

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Г.З. Чкадуа, А.А. Борунова, И.Б. Шоуа, И.С. Долгополов, Р.И. Пименов, И.Н. Михайлова,
Т.Н. Заботина, М.А. Барышникова

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия,
115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Георгий Зурабович Чкадуа gechkadua@yandex.ru

Введение. Применение клеточных технологий в медицине предполагает возможность длительного хранения клеточного продукта без утраты его жизнеспособности и основных свойств. Методики криоконсервации клеток, применяемые в клинике, довольно разнообразны и могут сильно отличаться друг от друга. Тем не менее в самом методе можно выделить 2 части: 1-я – замораживающая среда, в которой находятся клетки, 2-я – способ криоконсервации. В данной работе мы исследуем метод, который используют в Национальном медицинском исследовательском центре онкологии им. Н.Н. Блохина для криоконсервации костного мозга у онкологических больных (взрослых и детей) для последующей трансплантации. Замораживающая среда состоит из полиглюкина (95 %) и диметилсульфоксида (5 %), а криоконсервация происходит в парах жидкого азота (-160°C).

Цель исследования – показать, что предлагаемый способ криоконсервации дендритных клеток высокоэффективен, прост, воспроизводим и наиболее удобен для клинического применения.

Материалы и методы. Зрелые дендритные клетки, которые культивировали из моноцитов периферической крови, подвергали криоконсервации, после чего исследовали, как меняются жизнеспособность, экспрессия основных поверхностных антигенов и стимулирующая активность в отношении аллогенных Т-лимфоцитов.

Результаты. Криоконсервация приводила к гибели незначительной части клеток, а повторная заморозка увеличивала долю мертвых клеток. Между тем разница в экспрессии основных поверхностных антигенов у свежих, криоконсервированных и повторно криоконсервированных дендритных клеток была статистически недостоверна. Уровень стимулирующей активности свежих и криоконсервированных дендритных клеток был одинаковым, тогда как повторная криоконсервация приводила к достоверному снижению пролиферации аллогенных Т-лимфоцитов.

Заключение. Представленный метод криоконсервации позволяет эффективно сохранять жизнеспособность и основные функции дендритных клеток. Для введения вакцины больному после разморозки дендритных клеток достаточно развести их изотоническим раствором, что наиболее удобно для клинического применения.

Ключевые слова: криоконсервация, дендритные клетки, аллогенная стимуляция лимфоцитов

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-4-65-75

CRYOPRESERVATION OF HUMAN DENDRITIC CELLS FOR CLINICAL USE

G. Z. Chkadua, A. A. Borunova, I. B. Shoua, I. S. Dolgoplov, R. I. Pimenov,
I. N. Mikhailova, T. N. Zabolina, M. A. Baryshnikova

N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation;
24 Kashirskoye Shosse, Moscow 115478, Russia

Introduction. The increasing clinical use of cellular technologies suggests the possibility of long-term storage of the cellular product while maintaining its viability and basic properties. The procedures of cell's cryopreservation used in laboratory as well in clinical practice differ a lot. Each method includes two tasks to solve: what is the optimal freezing medium to use and what cryopreservation procedure to prefer. In this paper, we present the method utilized in our center for bone marrow cell cryopreservation. The freezing was carried out in nitrogen vapor after adding the medium containing 95 % dextran [average mw 50000–70000] and 5 % dimethylsulfoxid.

Purpose. To show that the proposed method of cryopreservation of dendritic cells is highly effective, simple, reproducible and most convenient for clinical use.

Materials and methods. Viability, expression of surface antigens and stimulating activity towards allogeneic T lymphocytes of cryopreserved mature dendritic cells cultured from peripheral blood monocytes were evaluated.

Results. The first cryopreservation resulted in the death of a small amount of cells. The second freezing procedure increased the proportion of dead cells. Meanwhile, the difference in the expression of the surface antigens in fresh, cryopreserved and re-cryopreserved dendritic cells was not statistically significant. The level of stimulating activity of fresh and cryopreserved dendritic cells did not significantly differ. Conversely the proliferation of allogeneic T lymphocytes was decreased after stimulation with re-cryopreserved dendritic cells.

Conclusion. *The presented method of cryopreservation allows to preserve the viability and basic functions of dendritic cells. After thawing dendritic vaccine could be administered to patients after being diluted in an isotonic saline without washing, which makes this method the most convenient for clinical use.*

Key words: *cryopreservation, dendritic cells, allogenic lymphocyte stimulation*

Введение

В настоящее время применение клеточных технологий в медицине имеет широкое распространение, и одной из первых технических задач, которую приходится решать, является консервация клеток с сохранением их жизнеспособности и функций. Для эукариотических клеток единственным способом консервации является криоконсервация. Данный метод уже давно используется как в экспериментальных работах, так и в клинической практике, и, пожалуй, общим во всех протоколах является только наличие криофилактика диметилсульфоксида (ДМСО) в составе замораживающей среды. В остальном же методики отличаются довольно сильно, а именно: составом среды, содержанием ДМСО, программой криоконсервации, а также манипуляциями, следующими после разморозки клеток. Для того чтобы метод криоконсервации был эффективным, ему необходимо отвечать ряду требований: 1-е и главное — после разморозки клетки должны сохранять жизнеспособность и свои функции; 2-е — метод должен быть относительно прост, воспроизводим и по возможности дешев. Клиническое его применение накладывает дополнительные условия относительно замораживающей среды, которая не должна содержать ксеногенных белков. В случае, когда используются дифференцированные клетки, например дендритные клетки (ДК), не обладающие способностью к пролиферации, очень важно, чтобы после разморозки максимально возможное количество клеток сохраняло жизнеспособность. Также следует уменьшить количество манипуляций, следующих после разморозки, и свести к минимуму временной промежуток между разморозкой клеток и введением их больному.

Замораживающая среда, по сути, состоит из 2 компонентов: криофилактика ДМСО (его содержание чаще всего составляет 10–20 %) и среды, в которой его растворяют. Отличия в составе среды очень большие: это и культуральная жидкость, содержащая сыворотку человека, раствор альбумина и глюкозы, и чистая сыворотка человека и т. д. [1–7]. Программы криоконсервации также могут сильно отличаться друг от друга, например, ампулы с клетками кладут в пластиковый контейнер, во внутренней камере которого находится изопропиловый спирт, после этого контейнер помещают в низкотемпературный морозильник, и через несколько часов замороженные клетки переносят в жидкий азот [1–3, 6, 7]. Альтернативным

способом является криоконсервация с помощью программного замораживателя, который способен понижать температуру со скоростью 1–2 градуса в минуту [5]. Манипуляции, следующие после разморозки клеток, в основном сводятся к отмывке от замораживающей среды и переводу клеток в изотонический раствор.

Дендритные клетки относят к профессиональным антигенпрезентирующим клеткам, при помощи которых можно получить направленный иммунный ответ против антигенов, которыми они были «нагружены» [8]. Зрелые ДК, которыми вакцинируют онкологических больных, обладают рядом характеристик, в частности экспрессией на поверхности таких антигенов, как CD54, CD80, CD83, CD86, CCR7, HLA-ABC, HLA-DR. Также зрелые ДК обладают сильной активирующей способностью в отношении аллогенных Т-лимфоцитов, которые после совместного культивирования начинают интенсивно пролиферировать. Таким образом, для оценки предлагаемого способа криоконсервации необходимо сравнить следующие характеристики свежих и замороженных ДК: 1) жизнеспособность клеток, 2) иммунофенотип ДК, 3) пролиферативную активность аллогенных Т-лимфоцитов.

За основу был взят метод криоконсервации костного мозга, разработанный в 1986 г. ведущим научным сотрудником отделения переливания крови с банком костного мозга ВОНЦ АМН СССР Д. М. Мхеидзе. Суть его заключается в том, что клетки ресуспендируют в замораживающей среде, состоящей из полиглюкина и ДМСО, криопробирки с клетками кладут в коробку из многослойной фанеры, после чего ее помещают в пары жидкого азота. Спустя 1 ч замороженные клетки можно переносить в жидкий азот на хранение. Перед использованием ДК размораживают при комнатной температуре, разводят изотоническим раствором или фосфатно-солевым буфером (PBS) и внутривенно вводят больному.

Цель исследования — показать, что предлагаемый способ криоконсервации ДК высокоэффективен, прост, воспроизводим, физиологичен и наиболее удобен для клинического применения.

Материалы и методы

Культивирование дендритных клеток

Дендритные клетки получали путем культивирования моноцитов периферической крови человека (здоровых доноров и онкологических больных,

получающих вакцинотерапию) по отработанной методике с небольшими изменениями [9]. Ранее нами было показано, что качество получаемых ДК не зависит от того, кто являлся донором крови – здоровый человек или онкологический больной. Из гепаринизированной крови при помощи среды для выделения лимфоцитов (MP Biomedicals, США) выделяли мононуклеары периферической крови. После этого клетки ресуспендировали в полной среде (ПС) и доводили плотность клеток до 5 млн/мл. Состав ПС: RPMI 1640 (Gibco, США), сыворотка крови человека IV группы (2 %), L-глутамин (2 мМ), HEPES буфер (10 мМ), гентамицин (40 нг/мл), β -меркаптоэтанол (50 мкМ). Для получения ДК в чашку Петри $d = 100$ мм (Falcon, США) вносили 10 мл ПС, содержащей 50 млн мононуклеаров периферической крови и инкубировали в термостате (5 % CO_2 , 37 °С). Через 1,5 ч среду с неприкрепившимися клетками (лимфоцитами) отбирали, а к клеткам, адгезированным на пластике (моноцитам), добавляли 10 мл свежей ПС, содержащей гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ) (Shering-Plough, США) (конечная концентрация 80 нг/мл) и интерлейкин-4 (ИЛ-4) (Gibco, США) (конечная концентрация 10 нг/мл). На 2-е сутки культивирования добавляли 1 мл свежей ПС, содержащей 800 нг ГМ-КСФ и 100 нг ИЛ-4. На 3-и сутки культивирования для осуществления дифференцировки ДК производили полную замену среды на 10 мл свежей ПС, содержащей 100 нг фактора некроза опухоли α (Gibco, США) и 10 мкг простагландина E_2 (Cayman Chemical Company, США). Через 48 ч свободно плавающие ДК собирали, отмывали от культуральной среды, определяли их количество и использовали в дальнейших экспериментах.

Криоконсервация дендритных клеток

Отмытые ДК ресуспендировали в замораживающей среде из расчета 10 млн клеток на 1 мл среды. Состав замораживающей среды: 95 % полиглюкина (Биохимик, Россия), 5 % ДМСО (MP Biomedicals, США). Криопробирки с суспензией ДК переносили в коробку из многослойной фанеры (толщина стенок – 1 см) и помещали ее в пары жидкого азота (–160 °С). Через 1 ч ампулы переносили в жидкий азот для хранения. Повторную криоконсервацию осуществляли следующим образом: криопробирку с замороженными клетками размораживали при комнатной температуре (+20 °С), после чего ампулу снова помещали в коробку и проводили криоконсервацию по схеме, описанной выше.

Имунофенотипирование дендритных клеток

Имунофенотипирование зрелых ДК проводили на 5-е сутки культивирования методом проточной цитометрии. По окончании культивирования ДК

собирали, отмывали от культуральной среды и разделяли на 3 части. Первую часть использовали для иммунофенотипирования, тогда как остальные 2 части подвергали однократной и повторной криоконсервации. Анализ иммунофенотипа клеток проводили на цитофлуориметре FACSCalibur (BD, США). Для иммунофенотипирования ДК однократно и повторно криоконсервированные клетки размораживали при комнатной температуре, разводили PBS в 3 раза, разносили по пробиркам и проводили инкубацию с антителами к исследуемым антигенам по стандартной методике. В работе использовали моноклональные антитела к CD54, CD80, CD83, HLA-ABC, меченные FITC (Beckman Coulter, США), антитела, меченные PE к CD86, HLA-DR (Beckman Coulter, США) и к CCR7 (R&D Systems, США), и соответствующие изотипические контроли, конъюгированные с FITC или PE (Beckman Coulter, США).

Об экспрессии исследуемых антигенов судили по значению средней интенсивности флуоресценции (MFI). Для сопоставления результатов различных экспериментов полученные данные переводили из абсолютных в относительные значения MFI. Это обусловлено тем, что настройки проточного цитофлуориметра от опыта к опыту могут различаться между собой. Для получения относительных величин значение MFI исследуемого антигена делили на значение MFI соответствующего изотипического контроля. Для обработки данных использовали программу WinMDI 2.8.

Исследование жизнеспособности дендритных клеток

Жизнеспособность ДК определяли методом окрашивания Annexin V, конъюгированного с FITC (Invitrogen, США), согласно инструкции производителя. Однократно и повторно замороженные ДК размораживали при комнатной температуре, разводили PBS в 3 раза и проводили аналогичное окрашивание Annexin V.

Аллогенная стимуляция Т-лимфоцитов

Пролиферацию Т-лимфоцитов исследовали при помощи витального флуоресцентного красителя CFSE (Fluka, США), который проникает в ядро клетки, а после ее деления поровну распределяется между дочерними клетками, и, соответственно, интенсивность свечения клеток падает. Для аллогенной стимуляции использовали общую популяцию лимфоцитов, которую получали после удаления моноцитов из мононуклеаров периферической крови за счет адгезии последних на пластик. Полученные лимфоциты ресуспендировали в 1 мл ПС и добавляли CFSE (конечная концентрация 5 мкг/мл), после 5 мин инкубации при комнатной температуре

Таблица 1. Сравнение жизнеспособности зрелых ДК до и после криоконсервации
Table 1. Comparison of viability of mature dendritic cells before and after cryopreservation

Annexin V (n = 10)	Среднее значение мертвых клеток (%) \bar{X} (S) Average dead cells value (%) \bar{X} (S)	95 % доверительный интервал для среднего 95 % confidence interval		Мин. Min.	Макс. Max.	Значимость разницы, t Significance, t
		Нижняя граница Lower bound	Верхняя граница Upper bound			
Свежие ДК Fresh DC	7,8 (1,1)	6,9	8,6	5,5	9,3	Свежие/Крио (t < 0,0001) Fresh/Cryo (t < 0,0001) Свежие/Крио 2 (t < 0,001) Fresh/Cryo 2 (t < 0,001) Крио/Крио 2 (t < 0,005) Cryo/Cryo 2 (t < 0,005)
Крио ДК Cryopreserved DC	10,3 (2,03)	8,8	11,7	6,9	13,8	
Повторно крио ДК Repeatedly cryopreserved DC	16,2 (5,4)	12,3	20,2	9,8	28,01	

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3: ДК – дендритные клетки.
Note. Here and in Table 2, 3: DC – dendritic cells.

окрашенные клетки дважды отмывали, определяли их количество и наносили 5 млн в 5 мл ПС на чашку Петри d = 60 мм (Falcon, США). Далее к лимфоцитам добавляли 0,5 млн свежих или замороженных, или повторно замороженных аллогенных ДК. Контролем на спонтанную пролиферацию служила культура клеток без добавления ДК, а контролем на индуцированную пролиферацию были лимфоциты с добавлением интерлейкина-2 (ронколейкин, Россия) (150 Ед/мл). Так как после разморозки ДК не отмывали, то в чашки Петри со свежими ДК, а также в контрольные пробы вносили аналогичное количество замораживающей среды. Спустя 6 сут культуры клеток собирали, отмывали от среды и проводили окрашивание при помощи антител к CD3-антигену, конъюгированных с PE (Beckman Coulter, США). Анализ пролиферации осуществляли методом проточной цитометрии, для этого проводили гейтирование CD3-положительных клеток, после чего оценивали количество Т-лимфоцитов со сниженной интенсивностью флуоресценции по каналу FL1.

Статистическая обработка результатов

Статистический анализ данных проводили с использованием пакета статистических программ SPSS 17.0, значения считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждения

Оценка жизнеспособности дендритных клеток

Первым параметром при оценке эффективности криоконсервации является жизнеспособность, т.е. какая доля клеток погибла, а какая осталась живой. Жизнеспособность определяли при помощи окра-

шивания Annexin V, который позволяет выявлять гибнущие клетки на самых ранних стадиях. Исходные значения мертвых клеток до замораживания не превышали 10 %, тогда как после криоконсервации количество мертвых ДК увеличивалось на 2–5 %, а повторная криоконсервация приводила к дальнейшему росту погибших клеток (рис. 1). Объединенные данные экспериментов приведены в табл. 1, разница в жизнеспособности клеток между группами статистически значима.

Определение иммунофенотипа дендритных клеток

Для исследования выбрали антигены, которые, с одной стороны, хорошо экспрессированы на поверхности зрелых ДК, а с другой – имеют ключевое значение при реализации основных функций ДК: молекула адгезии ICAM-1 – CD54; костимуляторные молекулы CD80 и CD86; маркер зрелых ДК – CD83; молекулы главного комплекса гистосовместимости I (HLA-ABC) и II (HLA-DR) классов; хемокиновый рецептор CCR7, обеспечивающий миграцию ДК в лимфоузлы. Криоконсервация, а также повторная криоконсервация не меняли уровень экспрессии исследуемых антигенов по сравнению со свежими ДК (рис. 2). Объединенные данные экспериментов приведены в табл. 2.

Аллогенная стимуляция Т-лимфоцитов

ДК обладают выраженной активационной способностью в отношении аллогенных Т-лимфоцитов, это обусловлено высокой экспрессией молекул главного комплекса гистосовместимости I и II классов, а также костимуляторных молекул CD80 и CD86 на поверхности ДК. После 6 сут совместного культивирования пролиферацию регистрировали у 30 %

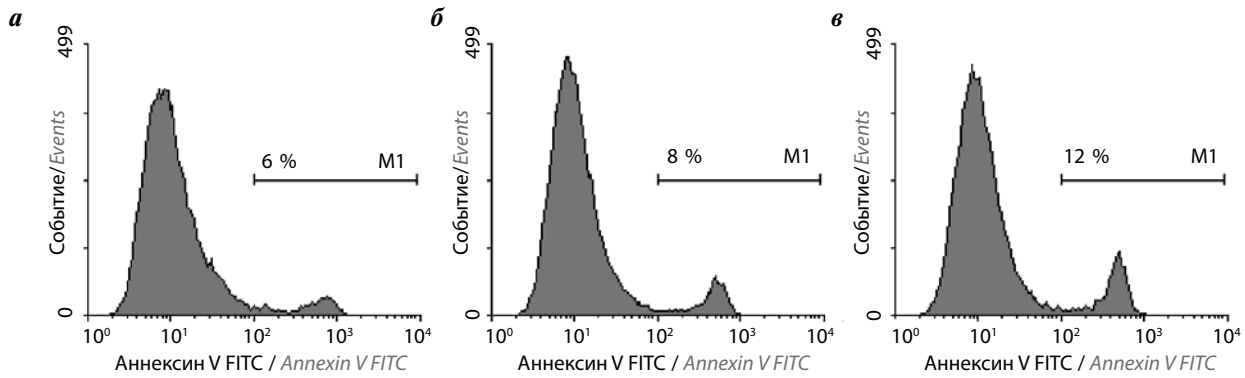


Рис. 1. Исследование жизнеспособности зрелых ДК методом проточной цитометрии. По оси абсцисс – интенсивность свечения клеток, по оси ординат – количество событий. Маркер определяет процент мертвых клеток, связавших Annexin V: а – свежие ДК; б – криоконсервированные ДК; в – повторно криоконсервированные ДК. Здесь и далее на рис. 2–4: ДК – дендритные клетки

Fig. 1. Flow cytometry analysis of viability of mature DC. X axis shows the intensity of fluorescence, Y axis shows the number of events. Marker determines the percentage of dead cells that have bound Annexin V: a – fresh DC; б – cryopreserved DC; в – re-cryopreserved DC. Here and in Fig. 2–4: DC – dendritic cells

Таблица 2. Сравнение экспрессии антигенов на зрелых ДК до и после криоконсервации

Table 2. Comparison of antigen expression on mature DC before and after cryopreservation

Маркеры Markers	Среднее значение MFI \bar{X} (S) Average dead MFI \bar{X} (S)	95 % доверительный интервал для среднего 95 % confidence interval		Мин. Min.	Макс. Max.	Значимость разницы, <i>t</i> Significance, <i>t</i>
		Нижняя граница Lower bound	Верхняя граница Upper bound			
CD54 (n = 10)						
Свежие ДК Fresh DC	30,8 (6,8)	20,02	41,6	21,01	36,6	Свежие/Крио (<i>t</i> < 0,7) Fresh/Cryo (<i>t</i> < 0,7) Свежие/Крио 2 (<i>t</i> < 0,6) Fresh/Cryo 2 (<i>t</i> < 0,6) Крио/Крио 2 (<i>t</i> < 0,2) Cryo/Cryo 2 (<i>t</i> < 0,2)
Крио ДК Cryopreserved DC	30,3 (6,4)	20,05	40,5	22,7	38,4	
Повторно крио ДК Repeatedly cryopreserved DC	31,7 (6,2)	21,8	41,6	25,01	39,8	
CD80 (n = 10)						
Свежие ДК Fresh DC	9,1 (1,4)	6,8	11,4	7,2	10,4	Свежие/Крио (<i>t</i> < 0,6) Fresh/Cryo (<i>t</i> < 0,6) Свежие/Крио 2 (<i>t</i> < 0,8) Fresh/Cryo 2 (<i>t</i> < 0,8) Крио/Крио 2 (<i>t</i> < 0,5) Cryo/Cryo 2 (<i>t</i> < 0,5)
Крио ДК Cryopreserved DC	9,01 (2,01)	5,7	12,2	6,4	10,6	
Повторно крио ДК Repeatedly cryopreserved DC	9,1 (1,8)	6,2	12,1	7,2	10,8	
CD83 (n = 10)						
Свежие ДК Fresh DC	5,3 (0,5)	4,5	6,1	4,6	5,8	Свежие/Крио (<i>t</i> < 0,2) Fresh/Cryo (<i>t</i> < 0,2) Свежие/Крио 2 (<i>t</i> < 0,1) Fresh/Cryo 2 (<i>t</i> < 0,1) Крио/Крио 2 (<i>t</i> < 0,7) Cryo/Cryo 2 (<i>t</i> < 0,7)
Крио ДК Cryopreserved DC	4,9 (0,6)	3,9	5,9	4,5	5,9	
Повторно крио ДК Repeatedly cryopreserved DC	4,9 (0,5)	4,04	5,8	4,4	5,7	

Окончание табл. 2

The end of table 2

Маркеры Markers	Среднее значение MFI \bar{X} (S) Average dead MFI \bar{X} (S)	95 % доверительный интервал для среднего 95 % confidence interval		Мин. Min.	Макс. Max.	Значимость разницы, <i>t</i> Significance, <i>t</i>
		Нижняя граница Lower bound	Верхняя граница Upper bound			
CD86 (n = 10)						
Свежие ДК Fresh DC	348,8 (171,3)	76,1	621,4	184,9	537,5	Свежие/Крио (t < 0,5) Fresh/Cryo (t < 0,5) Свежие/Крио 2 (t < 0,4) Fresh/Cryo 2 (t < 0,4) Крио/Крио 2 (t < 0,5) Cryo/Cryo 2 (t < 0,5)
Крио ДК Cryopreserved DC	319,8 (95,3)	168,1	471,5	223,5	412,8	
Повторно крио ДК Repeatedly cryopreserved DC	306,6 (83,7)	173,3	439,9	213,5	387,5	
HLA-ABC (n = 10)						
Свежие ДК Fresh DC	210,4 (50,8)	129,5	291,3	161,3	274,6	Свежие/Крио (t < 0,5) Fresh/Cryo (t < 0,5) Свежие/Крио 2 (t < 0,8) Fresh/Cryo 2 (t < 0,8) Крио/Крио 2 (t < 0,9) Cryo/Cryo 2 (t < 0,9)
Крио ДК Cryopreserved DC	216,9 (59,6)	122,07	311,8	161,6	298,4	
Повторно крио ДК Repeatedly cryopreserved DC	216,1 (68,3)	107,3	324,9	160,8	313,01	
HLA-DR (n = 10)						
Свежие ДК Fresh DC	50,3 (26,8)	7,5	93,1	28,3	89,3	Свежие/Крио (t < 0,4) Fresh/Cryo (t < 0,4) Свежие/Крио 2 (t < 0,4) Fresh/Cryo 2 (t < 0,4) Крио/Крио 2 (t < 0,3) Cryo/Cryo 2 (t < 0,3)
Крио ДК Cryopreserved DC	55,8 (26,9)	12,8	98,7	28,9	85,6	
Повторно крио ДК Repeatedly cryopreserved DC	44,4 (16,9)	17,4	71,4	30,9	66,6	
CCR-7 (n = 10)						
Свежие ДК Fresh DC	6,7 (3,5)	1,1	12,3	3,8	11,8	Свежие/Крио (t < 0,7) Fresh/Cryo (t < 0,7) Свежие/Крио 2 (t < 0,7) Fresh/Cryo 2 (t < 0,7) Крио/Крио 2 (t < 0,8) Cryo/Cryo 2 (t < 0,8)
Крио ДК Cryopreserved DC	6,5 (2,8)	1,9	11,1	4,1	10,6	
Повторно крио ДК Repeatedly cryopreserved DC	6,4 (1,9)	3,2	9,5	4,5	9,1	

популяции Т-лимфоцитов (рис. 3). Объединенные данные экспериментов приведены в табл. 3, разница в пролиферативной активности в группах со свежими и криоконсервированными ДК была статистически недостоверна, тогда как повторная криоконсервация приводила к снижению пролиферации Т-лимфоцитов.

Исследование свойств дендритных клеток после длительного хранения

В исследование были включены невостребованные образцы дендритноклеточных вакцин больных меланомой, которые хранились в жидком азоте более 10 лет. Так как образцов было всего 4, то статистическая обработка полученных результатов была

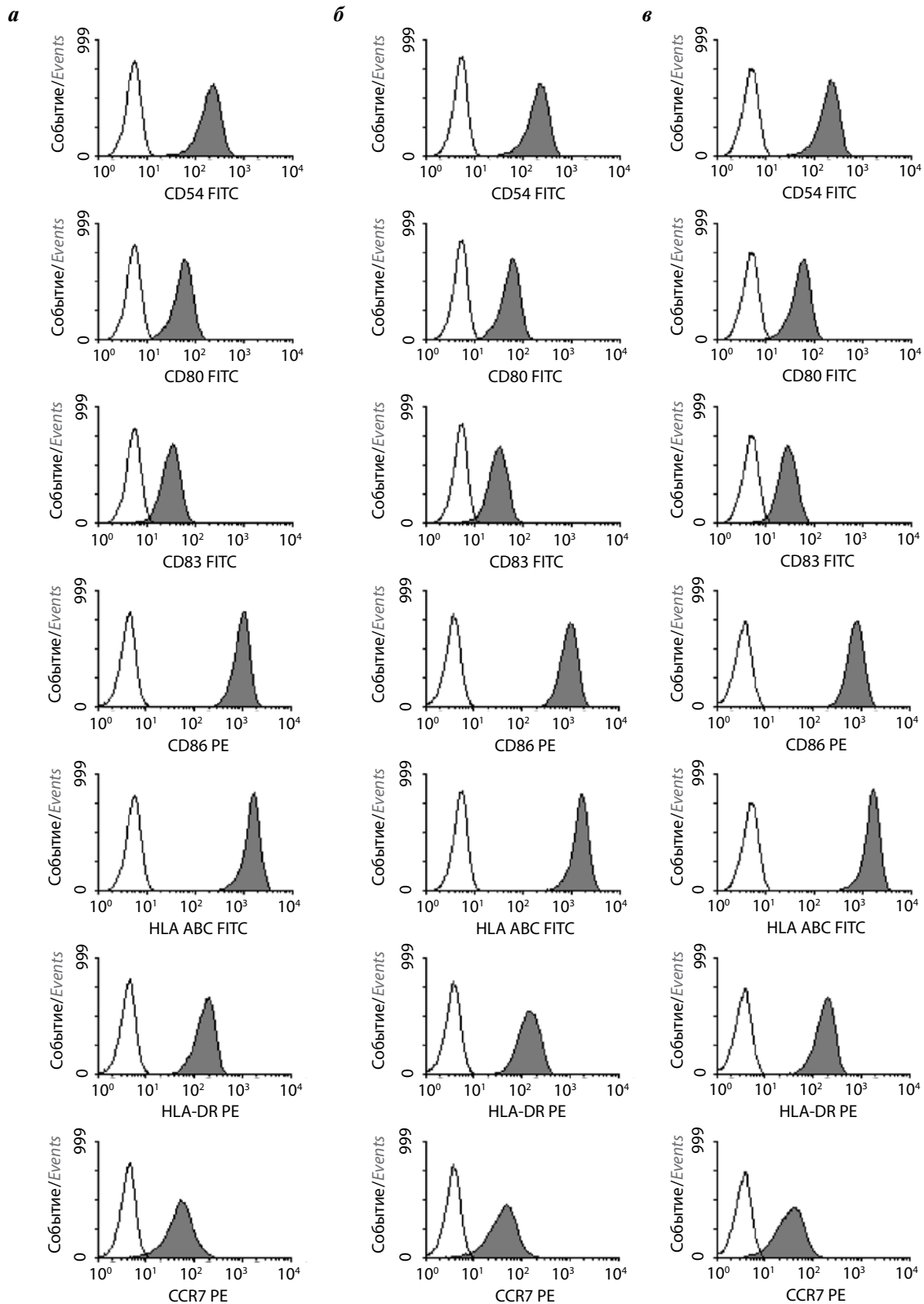


Рис. 2. Исследование экспрессии антигенов на зрелых ДК методом проточной цитометрии. Гистограммы серого цвета – исследуемые антигены, прозрачные гистограммы с черной линией – изотипические контроли. По оси абсцисс – интенсивность свечения клеток, по оси ординат – количество событий: а – свежие ДК; б – криоконсервированные ДК; в – повторно криоконсервированные ДК

Fig. 2. Flow cytometry analysis of antigen expression on mature DC. Grey histograms – examined antigens, clear histograms with bold line – isotypic controls. X axis shows the intensity of fluorescence, Y axis shows the number of events: а – fresh DC; б – cryopreserved DC; в – re-cryopreserved DC

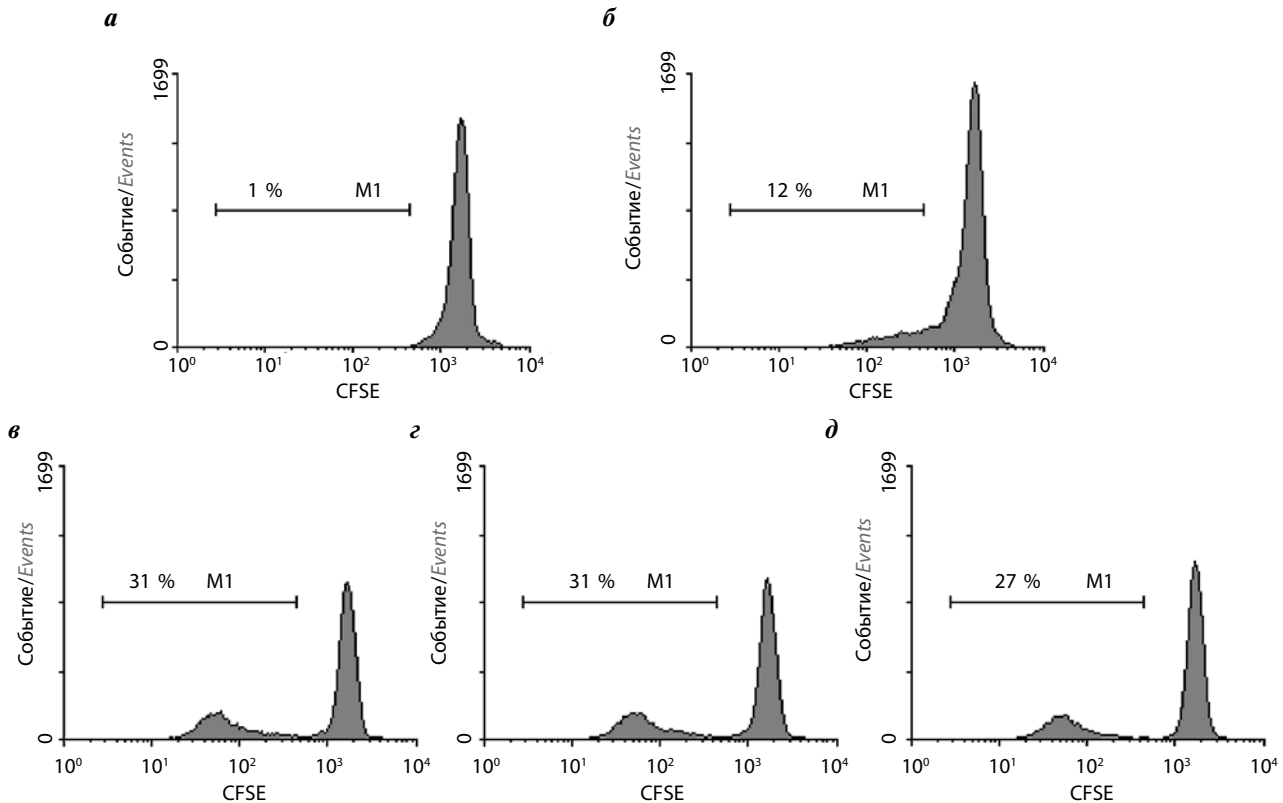


Рис. 3. Исследование аллогенной стимуляции T-лимфоцитов зрелыми ДК методом проточной цитометрии. По оси абсцисс – интенсивность свечения клеток, по оси ординат – количество событий. Маркер определяет процент поделившихся клеток: а – контроль 1 (лимфоциты без добавления ДК); б – контроль 2 (лимфоциты + интерлейкин-2); в – лимфоциты + свежие ДК; з – лимфоциты + криоконсервированные ДК; д – лимфоциты + повторно криоконсервированные ДК

Fig. 3. Flow cytometry analysis of allogenic T-lymphocyte stimulation by mature dendritic cells. X axis shows the intensity of fluorescence, Y axis shows the number of events. Marker determines the percentage of proliferated cells: a – control 1 (lymphocytes w/o DC); б – control 2 (lymphocytes + interleukin-2); в – lymphocytes + fresh DC; з – lymphocytes + cryopreserved DC; д – lymphocytes + re-cryopreserved DC

Таблица 3. Сравнение пролиферативной активности T-лимфоцитов после аллогенной стимуляции зрелыми ДК до и после криоконсервации
Table 3. Comparison of proliferation of T-lymphocytes after allogenic stimulation by mature DC

CFSE (n = 10)	Количество поделившихся клеток (%) \bar{X} (S) Number of cells (%) of \bar{X} (S)	95 % доверительный интервал для среднего 95 % confidence interval		Мин. Min.	Макс. Max.	Значение разницы, t Significance, t
		Нижняя граница Lower bound	Верхняя граница Upper bound			
Контроль 1 (без ДК) The control 1 (without DC)	1,3 (0,4)	1,02	1,6	1,0	2,00	Контроль 1/Свежие (t < 0,001) The control 1/Fresh (t < 0,001) Контроль 2/Свежие (t < 0,001) The control 2/Fresh (t < 0,001) Свежие/Крио (t < 1,0) Fresh/Cryo (t < 1,0) Свежие/Крио 2 (t < 0,001) Fresh/Cryo 2 (t < 0,001) Крио/Крио 2 (t < 0,001) Cryo/Cryo 2 (t < 0,001)
Контроль 2 (интерлейкин-2) The control 2 (interleukin-2)	13,3 (2,05)	12,02	14,6	10,0	16,0	
Свежие ДК Fresh DC	32,6 (2,05)	31,3	33,9	30,0	36,0	
Крио ДК Cryopreserved DC	32,6 (1,9)	31,4	33,9	30,0	35,0	
Повторно крио ДК Repeatedly cryopreserved DC	26,3 (1,5)	25,3	27,3	24,0	28,0	

невозможна. В этом исследовании после разморозки определяли жизнеспособность ДК и экспрессию основных поверхностных антигенов. Несмотря на длительное хранение, размороженные ДК сохраняли свою жизнеспособность и экспрессию антигенов (рис. 4).

В НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина с 2003 г. ведутся клинические исследования по вакцинотерапии ДК онкологических больных [10, 11]. Первоначально, когда число больных было небольшим, вакцинотерапию проводили свежими ДК. Впоследствии

в связи с увеличением числа пациентов ДК стали подвергать криоконсервации и хранить в жидком азоте до момента их использования. Отличительной реакцией организма на введение ДК является гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ) в местах введения клеток (рис. 5). Это реакция, характеризующая развитие клеточного иммунного ответа на антигены, которыми были «нагружены» ДК. Криоконсервированные ДК размораживали, разводили изотоническим раствором и вводили внутривожно больному. Как свежие, так и криоконсервированные

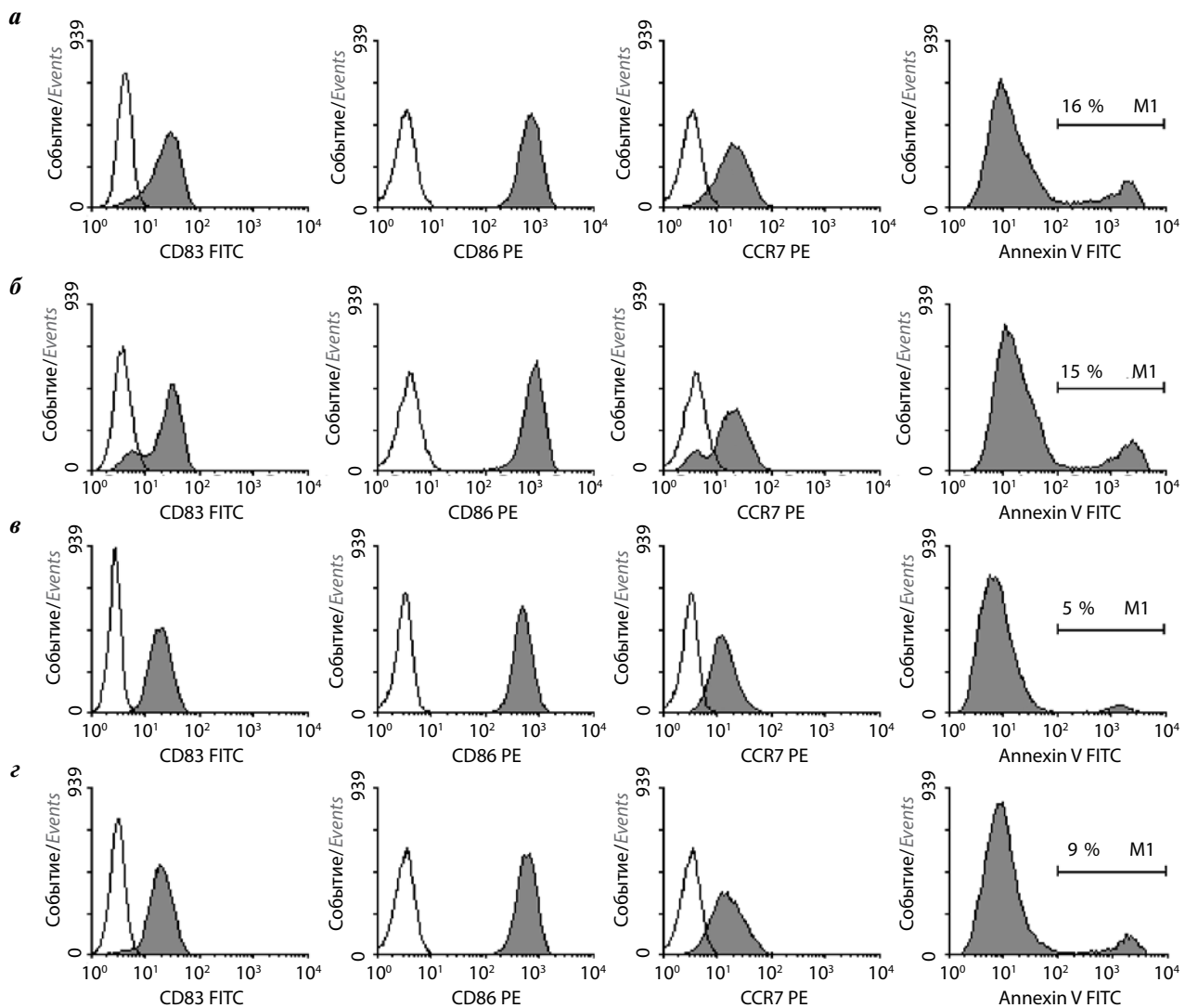


Рис. 4. Исследование экспрессии антигенов и жизнеспособности зрелых ДК после длительного (более 10 лет) хранения в жидком азоте. По оси абсцисс — интенсивность свечения клеток, по оси ординат — количество событий. Гистограммы серого цвета — исследуемые антигены, прозрачные гистограммы с черной линией — изотипические контроли. Маркер определяет процент мертвых клеток, связавших Annexin V: а — ДК больного Ю.М. М. (12 лет в жидком азоте); б — ДК больной К.Е. А. (11 лет в жидком азоте); в — ДК больной К.М. В. (10 лет в жидком азоте); г — ДК больного Н.А. А. (11 лет в жидком азоте)

Fig. 4. Flow cytometry analysis of antigen expression and viability of mature dendritic cells after more than 10 years storage in liquid nitrogen. X axis shows the intensity of fluorescence, Y axis shows the number of events. Grey histograms — examined antigens, clear histograms with bold line — isotypic controls. Marker determines the percentage of dead cells that have bound Annexin V: а — DC of patient Yu.M. M. (12 years in liquid nitrogen); б — DC of patient K.E. A. (11 years in liquid nitrogen); в — DC of patient K.M. V. (10 years in liquid nitrogen); г — DC of patient N.A. A. (11 years in liquid nitrogen)



Рис. 5. Реакция гиперчувствительности замедленного типа у больного Д.М.И. (нейробластома) в местах введения дендритноклеточной вакцины

Fig. 5. Delayed type hypersensitivity reaction of patient D.M.I. with neuroblastoma after injection of dendritic cell vaccine

ДК вызывали аналогичные иммунные реакции у пациентов и формировали противоопухолевый иммунный ответ.

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют об эффективности предложенного способа криоконсервации ДК. Помимо высоких показателей жизнеспособности и сохранения основных функций дендритных клеток, наш метод демонстрирует удобство для клинического применения, так как после разморозки

достаточно развести клетки нужным раствором и ввести их больному. Наш многолетний опыт клинического применения дендритноклеточных вакцин позволяет утверждать, что данный способ криоконсервации ДК сохраняет иммуностимулирующие способности ДК даже после длительного хранения и повторной криоконсервации. В состав замораживающей среды входят только стандартные соединения, такие как полиглюкин и ДМСО. Если сыворотка крови, которую часто используют как компонент замораживающей среды, отличается от партии к партии, а также может быть контаминирована вирусами, то полиглюкин лишен этих недостатков. Кроме того, следует отметить, что криоконсервация в парах жидкого азота надежнее, чем использование низкотемпературного морозильника или программного замораживателя, так как не зависит от электрического тока. В нашем случае низкое содержание ДМСО (всего 5 %) также дает преимущество, а именно снижает токсический эффект на клетки и позволяет после разморозки не отмывать их, а только развести буфером и сразу ввести пациенту. Таким образом, описанный способ криоконсервации ДК эффективен и надежен, а состав замораживающей среды стандартен, физиологичен и не требует отмывки после разморозки, что сводит к минимуму количество манипуляций, следующих после разморозки клеток.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- John J., Hutchinson J., Dalgleish A., Pandha H. Cryopreservation of immature monocyte-derived dendritic cells results in enhanced cell maturation but reduced endocytic activity and efficiency of adenoviral transduction. *J Immunol Methods* 2003;272:35. DOI: 10.1016/S0022-1759(02)00430-1.
- Thumann P., Moc I., Humrich J. et al. Antigen loading of dendritic cells with whole tumor cell preparations. *J Immunol Methods* 2003;277(1–2):1–16. DOI: 10.1016/S0022-1759(03)00102-9.
- Zobywalski A., Javorovic M., Frankenberger B. et al. Generation of clinical grade dendritic cells with capacity to produce biologically active IL-12p70. *J Transl Med* 2007;5:18. DOI: 10.1186/1479-5876-5-18.
- Sundarasetty B., Kloess S., Oberschmidt O. et al. Generation of lentivirus-induced dendritic cells under GMP-compliant conditions for adaptive immune reconstitution against cytomegalovirus after stem cell transplantation. *J Trans Med* 2015;13:240. DOI: 10.1186/s12967-015-0599-5.
- Nava S., Lisini D., Pogliani S. et al. Safe and reproducible preparation of functional dendritic cells for immunotherapy in glioblastoma patients. *Stem Cells Transl Med* 2015;4:1164–72. DOI: 10.5966/sctm.2015-0091.
- Ponsaerts P., van Tendeloo V., Cools N. et al. mRNA-electroporated mature dendritic cells retain transgene expression, phenotypical properties and stimulatory capacity after cryopreservation. *Leukemia* 2002;16:1324–30. DOI: 10.1038/sj.leu.2402511.
- Zhou Q., Zhang Y., Zhao M. et al. Mature dendritic cell derived from cryopreserved immature dendritic cell shows impaired homing ability and reduced anti-viral therapeutic effects. *Sci Rep* 2016;6:39071. DOI: 10.1038/srep39071.
- Петенко Н.Н., Михайлова И.Н., Чкадуа Г.З. и др. Вакциноterapia меланомы кожи дендритными клетками после хирургического лечения. Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи 2015;1:43–9. [Petenko N.N., Mikhailova I.N., Chkadua G.Z. et al. Dendritic cell vaccine therapy of cutaneous melanoma after the radical surgery. *Sarkomy kostey, myagkikh tkaney i opukholy kozhi = Bones and Soft Tissue Sarcomas and Skin Tumors* 2015;1:43–9. (In Russ.)].
- Чкадуа Г.З., Заботина Т.Н., Буркова А.А. и др. Адаптирование методики культивирования дендритных клеток человека из моноцитов периферической крови для клинического применения. Российский биотерапевтический журнал 2002;3:56. [Chkadua G.Z., Zabolina T.N., Burkova A.A. et al. The adaptation of method of generation monocyte derived human dendritic cells for clinical practice. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2002;3:56. (In Russ.)].
- Долгополов И.С., Чкадуа Г.З., Менткевич Г.Л. Роль и место иммунотерапии в детской онкологии: некоторые клинические примеры. *Иммунология гемопоза* 2015;13(1):63. [Dolgoplov I.S., Chkadua G.Z., Mentkevich G.L. Does immunotherapy play role

in the treatment of pediatric cancer: some clinical observation. *Immunologiya gemopoeza = Haemotopoiesis Immunology* 2015;13(1):63. (In Russ.).

11. Самойленко И.В., Заботина Т.Н., Михайлова И.Н. и др. Дендритноклеточная вакцина в комбинации с химиотерапией в лечении диссемини-

рованной меланомы кожи: окончательные результаты одноцентрового рандомизированного контролируемого исследования II фазы. *Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН* 2016;27(2):119. [Samoilenko I.V., Zabolina T.N., Mikhailova I.N. et al. Dendritno-

kletochnaya vaccine in combination with chemotherapy in the treatment of disseminated melanoma: final results of randomized controlled studies of phase II. *Vestnik RONTs im. N.N. Blokhina RAMN = Vestnik N.N. Blokhin RCRC* 2016;27(2):119. (In Russ.).

Вклад авторов

Г.З. Чкадуа: разработка дизайна исследования, получение данных для анализа, анализ полученных данных, написание текста рукописи;
А.А. Борунова: получение данных для анализа, анализ полученных данных;
И.Б. Шоуа: анализ полученных данных;
И.С. Долгополов: получение данных для анализа, написание текста рукописи;
Р.И. Пименов, И.Н. Михайлова, Т.Н. Заботина: получение данных для анализа;
М.А. Барышникова: обзор публикаций по теме статьи.

Authors' contributions

G.Z. Chkadua: developing the research design; obtaining data for analysis, analysis of the obtained data, article writing;
A.A. Borunova: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data;
I.B. Shoua: analysis of the obtained data;
I.S. Dolgoplov: obtaining data for analysis, article writing;
R.I. Pimenov, I.N. Mikhailova, T.N. Zabolina: obtaining data for analysis;
M.A. Baryshnikova: reviewing of publications of the article's theme.

ORCID авторов/ORCID of authors

Г.З. Чкадуа/G.Z. Chkadua: <https://orcid.org/0000-0002-1416-0545>
А.А. Борунова/A.A. Borunova: <https://orcid.org/0000-0002-1854-3455>
И.Б. Шоуа/I.B. Shoua: <https://orcid.org/0000-0002-9488-4710>
И.С. Долгополов/I.S. Dolgoplov: <https://orcid.org/0000-0001-9777-1220>
Р.И. Пименов/R.I. Pimenov: <https://orcid.org/0000-0002-5913-3604>
И.Н. Михайлова/I.N. Mikhailova: <https://orcid.org/0000-0002-7659-6045>
Т.Н. Заботина/T.N. Zabolina: <https://orcid.org/0000-0001-7631-5699>
М.А. Барышникова/M.A. Baryshnikova: <https://orcid.org/0000-0002-6688-8423>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Статья поступила: 16.09.2019. Принята в печать: 18.09.2019.

Article submitted: 16.09.2019. Accepted for publication: 18.09.2019.