

# Celično zdravljenje s tolerogenimi dendritičnimi celicami – vzročno zdravljenje avtoimunskih bolezni

Tolerogenic dendritic cell therapy – causal treatment of autoimmune diseases

Urban Švajger,<sup>1,3</sup> Matjaž Jeras<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, Štajmerjeva 6, 1000 Ljubljana

<sup>2</sup> Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana

<sup>3</sup> Celica, Biomedicinski center d.o.o., Tehnološki park 24, 1000 Ljubljana

## Korespondenca/ Correspondence:

Urban Švajger, Zavod RS za transfuzijsko medicino, Štajmerjeva 6 1000 Ljubljana  
email: urban.svajger@ztm.si

## Ključne besede:

tolerogene dendritične celice, imunoterapija, imunosupresivni mehanizmi

## Key words:

tolerogenic dendritic cells, immunotherapy, immunosuppressive mechanisms

## Citirajte kot/Cite as:

Zdrav Vestn 2013;  
82: 47–54

Prispelo: 25. okt. 2011,  
Sprejeto: 26. okt. 2012

## Izvleček

**Izhodišča:** Dendritične celice (DC) v človeškem organizmu so poglaviti prenašalci antigenske (Ag) informacije. Le-to posredujejo Ag-specifičnim limfocitom T v različnem smislu imunske aktivacije, ki je lahko imunostimulativna oz. imunosupresivna. Slednje je odvisno od njihovega aktivacijskega stanja, pri čemer izražajo DC izjemno funkcijsko plastičnost. Tolerogene DC, ki jih označujejo izrazite imunosupresivne značilnosti, lahko inducirajo nastanek regulacijskih limfocitov T ter povzročijo nastanek T celične anergije. V zadnjih dveh desetletjih se je nabralo dovolj eksperimentalnih dokazov na živalskih modelih, ki nakazujejo varnost in učinkovitost uporabe DC za zdravljenje imunske posredovane bolezni. Imunoterapija z DC tako postaja klinična stvarnost. Trenutno je v okviru NIH (National Institutes of Health) registrirana klinična študija za uporabo avtolognih DC, pridobljenih iz človeških monocitov, spremenjenih v pogojih *ex vivo* v smislu indukcije imunosupresivnih lastnosti, za zdravljenje avtoimunskega diabetesa tipa 1.

**Zaključki:** Pregledni članek opisuje poglavne lastnosti DC, primernih za uporabo v celičnem zdravljenju avtoimunskih bolezni, njihovo vlogo pri tovrstnem zdravljenju ter načine priprave te vrste celičnih pripravkov v laboratoriju. Zdravljenje avtoimunskih bolezni s tolerogenimi DC je izjemen potencial, pri čemer pa je poglavna ovira ustrezna pridobitev celičnega proizvoda ob upoštevanju strogih načel dobre proizvodne prakse (GMP).

## Abstract

**Background:** Dendritic cells (DCs) are considered as primary carriers of antigenic (Ag) information in the human body. This information is later presented to Ag-specific T lymphocytes in various ways that can be either immunostimulating or immunosuppressive. The latter depends on the activation status of DCs, in which way the DCs display extreme plasticity in terms of their function. Tolerogenic DCs, which are characterized by extensive immunosuppressive properties, can induce the generation of regulatory T lymphocytes or cause T-cell anergy. In the last two decades, considerable evidence has accumulated using animal models, which points to safety and efficacy of DC application in terms of treating immune-mediated diseases. Immunotherapy using DCs is nowadays becoming a clinical reality. At present, a clinical study using autologous DCs derived from human monocytes and treated *ex vivo* to induce their immunosuppressive potential, with the aim to treat autoimmune type 1 diabetes, is registered within NIH (National Institutes of Health).

**Conclusion:** The review discusses the characteristics of DCs, suitable for use in cellular therapy of autoimmune diseases, their role in such therapies and the way in which such cells can be generated in the laboratory. Therapy of autoimmune diseases using tolerogenic DCs represents an outstanding potential, however the major obstacles lay in the way of proper preparation of cellular products, where all procedures should follow the strict demands of good manufacturing practice (GMP).

## Uvod

Dendritične celice so v imunološki znanosti pridobile na pomenu z odkritjem, da lahko kot profesionalne Ag predstavljajočice celice (APC), poleg vzpostavitve Ag-specifičnih efektorskih imunskih odzivov, v enakem obsegu povzročijo tudi nastanek tolerogenih imunskih odzivov, pri čemer botrujejo nastanku T-celične neodzivnosti ter regulacijskih celic T in na tak način v veliki meri prispevajo k vzdrževanju periferne imunske tolerance.<sup>1</sup> V človeškem perifernem obtoku je moč najti nizko število DC, več pa se jih nahaja ob telesnih površinah, kot je sluznica, in pod kožo. Dendritične celice v veliki meri migrirajo, pri čemer lahko potujejo iz tkiv v območja celic T in B v sekundarnih limfnih organih, kjer uravnavajo odzive celic T.<sup>2,3</sup> Slednja dejavnost poteka tako v fizioloških pogojih, kakor med stanjem okužbe, prav tako pa je od teh pogojev odvisen način, preko katerega DC aktivirajo odzivne limfocite T. Pred kratkim so prikazali, da lahko nezrele oz. neaktivirane DC prav tako potujejo v sekundarna limfna tkiva, kjer namesto efektorskih imunskih odzivov povzročijo delecijo celic T oz. njihovo neodzivnost.<sup>4</sup> Pod fiziološkimi pogoji je poglobljena naloga DC vzorčenje Ag na mestu, kjer prebivajo. Ob tem prav tako shranjujejo lastno Ag informacijo, ki izvira iz odmrlih in apoptotičnih celic okoliškega tkiva.<sup>5</sup> Smiselno je predpostaviti, da bi v primeru odsotnosti prej omenjenega procesa delecije in povzročitve neodzivnosti celic T, specifičnih na lastne Ag, v primeru aktivacije DC, le-te lahko aktivirale naivne celice T s specifično T-celičnega receptorja (TCR), usmerjeno proti istim Ag. Aktivacija oz. zorenje DC je namreč proces, ki popolnoma spremeni tako morfologijo, fenotip kakor tudi funkcijske lastnosti DC. Slika 1 prikazuje morfološke razlike nezrelih in zrelih DC. Ob izpostavitvi DC dejavnikom, ki povzročajo njihovo zorenje (bakterijski lipopolisaharid – LPS, vnetni citokini – TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  itd.), DC prenehajo z vzorčenjem Ag in jih začnejo predstavljati na lastni površini v kompleksu z molekulami poglobljene tkivne skladnosti razreda I in II (molekule MHC – major histocompatibility complex).<sup>6</sup> Ob tem prene-

hajo izražati kemokinske receptorje, ki jih vodijo na odgovorna tkivna mesta in pričnejo izražati kemokinski receptor CCR7,<sup>7</sup> ki vodi DC v sekundarne limfne organe. Prav tako se izrazito poveča površinsko izražanje ko-stimulacijskih molekul CD40, CD80 in CD86, s pomočjo katerih aktivirajo odzivne celice, zato se spremeni njihov citokinski profil<sup>6</sup> (različno povečano izražanje IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-8, kakor tudi IL-10), kar pa je v veliki meri odvisno od načina njihove aktivacije DC.<sup>8</sup>

## Tolerogene dendritične celice

Glede aktivacijskega stanja je dolgo veljalo prepričanje, da se DC nahajajo v dveh končnih oblikah razvoja, nezrelem in zrelem stanju, pri čemer nezrele DC botrujejo nastanku tolerogenih imunskih odzivov, zrele pa inducirajo močne efektorske odzive z nastankom celic T tipa Th1 oz. Th2.<sup>9</sup> Danes je znano, da se lahko DC poleg obeh omenjenih stanj nahajajo tudi v vmesnem aktivacijskem stanju, ki v primerjavi z nezrelimi DC v večjem obsegu zagotavlja tolerogen imunski odziv. Takšne DC imajo povečano izražanje kostimulacijskih molekul, njihova poglobljena značilnost pa je nizka proizvodnja provnetnega citokina IL-12 ob sočasno povečanem izražanju imunosupresivnega citokina IL-10<sup>10</sup>. Povečano izražanje IL-10 je eden poglobljene dejavnikov, ki usmerja razvoj celic T ob njihovem stiku s takšnimi DC v smer regulacijskih limfocitov T. Ena od vrst regulacijskih celic T, ki nastanejo na tak način, so celice vrste Tr1, ki lahko po aktivaciji same proizvajajo IL-10<sup>10</sup>. Takšne vrste DC so bile kmalu označene kot tolerogene DC. Danes je znano, da obstajajo tudi v kontekstu tolerogenih DC številne razlike glede izražanja različnih citokinov in drugih imunosupresivnih dejavnikov, ter vrste regulacijskih celic T, ki jih le-te inducirajo. Tolerogene DC namreč poleg imunosupresivnega citokinskega profila izražajo tudi različne površinsko vezane inhibicijske molekule, ki ob interakciji s celicami T in odgovornimi ligandi oz. receptorji sprožajo v notranjost celic negativne signale,<sup>11</sup> pri čemer lahko povzročijo apoptozo odzivnih celic T<sup>12</sup> ter nadzorujejo delovanje aktiviranih celic T.<sup>13</sup>

Pomembni inhibicijski receptorji, izraženi na DC, so t. i. imunoglobulinu podobni prepisi (immunoglobulin-like transcript – ILT)<sub>3</sub> in ILT<sub>4</sub>, ligand Fas, PDL-1 (programmed death ligand 1) in druge.<sup>14</sup> Slika 2 prikazuje pglavitne lastnosti tolerogenih DC.

Pomembna in zaželena lastnost tolerogenih DC je stabilnost tolerogenega fenotipa. Slednje pomeni, da so DC s potencialnimi imunosupresivnimi lastnostmi odporne na zorenje z aktivacijskimi dejavniki, kot so LPS, ligand CD40 ter številni vnetni citokini. Stabilnost tolerogenih DC je ključna, če jih želimo kasneje uporabiti kot morebitni celični pripravek z namenom reguliranja neželenih imunskih procesov *in vivo*. Za številne avtoimunske bolezni, kot je npr. revmatoidni artritis, so pogosto značilni imunski odzivi tipa Th<sub>1</sub> (seveda tudi Th<sub>17</sub>), kjer so vnetna stanja zaznamovana s prisotnostjo številnih vnetnih citokinov<sup>15</sup>, ki bi lahko potencialno aktivirali DC kot celični pripravek, ko bi ta enkrat dosegel mesto vnetja. Takšen poseg bi v končni fazi privedel do nasprotnega učinka, saj bi vnešene in kasneje aktivirane DC v povečanem obsegu nadalje aktivirale limfocite, specifične za Ag, pomembne v razvoju določene avtoimunske bolezni.

## Načini pridobitve tolerogenih DC v laboratoriju

Do danes so se uveljavili že mnogoteri načini, s pomočjo katerih lahko DC v laboratorijskih pogojih izpostavimo specifičnim pogojem, ki narekujejo njihov razvoj v smer tolerogenih DC, ki so v precejšni meri odporne na posledično aktivacijo tudi s tako močnimi imunogeni, kot sta bakterijski LPS ali ligand receptorja CD40. Ob tej priložnosti je potrebno omeniti, da DC, s katerimi večina znanstvenikov in laboratorijskih delavcev rokuje v *in vitro* oz. *ex vivo* pogojih, izhajajo iz človeških monocitov. Zaradi nizkega števila DC v telesu bi bila njihova neposredna osamitev in kasnejša uporaba s tehnološkega vidika neizvedljiva. V ta namen se danes uporablja splošno razširjen model, s katerim iz človeških monocitov (v periferni krvi posameznika so obilno zastopani) v 5-dnevni celični kulturi

ob prisotnosti rekombinantnega humanega (rh) granulocitne in monocitne kolonije stimulirajočega dejavnika (GM-CSF) ter IL-4, dosežemo diferenciacijo monocitov v DC. Takšne DC posedujejo številne značilnosti, ki so značilne za DC, naravno prisotne v telesu, kot je izjemna sposobnost privzema Ag ter obširna Ag predstavitev in doseg zrelega stanja po aktivaciji.<sup>16</sup>

Klasičen model za doseg tolerogenega stanja je izpostavitve nezrelih DC imunosupresivnim citokinom, kot sta IL-10 ali transformirajoči rastni dejavnik (TGF)- $\beta$ . Znano je, da so DC po dodatku IL-10 *in vitro* nezmožne popolne aktivacije, pri čemer izražajo zmanjšano stopnjo kostimulacijskih molekul CD80 in CD86, izražajo IL-10 v večjem obsegu in imajo zmanjšano sposobnost aktivacije alogenskih limfocitov CD4+.<sup>17</sup> Po drugi strani so mišje DC, ki so jih inkubirali s TGF- $\beta$ , po ponovnem vnosu v živali preprečile nastanek eksperimentalnega avtoimunskega encefalomielitisa (EAE).<sup>18</sup> Zanimivo je, da TNF- $\alpha$  sam po sebi po krajši aktivaciji povzroči nastanek delno zrelih DC, ki v večji meri izražajo ko-stimulacijske molekule, a ne izkazujejo povečane proizvodnje IL-12, pglavitnega citokina, ki usmerja tip Th<sub>1</sub> T-celičnega imunskega odziva. Te vrste DC so v miših zavrle nastanek avtoimunskega tiroiditisa.<sup>19</sup> Poleg aktivacije že razvitih DC, je za kasnejšo funkcijo DC pomembna njihova razvojna pot iz monocitov. Monociti, ki jih gojimo v prisotnosti makrofagne kolonije stimulirajočega dejavnika (M-CSF) ter IL-4, se razvijejo v DC z izrazitimi tolerogenimi lastnostmi, za katere je značilno obsežno proizvodjanje IL-10 in odsotnost proizvodjanja IL-12.<sup>20</sup> Podoben tolerogeni značaj pridobijo tudi DC, ki jih ob razvoju iz monocitov spremljajo interakcije z ligandi lektinskega receptorja DC-SIGN.<sup>21</sup>

Poleg obdelovanja DC z različnimi imunosupresivnimi biomolekulami lahko vplivamo na ključne točke v njihovi biologiji z različnimi farmakološkimi sredstvi. Dobro je znano, da aktivna oblika vitamina D, 1 $\alpha$ ,25-dihidroksi-vitamin D<sub>3</sub> [1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>], kakor tudi kortikosteroidi, pomembno vplivajo tako na diferenciacijo kot zorenje DC, zlasti v negativnem smislu. Dodatek teh snovi v kulture DC prepreči, da

jih aktivirata LPS ali ligand CD40. Slednje se kaže v zmanjšanem obsegu izražanja molekul CD80 in CD86, kakor tudi majhnem izločanju provnetnih citokinov in občutno povečanem izločanju IL-10<sup>22</sup>. Tako obdelane DC lahko preprečijo nastanek avtoimunskih bolezni pri živalih in botrujejo nastanku regulacijskih celic T.<sup>22</sup> V našem laboratoriju smo pokazali, da DC, obdelane bodisi z niiflumsko kislino ali z resveratrolom (prva deluje kot nesteroidna protivnetna učinkovina, druga pa kot rastlinski antioksidant), pridobijo izrazit tolerogeni fenotip,<sup>23</sup> pri čemer omogoči resveratrol pridobitev DC, ki inducirajo nastanek Tr1 regulacijskih celic T.<sup>24</sup>

## Mehanizmi, preko katerih DC nadzorujejo imunsko reaktivnost

### Indukcija apoptoze naivnih in spominskih limfocitov T ter vzpostavitev T-celične neodzivnosti

Mnoge študije navajajo, da lahko nepopolno aktivirane oz. nezrele DC ob interakciji z alogensko specifičnimi celicami T izzovejo njihovo neodzivnost na kasnejšo stimulacijo z odgovarjajočim Ag, kar razumemo pod pojmom T-celična anergija. Blokada kostimulacijskih molekul B7, vpliv imunosupresivnih citokinov karkšna sta IL-10 ter TGF- $\beta$  oz. gensko spremenjene DC, ki izražajo zvečano stopnjo virusnega IL-10, citotoksičnega T-limfocitnega Ag, vezanega na protitelo (CTLA4)Ig ter liganda Fas (CD95L), lahko inducirajo aloantigensko-specifično T-celično anergijo kakor tudi apoptozo odzivnih celic T in na tak način pomembno prispevajo k zaviranju imunske reaktivnosti.<sup>12,14,25,26</sup> Kot smo omenili, lahko DC z nepopolnim zrelostnim fenotipom pod določenimi pogoji usmerijo razvoj naivnih limfocitov T v anergične celice T, ki se po aktivaciji obnašajo povsem drugače kot bodisi efektorske ali regulacijske celice T. Za anergične celice T je ob stimulaciji T-celičnega receptorja (TCR) značilna izjemno nizka stopnja proliferacije. Prav tako takšne celice niso sposobne izločati večjih količin

imunomodulacijskih citokinov, kot sta IL-2 in IFN- $\gamma$ , ter zelo malo oz. nič IL-4 kakor tudi ne imunosupresivnega IL-10,<sup>17,27</sup> citokin, katerega izločanje je za regulacijske celice T tipa Tr1 značilno v izobilju.<sup>28</sup>

Poleg vloge prenašalca Ag informacije in krojenja T-celičnih odzivov lahko DC preko izražanja določenih površinskih molekul prav tako nastopijo v vlogi efektorskih celic. Ena takšnih molekul je ligand Fas. Po vezavi receptorja Fas na limfocitih T lahko ob zmanjšani prisotnosti molekul B7 na površini DC, slednje privede do apoptoze celic T, zlasti predhodno aktiviranih celic T.<sup>12,26</sup> Dodatno je vloga receptorja Fas večnamenska in odvisna tudi od tipa celic T. Tako ob vezavi liganda Fas pri naivnih celicah T leta povzroči njihovo zmanjšano aktivacijo in proliferacijo, ne pa apoptoze.<sup>29</sup>

Drugače je pri spominskih limfocitih T. Ti potrebujejo namreč zelo malo kostimulacijskih signalov za doseganje polnega aktivacijskega stanja, zaradi česar igrajo zelo pomembno vlogo pri vrstah neželenih imunsko posredovanih procesov, kot je npr. zgodnja zavrnitvena reakcija pri presaditvi alogenskega tkiva.<sup>30</sup> Zaradi izjemnega potenciala aktivacije je dolgo časa veljalo pričanje, da so spominske celice T, izvzete iz možnosti deaktivacije s strani ostalih imunskih akterjev. Pred kratkim pa so dokazali, da lahko nezrele DC, ki konstitutivno predstavljajo Ag spominskim CD8+ celicam T, zavrejo njihove odzive preko mehanizmov delecije in deaktivacije.<sup>31</sup>

### Indukcija regulacijskih celic T

Prej smo omenili, da tako nezrele kot tolerogene DC omogočajo nastanek regulacijskih imunskih odzivov ter da je vrsta T-celičnega odziva, ki ga inducirajo tovrstne DC, odvisna od številnih dejavnikov, ki so vezani na specifično aktivacijsko stanje DC. Danes lahko v grobem trdimo, da nezrele DC zaradi pomanjkanja imunostimulacijskih elementov izzovejo toleranco prek t. i. pasivnih mehanizmov, in sicer predvsem s T-celično anergijo, pri čemer tolerogene DC zaradi imunosupresivnega citokinskega profila in izražanja številnih inhibicijskih molekul preko teh elementov aktivne tolerance v



večji meri omogočajo nastanek regulacijskih celic T (Treg). Regulacijskih celic T poznamo danes že več vrst in jih prepoznamo tako med CD4+ kot tudi CD8+ celicami T. Pomemben mejnik v imunologiji predstavlja odkritje t. i. naravno prisotnih regulacijskih celic T (nTreg), ki nastanejo kot samostojna celična vrsta v priželjcu, s čimer so bile postavljene nove osnove v mehanizmih vzdrževanja periferne tolerance.<sup>32</sup> Druga možnost je, da Treg nastanejo na periferiji pod specifičnimi okoljskimi pogoji iz naivnih celic T, pri čemer pa igrajo pomembno vlogo tolerogene DC. Takšen tip regulacijskih celic T imenujemo pridobljene regulacijske celice T, med katerimi so najbolj opisane celice Tr1.<sup>33</sup> Poznamo pa še številne druge, kot so celice Th3, CD8+CD28—supresorske celice in ostale. Za vzdrževanje kompleksne mreže imunske regulacije je ključnega pomena obojestranska komunikacija med regulacijski limfociti in DC. Tako kot lahko namreč tolerogene DC prispevajo k nastanku regulacijskih limfocitov, lahko le-ti delujejo na druge DC, v katerih izzovejo tolerogene lastnosti, tako se ojača krog imunske tolerance.

## Potencialna terapevtska uporabnost tolerogenih DC

Z namenom vzpostaviti protitumorske imunosti so do danes opravili številne klinične študije (več sto jih je trenutno v teku – vir National Institutes of Health), s pomočjo katerih so dokazali, da je uporaba DC za predstavljanje tumorskih Ag ter stimulacijo imunskega odziva varna in potencialno klinično učinkovita metoda. Funkcijska plastičnost DC pa je spodbudila tudi razmišljanja o možnosti uporabe DC za preprečevanje avtoimunskih bolezni ali kroničnih vnetnih procesov.

Številne predklinične študije, opravljene na različnih živalskih modelih avtoimunskih bolezni kakor tudi transplantacij z uporabo DC z zmanjšano imunostimulacijsko sposobnostjo, so prinesle zelo obetajoče rezultate. Trenutno se strokovno mnenje močno nagiba k prenosu tega znanja v klinično prakso. Pri tem velja poudariti, da velika funkcijska plastičnost DC, v ožjem smi-

slu tudi tolerogenih DC, narekuje uporabo pravilno pripravljenih tolerogenih DC za uporabo pri zdravljenju bolezni, kot je npr. T1D. Znanstveniki danes razumejo, da iste tolerogene DC, ki so zmožne zavreti imunsko reaktivnost na alogenski presadek, morada ne bi bile zmožne nadzirati in ozdraviti stanja avtoimunske bolezni.<sup>34</sup> Pred kratkim so na mišjem modelu T1D dokazali zelo dobro učinkovitost DC, ki so jih zadržali v stanju nezrelosti z uporabo protismiselnih oligodeoksinukletidov (AS-ODN) proti kostimulacijskim molekulam CD40, CD80 in CD86. Takšne DC so pri miših NOD, nagnjenih k razvoju T1D, popolnoma preprečile nastanek avtoimunskega diabetesa.<sup>35</sup> Te in podobne študije so pred kratkim botrovale odobritvi prve faze klinične študije s strani FDA (Food and Drug Administration), za uporabo tolerogenih DC pri odraslih prostovoljcih z razvitim T1D (vir NIH). V konkretnem primeru so pridobili bolnikove levkocite z uporabo afereze ter v pogojih *in vitro* ustvarili DC pod GMP pogoji. Tolerogenost DC so zagotovili z uporabo AS-ODN. Te DC z nizkim izražanjem CD40, CD80 in CD86 so nato vbrizgali bolnikom intradermalno ali subkutano na mestu blizu trebušne slinavke.<sup>34</sup> Mesto vnosa celičnega pripravka je pri tovrstnih posegih zelo pomembna in izbira takšnega anatomskega mesta zaradi obstoja limfnega mikrožilja na tem mestu zagotavlja prenos vbrizganih DC v bezgavke trebušne slinavke. Antigen-ska informacija potrebna za vzpostavitev tolerance, bi prispela do injiciranih DC preko limfe iz okolice pankreasa, njen vir pa bi zagotavljale apoptotične  $\beta$ -celice Langerhansovih otočkov. Na podoben način je pred kratkim opravljena študija z namenom vzpostavitve imunosupresivnih lastnosti DC, uvedla uporabo mikrosfer, v katerih se nahajajo AS-ODN proti prej omenjenim kostimulacijskim molekulam. Namen tega je, da se mikrosfere injicirajo na prej omenjeno anatomsko mesto. Dendritične celice bi te mikrosfere na tem mestu prevzele in na ta način pridobile imunosupresivne lastnosti *in vivo*.<sup>36</sup>

## Praktičen vidik uporabe DC v zdravljenju pri ljudeh

Uporaba DC za celično zdravljenje imunsko-posredovanih bolezni je trenutno v fazi dokazovanja varnosti uporabe tovrstnih terapij pri ljudeh. Večina kliničnih študij, ki so vključevale vakcinacijo z DC je bila do sedaj opravljena na bolnikih z rakom, pri čemer so poročali o pojavu nekaterih neželenih učinkov kljub avtolognosti pripravka. Med temi so bili najpogostejši glavoboli, vročinski simptomi, vtiligo, obstrukcija pljuč in v redkih primerih šok.<sup>37,38</sup> Čez čas so ugotovili, da DC same niso povzročitelji teh neželenih učinkov, ampak so to pripisali sočasni uporabi citokinov, kot sta npr. GM-CSF in IL-2, s katerimi so dopolnjevali zdravljenje.<sup>39</sup>

Poleg specifičnih lastnosti posameznih tipov tolerogenih DC je treba upoštevati tudi biologijo teh celic po vbrizganju. Zaenkrat še namreč ni dokazano, koliko zaporednih aplikacij vodi v zagotovitev daljše oz. trajne sistemske tolerance, z delovanjem na ostale celice imunskega sistema. Ve se, da je življenjska doba DC po vbrizganju v miši omejena in enako se pričakuje pri ljudeh.<sup>40</sup> Ker so DC vrsta celic s kratko življenjsko dobo, je potrebno imeti v mislih morebiten nastanek spominskih regulatornih celic T, oz. v nasprotnem primeru potrebo po periodičnem zdravljenju s tolerogenimi DC. Zaenkrat velja prepričanje, da povzročijo vbrizgane DC nastanek na novo induciranih regulacijskih celic T z omejeno življenjsko dobo, kar narekuje ponavljanje terapije.

Poleg izbire primerne tipa tolerogenih DC za zdravljenje določene vrste bolezni, kar se nanaša na pripravo kakovostnih laboratorijskih protokolov, je naslednji pomemben korak spoštovanje načel dobre proizvodne prakse. Uporaba brezserumskih celičnih medijev in reagentov GMP predstavlja poleg dodatne optimizacije protokolov tudi večji finančni zalogaj. Vsi procesi priprave DC se morajo po današnjih standardih nujno odvijati v prostorih, ki zadoščajo standardoma GMP in GLP (Good Laboratory Practice). Temu primerno pa mora biti tudi osebje, ki z zadostnimi izkušnjami zagotovi neoporečnost pripravka.

## Zaključek

Po dosedanjih rezultatih, kljub številnim izzivom, obeta celično zdravljenje avtoimunskih bolezni s tolerogenimi DC velik potencial. Pri tem se moramo zavedati, da je namen tovrstnih terapij v svoji osnovi celostno in vzročno zdravljenje bolezni. Poglavitna vprašanja postajajo čedalje bolj tehnične in izvedbene narave, in sicer strogo upoštevanje načel GMP in seveda visoki finančni stroški, ki bodo zelo verjetno spremljali tovrstno zdravljenje. Ne glede na številne ovire oz. izzive pa ostaja ideja o bodoči imunoterapiji z imunskimi celicami, kot so DC, ena najpoglavitejših tem naprednega zdravljenja imunsko posredovanih bolezni.

## Literatura

- Banchereau, J. et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18, 767–811 (2000).
- Alvarez, D., Vollmann, E.H. & von Andrian, U.H. Mechanisms and consequences of dendritic cell migration. *Immunity* 29, 325–342 (2008).
- Randolph, G.J., Ochoa, J. & Partida-Sanchez, S. Migration of dendritic cell subsets and their precursors. *Annu Rev Immunol* 26, 293–316 (2008).
- Hawiger, D. et al. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med* 194, 769–779 (2001).
- Steinman, R.M., Turley, S., Mellman, I. & Inaba, K. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med* 191, 411–416 (2000).
- Banchereau, J. & Steinman, R.M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245–252 (1998).
- Sallusto, F. et al. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* 28, 2760–2769 (1998).
- Svajger, U., Anderlueh, M., Jeras, M. & Obermajer, N. C-type lectin DC-SIGN: an adhesion, signaling and antigen-uptake molecule that guides dendritic cells in immunity. *Cell Signal* 22, 1397–1405 (2010).
- Moser, M. & Murphy, K.M. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat Immunol* 1, 199–205 (2000).
- Lutz, M.B. & Schuler, G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol* 23, 445–449 (2002).
- Chang, C.C. et al. Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nat Immunol* 3, 237–243 (2002).
- Suss, G. & Shortman, K. A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis. *J Exp Med* 183, 1789–1796 (1996).
- Keir, M.E., Francisco, L.M. & Sharpe, A.H. PD-1 and its ligands in T-cell immunity. *Curr Opin Immunol* 19, 309–314 (2007).
- Morelli, A.E. & Thomson, A.W. Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nat Rev Immunol* 7, 610–621 (2007).
- Luger, D. et al. Either a Th17 or a Th1 effector response can drive autoimmunity: conditions of disease induction affect dominant effector category. *J Exp Med* 205, 799–810 (2008).
- 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* 179, 1109–1118 (1994).
- Steinbrink, K., Wolff, M., Jonuleit, H., Knop, J. & Enk, A.H. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol* 159, 4772–4780 (1997).
- Faunce, D.E., Terajewicz, A. & Stein-Streilein, J. Cutting edge: in vitro-generated tolerogenic APC induce CD8+ T regulatory cells that can suppress ongoing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 172, 1991–1995 (2004).
- Verginis, P., Li, H.S. & Carayanniotis, G. Tolerogenic semimature dendritic cells suppress experimental autoimmune thyroiditis by activation of thyroglobulin-specific CD4+CD25+ T cells. *J Immunol* 174, 7433–7439 (2005).
- Li, G., Kim, Y.J. & Broxmeyer, H.E. Macrophage colony-stimulating factor drives cord blood monocyte differentiation into IL-10(high)IL-12absent dendritic cells with tolerogenic potential. *J Immunol* 174, 4706–4717 (2005).
- Svajger, U., Obermajer, N., Anderlueh, M., Kos, J. & Jeras, M. DC-SIGN ligation greatly affects dendritic cell differentiation from monocytes compromising their normal function. *J Leukoc Biol* 89, 893–905 (2011).
- Hackstein, H. & Thomson, A.W. Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs. *Nat Rev Immunol* 4, 24–34 (2004).
- Svajger, U., Vidmar, A. & Jeras, M. Niflumic acid renders dendritic cells tolerogenic and up-regulates inhibitory molecules ILT3 and ILT4. *Int Immunopharmacol* 8, 997–1005 (2008).
- Svajger, U., Obermajer, N. & Jeras, M. Dendritic cells treated with resveratrol during differentiation from monocytes gain substantial tolerogenic properties upon activation. *Immunology* 129, 525–535 (2010).
- Lu, L. et al. Genetic engineering of dendritic cells to express immunosuppressive molecules (viral IL-10, TGF-beta, and CTLA4Ig). *J Leukoc Biol* 66, 293–296 (1999).
- Lu, L. et al. Fas ligand (CD95L) and B7 expression on dendritic cells provide counter-regulatory signals for T cell survival and proliferation. *J Immunol* 158, 5676–5684 (1997).
- Steinbrink, K. et al. Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood* 93, 1634–1642 (1999).
- Roncarolo, M.G., Bacchetta, R., Bordignon, C., Narula, S. & Levings, M.K. Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev* 182, 68–79 (2001).
- Strauss, G. et al. CD95 co-stimulation blocks activation of naive T cells by inhibiting T cell receptor signaling. *J Exp Med* 206, 1379–1393 (2009).
- Bingaman, A.W. & Farber, D.L. Memory T cells in transplantation: generation, function, and potential role in rejection. *Am J Transplant* 4, 846–852 (2004).
- Kenna, T.J., Thomas, R. & Steptoe, R.J. Steady-state dendritic cells expressing cognate antigen terminate memory CD8+ T-cell responses. *Blood* 111, 2091–2100 (2008).
- Sakaguchi, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 6, 345–352 (2005).
- Battaglia, M., Gregori, S., Bacchetta, R. & Roncarolo, M.G. Tr1 cells: from discovery to their clinical application. *Semin Immunol* 18, 120–127 (2006).
- Phillips, B., Giannoukakis, N. & Trucco, M. Dendritic cell-based therapy in Type 1 diabetes mellitus. *Expert Rev Clin Immunol* 5, 325–339 (2009).
- Machen, J. et al. Antisense oligonucleotides down-regulating costimulation confer diabetes-preven-

- tive properties to nonobese diabetic mouse dendritic cells. *J Immunol* 173, 4331–4341 (2004).
36. Phillips, B. et al. A microsphere-based vaccine prevents and reverses new-onset autoimmune diabetes. *Diabetes* 57, 1544–1555 (2008).
  37. Saito, H., Frleta, D., Dubsky, P. & Palucka, A.K. Dendritic cell-based vaccination against cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 20, 689–710 (2006).
  38. Ridgway, D. The first 1000 dendritic cell vaccinees. *Cancer Invest* 21, 873–886 (2003).
  39. Dranoff, G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 4, 11–22 (2004).
  40. Wang, T. et al. Inhibition of activation-induced death of dendritic cells and enhancement of vaccine efficacy via blockade of MINOR. *Blood* 113, 2906–2913 (2009).