україна). До суспензії МНК (1×10^7 кл/мл) по краплях додавали розчин для кріоконсервування у співвідношенні 1 : 1 з кінцевою концентрацією кріопротектора 10 %. Суспензію МНК вносили в пластикові ампули об'ємом 1,8 мл (Nunc, Німеччина). Експозицію клітин у розчині для кріоконсервування проводили протягом 10 хв за умов кімнатної температури (20–24) °С.

У представленому дослідженні було проведено кріоконсервування МНК за двома режимами. Режим 1 (P1) здійснювали за допомогою контейнера «Mr. Frosty™» (Thermo Scientific, США) зі швидкістю біля 1 град/хв до –80 °С та подальшим зануренням у рідкий азот

(–196 °С). Режим 2 (P2) проводили на програмному заморожувачі ЗП-10 (СКТБ з ДВ при ІПКіК НАН України зі швидкістю 1 град/хв до –40°С та подальшим зануренням у рідкий азот (–196 °С). Вибір вказаних режимів кріоконсервування був обґрунтований наступними фактами: P1 має більш широке застосування під час кріоконсервування МНК або моноцитів периферичної крові людини для отримання іДК з метою клінічного застосування [8] та високу ефективність під час кріоконсервування клітинних сфероїдів, яка доведена результатами фізико-математичного моделювання процесів масопереносу [4]; P2 дозволяє пройти точку евтектичної кристалізації 10 %-го розчину ДМСО (–66,7°С) з більш високою швидкістю охолодження (від –40 до –196°С), що сприяє зниженню кріодеструкції клітин під час заморожування-відігрівання [3]. Ефективність P2 при отриманні незрілих ДК була доведена результатами роботи Н. Kysielova та співавт. [25]. У нашому дослідженні була проведена порівняльна оцінка можливості отримання іДК із кріоконсервованих МНК за P1 та P2.

Зразки відігрівали на водяній бані при температурі 40 °С до зникнення твердої фази. Клітини одноразово відмивали від ДМСО шляхом повільного додавання подвійного об'єму робочого середовища і подальшого центрифугування (200 g, 10 хв). Кількість МНК підраховували в камері Горяєва.

Оцінка структурних та функціональних характеристик мононуклеарів. Життєздатність МНК визначали з використанням пропідій йодиду — PI (Becton Dickinson, США) на потоковому цитофлуориметрі «FACS Calibur» (Becton Dickinson) згідно з інструкцією фірми-виробника. Пропідій йодид є мембранонепроникним для непошкоджених клітин барвником. У випадку порушення цілісності клітинної мембрани він входить у клітину та зв'язується з ДНК. Пропідій йодид зазвичай використовують для виявлення нежиттєздатних клітин (PI+-клітин) на стадії некрозу або пізнього апоптозу.

Кількість життєздатних МНК визначали за формулою:

Життєздатність = 100 % – кількість PI+-клітин.

Фенотипову оцінку CD14⁺-клітин у складі МНК проводили на протоковому цитофлуориметрі «FACS Calibur» (Becton Dickinson) з використанням моноклональних антитіл CD14 FITC (Becton Dickinson) згідно з інструкцією фірми-виробника.

Отримання *in vitro* імунних дендритних клітин. Культивування МНК здійснювали у середовищі: RPMI-1640 із додаванням 10 % ЕТС і 1 %-го розчину антибіотиків (100 од/мл пеніциліну, 0,1 мг/мл стрептоміцину) в пластикових чашках Петрі з діаметром 3 см (посівна доза 1×10^7 кл/чашку) [31]. Клітини культивували при 37°C у атмосфері 5 % CO₂. Через 2 години середовище з клітинами, які не прикріпилися, видаляли та додавали 3 мл свіжого культурального середовища, що містило ГМ-КСФ (20 нг/мл) та ІЛ-4 (5 нг/мл) (Sigma-Aldrich, Велика Британія). Середовище вносили на 1- та 3-тю доби культивування. На 5-ту добу культивування з чашок відбирали половину культурального середовища і додавали 3 мл свіжого культурального середовища з ГМ-КСФ (20 нг/мл), ІЛ-4 (5 нг/мл) та кріолізатом (КЛ) пухлинних клітин (1,0 мг білка/мл). У якості контролю в чашки додавали 3 мл свіжого культурального середовища з 100 нг/мл ЛПС (O26:B6, Escherichia coli, Sigma-Aldrich).

Акцентуємо увагу на тому, що ми отримували ДК з нативних моноклеарів (НатМНК) або кріоконсервованих моноклеарів (КріоМНК), які у подальшому будемо називати НатДК або КріоДК. Клітини, що отримані *in vitro* з КріоМНК за Р1 (КріоР1МНК) або Р2 (КріоР2МНК) позначені як КріоР1ДК або КріоР2ДК відповідно.

Сформовано наступні дослідні групи:

група 1 — незрілі НатДК, отримані з НатМНК за умов додавання в середовище культивування ГМ-КСФ та ІЛ-4, $n = 5$;

група 2 — імунні НатДК, отримані з НатМНК за умов додавання в середовище культивування ГМ-КСФ, ІЛ-4 та КЛ, $n = 5$;

група 3 — імунні НатДК, отримані з НатМНК за умов додавання в середовище культивування ГМ-КСФ, ІЛ-4 та ЛПС, $n = 5$;

група 4 — незрілі КріоР1ДК, отримані з КріоР1МНК за умов додавання в середовище культивування ГМ-КСФ та ІЛ-4, $n = 5$;

група 5 — незрілі КріоР2ДК, отримані з КріоР2МНК за умов додавання в середовище культивування ГМ-КСФ та ІЛ-4, $n = 5$;

група 6 — імунні КріоР1ДК, отримані з КріоР1МНК за умов додавання в середовище культивування ГМ-КСФ, ІЛ-4 та КЛ, $n = 5$;

група 7 — імунні КріоР2ДК, отримані з КріоР2МНК за умов додавання в середовище культивування ГМ-КСФ, ІЛ-4 та КЛ, $n = 5$;

група 8 — імунні КріоР1ДК, отримані з КріоР1МНК за умов додавання в середовище культивування ГМ-КСФ, ІЛ-4 та ЛПС, $n = 5$;

група 9 — імунні КріоР2ДК, отримані з КріоР2МНК за умов додавання в середовище культивування ГМ-КСФ, ІЛ-4 та ЛПС, $n = 5$.

На 7-му добу культивування МНК було отримано ДК, які знімали скрепером та піддавали дворазовому центрифугуванню (200g, 10 хв) в 5 мл фосфатно-сольового буфера (Sigma-Aldrich, Німеччина). На всіх етапах культивування ріст клітин контролювали за допомогою інвертованого мікроскопа «Axiovert 40C» (Zeiss, Німеччина).

Оцінка структурних та функціональних характеристик імунних дендритних клітин. Кількість клітин підраховували в камері Горяєва, їх життєздатність оцінювали на протоковому цитофлуориметрі «FACS Calibur» (Becton Dickinson) з використанням РІ.

Фенотипові характеристики клітин, одержаних *in vitro* на 7-му добу культивування, визначали за допомогою протокового цитофлуориметра «FACS Calibur» (Becton Dickinson) з використанням моноклональних антитіл CD14 FITC (Becton Dickinson), CD83-PE (Becton Dickinson), CD11c-FITC (Becton Dickinson), CD80-FITC (Biolegend, США), CD86-FITC (Biolegend) та відповідних ізотипових контролів згідно з інструкцією фірми виробника. Для кожного зразка було проаналізовано 10 000 подій протокового цитофлуориметра за допомогою програмного забезпечення «CellQuest Pro» (BD Biosciences, США). Аналіз отриманих даних проводили за допомогою програми «WinMDI 2.8» (Joseph Trotter, США).

Отримання кріолізату пухлинних клітин. Кріолізат клітин асцитної аденокарциноми Ерліха був джерелом пухлинних антигенів для одержання іДК [1]. Пухлинні клітини в концентрації $15,0 \times 10^6$ кл/мл п'ятиразово послідовно заморожували (до -196°C) без кріопротектора та відтавали за умов кімнатної температури (20–24) °C протягом 20 хв за постійного шутелювання ампул до зникнення

твердої фази. Загальний білок у КЛ пухлинних клітин визначали колориметричним біуретовим методом за допомогою набору «Загальний білок» (Філісіт-Діагностика, Україна). Концентрація загального білка в отриманому КЛ складала 14,0 мг/мл. Пухлинний КЛ розфасували в кріопробірки (1 мл) та зберігали при -20°C до використання.

Статистичну обробку даних проводили з використанням електронних таблиць «Microsoft Excel 2010» і програми «Statistica 10.0» (StatSoft, США). Кількісні дані обробляли методом варіаційної статистики з обчисленням медіани (Me) та інтерквартильного розмаху [25; 75]. Порівняння незалежних вибірок із контрольною групою проводили методом Манна-Уїтні. Відмінності вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Наведені в табл. 1 дані свідчать про те, що кріоконсервування МНК за різними режимами значуще не впливало на показник їхньої життєздатності визначений з використанням P1 (P1 — 89,0 % та P2 — 87,0 % відповідно) порівняно з НатМНК (96,0 %). Режими P1 і P2 забезпечували також збереження майже однакової високої кількості МНК ($8,6 \times 10^6$ та $7,8 \times 10^6$ кл/мл відповідно) порівняно з НатМНК ($10,6 \times 10^6$ кл/мл).

Суттєво, що після кріоконсервування МНК концентрація в них CD14⁺-клітин збільшувалася в порівнянні з НатМНК. Так, при використанні режимів P1 та P2 цей маркер експресувало 38,0 та 36,8 % клітин відповідно.

Відомо, що CD14-молекула є мембранним глікопротеїновим ко-рецептором у клітинному рецепторному комплексі CD14/TLR4/

MD2, який розпізнає антигенні подразнювачі, у тому числі бактеріальний ЛПС [43]. Отримані дані свідчать про те, що серед НатМНК CD14-маркер експресувало 29,1 % клітин (табл. 1), а в КріоМНК цей показник мав тенденцію до росту, причому здебільшого за використання P1. Доведено, що кріоконсервування може впливати на процеси диференціювання МНК у ДК із подальшою зміною відповіді сформованих ДК на запальні стимули або патогени [25, 29, 36].

Особлива увага в зміні функціонального стану ДК у процесі їх диференціювання з незрілих в імунні акцентується на білках теплового шоку (HSP) родини Hsp70 [39], які регулюють адаптивні реакції імунної системи та контролюють проліферацію імунокомпетентних клітин [26]. Відомо, що Hsp70-білки здатні впливати на експресію ядерного фактора-каппа В (NF-κB) як головного тригера запального процесу. Підвищення концентрації внутрішньоклітинного Hsp70 блокує активацію NF-κB і обумовлює утворення толерогенних ДК і, як наслідок, продукцію протизапального цитокіну ІЛ-10. Такі ДК використовують в імуносупресивній терапії аутоімунних захворювань [10, 25]. Протилежний ефект виникає у тому випадку, якщо Hsp70 знаходиться поза клітиною і може стимулювати імунну відповідь через підвищення продукції NF-κB-залежних прозапальних цитокінів (ІЛ-6, ІЛ-1β та ФНП-α), що викликає активацію запалення [21]. Отже, механізм дії Hsp70 реалізується опосередковано шляхом модуляції фенотипу і функції як попередників кісткового мозку, так і отриманих із них ДК [39].

У табл. 2 показано, що генеровані з НатМНК незрілі НатДК (група 1) та імунні НатДК, отри-

Таблиця 1. Показники, що характеризують стан МНК кісткового мозку після кріоконсервування

Вид матеріалу	Показник		
	Життєздатність МНК, %	Кількість МНК, $\times 10^6$ кл/мл	Концентрація CD14 ⁺ -клітин серед МНК, %
НатМНК	96,0 [95,0; 98,0]	96,0 [95,0; 98,0]	96,0 [95,0; 98,0]
КріоP1МНК	89,0 [85,0; 96,0]	89,0 [85,0; 96,0]	89,0 [85,0; 96,0]
КріоP2МНК	87,0 [86,0; 97,0]	87,0 [86,0; 97,0]	87,0 [86,0; 97,0]

* Різниця значуща порівняно з аналогічними показниками НатМНК, $p < 0,05$

мані в присутності активаторів созрівання у вигляді кріолізату пухлинних клітин (група 2) або ЛПС (група 3), мали високу життєздатність (89–91 %). Суттєво, що максимальна кількість імунних НатДК (72,5 % від початкової кількості посаджених на чашку клітин) формувалася в групі 2 після додавання в середовище культивування кріолізату, що підтверджує більш потужну його імуногенність в порівнянні з ЛПС. Після культивування КріоР1МНК та КріоР2МНК (групи 4 та 5) без індукторів дозрівання показники як життєздатності, так і кількості ДК були нижчими за показники групи 1 (НатДК). Проте після культивування КріоР1МНК у присутності кріолізату (група 6) була отримана найбільша кількість імунних КріоР1ДК (66,7 % від початкової кількості посаджених на чашку клітин) з життєздатністю 90 %. Після внесення ЛПС у культуру КріоМНК (групи 8 та 9) життєздатність отриманих іДК не відрізнялась від такої після додавання кріолізату (групи 6 та 7), але їхня кількість була нижчою. Складається враження, що у нативних або кріоконсерво-

ваних МНК по-різному реалізується здатність до созрівання іДК, тобто вихідний стан МНК має суттєве значення. Цей постулат важливий для підтвердження наявності певних характерних молекул на поверхні іДК, які визначають ступінь їхньої зрілості за фенотиповими ознаками у процесі формування в культурі з МНК [38].

Добре вивченим поверхневим маркером іДК є CD83-глікопротеїн, який належить до суперродини імуноглобулінів класу IgG. Він складається з позаклітинного Ig-подібного, трансмембранного та внутрішньоклітинного доменів із 39 амінокислот. W. Cao та співавт. [9] повідомлено, що CD83-структура є заздалегідь сформованим білком всередині моноцитів, макрофагів та незрілих ДК, а його експресія на поверхні мембрани індукується в процесі активації ДК. Суттєво, що моноцити та макрофаги лише тимчасово експресують цей маркер, тоді як зрілі іДК стабільно та щільно експресують CD83-структуру [9]. Імунним ДК притаманна також експресія поверхневого мембранного маркера CD11c [24]. Цей протеїн влас-

Таблиця 2. Показники ДК, отриманих *in vitro* на 7-му добу культивування з нативних або кріоконсервованих МНК

Номер групи	Показник		
	Життєздатність ДК, %	Кількість ДК	
		% від посаджених на чашку МНК	абсолютна, × 106
1	91,0 [86; 95]	52,5 [49,3; 53,4]	5,2 [4,9; 5,3]
2	90,0 [84; 95]	72,5 [70,1; 74,4]*	7,3 [7,0; 7,4] *
3	89,0 [85; 94]	55,7 [53,2; 56,8]	5,6 [5,3; 5,7]
4#	84,0 [82; 87]	45,6 [45,1; 48,4]*	4,5 [4,5; 4,8]*
5&	81,0 [76; 86]	41,6 [41,0; 43,8]*	4,2 [4,1; 4,4]*
6#	90,0 [90; 91]	66,7 [64,7; 68,3]*	6,7 [6,5; 6,8]*
7&	87,0 [85; 88]	51,3 [45,5; 55,9]	5,1 [4,6; 5,6]
8#	82,0 [78; 86]	50,0 [48,4; 51,1]	5,0 [4,8; 5,1]
9&	81,0 [77; 86]	46,0 [44,6; 48,0]*	4,6 [4,5; 4,8]*

— ДК, отримані з КріоР1МНК, & — ДК, отримані з КріоР2МНК; * — різниця статистично значуща в порівнянні з аналогічними показниками групи 1 (ДК, отримані з НатМНК), $p < 0,05$

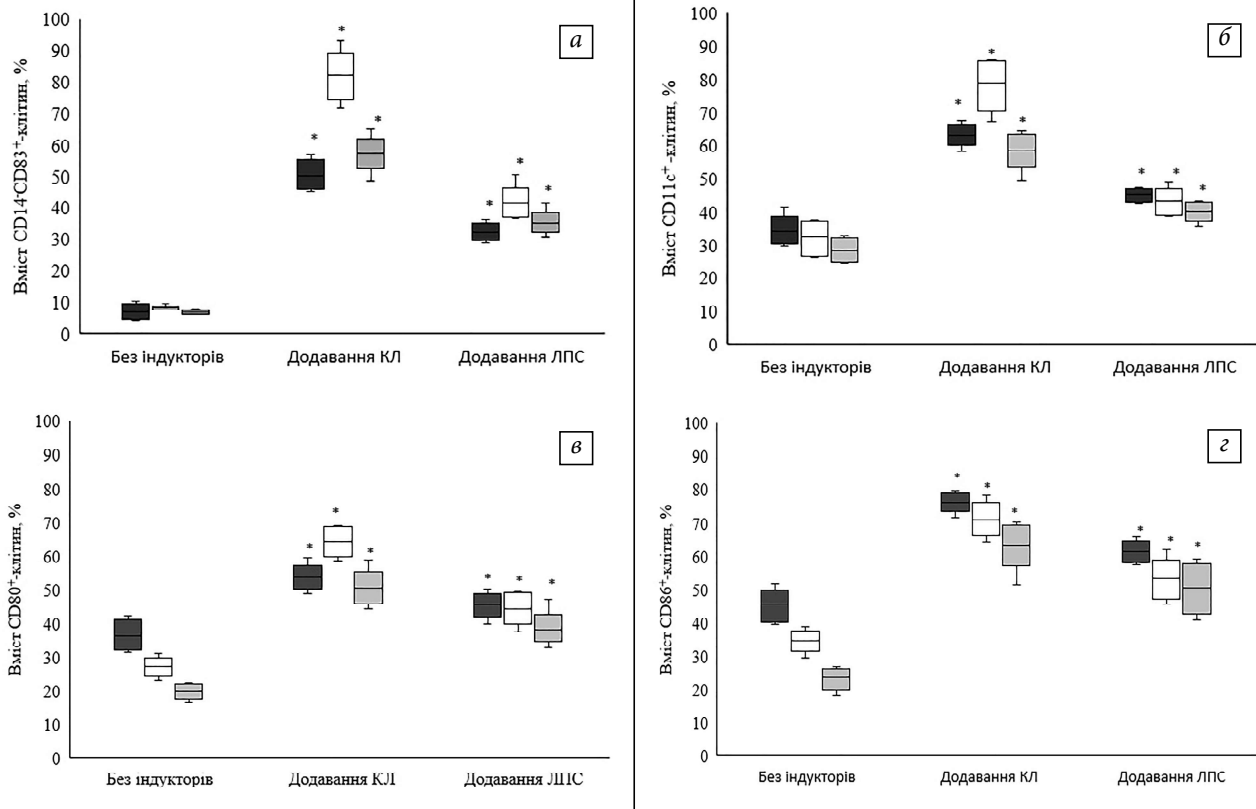


Рис. 1. Фенотипові характеристики клітин, одержаних *in vitro* на 7-му добу культивування: ■ — НатДК, сформовані з НатМНК; □ — КріоP1ДК, сформовані з КріоP1МНК; ▒ — КріоP2ДК, сформовані з КріоP2МНК; за маркерами CD83 (а), CD11с (б), CD80 (в), CD86 (г), $n = 5$. * — різниця статистично значуща в порівнянні з аналогічними показниками НатДК або КріоДК без індукторів созрівання, $p < 0,05$

тивий міелоїдним ДК і формує разом з CD18 (ланцюг інтегрину β -2) комплекс, який є рецептором до компонента комплексу іC3b, а також бере участь у клітинній адгезії. Проте CD11с може експресуватися на NK-клітинах і популяціях активованих Т- і В-клітин [32]. Обов'язковою мембранною молекулою зрілих ДК є також коstimуляторна молекула B7 (CD80/CD86), яка відноситься до суперродини імуноглобулінів [23]. Важливо, що кожна з наведених мембранних структур іДК відіграє певну роль у реалізації багатопрофільного і багатоступеневого структурно-функціонального потенціалу іДК [41]. Не викликає сумніву вірогідність зміни кількісно-якісних характеристик цих показників під час отримання іДК із МНК, які піддавалися дії ультранизких температур та підлягали подальшому впливу різних форм подразнювачів, що додаються у якості стимулів созрівання і формування виключно іДК [18, 28, 29, 36].

У представленому дослідженні приналежність ДК до імунних клітин була ідентифікова-

на за маркерами CD14/CD83, CD11с, CD80, CD86. Як видно з рисунка, серед незрілих НатДК, сформованих із НатМНК без додавання кріолізату або ЛПС, тільки невеликий їх відсоток (6,9 [4,7; 8,6] %) експресували маркери CD14-CD83⁺ (рисунок, а). Значно більший відсоток склали CD11с⁺-ДК (34,1 [31,3; 35,8] %) (рисунок, б), а також клітини, що експресували коstimуляторні молекули CD80 і CD86 (36,1 [32,5; 39,7] % та 45,6 [40,9; 47,8] % відповідно) (рисунок в, г).

Звертає на себе увагу факт залежності формування кількості CD80⁺- або CD86⁺-ДК від умов кріоконсервування МНК, з яких їх отримували (рисунок С, D). Кріоконсервування в цілому інгібувало здатність МНК до формування з них КріоДК з фенотипами CD80⁺ та CD86⁺, причому при використанні P2 більшою мірою. Це може бути пов'язано зі збільшенням вмісту внутрішньоклітинного Hsp70 у ДК, отриманих із кріоконсервованих за P2 МНК. Відомо, що Hsp70 у ДК пригнічує експресію CD86, ГКГ II та інгібує продукцію ФНП-а, що призводить до вироблення ними протизапального цитокіну

ІЛ-10 а, отже, до імуносупресії [7, 25]. Кріоконсервування може викликати шедінг певних рецепторів на мембранах клітин, який порушує міжклітинні комунікаційні зв'язки імунокомпетентних клітин і, як наслідок, знижує їхню функцію [16]. Дослідження мембранних рецепторів на незрілих КріоДК, сформованих із КріоМНК без додавання індукторів созрівання, показали, що умови кріоконсервування більш інгібують експресію коstimуляторних молекул (CD80, CD86), ніж маркерів зрілості (CD11с, CD83) на ДК.

Суттєво, що ДК, отримані з нативних або кріоконсервованих попередників, по-різному відповідали на індуктори формування іДК. При цьому кріолізат максимально стимулював експресію маркерів зрілості (CD11с, CD83) на КріоР1ДК. Інакше кажучи, кріоконсервування МНК за Р1 може виступати в ролі фактора-бустера формування зрілих іДК у відповідь на кріолізат. Крім того, кріолізат виявився більш потужним індуктором іДК у порівнянні з ЛПС, що підтверджується їх фенотиповими ознаками.

Отже, одержані результати свідчать про можливість отримання імунних КріоДК з використанням кріолізату клітин аденокарциноми Ер-

ліха. Їхнє формування залежить від умов кріоконсервування та культивування *in vitro* МНК, з яких вони отримані. Даний факт необхідно враховувати при подальшому застосуванні в імунокорекції онкопатології.

ВИСНОВКИ

Таким чином, на основі результатів проведених досліджень було встановлено:

1. Із кріоконсервованих за різними режимами МНК кісткового мозку після додавання в культуру культивування крім ГМ-КСФ та ІЛ-4, кріолізату клітин аденокарциноми Ерліха або ліпополісахариду отримано іДК.

2. Застосування кріолізату на відміну від ліпополісахариду стимулювало появу іДК з характерними маркерами зрілості (CD83, CD11с) та коstimуляторними молекулами (CD80, CD86). При цьому кріолізат максимально стимулював експресію маркерів зрілості на імунних КріоР1ДК, які були сформовані з кріоконсервованих МНК за режимом 1 зі швидкістю 1 град/хв до $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ з подальшим зануренням у рідкий азот.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гольцев АМ, Гаєвська ЮО, Дубрава ТГ, та ін. Кріолізат пухлинних клітин: від технології отримання до створення протиракових вакцин. Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2024; 34(3): 226–35.
2. Гольцев АМ, Дубрава ТГ, Ямпольська КЄ, та ін. Оптимізація методу одержання незрілих дендритних клітин для терапевтичного застосування. Фізіологічний журнал. 2018; 64(6): 33–40.
3. Гурина ТМ, Высеканцев ИП, Полякова АЛ. Влияние скорости охлаждения в области эвтектической температуры водного раствора криопротектора на жизнеспособность клеток *Saccharomyces cerevisiae* и *Escherichia coli* после оттаивания. Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2013; 23(1): 15–25.
4. Моїсєєв АІ, Коваленко ІФ, Божок ГА, Гордієнко ОІ. Теоретичні підходи до визначення оптимальних режимів кріоконсервування клітинних сфероїдів різних термінів культивування. Біофізичний вісник. 2021; (46): 7–22.
5. Ablin RJ. Cryoimmunotherapy. Br. Med. J. 1972; (5824): 476.
6. Alspach E, Lussier DM, Miceli AP, et al. MHC-II neoantigens shape tumour immunity and response to immunotherapy. Nature. 2019; 574(7780): 696–701.
7. Borges TJ, Wieten L, van Herwijnen MJ, et al. The anti-inflammatory mechanisms of Hsp70. Front Immunol [Internet]. 2012 May 4 [cited 2024 May 25]; 3: 95. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2012.00095/full> doi: 10.3389/fimmu.2012.0009514
8. Buhl T, Legler TJ, Rosenberger A, et al. Controlled-rate freezer cryopreservation of highly concentrated peripheral blood mononuclear cells results in higher cell yields and superior autologous T-cell stimulation for dendritic cell-based immunotherapy. Cancer Immunol Immunother. 2012; 61(11): 2021–31.
9. Cao W, Lee SH, Lu J. CD83 is preformed inside monocytes, macrophages and dendritic cells, but it is only stably expressed on activated dendritic cells. Biochem J. 2005; 385(Pt 1): 85–93.
10. Cauwels A, Tavernier J. Tolerizing strategies for the treatment of autoimmune diseases: from *ex vivo* to *in vivo* strategies. Front Immunol [Internet]. 2020 May 14 [cited 2024 May 20]; 11: 674. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2020.00674/full>
11. Constantino J, Gomes C, Falcao A, et al. Antitumor dendritic cell-based vaccines: Lessons from 20 years of clinical trials and future perspectives. Transl Res. 2016; 168:74–95.

12. Diao L, Liu M. Rethinking antigen source: cancer vaccines based on whole tumor cell/tissue lysate or whole tumor cell. *Adv Sci (Weinh)* [Internet]. 2023 Aug 04 [cited 2024 May 20]; 10(22): e2300121. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10401146/>
13. Dillman RO, Cornforth AN, McClay EF, Depriest C. Patient-specific dendritic cell vaccines with autologous tumor antigens in 72 patients with metastatic melanoma. *Melanoma Manag* [Internet]. 2019 May 31 [cited 2024 May 20]; 6(2): MMT20. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.2217/mmt-2018-0010>
14. Fevzer T, Pozenel P, Zajc K, *et al.* Combined TLR-3/TLR-8 signaling in the presence of α -type-1 cytokines represents a novel and potent dendritic cell type-1, anti-cancer maturation protocol. *Cells* [Internet]. 2022 February 28 [cited 2024 May 20]; 11(5): 835. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/11/5/835>
15. Gardner A, de Mingo Pulido Á, Ruffell B. Dendritic cells and their role in immunotherapy. *Front Immunol* [Internet]. 2020 May 21 [cited 2024 May 20]; 11: 924. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2020.00924/full>
16. Goltsev AN, Babenko NN, Dubrava TG, *et al.* Modification of the state of bone marrow hematopoietic cells after cryopreservation. *Int J Refrig*. 2006; 29(3): 358–67.
17. Gray HJ, Benigno B, Berek J, *et al.* Progression-free and overall survival in ovarian cancer patients treated with CVac, a mucin 1 dendritic cell therapy in a randomized phase 2 trial. *J Immunother Cancer*. [Internet] 2016 Jun 21 [cited 2024 May 20]; 4(1): 34. Available from: <https://jitc.bmj.com/content/4/1/34.long>
18. Hayden H, Friedl J, Dettke M, *et al.* Cryopreservation of monocytes is superior to cryopreservation of immature or semi-mature dendritic cells for dendritic cell-based immunotherapy. *J Immunother*. 2009; 32: 638–54.
19. Hettihewa LM. Prolonged expression of MHC class I - peptide expression in bone marrow derived retrovirus transfected matured dendritic cells by continuous centrifugation in the presence of IL-4. *Indian J Med Res*. 2011; 134(5): 672–8.
20. Hori S, Heike Y, Takei M, *et al.* Freeze-thawing procedures have no influence on the phenotypic and functional development of dendritic cells generated from peripheral blood CD14⁺ monocytes. *J Immunother*. 2004; 27(1): 27–35.
21. Hulina A, Rajković GM, Despot JD, *et al.* Extracellular Hsp70 induces inflammation and modulates LPS/LTA-stimulated inflammatory response in THP-1 cells. *Cell Stress Chaperones*. 2018; 23(3): 373–84.
22. Justin A, Babita A. IL-4 is more effective than IL-13 for in vitro differentiation of dendritic cells from peripheral blood mononuclear cells. *Int Immunol*. 2005; 17(10): 1337–46.
23. Ke N, Su A, Huang W, *et al.* Regulating the expression of CD80/CD86 on dendritic cells to induce immune tolerance after xeno-islet transplantation. *Immunobiology*. 2016; 221: (7): 803–12.
24. Kim MK, Kim J. Properties of immature and mature dendritic cells: phenotype, morphology, phagocytosis, and migration. *RSC Adv*. 2019; 9: 11230–38.
25. Kysielova H, Yampolska K, Dubrava T, *et al.* Improvement of bone marrow mononuclear cells cryopreservation methods to increase the efficiency of dendritic cell production. *Cryobiology*. 2022; 106: 122–30.
26. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther* [Internet]. 2017 July 14 [cited 2024 May 20]; 2: 17023. Available from: <https://www.nature.com/articles/sigtrans201723#citeas>
27. Marciscano AE, Anandasabapathy N. The role of dendritic cells in cancer and anti-tumor immunity. *Semin Immunol* [Internet]. 2021 May 20 [cited 2024 May 20]; 52: 101481. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8545750/>
28. Martikainen MV, Roponen M. Cryopreservation affected the levels of immune responses of PBMCs and antigen-presenting cells. *Toxicol In Vitro* [Internet]. 2020 Jun 19 [cited 2024 May 20]; 67: 104918. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0887233320304689?via%3Dihub>
29. Meijerink M, Ulluwishewa D, Anderson RC, Wells JM. Cryopreservation of monocytes or differentiated immature DCs leads to an altered cytokine response to TLR agonists and microbial stimulation. *J Immunol Methods*. 2011; 373: 136–42.
30. Nelson NLJ, Zajd CM, Lennartz MR, Gosselin EJ. Fc γ receptors and toll-like receptor 9 synergize to drive immune complex-induced dendritic cell maturation. *Cell Immunol* [Internet]. 2019 Aug 03 [cited 2024 May 20]; 345: 103962. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0008874919300954?via%3Dihub>
31. Obermaier B, Dauer M, Herten J, *et al.* Development of a new protocol for 2-day generation of mature dendritic cells from human monocytes. *Biol Proced Online* [Internet]. 2003 Oct 24 [cited 2024 May 20]; 5: 197–203. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC248478/>
32. Qualai J, Li LX, Cantero J, *et al.* Expression of CD11c is associated with unconventional activated T cell subsets with high migratory potential. *PLoS One* [Internet]. 2016 Apr 27 [cited 2024 May 20]; 11(4): e0154253. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0154253>

33. Radhakrishnan AK, Sim GC, Cheong SK. Comparing the ability of freshly generated and cryopreserved dendritic cell vaccines to inhibit growth of breast cancer in a mouse model. *BioResearch Open Access*. 2012; 5(1): 239–46.
34. Salik B, Smyth MJ, Nakamura K. Targeting immune checkpoints in hematological malignancies. *J Hematol Oncol*. 2020; 13(1): 111–29.
35. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med*. 1994; 179(4): 1109–18.
36. Silveira GF, Wovk PF, Machado AMB, *et al*. Immature dendritic cells generated from cryopreserved human monocytes show impaired ability to respond to LPS and to induce allogeneic lymphocyte proliferation. *PLoS One* [Internet]. 2013 Jul 31 [cited 2024 May 20]; 8(7): e71291. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0071291>
37. Sutherland SIM, Ju X, Horvath LG, Clark GJ. Moving on from Sipuleucel-T: new dendritic cell vaccine strategies for prostate cancer. *Front Immunol* [Internet]. 2021 March 29 [cited 2024 May 20]; 12: 641307. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2021.641307/full>
38. Toloudi M, Papatirou I. DC maturation: a brief comparison between three different processes. *J Cancer Therapy*. 2015; 6: 871–80.
39. Tukaj S. Heat Shock Protein 70 as a double agent acting inside and outside the cell: insights into autoimmunity. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 July 26 [cited 2024 May 20]; 21(15): 5298. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/15/5298>
40. Usero L, Miralles L, Esteban I, *et al*. Feasibility of using monocyte-derived dendritic cells obtained from cryopreserved cells for DC-based vaccines. *J Immunol Methods*. 2021; 498: 113–33.
41. Wculek SK, Cueto FJ, Mujal AM, *et al*. Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2020; 20(1): 7–24.
42. Yao CL, Tseng TY. The synergistic and enhancive effects of IL-6 and M-CSF to expand and differentiate functional dendritic cells from human monocytes under serum-free condition. *J Biol Eng* [Internet]. 2023 Jan 26 [cited 2024 May 20]; 17(1): 6.
43. Zanoni I, Ostuni R, Marek LR, *et al*. CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like receptor 4. *Cell*. 2011; 147(4): 868–80.

Надійшла 25.09.2024

Прийнята до друку 20.02.2025

A.M. Goltsev, Yu.O. Gaevska, T.G. Dubrava, M.O. Bondarovich, M.V. Ostantkov

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

*cryopato@gmail.com

CRYOPRESERVATION REGIMENS OF BONE MARROW MONONUCLEAR CELLS DETERMINE THE FORMATION OF IMMUNE DENDRITIC CELLS

One of the innovative directions in the therapy of oncology diseases is the use of vaccines based on immune dendritic cells (iDCs). The paper presents the results of obtaining *in vitro* iDCs from bone marrow mononuclear cells (MNCs) cryopreserved under different regimes using cryolysate of Ehrlich adenocarcinoma cells. For the formation of iDCs, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-4 and cryolysate of Ehrlich adenocarcinoma cells were added to the culture medium as an inducer of dendritic cells (DCs) maturation. It was proven that immature DCs obtained from native or cryopreserved MNCs responded differently to the addition of inducers of iDCs formation. The cryolysate turned out to be a more potent inducer of iDCs than lipopolysaccharide, which was manifested by an increase in the expression level of all studied markers (CD83, CD11c, CD80, CD86). At the same time, the cryolysate maximally stimulated the expression of maturity markers (CD11c, CD83) on iDCs, which were formed from cryopreserved MNCs using regimens 1 at a rate of 1 degree/min to -80°C with subsequent immersion in liquid nitrogen. Our findings demonstrate the possibility of obtaining *in vitro* iDCs from MNCs cryopreserved under certain conditions using cryolysate of Ehrlich adenocarcinoma cells for further use in immunotherapy of oncology pathology.

Key words: cryopreservation, bone marrow mononuclear cells, immune dendritic cells, cells cryolysate, Ehrlich carcinoma.