

UDC 616-006.66:57.086.13:616-097:611.018.46:612.017.1

А.М. Гольцев, Ю.О. Гаєвська*, Т.Г. Дубрава,
М.О. Бондарович, О.Д. Луценко, М.В. Останков

Кріолізат пухлинних клітин: від технології отримання до створення протиракових вакцин

UDC 616-006.66:57.086.13:616-097:611.018.46:612.017.1

A.M. Goltsev, Y.O. Gaevska*, T.G. Dubrava,
M.O. Bondarovich, O.D. Lutsenko, M.V. Ostankov

Cryolysate of Tumor Cells: From Technology of Its Obtaining Up to Creation of Anti-Cancer Vaccines

Реферат: У роботі доведено можливість отримання імунних дендритних клітин (iDC) із мононуклеарів кісткового мозку за умов додавання в культуру гранулоцитарно-макрофагального колонієстимулюючого фактора, інтерлейкіну-4 та кріолізату пухлинних клітин як індуктора їх дозрівання. Джерелом пухлинних антигенів для одержання iDC був кріолізат клітин аденокарциноми Ерліха (АКЕ), який отримували шляхом їх 5-разового заморожування-відтавання. Встановлено, що диференціювання мононуклеарів у імунні дендритні клітини супроводжується втратою CD14-антигена, появою характерних для цих клітин маркерів зрілості (CD83-, CD11c-антигенів) та збільшенням експресії коstimуляторних молекул (CD80, CD86). Результати дослідження дають можливість не тільки оцінити якісні характеристики отриманих у такий спосіб імунних дендритних клітин, але й окреслити перспективи їх застосування в імуннокорекції онкопатології.

Ключові слова: аденокарцинома Ерліха, кріолізат, мононуклеари, імунні дендритні клітини, культивування.

Abstract: The possibility of obtaining immune dendritic cells (iDCs) from bone marrow mononuclear cells has been proven by adding granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-4, and tumor cell cryolysate to the culture as an inducer of their maturation. The source of tumor antigens for obtaining iDCs was a cryolysate of Ehrlich adenocarcinoma cells, which was obtained by 5-fold freeze-thawing. It was established that the differentiation of mononuclear cells into iDCs is accompanied by the loss of the CD14 antigen, the appearance of maturity marker characteristics of these cells (CD83, CD11c antigens) and an increase in the expression of costimulatory molecules (CD80, CD86). The research results enable not only to evaluate the qualitative characteristics of iDCs obtained thereby, but also to outline the prospects of their use in immune correction of oncopathology.

Key words: Ehrlich's ascites carcinoma, cryolysate, mononuclear cells, immune dendritic cells, culturing.

Серед перспективних підходів лікування онкозахворювань особливе місце займає імунотерапія, а саме використання вакцин на основі дендритних клітин (ДК-вакцин) [8, 11, 16]. Виготовлення ДК-вакцин складається з кількох етапів: виділення моноцитів з периферичної крові або кісткового мозку (КМ) пухлиноносія, стимуляція їх цитокінами *in vitro* для диференціювання в незрілі ДК, додавання до культури імуногенного пептиду, що походить з пухлини хворого, продовження культивування до дозрівання ДК і, нарешті, введення отриманих зрілих імунних ДК (iDC) до організму хворого.

Вважається, що найбільш надійним методом отримання ДК із моноцитів є двоетапний спосіб їх стимуляції, запропонований F. Sallusto та A. Lanzavecchia [13]. На першому етапі з моноцитів пе-

Among the promising approaches of cancer treatments, the immune therapy occupies a special place, namely it concerns the use of vaccines based on dendritic cells (DC vaccines) [7, 11, 16]. The production of DC vaccines consists of several stages: isolation of monocytes from the peripheral blood or bone marrow (BM) of a tumor patient, stimulation of them with cytokines *in vitro* for differentiation into immature DCs, addition of an immunogenic peptide derived from the patient's tumor to the culture, continued cultivation until DC maturation, and, finally, introduction of the obtained mature immune DCs (iDCs) into the patient's body.

It is believed that the most reliable way of obtaining the DCs from monocytes is their two-stage stimulation, proposed by F. Sallusto and A. Lanzavecchia [13]. At the first stage, immature DCs

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків, Україна

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

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52
електронна пошта: cryopato@gmail.com

*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavka str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952
e-mail: cryopato@gmail.com

Надійшла 30.03.2024
Прийнята до друку 12.09.2024

Received March, 30, 2024
Accepted September, 12, 2024

© Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, 2024
© Publisher Publishing House 'Akadempriodyka' of the National Academy of Sciences of Ukraine, 2024

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

риферичної крові одержують незрілі ДК шляхом додавання в середовище культивування гранулоцитарно-макрофагальний колоніестимулюючий фактор (ГМ-КСФ) та інтерлейкін-4 (ІЛ-4). Отримані таким чином незрілі ДК мають високу антиген-захоплюючу, але обмежену здатність до презентації антигена.

Для індукції диференціювання незрілих ДК у зрілі іДК використовують різні цитокинові коктейлі, ліганди до Toll-подібних рецепторів, або рецептора CD40 (CD40L) [3, 11]. Крім того, акцентується увага на використанні пухлинних антигенів для навантаження незрілих ДК з метою отримання зрілих іДК з протипухлинною активністю. Джерелом пухлинних антигенів служать: лізати пухлин [12], синтетичні пухлиноспецифічні пептиди [21], пухлинні білки [5], апоптотичні пухлинні клітини [9], нуклеїнові кислоти (ДНК) [18] та загальна матрична рибонуклеїнова кислота (мРНК) пухлинних клітин [7]. При цьому вказується, що аутологічні пухлинні клітини є більш прагматичним джерелом антигенів, ніж алогенні пухлинні клітинні лінії [6]. Вони вже потенційно містять повний набір особистих пухлиноасоційованих неоантигенів пацієнта, зокрема ті, які можуть мати вирішальне значення для відторгнення конкретної пухлини. Аутоантигенний репертуар лізатів пухлинних клітин сприяє і забезпечує більш «таргетовану» активацію імунокомпетентних клітин пухлиноносія, а саме Т-хелперів і цитотоксичних лімфоцитів відносно злякисних структур, що має важливе значення для підвищення ефективності їх знищення [2].

Слід зауважити, що зрілі іДК втрачають фагоцитарну активність, але набувають здатність до презентації саме пухлинних антигенів та стимуляції наївних Т-лімфоцитів до диференціації в зрілі Т-клітини ефектори. Для виконання функції презентації антигенів іДК використовують молекули головного комплексу гістосумісності та коstimуляторні молекули [19].

Мета роботи — опрацювання методологічно-методичних підходів отримання *in vitro* імунних дендритних клітин з мононуклеарів кісткового мозку шляхом їх співкультивування з кріолізатом клітин аденокарциноми Ерліха як джерела пухлинних антигенів.

Матеріали і методи

Миші та клітинна лінія аденокарциноми Ерліха

Роботу проводили на 6-місячних самцях мишей лінії BALB/c, що утримувались у стандартних умовах віварію Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (Харків).

are obtained from peripheral blood monocytes by adding granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and interleukin-4 (IL-4) to the culture medium. The immature DCs obtained thereby have a high antigen-capturing but limited antigen-presenting capacity.

Different cytokine cocktails, Toll-like receptor ligands, or CD40 receptor (CD40L) ligands have been applied to induce differentiation of immature DCs into mature iDCs [2, 11]. In addition, attention is focused on the use of tumor antigens to load immature DCs in order to obtain mature iDCs with antitumor activity. The following sources of tumor antigens are used: tumor lysates [12], synthetic tumor-specific peptides [21], tumor proteins [4], apoptotic tumor cells [9], nucleic acids (DNA) [18], and total mRNA (mRNA) of tumor cells [7]. It is indicated that autologous tumor cells are a more pragmatic source of antigens than allogeneic tumor cell lines [5]. They already potentially contain the full set of the patient's personal tumor-associated neoantigens, in particular those that may be crucial for the rejection of a specific tumor. The autoantigenic repertoire of tumor cell lysates promotes and provides a more 'targeted' activation of the tumor-bearing immune competent cells, namely T-helper and cytotoxic lymphocytes, against malignant structures, which is important for increasing the efficiency of their destruction [1].

It should be noted that mature iDCs lose phagocytic activity, but acquire the ability to present tumor antigens and stimulate naive T lymphocytes to differentiate into mature effector T cells. To perform the function of antigen presentation, iDCs exploit molecules of the major histocompatibility complex and co-stimulatory molecules [19].

The aim of this research was to develop methodological approaches for *in vitro* obtaining the immune dendritic cells from bone marrow mononuclear cells by co-culturing them with cryolysate of Ehrlich ascites carcinoma cells as a source of tumor antigens.

Materials and methods

Mice and Ehrlich ascites carcinoma cell line

The studies were performed in 6-month-old male BALB/c mice kept under standard conditions at the animal house of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine (Kharkiv). The experiments were carried out in accordance with the protocols approved by the Bioethics Committee of the Institute and agreed with the main provisions of the Law of Ukraine 'On the Protection of Animals Against Cruelty' (№3447-IV of 21.02.2006)



Експерименти проведені відповідно до протоколів, схвалених комітетом з біоетики Інституту та узгоджених з основними положеннями Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№3447-IV від 21.02.2006) та «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

Аденокарцинома Ерліха (АКЕ) — це лінія клітин недиференційованої аденокарциноми мишей, що втратила епітеліальний характер, вихідною пухлиною для якої був спонтанний рак молочної залози самок мишей. Мишам ($n = 10$) перещеплювали АКЕ шляхом внутрішньо-черевного введення пухлинних клітин у дозі 5×10^6 клітин/мишу в 0,3 мл фізіологічного розчину (АТ «Галичфарм», Україна). На 7-му добу розвитку АКЕ пухлинні клітини отримували за допомогою шприца з голкою 21G, двічі відмивали фізіологічним розчином від асцитичної рідини шляхом додавання фізіологічного розчину (1:2) та подальшого центрифугування (200 g, 10 хв).

Лізис клітин АКЕ

Клітини АКЕ у концентрації $15,0 \times 10^6$ кл/мл розносили в кріопробірки об'ємом 1 мл (Nunc, Німеччина) і проводили 5 послідовних циклів заморожування зануренням у рідкий азот (-196°C) без кріопротектора та відтавання зразків за умов кімнатної температури ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) протягом 20 хв при постійному шутелюванні ампул до зникнення твердої фази. Кількість життєздатних клітин контролювали за допомогою 0,4% розчину трипанового синього (Sigma, США) із засосуванням світлового мікроскопа «Axio Observer Z1» (Carl Zeiss, Німеччина). Клітинний детрит осаджували шляхом центрифугування (600 g, 10 хв). Надосадову рідину пропускали через міліпоровий фільтр з діаметром пор 0,22 мкм. Загальний білок у кріолізатах пухлинних клітин визначали колориметричним біуретовим методом за допомогою набору «Загальний білок» («Філісіт-Діагностика», Україна). Вимірювання оптичної щільності проводили на спектрофотометрі «Lambda 465» (PerkinElmer, США) при довжині хвилі 540 нм згідно з інструкцією фірми-виробника. Пухлинний кріолізат розфасовували в кріопробірки по 1 мл та зберігали при -20°C у морозильній камері до використання.

Отримання іДК

Отриманий зі стегових кісток мишей аспірат кісткового мозку (КМ) ресуспендували у середовищі «RPMI-1640» (Biowest, Франція) з додаван-

and the 'European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes' (Strasbourg, 1986).

Ehrlich ascites carcinoma (EAC) is a cell line of undifferentiated murine carcinoma that has lost its epithelial character, the initial tumor for which was spontaneous mammary cancer of female mice. Mice ($n = 10$) were transplanted with EAC by intraperitoneal injection of tumor cells at a dose of 5×10^6 cells/mouse in 0.3 ml of saline (JSC 'Galychpharm', Ukraine). On the 7th day of EAC development, tumor cells were obtained using a syringe with a 21G needle, washed twice with saline from ascitic fluid by adding saline (1:2) and subsequent centrifugation (200 g, 10 min).

Lysis of EAC cells

EAC cells at a concentration of 15.0×10^6 cells/ml were distributed into 1 ml cryotubes (Nunc, Germany) and subjected to 5 consecutive cycles of freezing by immersion into liquid nitrogen (-196°C) without cryoprotectant and thawing of the samples at room temperature ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) for 20 min with constant shaking of the vials until the solid phase disappeared. The number of viable cells was monitored using 0.4% trypan blue solution (Sigma, USA) using a light microscope 'Axio Observer Z1' (Carl Zeiss, Germany). Cell debris was precipitated by centrifugation (600 g, 10 min). The supernatant was passed through a millipore filter with a pore diameter of 0.22 μm . Total protein in tumor cell cryolysates was determined by the colorimetric biuret test using the 'Total Protein' kit (Filisit-Diagnostics, Ukraine). Optical density was measured on a 'Lambda 465' spectrophotometer (PerkinElmer, USA) at a 540 nm wavelength according to the manufacturer's instructions. The tumor cryolysate was placed in 1 ml cryotubes and stored at -20°C in a freezer until use.

iDC Obtaining

The bone marrow (BM) aspirate obtained from the femurs of mice was resuspended in 'RPMI-1640' medium (Biowest, France) with the addition of 3% fetal calf serum (FCS) (Biowest) and 2% sodium citrate (Sigma-Aldrich, USA) (hereinafter referred to as the working medium) and passed through a nylon filter with a pore diameter of 100 μm (Falcon, USA), centrifuged (300g, 10 min) and resuspended in the working medium. Mononuclear cells (MNCs) were isolated by centrifugation of the BM suspension in a density gradient (1.077 g/ml) of a 76% Trazograf solution (Unique Pharmaceutical Laboratories, India) [8].



ням 3% ембріональної телячої сироватки (ЕТС) (Biowest) і 2% цитрату натрію (Sigma-Aldrich, США) (далі в тексті — робоче середовище) та пропускали через нейлоновий фільтр з діаметром пор 100 мкм (Falcon, США), центрифугували (300g, 10 хв) і ресуспендували у робочому середовищі. Мононуклеарні клітини (МНК) виділяли за допомогою центрифугування суспензії КМ у градієнті щільності (1,077 г/мл) розчину 76% «Тразографа» («Юнік Фармасьютикал Лабораторіз», Індія) [1].

Культивування МНК здійснювали у середовищі RPMI-1640 з додаванням 10% ЕТС і 1%-го розчину антибіотиків (100 од/мл пеніциліну, 0,1 мг/мл стрептоміцину) у пластикових чашках Петрі з діаметром 3 см (посівна доза 1×10^7 клітин/чашку) [10]. Клітини культивували при 37°C у атмосфері 5%-го 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). Його вносили на 1-шу та 3-тю доби культивування. На 5-ту добу культивування з чашок відбирали 0,5 культурального середовища і додавали 3 мл свіжого культурального середовища з ГМ-КСФ, ІЛ-4 та кріолізатами пухлинних клітин, які містили різні концентрації білка (Л1 – 0,5 мг білка / мл або Л2 – 1,0 мг білка / мл). Застосування таких концентрацій було обумовлено співвідношенням однієї ДК до лізату з трьох пухлинних клітин (тобто 1:3), що дало змогу отримати іДК *in vitro*. У якості контролю в чашки Петрі вносили 3 мл свіжого культурального середовища зі 100 нг/мл ліпополісахариду (ЛПС) (O26:B6, E.coli, Sigma Aldrich, St Louis, MO, США). Його використовували як неспецифічне антигенне навантаження при одержанні ДК. Інкубацію клітин з переліченими активаторами дозрівання ДК проводили протягом 48 годин.

У роботі було сформовано наступні дослідні групи ($n = 5$ у кожній): 1 — МНК + ГМ-КСФ, ІЛ-4 (незрілі ДК); 2 — МНК + ГМ-КСФ, ІЛ-4 + Л1 (іДК); 3 — МНК + ГМ-КСФ, ІЛ-4 + Л2 (іДК); 4 — МНК + ГМ-КСФ, ІЛ-4 + ЛПС.

На 7-му добу культивування МНК було отримано іДК, які збирали піпеткою Пастера, а частину прикріплених клітин обережно знімали скрепером, відмивали дворазовим центрифугуванням (200g, 10 хв) у 5 мл фосфатно-сольового буфера (Merck Sigma-Aldrich, Німеччина). За допомогою камери Горяєва проводили підрахунок клітин. Оцінку їхньої життєздатності здійснювали шляхом суправітального фарбування

MNCs were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% ETC and 1% antibiotic solution (100 units/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin) in 3 cm diameter plastic Petri dishes (1×10^7 cells/dish seeding dose) [10]. Cells were cultured at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂. After 2 hours, the medium with non-adherent cells was removed and 3 ml of fresh culture medium containing GM-CSF (20 ng/ml) and IL-4 (5 ng/ml) (Sigma-Aldrich, United Kingdom) was added. It was added on the 1st and 3rd days of culture. On the 5th day of incubation, 0.5 ml of culture medium was removed from the dishes and 3 ml of fresh culture medium with GM-CSF, IL-4 and tumor cell cryolysates containing different protein concentrations were added (L1 – 0.5 mg protein/ml or L2 – 1.0 mg protein/ml). The use of such concentrations was due to the ratio of one DC to the lysate from three tumor cells (i.e. 1:3), which made it possible to obtain iDC *in vitro*. As a control, 3 ml of fresh culture medium with 100 ng/ml lipopolysaccharide (LPS) (O26:B6, E.coli, Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) was added to the Petri dishes. It was used as a non-specific antigenic load when obtaining DCs. The cells with the listed activators of DC maturation were incubated for 48 hours.

The following experimental groups were formed in the work ($n = 5$ in each): 1 – MNC + GM-CSF, IL-4 (immature DCs); 2 – MNC + GM-CSF, IL-4 + L1 (iDCs); 3 – MNC + GM-CSF, IL-4 + L2 (iDCs); 4 – MNC + GM-CSF, IL-4 + LPS.

On the 7th day of MNC cultivation, iDCs were obtained, which were collected with a Pasteur pipette, and some of the attached cells were carefully removed with a scraper, washed by centrifugation twice (200g, 10 min) in 5 ml of phosphate-buffered saline (Merck Sigma-Aldrich, Germany). Cells were counted using a Goryaev chamber. Their viability was assessed by supravital staining with 0.4% trypan blue solution (Sigma, USA). At all stages of cell cultivation, their quantitative and qualitative characteristics were observed and evaluated using an inverted microscope 'Axiovert 40C' (Carl Zeiss, Germany). The expression of markers on the cell surface was determined by flow cytometry using monoclonal antibody kits against the molecules CD14-FITC (No. 553739, Becton Dickinson, USA), CD83-PE (No. 558205, Becton Dickinson), CD11c-FITC (No. 557400, Becton Dickinson), CD80-FITC (No. 104706, Biolegend, USA), CD86-FITC (No. 105110, Biolegend, USA) and corresponding isotypic controls on a flow cytometer 'FACSCalibur' (Becton Dickinson). There were analyzed 10,000 cells in each sample. The obtained data were analyzed using



0,4% розчином трипанового синього (Sigma, США). На всіх етапах культивування клітин за допомогою інвертованого мікроскопа «Axiovert 40C» (Carl Zeiss, Німеччина) спостерігали і оцінювали їхні кількісно-якісні характеристики.

Експресію маркерів на поверхні клітин визначали методом протокової лазерної цитометрії за допомогою наборів моноклональних антитіл проти молекул CD14-FITC (№553739, Becton Dickinson, США), CD83-PE (№558205, Becton Dickinson), CD11c-FITC (№557400, Becton Dickinson), CD80-FITC (№104706, Biolegend, США), CD86-FITC (№105110, Biolegend, США) та відповідних ізотипічних контролів на протоковому цитофлюориметрі «FACSCalibur» (Becton Dickinson). У кожній пробі аналізували 10 000 клітин. Отримані дані аналізували за допомогою програми «WinMDI 2.8» (Joseph Trotter, Scripps Institute, La Jolla, США).

Статистичну обробку даних проводили з використанням електронних таблиць «Excel 2010» (Microsoft, США) 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 з контрольною групою проводилося методом Манна-Уїтні. Відмінності вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення

З метою формування зрілих іДК *in vitro*, незрілі ДК навантажували пухлинними антигенами, а саме кріолізатом клітин АКЕ. Для отримання кріолізату клітини АКЕ в концентрації $14,6 \times 10^6$ кл/мл піддавали п'яти циклам заморожування-відтавання (табл. 1).

За результатами аналізу життєздатності та кількості клітин АКЕ при використанні 5 циклів заморожування-відтавання (табл. 1) спостерігалось поступове зменшення цих показників порівняно з початковими значеннями (нативом). При цьому, вже після 3-го циклу заморожування-відтавання не залишилося життєздатних клітин АКЕ, але їхня кількість (за підрахунком у камері Горяєва) знизилася майже в 5 разів від нативу. Після 5-го циклу заморожування-відтавання залишилося не більше 1,5% клітин. Концентрація загального білка після 5-го циклу заморожування-відтавання АКЕ в отриманому кріолізаті складала 14,1 [13,5; 14,5] мг/мл.

Як вказувалося вище, вирощування іДК складається з двох етапів — формування незрілих ДК та наступне дозрівання у іДК під впливом імуногенних стимулів. Дійсно, при культивуван-

the program 'WinMDI 2.8' (Joseph Trotter, Scripps Institute, La Jolla, USA).

Statistical data processing was performed using the spreadsheet 'Excel 2010' (Microsoft, USA) and the program 'Statistica 10.0' (StatSoft, USA). Quantitative data were processed using the variational statistics with the calculation of the median (Me) and interquartile range [25; 75]. Comparison of independent samples with the control group was performed using the Mann-Whitney test. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results and discussion

In order to form mature iDCs *in vitro*, immature DCs were loaded with tumor antigens, namely, cryolysate of EAC cells. To obtain the cryolysate, EAC cells at a concentration of 14.6×10^6 cells/ml were subjected to five freeze-thaw cycles (Table 1).

According to the results of the analysis of viability and number of EAC cells using 5 freeze-thaw cycles (Table 1), a gradual decrease in these indices was observed compared to the initial values (native). At the same time, after the 3rd freeze-thaw cycle, there were no viable EAC cells left, but their number (as calculated in the Goryaev chamber) decreased almost 5 times from the native. After the 5th freeze-thaw cycle, no more than 1.5% of cells remained. The total protein concentration after the 5th freeze-thaw cycle of EAC in the resulting cryolysate was 14.1 [13.5; 14.5] mg/ml.

As indicated above, iDC cultivation consists of two stages – formation of immature DCs and subsequent maturation into iDCs under the influence of immunogenic stimuli. Indeed, when cultivating MNCs in the presence of GM-CSF, IL-4 and maturation activators in the form of cryolysates of EAC cells in different concentrations, iDCs were obtained, the viability and number of which are shown in Table 2. High viability (89–91%) of DCs was established in all experimental groups. Interestingly, the maximum number of DCs obtained (72.5% of the initial number of cells plated on plastic) was observed in group 3 using the maximum protein concentration in the cryolysate – L2. That is, a higher concentration of tumor protein induces the formation of antitumor iDCs to a greater extent. These data guide oncologists to the need to choose the 'optimal' doses of immunogenic substrate when creating antitumor vaccines.

An important and necessary step in the creation of antitumor vaccines is the confirmation of the formed iDC phenotypic features. It is known that iDCs are usually identified by the presence of CD11c⁺, CD18⁺, CD40⁺, CD54⁺, CD58⁺, CD83⁺, CD80⁺, CD86⁺, HLA-DR⁺, CCR7-markers and the absence



Таблиця 1. Кількість клітин АКЕ та їхня життєздатність після проведення п'яти циклів заморожування-відтавання, Me [25; 75], n = 10

Table 1. Number of EAC cells and their viability after five freeze-thaw cycles, Me [25; 75], n = 10

Показник Parameter	Натив Native	Номер циклу заморожування-відтавання Number of freeze-thaw cycle				
		1	2	3	4	5
Кількість клітин, × 10 ⁶ кл/мл (Me [25; 75]) Number of cells, × 10 ⁶ cells/ml (Me [25; 75])	14,6 [14,1; 16,4]	5,0 [4,6; 5,7]*	4,0 [3,7; 4,7]*	2,6 [2,2; 3,3]*	0,8 [0,5; 0,9]*	0,2 [0,1; 0,3]*
Життєздатність клітин, % (Me [25; 75]) Cell viability, % (Me [25; 75])	95,5 [93,5; 97,0]	29,5 [28,3; 32,8]*	2,0 [2,0; 2,0]*	0,0 [0,0; 0,0]*	0,0 [0,0; 0,0]*	0,0 [0,0; 0,0]*

Примітка: * – різниця значуща порівняно з нативом, p < 0,05.

Note: * – significant difference compared to native, p < 0.05

ні МНК у присутності ГМ-КСФ, ІЛ-4 і активаторів дозрівання у вигляді кріолізатів клітин АКЕ у різних концентраціях були отримані іДК, життєздатність і кількість яких наведено в табл. 2. Встановлена висока життєздатність (89–91%) ДК у всіх дослідних групах. Цікаво, що максимальна кількість отриманих ДК (72,5% від початкової кількості посаджених на пластик клітин) спостерігалася у групі 3 з використанням максимальної концентрації білка в кріолізаті — Л2. Тобто, вища концентрація пухлинного протеїну більшою мірою індукує формування протипухлинних іДК. Ці дані орієнтують клініцистів-онкологів на необхідність вибору «оптимальних» доз імуногенного субстрату при створенні протипухлинних вакцин.

of the membrane CD14-antigen [19, 20]. Unlike immature DCs, immune DCs express the surface molecule CD83 and a higher density of expression of the markers: CD40, CD80, CD86 and HLA-DR [14].

In the presented study, the following markers were used to determine the phenotype of iDCs: CD14/CD83, CD11c, CD80, CD86 (Fig. 1). The results of cytofluorimetric analysis of the obtained DCs in culture without the addition of maturation inducers indicate the formation of almost 90% of DCs with an immature phenotype (Fig. 1). Indeed, only 7.4% [4.7; 8.6] cells had the CD14-CD83+ phenotype characteristic of mature cells. The content of CD11c⁺ cells in the DC population was 33.5% [32.5; 39.7]. An important role in the manifesta-

Таблиця 2. Показники ДК, отриманих *in vitro* з МНК на 7-му добу культивування, Me [25; 75], n = 5

Table 2. DC values obtained *in vitro* from MNCs on the 7th day of cultivation, Me [25; 75], n = 5

Групи Group	Умови культивування Culturing conditions	Життєздатність клітин, % Cell viability, %	Кількість ДК, отриманих на 7-му добу культивування Number of DCs, obtained on day 7 of culturing	
			абсолютна, × 10 ⁶ absolute, × 10 ⁶	% від посаджених на чашку % of plated per dish
1	МНК + ГМ-КСФ, ІЛ-4 (незрілі ДК) MNC + GM-CSF, IL-4 (immature DC)	91 [86; 95]	5,2 [4,9; 5,3]	52,5
2	МНК + ГМ-КСФ, ІЛ-4 + Л1 (іДК) MNC + GM-CSF, IL-4 + L1 (iDC)	89 [84; 90]	5,8 [5,8; 6,1]*	60,0
3	МНК + ГМ-КСФ, ІЛ-4 + Л2 (іДК) MNC + GM-CSF, IL-4 + L2 (iDC)	90 [88; 90]	7,3 [7; 7,4]*	72,5
4	МНК + ГМ-КСФ, ІЛ-4 + ЛПС (іДК) MNC + GM-CSF, IL-4 + LPS (iDC)	89 [85; 91]	5,6 [5,5; 5,6]	55,7

Примітки: кількість посаджених на чашку Петрі клітин складала 10 × 10⁶ кл; Л1 – 0,5 мг білка / мл та Л2 – 1,0 мг білка / мл; * – різниця є значущою порівняно з аналогічними показниками групи 1 (незрілі ДК), p < 0,05.

Notes: the number of cells plated on a Petri dish was 10 × 10⁶ cells; L1 – 0.5 mg protein/ml and L2 – 1.0 mg protein/ml; * – the difference is significant compared to the similar values of group 1 (immature DCs), p < 0.05.

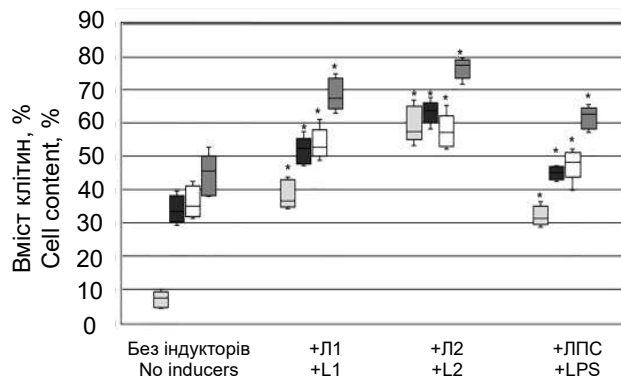


Важливим і необхідним кроком створення протипухлинних вакцин є підтвердження сформованих іДК фенотипових ознак. Відомо, що іДК зазвичай ідентифікують за присутністю CD11c⁻, CD18⁻, CD40⁻, CD54⁻, CD58⁻, CD83⁻, CD80⁻, CD86⁻, HLA-DR⁻, CCR7-маркерів та відсутністю мембранного CD14-антигена [19, 20]. На відміну від незрілих ДК, імунні ДК експресують поверхневі молекули CD83 та більшу щільність експресії маркерів: CD40, CD80, CD86 і HLA-DR [14].

У представленому дослідженні для визначення фенотипу іДК було використано такі маркери як: CD14/CD83, CD11c, CD80, CD86 (рис. 1). Результати цитофлуориметричного аналізу отриманих ДК у культурі без додавання індукторів дозрівання свідчать про формування майже 90% ДК з незрілим фенотипом (рис. 1). Дійсно, тільки 7,4% [4,7; 8,6] клітин мали характерний для зрілих клітин фенотип CD14⁻CD83⁺. Вміст CD11c⁺-клітин у популяції ДК становив 33,5% [32,5; 39,7]. Важлива роль у прояві функціонального потенціалу ДК відводиться поверхневим мембранним рецепторам CD80 й CD86 [10]. Отримані дані свідчать, що на проміжному етапі культивування кількість клітин, які експресували на своїй поверхні ко-стимуляторні молекули CD80 та CD86, становила 35,1 [32,5; 39,7] та 45,6 [38,5; 47,8] % відповідно.

Для формування іДК з протипухлинною активністю використовуються різні види пухлинних антигенів [5, 12, 21]. У даній роботі для отримання іДК було застосовано криолізати клітин АКЕ у різних концентраціях, що мало дозозалежний ефект щодо вмісту ДК з характерним маркером зрілості — CD83. Так, вміст CD14⁻CD83⁺-клітин при додаванні Л1 у культуру МНК збільшувався в 5,0, а Л2 — у 7,8 разів порівняно з показником незрілих ДК, що отримані без індукторів дозрівання (рис. 1). Тобто, показано концентраційну залежність і здатність Л2 максимально стимулювати експресію функціонально важливої CD83-молекули. Отримані дані свідчать, що ДК відповідають на дію криолізатів як індукторів формування іДК більшим підвищенням кількості CD14⁻CD83⁺-клітин порівняно з ЛПС (рис. 1).

Ступінь експресії мембранного маркера CD83 заслуговує певної уваги. У роботі W. Cao та співавторів [4] показано, що CD83-маркер експресується у вигляді заздалегідь сформованого ендотарного білка моноцитів, макрофагів та незрілих ДК. Важливо, що поверхнева експресія цієї структури швидко індукується на мембрані при переході ДК з неактивованих в активовані іДК. Більш того, наші результати демонструють чіт-



Фенотип клітин за маркерами CD83, CD11c, CD80, CD86, одержаними в культурі з МНК ($n = 5$); * — різниця значуща порівняно з аналогічними показниками групи 1, $p < 0,05$: ■ — CD14⁻CD83⁺, ■ — CD11c⁺, □ — CD80⁺, ■ — CD86⁺.

Cell phenotype according to markers CD83, CD11c, CD80, CD86, obtained in culture with MNCs ($n = 5$); * — significant difference compared to similar values of group 1, $p < 0.05$: ■ — CD14⁻CD83⁺, ■ — CD11c⁺, □ — CD80⁺, ■ — CD86⁺.

tion of the functional potential of DCs is assigned to the surface membrane receptors CD80 and CD86 [10]. The findings demonstrate that at the intermediate stage of cultivation, the number of cells that expressed the co-stimulatory molecules CD80 and CD86 on their surface was 35.1 [32.5; 39.7] and 45.6 [38.5; 47.8] %, respectively.

For the formation of iDCs with antitumor activity, various types of tumor antigens are used [4, 12, 21]. In this work, cryolysates of EAC cells in different concentrations were used to obtain iDCs, which had a dose-dependent effect on the content of DCs with a characteristic marker of maturity — CD83. Thus, the content of CD14⁻CD83⁺ cells increased by 5.0 times when L1 was added to the MNC culture, and L2 — by 7.8 times compared to the value of immature DCs obtained without maturation inducers (Fig. 1). That is, the concentration dependence and the ability of L2 to maximally stimulate the expression of the functionally important CD83 molecule are shown. The obtained data indicate that DCs respond to the action of cryolysates as inducers of iDC formation with a greater increase in the number of CD14⁻CD83⁺ cells compared to LPS (Fig. 1).

The degree of expression of the membrane marker CD83 deserves some attention. In the work of W. Cao *et al.* [3] it was shown that the CD83 marker is expressed as a preformed endocytic protein of monocytes, macrophages and immature DCs. Importantly, the surface expression of this structure is rapidly induced on the membrane during the transition of DCs from unactivated to activated iDCs. Moreover, our results demonstrate a clear dose-dependent activity of the expression



ку дозозалежну активність експресії цього маркера — збільшення концентрації пухлинного лізату (Л2) приводило до утворення максимальної (порівняно з Л1 та ЛПС) не тільки загальної кількості ДК (табл. 2), а і вмісту CD14⁺CD83⁺-клітин (рис. 1).

Обидві дози пухлинного лізату були значимі для експресії специфічного для зрілих іДК маркера CD11c (рис. 1). Так, при використанні Л2 вміст CD11c⁺-ДК значущо перевищував (63,8 [62,1; 64,5] %) показник при застосуванні Л1 (52,4 [48,5; 53,6] %). Як видно з рис. 1, ЛПС мав значущо нижчий іДК-індуцибельний потенціал (45,1 [43,4; 46,8] %) порівняно з Л2 (63,8 [62,1; 64,5] %). Таким чином, отримані дані підкреслюють максимальну стимуляцію дозрівання ДК із застосуванням Л2.

Певна значимість у реалізації функціонального потенціалу ДК відводиться поверхневим молекулам коstimуляції, а саме B7 (CD80/CD86) [20]. Ці мембранні білки віднесено до суперродини імуноглобулінів, лігандами яких є молекули CD28 і CTLA-4, що експресуються на Т-лімфоцитах. Саме контакт CD80/CD86-рецепторів з вказаними лігандами забезпечує проведення коstimуляторних сигналів і активацію, що супроводжується проліферацією та диференціюванням Т-клітин. Коstimуляція через CD28-структури забезпечує зростання та виживання Т-клітин, тоді як зв'язування з CTLA-4 інгібує Т-клітинну відповідь [17]. Крім того, високий ступінь експресії CD80 на мембрані ДК є надзвичайно важливим для прояву її імуних властивостей, оскільки ця молекула взаємодіє і «нейтралізує» PD-L1, блокуючи його зв'язування з рецептором PD-1 на Т-клітинах і запобігає пригніченню активності Т-клітин [15].

У реалізації протипухлинної активності імуноної системи ліганд-рецепторні взаємодії мають надважливе значення. Як видно на рис. 1, при додаванні криолізату пухлинних клітин у культуральне середовище рівні експресії на мембрані ДК коstimуляторних молекул CD80 та CD86 значно збільшувалися порівняно як з незрілими ДК (без індукторів), так і з ЛПС-стимульованими (рис. 1). Так, додавання Л1, Л2 та фактора термінального диференціювання (ЛПС) сприяло підвищенню вмісту CD80⁺-ДК, що становило 52,7 [51,4; 54,9]; 57,2 [53,7; 59,2] та 48,4 [47,6; 50,1] % відповідно порівняно з незрілими ДК (35,1 [32,5; 39,7] %). Вміст CD86⁺-ДК підвищувався з 45,6 [38,5; 47,8] (незрілі ДК) до 67,4 [65,8; 72,5] % за умов використання Л1, до 77,4 [75,3; 78,4] — Л2 і до 62,8 [59,1; 63,4] % при додаванні ЛПС.

of this marker – an increased concentration of tumor lysate (L2) led to the formation of the maximum (compared to L1 and LPS) not only the total number of DCs (Table 2), but also the content of CD14⁺CD83⁺ cells (Fig. 1).

Both doses of tumor lysate were significant for the expression of the mature iDC-specific marker CD11c (Fig. 1). Thus, when using L2, the content of CD11c⁺-DCs significantly exceeded (63.8 [62.1; 64.5] %) the value when using L1 (52.4 [48.5; 53.6] %). As Fig. 1 shows, LPS had a significantly lower iDC-inducible potential (45.1 [43.4; 46.8] %) compared to L2 (63.8 [62.1; 64.5] %). Thus, the obtained data emphasize the maximum stimulation of DC maturation with the use of L2.

A certain importance in implementing the functional potential of DCs is assigned to surface co-stimulation molecules, namely B7 (CD80/CD86) [20]. These membrane proteins are classified as a superfamily of immunoglobulins, the ligands of which are CD28 and CTLA-4 molecules expressed on T lymphocytes. It is the contact of CD80/CD86 receptors with these ligands that ensures the conduction of co-stimulatory signals and activation, which is accompanied by proliferation and differentiation of T cells. Co-stimulation via CD28 structures promotes T-cell growth and survival, whereas binding to CTLA-4 inhibits T-cell responses [17]. In addition, the high expression of CD80 on the DC membrane is crucial for the expression of its immune properties, as this molecule interacts with and 'neutralizes' PD-L1, blocking its binding to the PD-1 receptor on T cells and preventing the inhibition of T-cell activation [15].

In the implementation of the immune system antitumor activity, ligand-receptor interactions are of paramount importance. As Fig. 1 demonstrates, when adding tumor cell cryolysate to the culture medium, the expression rates of the co-stimulatory molecules CD80 and CD86 on the DC membrane significantly increased compared to both immature DCs (without inducers) and LPS-stimulated ones (Fig. 1). Thus, the addition of L1, L2 and terminal differentiation factor (LPS) contributed to a rise in the content of CD80⁺-DCs, which was 52.7 [51.4; 54.9]; 57.2 [53.7; 59.2] and 48.4 [47.6; 50.1] %, respectively, compared to immature DCs (35.1 [32.5; 39.7] %). The content of CD86⁺-DCs increased from 45.6 [38.5; 47.8] (immature DCs) to 67.4 [65.8; 72.5] % under the conditions of using L1, to 77.4 [75.3; 78.4] – L2 and to 62.8 [59.1; 63.4] % when adding LPS.

Conclusion

Thus, our studies proved the possibility of iDCs *in vitro* growing, which were obtained



Висновок

Таким чином, у роботі доведено можливість вирощування *in vitro* іДК, отриманих з МНК КМ, при застосуванні у якості індукторів дозрівання кріолізатів пухлинних клітин. Встановлено, що ступінь індукуючого потенціалу пухлинних кріолізатів у формуванні іДК залежить від концентрації пухлинних антигенів. Належність ДК до імунних було підтверджено за фенотиповими ознаками, що характерні для цих клітин. Зростання концентрації білка в лізаті пухлинних клітин, що додавали в культуру, приводило до підвищення рівня експресії CD11c, CD83, а також коstimуляторних молекул CD80, CD86. Використання Л2 порівняно з Л1 або ЛПС забезпечувало формування більшої кількості іДК. Отже, проведені дослідження дозволили підібрати умови одержання іДК *in vitro* з МНК КМ із застосуванням кріолізату клітин АКЕ як джерела пухлинних антигенів.

Проведені дослідження свідчать про можливість використання ультранизьких температур (-196°C) як фактора дезінтеграції пухлинних клітин і отримання їх кріолізату АКЕ при використанні п'яти циклів заморожування-відтавання. Це відповідає концепції про зміну імуногенних характеристик клітин після впливу ультранизьких температур як модифікатора стану пухлинних клітин та структур імунної системи організму, що формує імунну відповідь на пухлинні антигени.

Література

1. Гольцев А.М., Дубрава Т.Г., Ямпольська К.Є., та інш. Оптимізація методу одержання незрілих дендритних клітин для терапевтичного застосування. Фізіол. журн. 2018; (6): 33–40.
2. Alspach E, Lussier DM, Miceli AP, et al. MHC-II neoantigens shape tumour immunity and response to immunotherapy. Nature. 2019; 574(7780): 696-701.
3. Bourque J, Hawiger D. Activation, amplification, and ablation as dynamic mechanisms of dendritic cell maturation. Biology (Basel). [Internet]. 2023 May 14 [Cited 20.05.2024]; 12(5): 716. Available from: <https://www.mdpi.com/2079-7737/12/5/716>
4. Cao WJ, Dai JY, Dong WJ, et al. [Effects of Dasatinib on the maturation of monocyte-derived dendritic cells derived from healthy donors and chronic myelogenous leukemia patients]. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi. 2022; 30(3): 677-87. Chinese.
5. Date I, Koya T, Sakamoto T, et al. Interferon- α -induced dendritic cells generated with human platelet lysate exhibit elevated antigen presenting ability to cytotoxic T lymphocytes. Vaccines (Basel) [Internet]. 2020 Dec 24 [Cited 20.05.2024]; 9(1): 10. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-393X/9/1/10>
6. 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 20.05.2024]; 6(2):

from BM MNCs being used as inducers of tumor cell cryolysates maturation. It was established that the degree of inducing potential of tumor cryolysates in the formation of iDCs depended on the concentration of tumor antigens. The belonging of DCs to immune cells was confirmed by phenotypic characteristic of these cells. An increase in the protein concentration in the lysate of tumor cells added to the culture led to a rise in the expression rate of CD11c, CD83, as well as co-stimulatory molecules CD80, CD86. The use of L2 compared to L1 or LPS ensured the formation of a greater number of iDCs. Thus, the conducted research allowed us to select the conditions for obtaining iDCs *in vitro* from MNCs of CM using cryolysate of EAC cells as a source of tumor antigens.

The performed investigations indicate the possibility of using ultralow temperatures (-196°C) as a factor for disintegration of tumor cells and obtaining their cryolysate of EAC cells using five freeze-thaw cycles. This corresponds to the concept of a change in the immunogenic characteristics of cells after exposure to ultralow temperatures as a modifier of the state of tumor cells and structures of the body's immune system, that forms an immune response to tumor antigens.

References

1. Alspach E, Lussier DM, Miceli AP, et al. MHC-II neoantigens shape tumour immunity and response to immunotherapy. Nature. 2019; 574(7780): 696-701.
2. Bourque J, Hawiger D. Activation, amplification, and ablation as dynamic mechanisms of dendritic cell maturation. Biology (Basel). [Internet]. 2023 May 14 [Cited 20.05.2024]; 12(5): 716. Available from: <https://www.mdpi.com/2079-7737/12/5/716>
3. Cao WJ, Dai JY, Dong WJ, et al. [Effects of Dasatinib on the maturation of monocyte-derived dendritic cells derived from healthy donors and chronic myelogenous leukemia patients]. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi. 2022; 30(3): 677-687. Chinese.
4. Date I, Koya T, Sakamoto T, et al. Interferon- α -induced dendritic cells generated with human platelet lysate exhibit elevated antigen presenting ability to cytotoxic T lymphocytes. Vaccines (Basel) [Internet]. 2020 Dec 24 [Cited 20.05.2024]; 9(1): 10. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-393X/9/1/10>
5. 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 20.05.2024]; 6(2): MMT20. Available from: <https://www.futuremedicine.com/doi/full/10.2217/mmt-2018-0010>
6. Dorrie J, Schaft N, Schuler G, Schuler-Thurner B. Therapeutic cancer vaccination with ex vivo mna-transfected dendritic cells-an update. Pharmaceuticals [Internet]. 2020 Jan 23 [Cited 20.05.2024]; 12(2): 92. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4923/12/2/92>



- MMT20. Available from: <https://www.futuremedicine.com/doi/full/10.2217/mmt-2018-0010>
7. Dorrie J, Schaft N, Schuler G, Schuler-Thurner B. Therapeutic cancer vaccination with ex vivo rna-transfected dendritic cells-an update. *Pharmaceutics* [Internet]. 2020 Jan 23 [Cited 20.05.2024]; 12(2): 92. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4923/12/2/92> doi: 10.3390/pharmaceutics12020092
 8. Gardner A, de Mingo Pulido Á, Ruffell B. Dendritic cells and their role in immunotherapy. *Front Immunol* [Internet]. 2020 May 21 [Cited 20.05.2024]; 11: 924. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2020.00924/full>
 9. Jarnjak-Jankovic S, Pettersen RD, Saebøe-Larssen S, et al. Preclinical evaluation of autologous dendritic cells transfected with mRNA or loaded with apoptotic cells for immunotherapy of high-risk neuroblastoma. *Cancer Gene Ther.* 2005; 12(8): 699-707.
 10. Obermaier B, Dauer M, Hertzen J, et al. Development of a new protocol for 2-day generation of mature dendritic cells from human monocytes. *Biol Proced Online.* 2003; 5: 197-203.
 11. Perez CR, De Palma M. Engineering dendritic cell vaccines to improve cancer immunotherapy. *Nat Commun* [Internet]. 2019 Nov 27 [Cited 20.05.2024]; 10(1): 5408. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-019-13368-y>
 12. Rapp M, Grauer OM, Kamp M, et al. A randomized controlled phase II trial of vaccination with lysate-loaded, mature dendritic cells integrated into standard radiochemotherapy of newly diagnosed glioblastoma (GlioVax): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* [Internet]. 2018 May 25 [Cited 20.05.2024]; 19(1): 293. Available from: <https://trialsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13063-018-2659-7>
 13. 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.
 14. Sorg RV, Ozcan Z, Brefort T, et al. Clinical-scale generation of dendritic cells in a closed system. *J Immunother.* 2003; 26(4): 374-83.
 15. Sugiura D, Maruhashi T, Okazaki IM, et al. Restriction of PD-1 function by cis-PD-L1/CD80 interactions is required for optimal T cell responses. *Science.* 2019; 364(6440): 558-66.
 16. 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 Mar 29 [Cited 20.05.2024]; 12: 641307. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2021.641307/full>
 17. Ueno H, Klechevsky E, Morita R, et al. Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol Rev.* 2007; 219: 118-42.
 18. Van Tendeloo VF, Ponsaerts P, Lardon F, et al. Highly efficient gene delivery by mRNA electroporation in human hematopoietic cells: superiority to lipofection and passive pulsing of mRNA and to electroporation of plasmid cDNA for tumor antigen loading of dendritic cells. *Blood.* 2001; 98(1): 49-56.
 19. Wang Y, Xiang Y, Xin VW, et al. Dendritic cell biology and its role in tumor immunotherapy. *J Hematol Oncol* [Internet]. 2020 Aug 3 [Cited 20.05.2024]; 13(1): 107. Available from: <https://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13045-020-00939-6>
 20. Wculek SK, Cueto FJ, Mujal AM, et al. Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2020; 20(1): 7-24.
 21. Westdorp H, Creemers JHA, van Oort IM, et al. Blood-derived dendritic cell vaccinations induce immune responses that correlate with clinical outcome in patients with chemo-naive castration-resistant prostate cancer. *J Immunother Cancer* [Internet]. 2019 Nov 14 [Cited 20.05.2024]; 7(1): 302. Available from: <https://jitc.bmj.com/content/7/1/302.long>
 7. Gardner A, de Mingo Pulido Á, Ruffell B. Dendritic cells and their role in immunotherapy. *Front Immunol* [Internet]. 2020 May 21 [Cited 20.05.2024]; 11: 924. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2020.00924/full>
 8. Goltsev AN, Dubrava TG, Yampolskaya EE, et al. The optimization method of isolation of immature dendritic cells. *Fiziol. Zh.* 2018; (6): 33-40.
 9. Jarnjak-Jankovic S, Pettersen RD, Saebøe-Larssen S, et al. Preclinical evaluation of autologous dendritic cells transfected with mRNA or loaded with apoptotic cells for immunotherapy of high-risk neuroblastoma. *Cancer Gene Ther.* 2005; 12(8): 699-707.
 10. Obermaier B, Dauer M, Hertzen J, et al. Development of a new protocol for 2-day generation of mature dendritic cells from human monocytes. *Biol Proced Online.* 2003; 5: 197-203.
 11. Perez CR, De Palma M. Engineering dendritic cell vaccines to improve cancer immunotherapy. *Nat Commun* [Internet]. 2019 Nov 27 [Cited 20.05.2024]; 10(1): 5408. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-019-13368-y>
 12. Rapp M, Grauer OM, Kamp M, et al. A randomized controlled phase II trial of vaccination with lysate-loaded, mature dendritic cells integrated into standard radiochemotherapy of newly diagnosed glioblastoma (GlioVax): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* [Internet]. 2018 May 25 [Cited 20.05.2024]; 19(1): 293. Available from: <https://trialsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13063-018-2659-7>
 13. 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.
 14. Sorg RV, Ozcan Z, Brefort T, et al. Clinical-scale generation of dendritic cells in a closed system. *J Immunother.* 2003; 26(4): 374-83.
 15. Sugiura D, Maruhashi T, Okazaki IM, et al. Restriction of PD-1 function by cis-PD-L1/CD80 interactions is required for optimal T cell responses. *Science.* 2019; 364(6440): 558-66.
 16. 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 Mar 29 [Cited 20.05.2024]; 12: 641307. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2021.641307/full>
 17. Ueno H, Klechevsky E, Morita R, et al. Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol Rev.* 2007; 219: 118-42.
 18. Van Tendeloo VF, Ponsaerts P, Lardon F, et al. Highly efficient gene delivery by mRNA electroporation in human hematopoietic cells: superiority to lipofection and passive pulsing of mRNA and to electroporation of plasmid cDNA for tumor antigen loading of dendritic cells. *Blood.* 2001; 98(1): 49-56.
 19. Wang Y, Xiang Y, Xin VW, et al. Dendritic cell biology and its role in tumor immunotherapy. *J Hematol Oncol* [Internet]. 2020 Aug 3 [Cited 20.05.2024]; 13(1): 107. Available from: <https://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13045-020-00939-6>
 20. Wculek SK, Cueto FJ, Mujal AM, et al. Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2020; 20(1): 7-24.
 21. Westdorp H, Creemers JHA, van Oort IM, et al. Blood-derived dendritic cell vaccinations induce immune responses that correlate with clinical outcome in patients with chemo-naive castration-resistant prostate cancer. *J Immunother Cancer* [Internet]. 2019 Nov 14 [Cited 20.05.2024]; 7(1): 302. Available from: <https://jitc.bmj.com/content/7/1/302.long>

