

Received: 2017.05.15  
Accepted: 2017.07.31  
Published: 2017.11.19

## Między biologią a medycyną: perspektywy wykorzystania komórek dendrytycznych w terapii przeciwnowotworowej

Between biology and medicine: perspectives on the use of dendritic cells in anticancer therapy

Agnieszka Szczygieł, Elżbieta Pajtasz-Piasecka

Laboratorium Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda we Wrocławiu

### Streszczenie

Komórki dendrytyczne (DCs) tworząc połączenie między odpornością wrodzoną a nabytą, odgrywają istotną rolę w utrzymaniu homeostazy w układzie odpornościowym. Populację DCs cechuje heterogenność – w jej skład wchodzi wiele subpopulacji, które mimo różnic fenotypowych i lokalizacyjnych pełnią jedną nadrzędną funkcję – są profesjonalnymi komórkami prezentującymi antygeny. W związku z ich rolą komórki dendrytyczne mogą się stać nowym narzędziem terapii chorób nowotworowych. Jej głównym celem jest bowiem generowanie odpowiedzi przeciwnowotworowej, prowadzącej do eliminacji komórek nowotworowych.

Mikrośrodowisko nowotworowe bogate w czynniki immunosupresorowe (np. IL-10, TGF- $\beta$ , Arg1, IDO) utrudnia prawidłowe funkcjonowanie pojawiających się DCs. Z tego powodu wykorzystuje się różne strategie otrzymywania DCs w warunkach *ex vivo* niezbędne do przygotowania szczepionek komórkowych oraz wspomaga się *in vivo* komórki dendrytyczne do walki z nowotworem. Szczepionki zawierające DCs łączy się z innymi schematami immunoterapii (np. blokowaniem cząsteczek PD-1 lub CTLA-4) lub z konwencjonalnymi metodami leczenia (np. chemioterapią). Mimo ogromnego postępu, który dokonał się w terapiach przeciwnowotworowych w ostatnich dwóch dziesięcioleciach, nadal nierozwiązanych pozostaje wiele istotnych kwestii dotyczących zwiększenia skuteczności zastosowania DCs. W pracy przedstawiono wiele subpopulacji DCs, zarówno w układzie mysim, jak i ludzkim, różnicujących się w warunkach prawidłowych lub pod wpływem mikrośrodowiska nowotworowego. Wyszczególniono istotne z punktu widzenia terapii czynniki oddziałujące na jakość powstającej odpowiedzi przeciwnowotworowej *in vivo* oraz *ex vivo*. Omówiono również najważniejsze strategie wykorzystania DCs w terapiach przeciwnowotworowych oraz drogi dalszego rozwoju tego kierunku badań.

Słowa kluczowe:

komórki dendrytyczne • subpopulacje DCs • szczepionki komórkowe na bazie DCs • immunoterapia przeciwnowotworowa

## Summary

Dendritic cells (DCs), as a link between innate and adaptive immunity, play a pivotal role in maintaining homeostasis of the immune system. The DC population is characterized by heterogeneity; it consists of many subpopulations which, despite their phenotypic and localization differences, play an essential function – they are professional antigen presenting cells.

Due to their role, DCs can be utilized in a new cancer treatment strategy. Their main purpose is to generate an anticancer response leading to the elimination of cancer cells.

The tumor microenvironment, abundant in immunosuppressive factors (e.g. IL-10, TGF- $\beta$ , Arg1, IDO), impairs the proper function of DCs. For this reason, various strategies are necessary for *ex vivo* preparation of DC-based vaccines and for the support of *in vivo* DCs to fight against tumors. DC-based vaccines are combined with other forms of immunotherapy (e.g. blockade of immune checkpoint molecules, e.g. PD-1 or CTLA-4) or conventional types of therapies (e.g. chemotherapy). Despite the enormous progress that has been made in anticancer therapy in the past two decades, there are still many unresolved issues regarding the effectiveness of the DCs usage.

In this paper we described, in both a mouse and a human subject, a series of DC subpopulations, differentiating in normal conditions or under the influence of cancer microenvironment. We listed factors affecting the quality of the *in vivo* and *ex vivo* generations of antitumoral responses, significant from a therapeutic point of view. Moreover, the most important strategies for the use of DCs in anticancer therapies, as well as further developments on this field, have been discussed.

**Key words:** dendritic cells • DCs • DC subsets • DC-based vaccines • anticancer immunotherapy

**GICID:** 01.3001.0010.5808  
**DOI:** 10.5604/01.3001.0010.5808  
**Word count:** 8017  
**Tables:** 1  
**Figures:** 5  
**References:** 118

**Adres autorki:** dr hab. Elżbieta Pajtasz-Piasecka, prof. PAN, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda, ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław; e-mail: pajtasz@iitd.pan.wroc.pl

**Wykaz skrótów:** **APC** – komórka prezentująca antygen (antigen presenting cell); **Arg1** – arginaza 1 (arginase 1); **BAC** – sztuczne chromosomy bakteryjne (bacterial artificial chromosomes); **BDCA** – antygen komórek dendrytycznych krwi (blood dendritic cell antigen); **BMP4** – białko morfogenetyczne kości 4 (bone morphogenetic protein 4); **Bst2** – antygen komórek podścieliska szpiku kostnego 2 (bone marrow stromal cell antigen 2); **cDCs** – konwencjonalne/klasyczne DCs (conventional/classical DCs); **CLEC** – lektyna typu C (C-type lectin); **CTL** – limfocyt T cytotoksyczny (cytotoxic T lymphocyte); **CTLA-4** – antygen-4 związany z CTL (CTL associated antigen-4); **DAMP** – wzorzec molekularny związany z zagrożeniem (danger-associated molecular patterns); **DCs** – komórki dendrytyczne (dendritic cells); **DCCreg** – regulatorowe DCs; **DC-SIGN** – nieintegryna swoista dla DCs chwytająca ICAM-3 (dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin); **Dex** – egzosomy wydzielane przez DCs (dendritic cell-derived exosomes); **ESAM** – cząsteczka adhezyjna komórek śródbłonna (endothelial cell adhesion molecule); **Flt3L** – ligand kinazy fms podobnej (fms-like tyrosine kinase ligand); **G-CSFR** – receptor czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów (granulocyte colony-stimulating factor receptor); **GM-CSF** – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor); **GVHD** – choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi (graft versus host disease); **HEV** – żyłki z wysokim śródbłonkiem (high endothelial venules); **HLA** – antygeny ludzkich leukocytów (human leukocyte antigen); **i.d.** – śródskórnie (intra-dermal); **i.n.** – dowęzłowo (intra-nodal); **i.t.** – doguzowo (intra-tumoral); **i.v.** – dożylnie (intra-venous); **IDO** – 2,3-dioksygenaza indoloaminowa (indoleamine 2,3-dioxygenase); **IFN** – interferon; **IL** – interleukina (interleukin); **IP-10** – białko indukowane przez IFN (IFN inducible protein); **iPSC** – indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (induced pluripotent stem cells); **LCs** – komórki Langerhansa; **Limfocyty Treg** – limfocyty T regulatorowe; **M-CSF** – czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów (macrophage colony-stimulating factor); **M-CSFR** – receptor M-CSF (M-CSF receptor); **mDCs** – mieloidalne DCs; **MHC** – główny

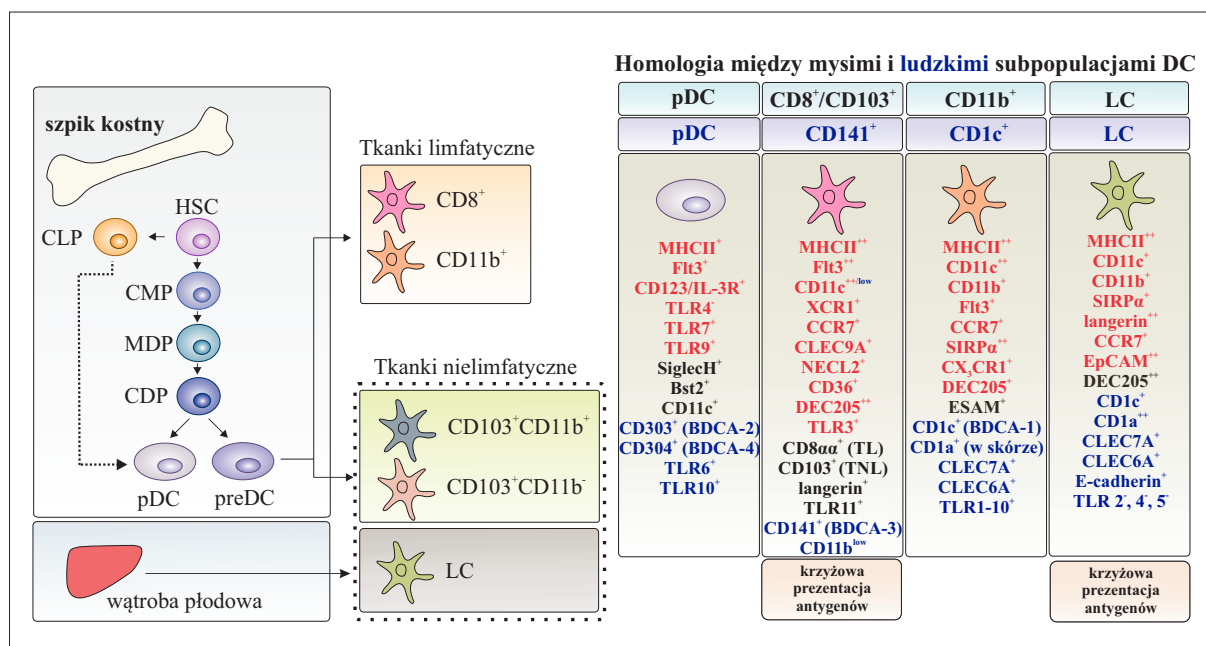
układ zgodności tkankowej (major histocompatibility complex); **PAP** – kwasna fosfataza prostaty (prostatic acid phosphatase); **PD-1** – receptor programowanej śmierci (programmed death 1); **pDCs** – plazmocytoidalne DCs; **PLGA** – kopolimer kwasu mlekowego i glikolowego (poly(lactic-co-glycolic acid)); **poli-ICLC** – kwas poliinozynowy policytydynowy stabilizowany polilizyną i karboksymetylocelulozą (polyinosinic-polycytidylic acid stabilized with polylysine and carbonylmethylcellulose); **poly(I:C)** – kwas poliinozynowy policytydynowy (polyinosinic:polycytidylic acid); **s.c.** – podskórze (subcutaneously); **SCF** – czynnik komórek macierzystych (stem cell factor); **SiglecH** – lektyny typu immunoglobulin wiążące kwas sialowy (sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins); **SIRP-α** – białko α regulujące sygnał (signal regulatory protein α); **TAA** – antygeny związane z nowotworem (tumor associated antigens); **TGF-β** – transformujący czynnik wzrostu β (transforming growth factor-β); **TLR** – receptor Toll-podobny (Toll-like receptor); **TNF-α** – czynnik martwicy nowotworu α (tumor necrosis factor α); **VEGF** – czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (vascular endothelial growth factor).

### SUBPOPULACJE DCs U MYSZY I LUDZI

Komórki dendrytyczne (dendritic cells; DCs) zostały odkryte w 1973 r. przez zespół, do którego należał Ralph Steinman [103]. Odkrycie tej nielicznej populacji komórek w mysiej śledzienie pogłębiło wiedzę w zakresie immunologii, a także sprawiło, że Ralph Steinman został nominowany do Nagrody Nobla w dziedzinie fizjologii lub medycyny, którą przyznano mu pośmiertnie w 2011 r. [102]. Początkowo uzyskana wiedza na temat rozwoju oraz funkcji DCs pochodziła z mysiego modelu, jednak w ostatnich dwóch dekadach nastąpił ogromny

postęp w badaniach nad ludzkimi komórkami dendrytycznymi. Pozwoliło to określić homologię między subpopulacjami ludzkich i mysich DCs, a także umożliwiło pierwsze próby ich klinicznego zastosowania.

Od czasu odkrycia DCs badania nad ich biologią doprowadziły do wyodrębnienia wielu subpopulacji (ryc. 1). Jednym z głównych kryteriów podziału jest pochodzenie, w którym wyróżnia się komórki dendrytyczne pochodzenia plazmocytoidalnego (pDCs) lub mieloidalnego (mDCs), częściej nazywane konwencjonalnymi lub klasycznymi DCs (cDCs) [48,104]. Stosuje się również



**Ryc. 1.** Rozwój komórek dendrytycznych. pDCs i cDCs różnicują się w szpiku kostnym z hematopoetycznej komórki macierzystej (HSC). Rozwój pDCs jest zlokalizowany od początku do końca w szpiku kostnym, w przeciwieństwie do cDCs, które opuszczają szpik jako komórki prekursorowe (preDC). W przypadku pDCs rozważany jest alternatywny szlak rozwojowy z wspólnej komórki progenitorowej limfopoety (CLP) (zaznaczony przerywaną linią). LC wywodzą się z embrionalnych komórek prekursorowych pochodzących z wątroby płodowej, które zasiedlają skórę jeszcze przed narodzinami (HSC – hematopoetyczna komórka macierzysta (hematopoietic stem cell); CMP – wspólna komórka progenitorowa mielopoety (common myeloid progenitor); CLP – wspólna komórka progenitorowa limfopoety (common lymphoid progenitor); MDP – komórka progenitorowa makrofagów i DCs, (macrophage DC progenitor); CDP – wspólna komórka progenitorowa DCs (common DC progenitor). Homologia między mysimi i ludzkimi subpopulacjami DCs. Kolorem czerwonym zaznaczono markery występujące na mysich i ludzkich subpopulacjach DCs; kolorem czarnym markery charakterystyczne dla mysich, natomiast niebieskim – dla ludzkich DCs (wg [30,37,63] zmodyfikowano)

podział uwzględniający typ tkanki organizmu, w których występują DCs. W tkankach limfatycznych (śledziona, węzły chłonne, błony śluzowe, grasica) większość DCs stanowią komórki rezydujące wnikaące do tych tkanek prosto z krwiobiegu. Natomiast tzw. migrujące DCs przedostają się do różnych tkanek nielimfatycznych (np. skóra, jelita, płuca), zanim zaczną przemieszczać się za pośrednictwem naczyń limfatycznych do węzłów chłonnych [104]. Jednak określanie fenotypu powierzchniowego i połączenie go z funkcjonalnym zróżnicowaniem DCs jest najbardziej precyzyjną metodą scharakteryzowania danej subpopulacji. Na podstawie ekspresji markerów możliwe jest jednoznaczne przypisanie danej subpopulacji komórek do układu mysiego (np. DCs CD8<sup>+</sup>) lub do układu ludzkiego (np. DCs CD141<sup>+</sup>).

### SUBPOPULACJE MYSICH DCs

Plazmocytoidalne komórki dendrytyczne w stanie niedojrzałym kształtem są zbliżone do komórek limfoidalnych lub plazmatycznych (stąd też pochodzi nazwa tej subpopulacji), jednak pobudzone pDCs wyglądem przypominają klasyczne komórki dendrytyczne [96]. Komórki pDCs charakteryzuje niski poziom ekspresji cząsteczek łańcucha CD11c integryny, antygenów MHC klasy II oraz cząsteczek kostymulujących, a markerami swoistymi dla mysiej subpopulacji pDCs są SiglecH oraz Bst2 [79]. Rozwój i różnicowanie komórek pDCs zależą od dwóch cytokin: liganda kinazy fms podobnej (Flt3L), który przyłącza się do cząsteczki powierzchniowej Flt3 oraz czynnika M-CSF wiążącego się do swobodnego receptora (M-CSFR). Myszy z genetycznym niedoborem Flt3L mają zredukowaną nie tylko populację pDCs, lecz również cDCs, a w wyniku podawania egzogennej Flt3L (lub M-CSF, choć w mniejszym stopniu) dochodzi do wyrównania wielkości tych populacji [79,96]. Cechą typową dla pDCs jest obecność w endosomach receptorów TLR (TLR7 oraz TLR9). Takie umiejscowienie tych cząsteczek sprawia, że komórki pDCs, aby zainicjować odpowiedź przeciwko wirusom lub wewnątrzkomórkowym bakteriom nie muszą być uprzednio zainfekowane [60]. Dzięki receptorowi TLR7 komórki plazmocytoidalne rozpoznają wirusowy jednoniciowy RNA lub syntetyczny analog guanozyny – R848, natomiast za sprawą receptora TLR9 komórki identyfikują niemetylowane sekwencje CpG DNA, zarówno pochodzenia bakteryjnego lub wirusowego, jak również syntetyczne oligonukleotydy, takie jak CpG-ODN [60,118]. Skutkiem aktywacji pDCs za pośrednictwem TLR7 lub TLR9 jest wysoka produkcja interferonów typu I. Jednak, jak podaje Steinman [104], w przeciwieństwie do innych komórek wytwarzających IFN typu I, tylko komórki pDCs są zdolne do wydzielania tej cytokiny w wyniku kontaktu z żywymi i inaktywowanymi wirusami oraz w odpowiedzi na własne kwasy nukleinowe. W związku z brakiem receptora TLR4 na powierzchni, pDCs słabo odpowiadają na stymulację lipopolisacharydami. W stanie równowagi zdrowotnej niedojrzałe pDCs krążą we krwi, a aktywowane dostają się przez żyłki z wysokim śródbłonkiem (HEV) do węzłów chłonnych [48,60]. Już jako dojrzałe pDCs

skutecznie pobudzają naiwne limfocyty T CD4<sup>+</sup>, a dzięki wydzielanej IL-12 polaryzują odpowiedź w kierunku typu Th1. Dodatkowo pDCs indukują aktywację limfocytów T CD8<sup>+</sup>, komórek NK oraz dojrzewanie limfocytów B w kierunku komórek plazmatycznych produkujących immunoglobuliny [57,72,79].

Wśród populacji cDCs na szczególną uwagę zasługują komórki dendrytyczne CD8<sup>+</sup>, będące unikalną subpopulacją występującą jedynie w tkankach limfatycznych myszy. Stanowią około 20-40% wszystkich komórek cDCs obecnych w śledzionie i węzłach chłonnych. Obecność homodimeru CD8 $\alpha\alpha$ , przy jednoczesnym braku ekspresji CD8 $\alpha\beta$  pozwoliło na odróżnienie komórek dendrytycznych CD8<sup>+</sup> od limfocytów T CD8<sup>+</sup>. Ponadto DCs CD8<sup>+</sup> nie wykazują ekspresji (lub jedynie niewielką) markerów typowych dla makrofagów, takich jak: CD11b, F4/80, CD115, CD172a oraz CX<sub>3</sub>CR1 [63]. Subpopulację DCs CD8<sup>+</sup> oraz jej odpowiednik występujący w tkankach nielimfatycznych (DCs CD103<sup>+</sup>), można określić jako komórki CD11b<sup>lo</sup>, DEC205<sup>+</sup>, CD207<sup>+</sup> (langerin<sup>+</sup>). Komórki obu subpopulacji, jako jedyne spośród wszystkich cDCs posiadają receptor TLR3, którego ligandem jest dwuniciowy wirusowy RNA oraz TLR11 wykrywające białka *Toxoplasma gondii* [63]. Dodatkowo mają receptory, takie jak: XCR1, NECL2, CD36 – receptory zmiatacze wykrywające martwe komórki oraz CLEC9A, będący receptorem lektynowym rozpoznającym ciała nekrotyczne [30,63,95]. Jedną z głównych i najważniejszych cech komórek dendrytycznych CD8<sup>+</sup> (oraz DCs CD103<sup>+</sup> płuc lub skóry) jest krzyżowa prezentacja antygenów egzogennej (np. pochodzenia wirusowego lub bakteryjnego), które klasycznie zostałyby zaprezentowane za pośrednictwem cząsteczki MHC klasy II [63]. W wyniku prezentacji antygenów egzogennej z wykorzystaniem cząsteczki MHC klasy I możliwe jest pobudzenie dziewięciu limfocytów T CD8<sup>+</sup>, aktywowanie cytotoksycznych limfocytów T CD8<sup>+</sup> (CTL) oraz wytwarzanie IL-12 oraz IL-15 – cytokin indukujących różnicowanie się CTL. Ponadto obie subpopulacje DCs mają receptor XCR1, dla którego ligandem jest chemokina XCL1 wydzielana przez limfocyty T CD8<sup>+</sup>, którym uprzednio komórki dendrytyczne CD8<sup>+</sup> zaprezentowały antygen. W rezultacie, pobudzenie receptora XCR1 na DCs, wtórnie pobudza komórki dendrytyczne CD8<sup>+</sup> do dalszego aktywowania limfocytów T CD8<sup>+</sup> w kierunku CTL [63]. Precyzyjna rola DCs CD8<sup>+</sup> w polaryzacji odpowiedzi odpornościowej w kierunku Th1 nie została jeszcze dobrze poznana, jednak zdolność do produkcji IL-12 sugeruje ich udział w tym procesie [30,63]. Komórki dendrytyczne CD103<sup>+</sup> należą do tej samej linii rozwojowej, do której należą DCs CD8<sup>+</sup> [30,95]. Jest to populacja migrujących komórek cDCs, zasiedlająca większość tkanek łącznych w organizmie. W przeciwieństwie do ekspresji cząsteczki CD8 $\alpha\alpha$  charakterystycznej dla DCs rezydujących w tkankach limfatycznych, cząsteczka CD103 nie jest swoistym markerem subpopulacji DCs CD103<sup>+</sup>. Przykładem są komórki CD103<sup>+</sup> zasiedlające kępki Peyera w jelicie, które dodatkowo wykazują ekspresję cząsteczki CD8 oraz niską ekspresję cząsteczki MHC II [9,63,68]. Inna subpopulacja komórek



dendrytycznych CD103<sup>+</sup> obecna jest w błonie podstawnej, komórki te w związku z ekspresją cząsteczki CD11b są zaliczane do subpopulacji cDCs CD11b<sup>+</sup> [63,112].

Komórki dendrytyczne CD11b<sup>+</sup> są główną subpopulacją DCs rezydujących w tkankach limfatycznych (z wyjątkiem grasicy) [30]. Część populacji DCs CD11b<sup>+</sup> obecna w tkankach limfatycznych wykazuje ekspresję cząsteczek adhezyjnych komórek śródbłonna – ESAM. Komórki o fenotypie ESAM<sup>high</sup>CD11b<sup>+</sup> charakteryzują się wyższą ekspresją cząsteczek CD4, CD11c, Flt3 oraz niższą M-CSFR, G-CSFR i CCR2 w porównaniu do komórek ESAM<sup>low</sup>CD11b<sup>+</sup> DCs [30,63]. Ze względu na dużą heterogenność populacji oraz trudności ze stworzeniem modelu doświadczalnego pozbawionego subpopulacji CD11b<sup>+</sup> DCs, określenie roli tych komórek w odpowiedzi odpornościowej jest niełatwym zadaniem. W porównaniu do subpopulacji DCs CD8<sup>+</sup>, komórki dendrytyczne CD11b<sup>+</sup> mają wyższą ekspresję cząsteczek MHC klasy II, dzięki czemu wydajniej prezentują antygeny limfocytom T CD4<sup>+</sup>, zarówno w stanie równowagi zdrowotnej, jak również podczas stanu zapalnego [19]. Pomimo że komórki dendrytyczne CD8<sup>+</sup> oraz CD103<sup>+</sup> lepiej pobudzają dziewicze limfocyty T CD8<sup>+</sup>, to właśnie DCs CD11b<sup>+</sup> są niezwykle ważne w tworzeniu odpowiedzi limfocytów T CD8<sup>+</sup> pamięci podczas kolejnego kontaktu z antygenem [30]. Ponadto DCs CD11b<sup>+</sup> pełnią istotną rolę w utrzymaniu tolerancji na antygeny własne, ponieważ dzięki nieustannej migracji z krwi do grasicy indukują delecję klonalną autoreaktywnych limfocytów T oraz pobudzają różnicowanie limfocytów Treg [63].

Kolejną subpopulację migrujących DCs stanowią komórki Langerhansa (LCs), które są umiejscowione w naskórku i nabłonkach wielowarstwowych płaskich [104]. W porównaniu do dermalnych cDCs, LCs wykazują niższą ekspresję cząsteczki MHC klasy II, średnią ekspresję CD11c oraz bardzo wysoką ekspresję langeryny (CD207), odpowiedzialnej za tworzenie charakterystycznych ziaren Bribecka [63]. W odróżnieniu od pozostałych cDCs w tkankach limfatycznych, rozwój komórek LCs jest niezależny od Flt3 oraz Flt3L, natomiast podobnie jak w przypadku makrofagów, jest zależny od M-CSF [63,104]. Mimo że mysie komórki LCs są częstym obiektem badań naukowców, niewiele wiadomo o roli jaką pełnią te komórki w układzie odpornościowym [30]. W 2003 r. Allan i wsp. [2] wykazali, że zlokalizowane w naskórku LCs nie indukowały odpowiedzi limfocytów T CD8<sup>+</sup> po infekcji wirusem HSV-1. Stwierdzono więc, że LCs są niezdolne do powszechnej aktywacji limfocytów T. Jednak, wykorzystując system BAC, stworzono model myszy transgenicznych charakteryzujących się konstytutywnym i trwałym brakiem LCs w naskórku, u których zaobserwowano silniejszą reakcję nadwrażliwości kontaktowej, co sugeruje właściwości tolerogenne LCs [44]. Merad i wsp. [62,63], wykazali, że LCs są istotnym elementem w chorobie przeszczep przeciwko gospodarzowi (GVHD). W przypadku allogeniczej transplantacji szpiku kostnego, komórki Langerhansa gospodarza okazały się zdolne do pobudzania allogenicznych limfocytów T, co

prowadziło do rozwoju choroby gospodarza przeciwko dawcy. Jak wykazał zespół Igyártó [40], w wyniku infekcji *Candida albicans* mysie LCs indukowały silną odpowiedź limfocytów Th17, przy jednoczesnym braku promowania odpowiedzi typu Th1.

Do końca ubiegłego wieku powszechnie sądzono, że komórki Langerhansa mogą aktywować wszystkie odpowiedzi odpornościowe, które powstają w skórze, a zwłaszcza w naskórku. Dziś ich immunogenne właściwości są nieustannie dyskutowane, mimo iż uważa się LCs za główną subpopulację komórek prezentujących antygeny w skórze. Podkreśla się również fakt, że kierunek aktywności LCs, podobnie jak innych subpopulacji DCs, jest zależny od czynników środowiskowych (prozapalnych, supresorowych) oraz charakteru patogenów znajdujących się w środowisku [81].

### SUBPOPULACJE LUDZKICH DCs

Badania nad biologią i zróżnicowaniem funkcjonalnym ludzkich DCs postępowyły znacznie wolniej niż w modelu mysim, z powodu ich słabej dostępności w tkankach organizmu i niewielkiej liczebności we krwi (około 1%). Dlatego też większość badań została przeprowadzona w warunkach *in vitro* w oparciu o analizę komórek dendrytycznych pozyskiwanych ze skóry, komórek prekursorowych CD34<sup>+</sup> krwi, a zwłaszcza zróżnicowanych komórek CD14<sup>+</sup> uzyskanych z krwi. Jednak udoskonalenie technik cytometrii przepływowej (znakomitą analizę różnych subpopulacji ludzkich i mysich DCs wykonali Guilliams i wsp. [27]), jak również nowe metody profilowania genomowego pozwoliły na pogłębienie wiedzy o ludzkich komórkach dendrytycznych [63].

Jedną z cech ludzkich DCs (określanych jako komórki negatywne pod względem markerów liniowych: Lin<sup>-</sup>CD3, CD19, CD14, CD20, CD56) jest konstytutywna ekspresja cząsteczek głównego układu zgodności tkankowej klasy II – HLA-DR [15,30,63,67]. Cecha ta jest utrudnieniem w wyodrębnianiu subpopulacji komórek prekursorowych, inaczej niż w układzie mysim – gdzie prekursorzy DCs nie wykazują ekspresji MHC II [30]. W oparciu o występowanie poszczególnych cząsteczek na powierzchni, w układzie ludzkim wyróżnia się dwiema klasyfikację markerów:

- klasycznie, za pomocą cząsteczek CD lub
- z wykorzystaniem antygenów komórek dendrytycznych krwi – BDCA.

DCs opisywane za pomocą BDCA są charakterystyczne tylko dla ludzi i wyłącznie dla komórek DCs znajdujących się we krwi. Na podstawie ekspresji BDCA można wyróżnić trzy główne populacje komórek: BDCA-2 (CD303) i BDCA-4 (CD304) charakterystyczne dla pDCs, BDCA-1 (CD1c) obecne na większości migrujących cDCs oraz BDCA-3 (CD141<sup>+</sup>) występujące na niewielkiej populacji DCs [63,73,110].

Podobnie jak w przypadku mysich komórek dendrytycznych, również ludzkie podlegają tradycyjnemu podziałowi na pDCs oraz na cDCs. Natomiast cDCs można podzielić jeszcze na rezydujące oraz migrujące DCs i tak jak w układzie mysim, różnicowanie komórek dendrytycznych z prekursorów jest zależne od M-CSF, Flt3L oraz GM-CSF.

Markerami charakterystycznymi dla pDCs są cząsteczki powierzchniowe, takie jak: CD123 (IL-3R), CD303 (BDCA-2) oraz CD304 (BDCA-4) [15,30]. W stanie równowagi zdrowotnej organizmu pDCs występują głównie we krwi i tkankach limfatycznych, jednak w razie wystąpienia stanu zapalnego, pDCs zasiedlają również tkanki nielinfatyczne [30]. Plazmocytoidalne DCs przemieszczają się ze strumieniem krwi i wnikają do tkanek limfatycznych podobnie jak limfocyty – poprzez żyłki z wysokim śródbłonkiem – HEV [30,48,60]. Na poziomie transkryptomu, funkcji oraz fenotypu stwierdzono, że między ludzkimi i mysimi pDCs istnieje bardzo duże podobieństwo i w obu układach są uważane za naturalnych producentów interferonów [67]. Niemniej jednak w przeciwieństwie do układu mysiego, ludzkie pDCs nie wykazują ekspresji cząsteczki CD11c, a w porównaniu do cDCs charakteryzują się mniejszą zdolnością do stymulowania dziewiczych limfocytów T [67]. Ludzkie pDCs zawierają unikatowy zestaw receptorów TLR 1, 6, 7, 9 oraz TLR 10, który jest charakterystycznym receptorem Toll-podobnym występującym tylko u ludzi. Po kontakcie z wirusami lub ich antygenami, pDCs wydzielają w dużych ilościach interferony typu I, jak również IP-10, TNF oraz IL-6 [48].

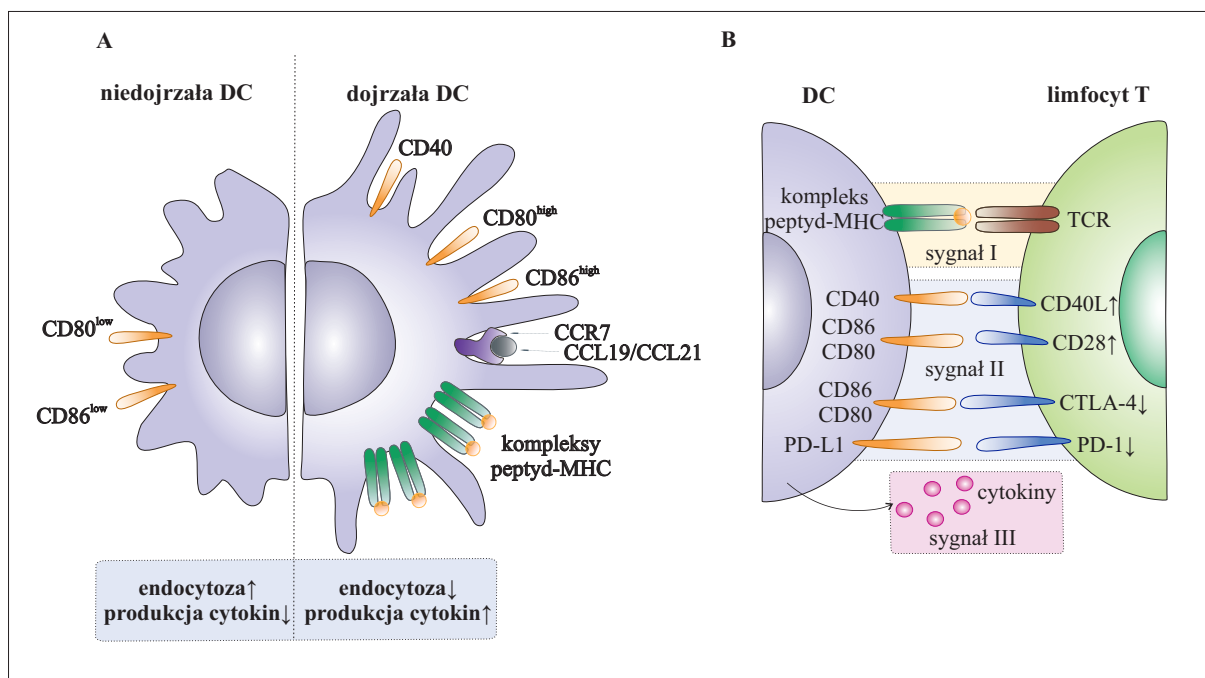
Subpopulacja komórek dendrytycznych CD1c<sup>+</sup>, jest główną populacją cDCs występującą we krwi, tkankach i narządach limfatycznych. Komórki CD1c<sup>+</sup> krwi określa się za pomocą markerów CD1c, CD11b, CD11c, MHCII (HLA-DR) CD13, CD33, CD172 (SIRP- $\alpha$ ) oraz CD45RO. Jednak w zależności od miejsca występowania mogą wykazywać nieco odmienny fenotyp – komórki CD1c<sup>+</sup> DCs obecne w skórze mają dodatkową ekspresję CD1a, natomiast obecne w jelitach wykazują ekspresję CD103 [15,67]. Subpopulację CD1c<sup>+</sup> uważa się za odpowiednik mysich komórek dendrytycznych CD11b<sup>+</sup>, z tą różnicą, że nie wykazują ekspresji cząsteczek ESAM [67]. W zależności od miejsca ich występowania obserwuje się zróżnicowanie w ekspresji cząsteczek CD80, CD83, CD86 oraz CD40 – komórki CD1c<sup>+</sup> znajdujące się we krwi wykazują większą ekspresję wspomnianych cząsteczek niż komórki CD1c<sup>+</sup> rezydujące w tkankach [30]. Subpopulacja tych komórek zawiera wiele różnorodnych lektyn oraz receptorów Toll-podobnych – zawierają TLR 1-10, dzięki czemu mogą rozpoznawać i prezentować antygeny różnego pochodzenia. Komórki CD1c<sup>+</sup> wykazują wysoką ekspresję lektyn CLEC7A i CLEC6A oraz zmienną ekspresję lektyny DEC205 i receptora mannozowego CD206 [30]. Komórki CD1c<sup>+</sup> pobudzają dziewicze limfocyty T CD4<sup>+</sup>, lecz ich zdolność do prezentacji krzyżowej limfocytom T CD8<sup>+</sup> jest niewielka [30].

Jedną z mniej licznych populacji komórek cDCs występujących u ludzi, są komórki dendrytyczne CD141<sup>+</sup> (we krwi stanowią około 10% wszystkich DCs). Poza krwią komórki te rezydują w węzłach chłonnych, migdałkach, śledzionie oraz szpiku kostnym, a w przypadku tkanek nielinfatycznych – w skórze, płucach oraz wątrobie [15]. Od strony fenotypowej, DCs CD141<sup>+</sup> nie wykazują ekspresji cząsteczki CD14, a niska ekspresja CD11b i CD11c pozwala na oddzielenie ich od populacji DCs CD1c<sup>+</sup> [15,30]. Komórki dendrytyczne CD141<sup>+</sup> są odpowiednikiem populacji mysich komórek dendrytycznych CD8<sup>+</sup> oraz CD103<sup>+</sup> głównie ze względu na podobną ekspresję cząsteczek, takich jak: XCR1, CLEC9A, NECL2, DEC205 oraz TLR3, jak również na zdolność do prezentacji krzyżowej antygenów [30].

W ludzkiej skórze wyodrębniono trzy typy komórek dendrytycznych: w warstwie naskórka – komórki Langerhansa, w warstwie skóry właściwej – komórki CD1a<sup>+</sup> oraz CD14<sup>+</sup> [48]. Komórki dendrytyczne CD14<sup>+</sup> charakteryzują się fenotypem pośrednim między DCs a monocytami lub makrofagami. Cechuje je wysoka ekspresja cząsteczek HLA-DR oraz CD11c, a na ich powierzchni występują markery typowe dla monocytów i makrofagów, takie jak: CD163, CD11b, CX<sub>3</sub>CR1, FXIIIa oraz CD209 (DC-SIGN). DCs CD14<sup>+</sup> nie wykazują ekspresji CCR7, zatem jest wątpliwe, czy są zdolne do migrowania do węzłów chłonnych. W porównaniu do komórek CD1c<sup>+</sup>, komórki CD14<sup>+</sup> mają niższą ekspresję cząsteczek kostymulujących CD86 oraz CD80, a dodatkowo nie wykazują ekspresji CD83 [30]. W tworzeniu odpowiedzi odpornościowej komórki CD14<sup>+</sup> odrywają istotną rolę w różnicowaniu: limfocytów T w kierunku folikularnych limfocytów pomocniczych, a także limfocytów B w kierunku komórek plazmatycznych [46,47].

Komórki dendrytyczne CD1a<sup>+</sup> skóry wykazują cechy typowe dla komórek Langerhansa, oraz DCs CD14<sup>+</sup>. Komórki CD1a<sup>+</sup> w porównaniu do LCs mają niższą ekspresję CD1a oraz nie ekspresjonują langeryny (CD207). Cechą wspólną tych dwóch subpopulacji DCs jest ekspresja cząsteczki CD1c, a także zdolność do wytwarzania IL-15. Podobnie jak DCs CD14<sup>+</sup>, komórki dendrytyczne CD1a<sup>+</sup> wykazują ekspresję cząsteczki CD11b i produkują IL-8 [46].

Spośród wszystkich ludzkich subpopulacji DCs, komórki Langerhansa były najdokładniej badane. Cała podstawowa wiedza o migrujących DCs pochodzi właśnie z doświadczeń z wykorzystaniem tych komórek [30]. Charakteryzuje je wysoka ekspresja langeryny oraz CD1a, a jednocześnie brak receptorów TLR 2, 4, 5 [30]. Zarówno w układzie mysim, jak również ludzkim, LCs stanowią główną populację komórek prezentujących antygeny w skórze, a w porównaniu do subpopulacji komórek dendrytycznych CD14<sup>+</sup>, LCs skuteczniej aktywują limfocyty T i polaryzują odpowiedź w kierunku typu Th2 [46,108]. Aktywacja cząsteczek kostymulujących CD40 wyzwała w LCs produkcję IL-15 indukującą różnicowanie dziewiczych limfocytów T CD8<sup>+</sup> do CTL



**Ryc. 2A.** Różnice pomiędzy niedojrzałymi i dojrzałymi DCs. Niedojrzałe DCs cechuje m.in. wzmożona endocytoza, a także obniżona ekspresja cząsteczek kostymulujących.

W wyniku pochłonięcia antygeny rozpoczyna się proces dojrzewania DCs – wypustki ulegają wydłużeniu, a kompleks peptyd-MHC na powierzchni komórki stabilizuje się, przy jednoczesnym zwiększeniu ekspresji cząsteczek kostymulujących (CD80, CD86), receptora chemokin CCR7 oraz wzmożonej produkcji cytokin (wg [18,28]; zmodyfikowano). **B.** Oddziaływanie dojrzałych DCs z dziewiczymi limfocytami T w obszarze synapsy immunologicznej. Do pełnej aktywacji limfocytów T niezbędne są trzy sygnały. Najważniejszy z nich (sygnał I), pochodzi od bezpośredniego kontaktu kompleksu peptyd-MHC i rozpoznającego go receptora TCR. Sygnał indukowany przez interakcję cząsteczek kostymulujących na obu komórkach (sygnał II) może wzmacniać lub osłabiać aktywację limfocytów T. Cząsteczki CD80/CD86 obecne na DCs oddziałują z cząsteczką CD28 silnie pobudzającą limfocyty T lub z cząsteczką CTLA-4 o charakterze hamującym. Ponadto ważnym czynnikiem w tworzeniu odpowiedzi odpornościowej są receptory i ligandy programowanej śmierci komórki. Kontakt limfocytów T z DCs poprzez PD-1/PD-L1 wpływa na przekazanie limfocytom T bodźców wyzwalających w nich proces apoptozy. Charakter odpowiedzi odpornościowej zależy od sygnału III, którym są cytokiny (np. IL-12, IL-15, IL-6 lub TNF- $\alpha$ ) oraz czynniki wydzielane przez DCs lub obecne w środowisku. Integracja wszystkich tych sygnałów jest istotna w procesie funkcjonalnej aktywacji dziewiczych limfocytów T, a tym samym w tworzeniu prawidłowej odpowiedzi odpornościowej (wg [39] zmodyfikowano)

wytwarzających perforynę oraz granzymy B [46,108]. Ludzkie LCs są zdolne do samodzielnego odnawiania się w stanie równowagi zdrowotnej, a w przypadku stanu zapalnego lub po transplantacji szpiku mogą regenerować się z prekursorów szpiku kostnego [63,67].

## DOJRZEWANIE DCs

Wspomniano wcześniej, że heterogenność populacji DCs może być analizowana na poziomie fenotypowym, funkcjonalnym, jak również w zależności od umiejscowienia w tkankach organizmu. Jednak głównym czynnikiem umożliwiającym klasyfikację poszczególnych subpopulacji jest zdolność DCs do działania w dwóch funkcjonalnie odrębnych stanach: niedojrzałym i dojrzałym (ryc. 2a).

Niedojrzałe komórki dendrytyczne w stanie równowagi zdrowotnej migrują do węzłów chłonnych niosąc „antygeny własne” dzięki czemu utrzymują tolerancję odpornościową na własne tkanki [6,39]. Wspecjalizowane w endocytozie (makropinocytozie i fagocytozie) niedojrzałe DCs gromadzą duże ilości antygenów, jednak mimo syntezowania cząsteczek MHC obu klas, komórki te są stosunkowo nieefektywne w wytwarzaniu komplek-

sów peptyd-MHC. Cechuje je niska ekspresja cząsteczek kostymulujących oraz niewielka zdolność do wytwarzania cytokin [39,61]. W wyniku pochłonięcia antygeny rozpoczyna się proces dojrzewania DCs, który charakteryzuje się wieloma zmianami na poziomie morfologicznym, fenotypowym oraz funkcjonalnym. Aby indukować odpowiedź odpornościową adekwatną do warunków miejsca, w którym komórka dendrytyczna pochłonięła obcy antygen, dalsze pobieranie antygenów ze środowiska jest ograniczone. Jednocześnie rozpoczyna się proces przetwarzania internalizowanego antygeny, w którym uczestniczą m.in. proteazy lizosomowe. Ich wzmożona aktywność umożliwia powstanie kompleksu peptyd-cząsteczka MHC i jego transport na powierzchnię komórki [61]. W procesie dojrzewania DCs niewielkie do tej pory wypustki ulegają wydłużeniu, a kompleks peptyd-MHC na powierzchni komórki stabilizuje się, przy jednoczesnym zwiększeniu ekspresji cząsteczek kostymulujących m.in. CD80, CD83, CD86 oraz wzmożonej produkcji cytokin [32,63,74]. Następnie dojrzewające DCs, aby zaprezentować antygen dziewiczym limfocytom T, migrują do narządów limfatycznych. Proces odbywa się w wyniku zwiększania ekspresji receptorów chemokin, takich jak CCR7, a sama migracja odbywa się w kierunku wzrasta-

jącego gradientu chemokin CCL19 oraz CCL21 [76]. Dojrzałe DCs, niosące na swojej powierzchni prezentowany antygen, przedostają się do narządów limfatycznych, w których dochodzi do zaprezentowania antygeny.

Komórki dendrytyczne są określane mianem profesjonalnych komórek prezentujących antygen (APC), do których są zaliczane również limfocyty B oraz makrofagi. Jednak to właśnie DCs są uważane za najistotniejszą populację komórek prezentujących antygen, ponieważ dostarczają wszystkie sygnały niezbędne do aktywacji dziewiczych limfocytów T i indukowania odpowiedzi odpornościowej [21,34,39,107]. Poza tradycyjnym prezentowaniem antygenów w kontekście cząsteczek MHC klasy I lub II, w której aktywowane są odpowiednio: limfocyty T CD8<sup>+</sup> lub CD4<sup>+</sup>, niektóre subpopulacje mysich i ludzkich DCs są wyspecjalizowane w prezentacji krzyżowej – egzogenne antygeny prezentowane są w kontekście cząsteczek MHC klasy I. Wśród mysich DCs subpopulacjami zdolnymi do efektywnej prezentacji krzyżowej są CD8<sup>+</sup> DCs oraz DCs CD103<sup>+</sup>, a także DCs stanu zapalnego. Natomiast wśród ludzkich DCs skuteczną prezentację krzyżową prowadzą subpopulacje DCs CD141<sup>+</sup>, pDCs oraz DCs zlokalizowane w skórze – komórki CD1a<sup>+</sup>, komórki CD1d<sup>+</sup>, a także komórki Langerhansa [94,95].

Na powierzchni DCs są obecne cząsteczki kostymulujące, które mogą wzmacniać lub osłabiać aktywację limfocytów T, polaryzując w ten sposób generowaną odpowiedź odpornościową (ryc. 2b). Głównymi cząsteczkami kostymulującymi są cząsteczki z rodziny B7 – CD80 (B7.1) oraz CD86 (B7.2), które tworzą najważniejszą ścieżkę aktywacji limfocytów T [39]. Ich oddziaływanie z cząsteczką CD28 znajdującą się na dziewiczych limfocytach T, indukuje wydzielanie IL-2 wpływającą na dalszą aktywację oraz proliferację limfocytów T. Silna aktywacja z udziałem cząsteczki CD28 uniemożliwia stabilizację receptora IL-10 na powierzchni limfocytów T, a tym samym hamuje powstawanie limfocytów Treg. Jednak podczas pobudzenia limfocytów T zwiększa się poziom ekspresji cząsteczki o charakterze hamującym – CTLA-4, która charakteryzuje się silniejszym powinowactwem do CD80/CD86 niż CD28 [39].

Na powierzchni APC (w tym komórek dendrytycznych) występują cząsteczki PD-L1 oraz PD-L2 – ligandy receptora programowanej śmierci (PD-1) obecnego na powierzchni limfocytów T. Zwiększenie ekspresji PD-L1 na DCs następuje w wyniku aktywacji cząsteczki CD40, a także w obecności cytokin (GM-CSF, IL-4, IFN- $\gamma$ , IL-12). Kontakt limfocytów T z komórkami DCs poprzez PD-1/PD-L1 wpływa na przekazanie limfocytom T bodźców hamujących wytwarzanie IFN- $\gamma$  oraz wyzwalających w nich proces apoptozy. Dzięki cząsteczce PD-1, regulatorowe DCs kontrolują autoreaktywne limfocyty T, choć silna aktywacja za pośrednictwem cząsteczki CD28 może znieść efekt działania cząsteczki PD-1 [39]. Rozwijający się nowotwór charakteryzuje m.in. nadekspresją ligandów dla PD-1, która prowadzi do supresji efektorowych

limfocytów T, hamując powstawanie odpowiedzi odpornościowej [39].

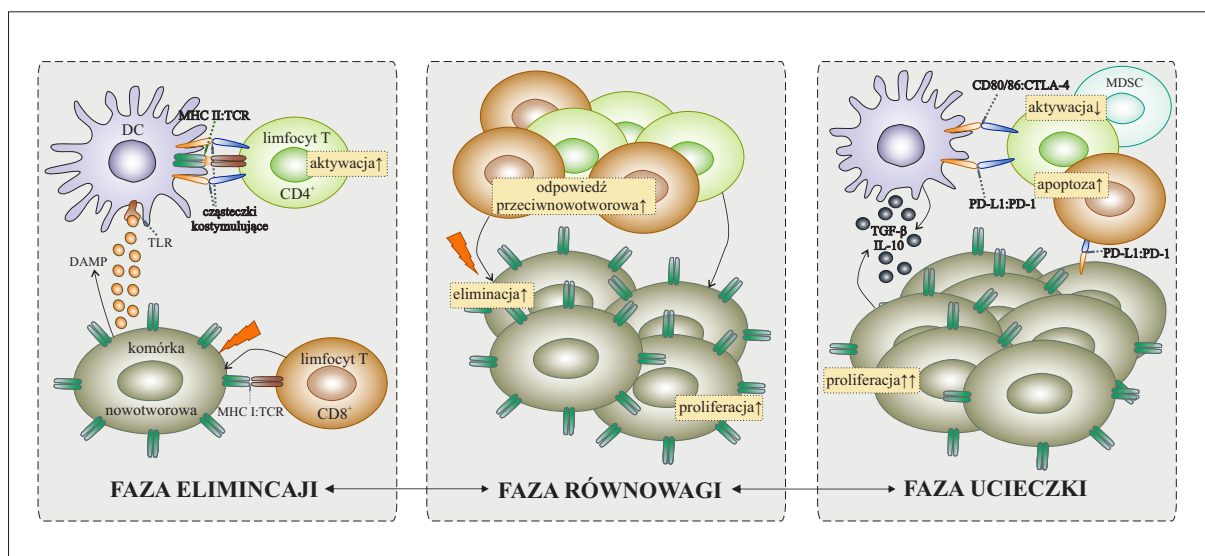
Do cząsteczek kostymulujących należy CD40, wchodząca w skład rodziny receptorów TNF. Ligandem dla cząsteczki CD40 występującej na komórkach dendrytycznych jest cząsteczka CD40L obecna na limfocytach T. W wyniku oddziaływań CD40/CD40L dochodzi do zwiększenia ekspresji innych cząsteczek kostymulujących i cząsteczek MHC, a dodatkowo do produkcji IL-12 przez DCs. Siła interakcji obu cząsteczek wpływa na kierunek promowania odpowiedzi odpornościowej. Słabe oddziaływanie, spowodowane niską ekspresją cząsteczki CD40L wpływa na zahamowanie aktywacji limfocytów T. Natomiast silne pobudzenie DCs prowadzi do wytwarzania IL-12, indukującej odpowiedź odpornościową typu Th1, podczas której wydzielany jest IFN- $\gamma$  wpływający na rekrutację makrofagów i limfocytów T cytotoksycznych [39,92].

Aby zwiększyć skuteczność, komórki dendrytyczne wykazują daleko idącą plastyczność zależną w równie mierze od rodzaju prezentowanego antygeny, jak i od warunków mikrośrodowiska [92,105]. Podczas kontaktu DCs z limfocytami T, do którego dochodzi w synapsie immunologicznej, oprócz interakcji peptyd-MHC-TCR oraz cząsteczek kostymulujących, bardzo istotnym czynnikiem w tworzeniu odpowiedzi odpornościowej jest związanie cytokin produkowanych zarówno przez DCs, jak i przez inne otaczające komórki. DCs znajdujące się w środowisku supresorowym, w którym są obecne czynniki, takie jak: IL-10, TGF- $\beta$ , PGE2, różnicują się w kierunku regulatorowych DCs (DCreg). Takie komórki cechuje zdolność do tłumienia odpowiedzi prozapalnej, przez wzmocnienie ekspansji limfocytów Treg. Cała sieć zależności między tworzeniem a tłumieniem odpowiedzi odpornościowej odbywająca się w stanie równowagi zdrowotnej, ulega zaburzeniu w trakcie rozwijającego się stanu chorobowego. Z jednej strony, zmniejszenie aktywności DCreg może być związane z wzmożonym i przewlekłym stanem zapalnym w organizmie, co może doprowadzić do uszkodzenia tkanek, np. w wyniku chorób autoimmunizacyjnych. Z drugiej strony, wzmożona aktywność DCreg prowadzi do przewlekłych infekcji organizmu, a także promuje progresję nowotworu.

#### **WPLYW MIKROŚRODOWISKA NOWOTWOROWEGO NA FUNKCJE KOMÓREK DENDRYTYCZNYCH**

Zgodnie z teorią nadzoru immunologicznego, układ odpornościowy jest zdolny do rozpoznania komórek nowotworowych pojawiających się w organizmie i przynajmniej w fazie początkowej – do ich eliminowania [29] (ryc. 3). W procesie uczestniczą napływające do tkanki guza efektorowe limfocyty T CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup>, makrofagi oraz DCs [58,97]. Szczególną rolę w aktywacji swoistych antygenowo limfocytów CTL odgrywa subpopulacja cDCs pochłaniająca antygeny uwalniane przez nowotwór i prezentująca je *in situ* w wyniku prezentacji krzyżowej [58,113]. Na tym etapie nadzoru immunolo-





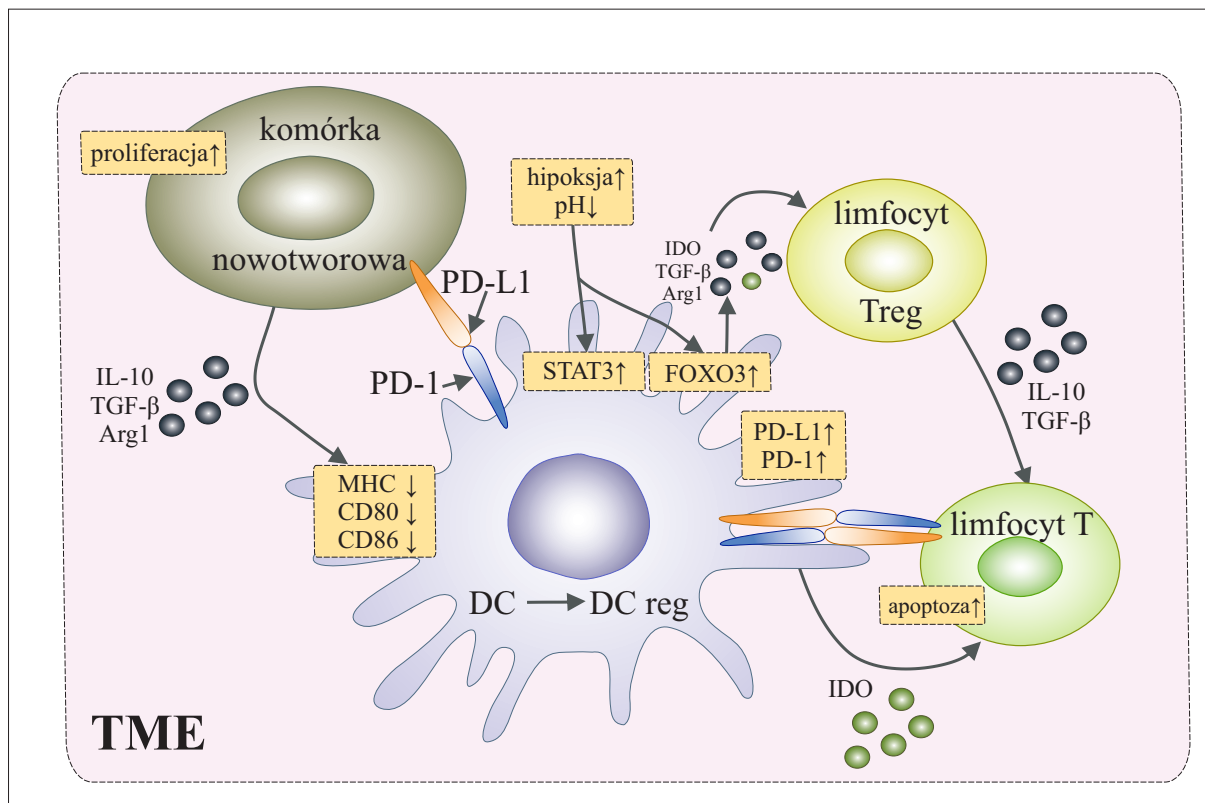
**Ryc. 3.** Ucieczka komórek nowotworowych spod nadzoru immunologicznego. Relację pomiędzy układem odpornościowym a rozwijającym się nowotworem, opisywaną w ramach immunoredagowania można podzielić na trzy fazy: eliminację, równowagę oraz ucieczkę. W pierwszej fazie, na wczesnym etapie rozwoju, komórki nowotworowe ekspozycją cząsteczek MHC klasy I, za pomocą których prezentują własne antygeny i indukują aktywację odpowiedzi przeciwnowotworowej. Dodatkowo komórki nowotworowe wydzielają DAMP, które pobudzają komórki prezentujące antygen infiltrujące do tkanki powstającego nowotworu. Jeżeli w fazie eliminacji komórki nowotworowe nie zostaną w pełni usunięte, proces immunoredagowania przechodzi w fazę równowagi. Na tym etapie, układ odpornościowy na bieżąco eliminuje powstające komórki nowotworowe, jednocześnie wywierając presję na pozostałe komórki nowotworowe, które zmieniając swoje właściwości i cechy przechodzą do ostatniej fazy – ucieczki spod nadzoru immunologicznego. Następuje dalszy nieograniczony rozwój nowotworu, któremu towarzyszy wytworzenie swoistej niszy zwanej mikrośrodowiskiem nowotworu (wg [29,42] zmodyfikowano)

gicznego, obecność komórek dendrytycznych infiltrujących tkankę nowotworu (tumor infiltrating DCs, TIDCs) jest dobrym markerem prognostycznym kojarzonym z dobrym rokowaniem w chorobie nowotworowej. Jednak na interakcje między komórkami odpornościowymi i komórkami nowotworowymi wpływa nie tylko liczba naciekających DCs. Istotne znaczenie ma stan dojrzałości tych komórek oraz miejsce ich naciekania, które ulega zmianie wraz ze stopniem zaawansowania nowotworu. Sandel i wsp. [91] u pacjentów z nowotworem jelita grubego stwierdzili stosunkowo dużą liczbę niedojrzałych DCs CD1a<sup>+</sup> w obszarach marginalnych zaawansowanego guza oraz w nabłonku nowotworowym, w którym wielkość nacieku DCs była związana z wielkością nacieku limfocytów T CD4<sup>+</sup>. Natomiast dojrzałe DCs CD208<sup>+</sup> wykryto głównie w zrębie i obszarze marginalnym nowotworu, a mimo to wzrost nacieku tych komórek był związany z krótszym czasem przeżycia pacjentów. Co więcej, Kocián i wsp. [49] zasugerowali, że u pacjentów leczonych z powodu nowotworu jelita grubego pojawia się wysokie ryzyko nawrotu choroby, gdy wykazują oni niski odsetek naciekających limfocytów, obniżony naciek dojrzałych DCs CD208<sup>+</sup> przy jednoczesnym zwiększonym napływności komórek DCs CD1a<sup>+</sup>. Dodatkowo proces ten był skorelowany z wystąpieniem mutacji w kodonie 13 protoonkogenu K-RAS.

Rozwijający się nowotwór tworzy w swoim otoczeniu szczególny rodzaj niszy, zwanej mikrośrodowiskiem nowotworu (TME), w którym jest utrudnione inicjowa-

nie skutecznej odpowiedzi odpornościowej przeciwko nowotworowi [92] (ryc. 4). Komórki dendrytyczne, które znajdują się pod niekorzystnym wpływem TME, ulegają niepełnemu zróżnicowaniu i pobudzeniu [113]. Populacja prawidłowo funkcjonujących dojrzałych DCs zmniejsza się, a zwiększa się natomiast liczba niedojrzałych DCs oraz prekursorów innych komórek pochodzenia mieloidalnego [23].

W wyniku presji wywieranej przez środowisko (w tym hipoksji, obniżonego pH), TIDCs mogą wykazywać nadekspresję genów, które wpływają na ich regulatorowy charakter. Przykładowo, zwiększenie ekspresji czynnika transkrypcyjnego STAT3, wiąże się z produkcją białka S100A9, które zapobiega pełnemu dojrzewaniu DCs. Zwiększenie aktywności czynnika transkrypcyjnego FOXO3 – wiąże się z indukcją wydzielania 2,3-dioksygenazy indoloaminowej (IDO), arginazy 1 (Arg1) i TGF-β oraz obniżeniem ekspresji czynników kostymulujących [107,113]. W rezultacie, DCs naciekające tkankę nowotworową nie pełnią swoich podstawowych funkcji i ulegają stopniowemu przeobrażeniu w komórki supresorowe wobec efektorowych limfocytów T oraz limfocytów T regulatorowych [92]. Należy podkreślić, że regulatorowe DCs są niezbędne w warunkach prawidłowych, aby utrzymać tolerancję na antygeny własne organizmu [92]. Jednak w TME oprócz komórek supresorowych pochodzenia mieloidalnego (MDSC) oraz makrofagów związanych z nowotworem (TAM), DCREg stają się jednymi z głównych komórek układu odpornościowego



**Ryc. 4.** Wpływ mikrośrodowiska nowotworowego (TME) na DCs naciekające tkankę guza. Proliferyjące komórki nowotworowe wydzielając czynniki o charakterze supresorowym (IL-10, TGF-β, Arg1) indukują obniżenie ekspresji MHC oraz cząsteczek kostymulujących, natomiast hipoksja oraz obniżone pH prowadzą do nadekspresji czynników transkrypcyjnych (*STAT3*, *FOXO3*) w DCs. W supresorowym środowisku DCs wykazują zwiększoną ekspresję cząsteczek PD-L1 oraz PD-1, które oddziałując z limfocytami T indukują ich apoptozę. W wyniku takiej presji, DCs naciekające tkankę nowotworu mogą przekształcać się w DCreg, które są odpowiedzialne za tłumienie powstawania odpowiedzi przeciwnowotworowej (wg [107] zmodyfikowano)

odpowiedzialnych za tłumienie powstawania odpowiedzi przeciwnowotworowej, co promuje dalszy rozwój i wzrost nowotworu [32,92,98].

Komórki dendrytyczne, podobnie jak inne komórki o charakterze supresorowym lub regulatorowym, takie jak MDSC, TAM lub limfocyty Treg ulegają zmianie pod wpływem nowotworu. Oprócz czynników wzrostowych wytwarzanych przez komórki nowotworowe, produkowane są także czynniki o charakterze immunosupresorowym, takie jak: cytokiny – IL-10, TGF-β, IL-6 lub Arg1, IDO, prostaglandyna E2 (PGE2), NO, w istotny sposób wpływające na funkcjonowanie TIDCs [92].

Interleukina 10 produkowana przez komórki nowotworowe, a także limfocyty T, B oraz makrofagi, hamuje dojrzewanie DCs, w tym indukując obniżenie ekspresji cząsteczek MHC i cząsteczek kostymulujących, a także wytwarzanie cytokin prozapalnych [45,57,92]. Co więcej, utrudnia komórkom dendrytycznym migrację zależną od cząsteczki CCR7 i wpływa na ich zdolność do wprowadzenia limfocytów T w stan anergii [39,57]. Zespół Ruffell [87] wykazał w mysim modelu raka piersi, że IL-10 produkowana głównie przez TAM wpływała na zmniejszenie wytwarzania IL-12 przez pojawiające się

DCs CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>. Uniemożliwiało to powstanie wydajnej odpowiedzi przeciwnowotworowej. Ogólnoustrojowe podanie przeciwciał blokujących receptor IL-10 (IL-10R) połączone z chemioterapią opartą na paklitakselu i karboplatynie odwracało negatywny wpływ IL-10 na komórki dendrytyczne. Natomiast Boks i wsp. [10] oceniali wpływ m.in. IL-10, TGF-β oraz witaminy D3 na generowanie DCreg, których obecność jest ważna w immunosupresji schorzeń autoagresywnych lub w transplantologii. Dowiedli że IL-10 indukowała największe wyciszenie odpowiedzi, głównie przez pobudzenie DCs do dużego wydzielania IL-10, ale również przez pobudzenie proliferacji Treg i zahamowanie aktywacji dziewiczych limfocytów T. Warto podkreślić, że interakcja między DCreg a limfocytami Treg jest zjawiskiem dynamicznym, samonapędzającym. Z jednej strony, DCreg promują proliferację limfocytów Treg, z drugiej strony, produkowana IL-10 przez limfocyty Treg wpływa na polaryzację DCs w kierunku DCreg [57].

Drugą niezwykle ważną cytokiną występującą w mikrośrodowisku nowotworu jest TGF-β. Wpływa hamująco na różnicowanie się DCs z hematopoetycznych komórek prekursorowych oraz na generowanie DCs o niedojrzałym fenotypie [33]. W obecności TGF-β, DCs słabiej

przetwarzają pochłonięte antygeny i migrują do węzłów chłonnych, a więc słabiej oddziałują z limfocytami T [57]. Ponadto, w odpowiednich warunkach środowiskowych również komórki dendrytyczne mogą być producentami TGF- $\beta$ . W obecności komórek nowotworowych, mieloidalne niedojrzałe DCs wydzielają TGF- $\beta$ , który indukuje proliferację naturalnie występujących limfocytów Treg *in vivo* oraz prowadzi do supresji odpowiedzi odpornościowej promującej dalszy wzrost nowotworu [25]. Co więcej, wykazano związek między TGF- $\beta$  wytwarzanym przez DCs, ekspresjąIDO a charakterem komórek dendrytycznych. TGF- $\beta$  wydzielany autokrynnie przez subpopulację DCs CD8<sup>+</sup>, indukuje w nich ekspresjęIDO, co przekształca je w DCreg. Z kolei subpopulacja DCs CD8<sup>+</sup>, która nie wytwarza TGF- $\beta$ , wykazuje właściwości immunogenne. Jednak kontakt tych komórek z TGF- $\beta$  pochodzenia egzogenego, powoduje zmiany charakterystyczne w populacji DCs CD8<sup>+</sup> [8]. Jak stwierdzili Liu i wsp. [54], TGF- $\beta$  oraz PGE2 obecne w mikrośrodowisku mysiego nowotworu płuca LLC, promowały różnicowanie się DCs w kierunku DCreg o fenotypie CD11b<sup>high</sup>MHCII<sup>low</sup>, które wydzielają Arg1 hamowały aktywność limfocytów T. Zidentyfikowane DCs nie wykazywały ekspresji cząsteczek F4/80 ani Gr-1, dlatego też możliwe było odróżnienie ich od populacji komórek MDSC oraz makrofagów CD11b<sup>high</sup>.

Działanie pleiotropowe czynników jest typowe także dla prostaglandyny E2. Podczas ostrego stanu zapalnego PGE2 działa immunomodulująco, zwiększając ekspresję CCR7 na powierzchni DCs i ułatwiając ich migrację do węzłów chłonnych. Niemniej jednak podczas przewlekłego stanu zapalnego, PGE2 wpływa na przeobrażenie się DCs w komórki regulatorowe z utrudnionym wydzielaniem bioaktywnej postaci heterodimeru cytokiny IL-12 – zwiększonemu wydzielaniu podjednostki IL-12p40, towarzyszy zmniejszone wydzielanie podjednostki IL-12p35. Jednocześnie takie komórki charakteryzuje wzrost wytwarzania IL-10 [92].

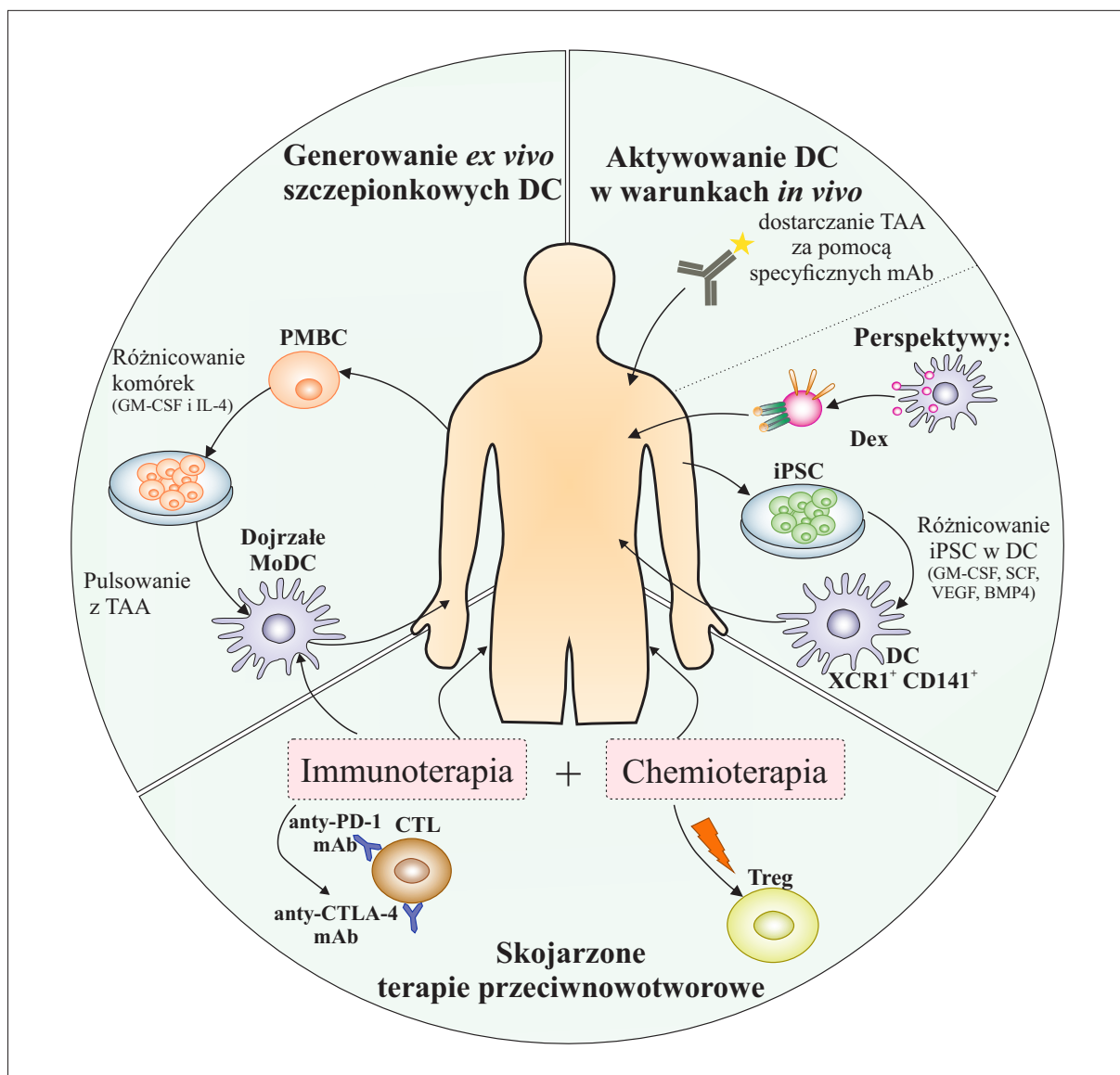
Do immunosupresorowych czynników mogących indukować powstawanie DCreg zalicza się enzymy, takie jak arginaza-1, metabolizująca L-argininę oraz 2,3 dioksygenaza indoloaminowa rozkładająca tryptofan. Oba aminokwasy są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania limfocytów T, a ich dostępność w środowisku obniża się wraz ze zwiększoną aktywnością Arg1 iIDO w komórkach DCs [66]. Dotychczas sądzono, że supresja powstawania odpowiedzi odpornościowej indukowana przez aktywność arginazy związana jest głównie z MDSC oraz TAM, jednak istnieją już dane, że taki sam mechanizm supresji może być uruchamiany w DCreg związanych z nowotworem [23,57]. Norian i wsp. [66] dowiedli, że w mysim raku sutka DCs o fenotypie MHCII<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>high</sup> naciekające tkankę nowotworu, hamowały aktywność limfocytów T CD8<sup>+</sup>, głównie przez wytwarzanie arginazy. Natomiast Zheng i wsp. [116] podjęli próbę zniesienia negatywnego wpływuIDO na powstawanie odpowiedzi odpornościowej. W tym celu w modelu mysiego raka sutka 4T1 wykorzystano szczepionki komórkowe na bazie DCs z wyciszoną za pomocą

siRNA ekspresjąIDO. W wyniku takiego traktowania uzyskano m.in. zmniejszenie objętości guzów, redukcję apoptozy limfocytów T CD4<sup>+</sup> oraz CD8<sup>+</sup>, wzrost proliferacji i cytotoksycznej aktywności limfocytów T swoistych antygenowo oraz zmniejszenie liczby limfocytów Treg w porównaniu do myszy obarczonych nowotworem i otrzymujących kontrolne szczepionki na bazie DCs.

Komórki dendrytyczne znajdujące się w TME mogą wykazywać zwiększoną ekspresję cząsteczek PD-L1, które oddziałując z cząsteczkami PD-1 na powierzchni limfocytów T naciekających tkankę nowotworu, indukują ich apoptozę. Taki mechanizm hamowania odpowiedzi przeciwnowotworowej jest obserwowany m.in. w nowotworach jajnika [17,50,57]. Jak stwierdzili Krempski i wsp. [50] komórki dendrytyczne naciekające tkankę nowotworową jajnika, stopniowo zwiększały ekspresję PD-L1, a dodatkowo także PD-1. Komórki o fenotypie PD-L1<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> miały klasyczny fenotyp DCs (np. CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>), jednak były niedojrzałe i słabo reagowały na sygnały niebezpieczeństwa. Akumulacja tych komórek w guzie wiązała się z hamowaniem aktywności i zmniejszeniem nacieku limfocytów T. Zablokowanie cząsteczki PD-1 przez ogólnoustrojowe podanie przeciwciał anty-PD-1, zaowocowało zmniejszeniem masy guza i wzrostem odpowiedzi limfocytów T [50]. Salmon i wsp. [90] wykazali, że w mysich modelach czerniaka komórki CD103<sup>+</sup> DCs napływające do węzłów chłonnych drenujących nowotwór cechowała większa ekspresja cząsteczki PD-L1. Aby znieść ich supresorowy wpływ na powstawanie odpowiedzi odpornościowej, autorzy zablokowali działanie PD-L1, a w celu pogłębienia efektu terapię uzupełniono o podawanie FLT3L oraz poly (I:C).

Do hamowania odpowiedzi przeciwnowotworowej, poza regulatorowymi komórkami dendrytycznymi, przyczyniają się także komórki MDSC, które w wyniku zaburzenia równowagi zdrowotnej organizmu (np. w chorobach z autoagresji, podczas przewlekłego stanu zapalnego lub podczas rozwoju nowotworu) ulegają wzmoczonej mielopoecie i gromadzeniu się w tkankach [13]. MDSC hamują odpowiedź układu odpornościowego z wykorzystaniem tych samych mechanizmów, jakie obserwowane są dla regulatorowych DCs. MDSC indukują ekspansję limfocytów Treg i upośledzają funkcjonowanie komórek NK przez wytwarzanie reaktywnych form tlenu oraz azotu, eliminację kluczowych aminokwasów ze środowiska (z wykorzystaniem enzymów Arg1 iIDO) oraz wytwarzanie IL-10 oraz TGF- $\beta$  [51,59].

Wiele uwagi poświęca się oddziaływaniom komórek MDSC z innymi komórkami układu odpornościowego znajdującymi się w TME oraz ich związkowi z TAM lub interakcjom z komórkami NK, jednak niepełna jest wciąż wiedza na temat relacji między MDSC a DCs [69]. Uważa się, że zwiększenie odsetka komórek MDSC u pacjentów z chorobą nowotworową wynika z uprzywilejowanego różnicowania się wspólnej komórki progenitorowej w kierunku niedojrzałych komórek mieloidalnych. Przykładem badań nad zależnością



**Ryc. 5.** Wykorzystanie DCs w terapii przeciwnowotworowej. DCs niezbędne do przygotowania szczepionek komórkowych są generowane w warunkach *ex vivo* poprzez różnicowanie komórek prekursorowych pobranych od pacjenta lub dawcy. Następnie niedojrzałe komórki są zmieniane w kierunku dojrzałych DCs prezentujących antygeny. Ponadto możliwe jest także aktywowanie DCs w warunkach *in vivo* dzięki wprowadzeniu antygenów (np. TAA) do organizmu. W tym celu wykorzystuje się nośniki, takie jak przeciwciała monoklonalne (mAb) skierowane przeciwko markerom powierzchniowym znajdującym się na DCs. Oprócz wykorzystania DCs w postaci monoterapii, stosuje się terapie łączone z innymi formami terapii np. chemioterapią. Poszukiwane są alternatywne, bardziej wydajne strategie otrzymywania szczepionkowych DCs (np. z wykorzystaniem indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSC)), a także prowadzone są badania nad wykorzystaniem egzosomów wydzielanych przez DCs (Dex) w terapii przeciwnowotworowej (wg [16] zmodyfikowano)

miedzy MDSC a DCs są doświadczenia Poschke i wsp. [78]. Dowiedli, że MDSC pozyskiwane od pacjentów obarczonych czerniakiem wpływały na upośledzenie funkcji komórek dendrytycznych, które charakteryzowała zmniejszona zdolność do pochłaniania antygenów i migracji oraz niezdolność do aktywowania limfocytów T wytwarzających IFN- $\gamma$ .

#### WYKORZYSTANIE DCs W TERAPII PRZECIWNOWOTWOROWEJ

Przytoczone wyżej przykłady ilustrują badania nad rolą

DCs w aktywacji układu odpornościowego i w generowaniu odpowiedzi przeciwnowotworowej, wskazując jednocześnie na próby odwrócenia supresorowego ich działania, gdy ulegają zmianie w mikrośrodowisku zaawansowanego nowotworu. Istnieją dwie główne koncepcje wykorzystania DCs w terapii przeciwnowotworowej (ryc. 5): (1) DCs pozyskiwane od autologicznego dawcy, generowane *ex vivo*, a następnie ponownie wprowadzane do jego organizmu lub (2) wspomaganie *in vivo* obecnych w organizmie DCs przez dostarczanie odpowiednich egzogennych sygnałów wspomagających ich



aktywację.

### KONCEPCJA GENEROWANIA *EX VIVO* SZCZEPIONKOWYCH DCs

Uwzględniając rolę DCs w aktywacji układu odpornościowego i w tworzeniu odpowiedzi przeciwnowotworowej, są traktowane jako potencjalne narzędzie terapeutyczne, a immunoterapia z wykorzystaniem tych komórek staje się nową strategią w leczeniu chorób nowotworowych.

Obecnie znane są metody otrzymywania komórek dendrytycznych w warunkach *ex vivo*, głównie przez możliwość różnicowania komórek prekursorowych. W układzie mysim jednym z najczęściej stosowanych sposobów jest utrzymywanie komórek pochodzenia szpikowego w hodowli zawierającej GM-CSF i IL-4 [65], aby umożliwić namnażanie się i przeobrażanie tych komórek w niedojrzałe cDCs. Niedojrzałe DCs mogą być dalej różnicowane *ex vivo* za pomocą wielu różnych stymulatorów i/lub w obecności TNF- $\alpha$  w kierunku komórek prezentujących antygeny [88,115]. Wygenerowanie komórek dendrytycznych z prekursorów innej linii rozwojowej, jak w przypadku pDCs, wymaga hodowli w obecności cytokin, takich jak IL-3 [4]. W układzie ludzkim DCs mogą być generowane z komórek prekursorowych izolowanych z krwi obwodowej np. komórek monocytarnych CD14<sup>+</sup>, prekursorów CD34<sup>+</sup> lub prekursorów DCs [88].

Obecnie jednym z głównych sposobów uzyskania DCs w próbach klinicznych jest izolacja monocytów CD14<sup>+</sup> z krwi pacjenta lub dawcy. Takie monocyty są utrzymywane w kilkudniowej hodowli w obecności GM-CSF i IL-4 umożliwiającej namnażanie i przeobrażanie w niedojrzałe komórki dendrytyczne. Populacje DCs otrzymywane z komórek prekursorowych, zarówno z CD14<sup>+</sup> oraz CD34<sup>+</sup> różnią się od DCs znajdujących się w organizmie, jednak odpowiednia modyfikacja warunków hodowli umożliwia otrzymanie funkcjonalnych DCs [88]. Jednym z najistotniejszych aspektów skuteczności szczepionek komórkowych na bazie DCs jest doprowadzenie ich do odpowiedniego stopnia dojrzałości. W zależności od potrzeb mogą to być komórki częściowo dojrzałe lub całkowicie zróżnicowane, ale zawsze muszą być zdolne do prezentowania antygenów nowotworowych i do zapoczątkowania odpowiedzi odpornościowej.

Za duży przełom w immunoterapii przeciwnowotworowej uważa się zidentyfikowanie subpopulacji DCs – ludzkich komórek CD141<sup>+</sup> mających ekspresję XCR1. Komórki te wydajniej prowadzą prezentację krzyżową antygenów oraz silniej aktywują komórki NK w porównaniu do innych subpopulacji ludzkich DCs [5,31]. Mimo że jest to niezwykle rzadka populacja (mniej niż 0,1% komórek jednonądrzastych krwi), wiąże się duże nadzieje z jej wykorzystaniem w immunoterapii przeciwnowotworowej. Dlatego też poszukiwane są metody pozyskiwania tych komórek w warunkach *ex vivo* [16]. Silk i wsp. [99] opracowali wieloetapową metodę otrzymywania komórek CD141<sup>+</sup>XCR1<sup>+</sup> z pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSC), hodowanych w obecności czynników, takich

jak GM-CSF, SCF, VEGF, BMP4. Otrzymane tą metodą DCs charakteryzowały się wydajną prezentacją krzyżową antygenów Melan A (MART-1) dziewiczym limfocytom T CD8<sup>+</sup>. iPSC stanowią nieograniczone źródło autologicznych DCs w związku z ich możliwością odnawiania się w warunkach *in vitro*. Dzięki wykorzystaniu iPSC jako prekursorów DCs, możliwe stało się otrzymywanie na dużą skalę populacji DCs o pożądanym fenotypie [53,89].

Najczęściej, aby uzyskać wydajną odpowiedź przeciwnowotworową, przed podaniem szczepionki komórki dendrytyczne stymuluje się (pulsuje) za pomocą antygenów związanych z nowotworem (TAA). Stosowane są różne źródła TAA, a dobór antygenów nowotworowych obejmuje zarówno unikatowe (zmutowane) antygeny, jak i prawidłowe, wspólne antygeny własne. Wykorzystywane są precyzyjnie zdefiniowane peptydy pochodzące z TAA; mRNA kodujące jeden ze swoistych antygenów lub wektory niosące informacje o określonym TAA. Oprócz antygenów nowotworowych stosuje się również lizaty całych komórek nowotworowych. Alternatywnie, tworzone dendritomy, będące efektem fuzji inaktywowanych komórek nowotworowych z DCs [11,16,24,88].

Zaletą pulsowania DCs peptydami uzyskanymi z TAA jest możliwość bezpośredniego wiązania się antygenów z cząsteczkami MHC i tworzenia kompleksów dostarczanych na powierzchnię DCs. Natomiast białka lub lizaty całych komórek nowotworowych, muszą najpierw zostać pochłonięte przez komórki dendrytyczne i przekształcone do krótkich peptydów. Jednak stosowanie lizatów komórkowych niesie za sobą istotną korzyść – w tym samym czasie do stymulacji może zostać wykorzystanych wiele stymulatorów pochodzenia nowotworowego oraz cząsteczek DAMP [88]. Najprostszą metodą otrzymywania lizatu jest kilkukrotny cykl szybkiego mrożenia i rozmrażania, prowadzący do uwolnienia antygenów oraz innych czynników stymulujących dojrzewanie komórek dendrytycznych [88]. Opisana metoda jest jedną z najczęściej stosowanych w pozyskiwaniu stymulatorów zarówno do pobudzania ludzkich, jak i mysich niedojrzałych DCs. W prowadzonych przez nas doświadczeniach terapeutycznych również stosujemy ten sposób aktywacji mysich DCs w warunkach *ex vivo* [71,82,86,115].

Innym sposobem dostarczania antygenów nowotworowych do DCs jest wykorzystanie wektorów wirusowych. Wprowadzenie genu kodującego określony TAA, z możliwością szybkiego przetransportowania produktu na powierzchnię DCs, przy jednoczesnym usunięciu genów odpowiedzialnych za wirulencję, czyni to rozwiązanie coraz bardziej atrakcyjnym. Wykorzystanie wektorów umożliwia wprowadzenie dodatkowych genów do genomu DCs. Mogą one kodować cytokiny lub cząsteczki kostymulujące, które wspierają proces dojrzewania DCs [16,88]. Spośród wektorów niosących TAA na szczególną uwagę zasługują lentiwirusy, głównie ze względu na ich mniejszą immunogenność w porównaniu do innych systemów transdukcji. Dodatkową przewagą lentiwirusów jest ich zdolność do transdukowania niedzieliących się

komórek np. komórek dendrytycznych generowanych z monocytów [88].

Obecnie prowadzonych jest kilkaset prób klinicznych, w których komórki dendrytyczne wykorzystuje się w terapii przeciwnowotworowej. Zdecydowaną część z nich to badania znajdujące się w I lub II fazie. W tabeli 1 zestawiono próby kliniczne będące w III fazie badań określających skuteczność szczepionek komórkowych na bazie DCs w terapii przeciwnowotworowej.

Przykładem jedyne w immunoterapii preparatu zaakceptowanego przez FDA jest Sipuleucel-T, do którego komórki niezbędne do wykonania szczepionek izoluje się z krwi. Oprócz DCs, składnikami tej szczepionki są limfocyty B, makrofagi oraz komórki NK hodowane *ex vivo* z rekombinowanym białkiem fuzyjnym składającym się z PAP (kwaśnej fosfatazy prostaty) oraz GM-CSF. Nadrzędnym zadaniem tej immunoterapii jest wykorzystanie DCs do aktywacji swoistych nowotworowo limfocytów T. Jednak jej rezultatem jest niewielkie wydłużenie średniego czasu przeżycia pacjentów z hormonoopornym rakiem stercza w porównaniu do grupy otrzymującej placebo [43].

Niemniej jednak obecnie nadal są prowadzone badania kliniczne, w których oceniana jest skuteczność terapii przeciwnowotworowej z wykorzystaniem preparatu Sipuleucel-T (tabela 1). Scholz i wsp. [93] opublikowali wyniki badań klinicznych (NCT01832870; I faza), w których wykazali, że Sipuleucel-T w połączeniu z przeciwciałami Ipilimumab (mAbs anty-CTLA-4) było dobrze tolerowane przez pacjentów chorych na przerzutującego raka stercza opornego na kastrację. Ponadto, w porównaniu do monoterapii preparatem Sipuleucel-T, zastosowanie skojarzonej terapii wpłynęło na zwiększenie poziomu przeciwciał swoistych nowotworowo.

Prowadzone są szerokie badania kliniczne nad szczepionkami komórkowymi o nazwie DCVAC, które w próbach klinicznych są wykorzystywane w terapii chorych na nowotwory stercza (DCVAC/PCa), płuca (DCVAC/LuCa) lub jajnika (DCVAC/OvCa). Istotą szczepionki DCVAC są generowane w warunkach *ex vivo* autologiczne DCs, które są pulsowane z komórkami nowotworowymi zabitymi wysokim ciśnieniem hydrostatycznym [38,109]. W badaniach klinicznych I/II fazy, w której szczepionki DCVAC/PCa stosowano w połączeniu z chemioterapią docetakselem, odnotowano wydłużony czas przeżycia pacjentów chorych na przerzutującego raka stercza opornego na kastrację [77]. Aktualnie trwa III faza badań klinicznych nad wykorzystaniem szczepionki DCVAC/PCa w terapii chorych na raka gruczołu krokowego (tabela 1).

Warto wspomnieć, że badania przedkliniczne wykazały, iż w wyniku mieszanej hodowli DCVAC/LuCa z limfocytami pobranymi od pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca, szczepionkowe DCs obniżały odsetek limfocytów Treg, a także pobudzały zdolne do wytwarzania IFN- $\gamma$  swoiste wobec antygenów nowotworowych limfocyty T CD4<sup>+</sup>

i CD8<sup>+</sup> (kontynuacja tych badań jest obecnie realizowana w ramach prób klinicznych NCT02470468; I/II faza) [38].

## DRUGI PODANIA SZCZEPIONKOWYCH DCs

Opracowano różne metody i schematy otrzymywania oraz warunki odpowiedniego pobudzenia DCs stanowiących istotę szczepionek komórkowych. Jednak nadal pozostaje wiele nierozwiązanych ważnych kwestii decydujących o skuteczności zastosowanej immunoterapii, w tym: wybór odpowiedniego schematu podań szczepionek, dobór liczby komórek niezbędnej do uruchomienia odpowiedzi oraz to co wydaje się najistotniejsze – zastosowanie odpowiedniej drogi podania [11,14,88].

Od lat oceniana jest skuteczność różnych dróg podania szczepionek komórkowych na bazie DCs [70,83]. Wykorzystywane są następujące drogi iniekcji: śródskórną (*i.d.*), podskórną (*s.c.*), dożylną (*i.v.*), dowęzłowo (*i.n.*) lub doguzowo (*i.t.*) [14,16,88]. Po zastosowaniu każdego ze sposobów obserwowano odpowiedź przeciwnowotworową, jednak uzyskane w ten sposób efekty różnią się charakterem i nasileniem [16]. W wyniku dostarczenia DCs na drodze *i.d.* lub *s.c.* większość komórek pozostaje w miejscu iniekcji, gdzie mogą zostać pochłonięte przez napływające makrofagi. Do węzłów chłonnych przedostaje się mniej niż 5% podanych komórek, jednak ten niewielki odsetek DCs migrujących do narządów limfatycznych może indukować skuteczną odpowiedź przeciwnowotworową. Natomiast komórki, które pozostały *in situ*, mogą zachowywać się jako adiuwant stymulujący rezydujące DCs do aktywacji limfocytów T CD8<sup>+</sup>, co w rezultacie pogłębia efekt przeciwnowotworowy [16]. Po podaniu DCs drogą *i.v.*, komórki napływają do płuc, a następnie do wątroby i śledziony, a ich niewielka część napływa do narządów limfatycznych [16]. Bezpośrednie podanie DCs do węzłów chłonnych wydaje się rozwiązaniem idealnym. Jednak wiąże się ono z wyzwaniem technicznymi – iniekcje muszą być wykonywane pod nadzorem ultrasonograficznym i przez specjalistę tak, aby nie naruszyć struktury węzłów chłonnych. Indukowana w ten sposób odpowiedź jest porównywalna lub nawet słabsza od obserwowanej po podaniu drogą *i.d.* [16]. DCs mogą być również wprowadzane bezpośrednio do guza nowotworowego (*i.t.*). Komórki szczepionkowe dostarczone w ten sposób są narażone na bezpośrednie oddziaływanie TME, które może negatywnie wpływać na ich funkcjonowanie [16]. Co więcej, nie tylko aktywowane *ex vivo* DCs wprowadzane są w ten sposób do organizmu gospodarza. Podejmowane są również próby doguzowego podawania DCs, bez wcześniejszego kontaktu z TAA [14]. Ponadto wykonywane są próby iniekcji DCs z jednoczesnym wykorzystaniem różnych dróg, np. *i.d.* oraz *s.c.* lub *i.d.* oraz *i.v.*, dzięki czemu możliwe jest generowanie szybszej i silniejszej odpowiedzi odpornościowej [16].

Bezpieczeństwo immunoterapii opartej na DCs zostało potwierdzone w wielu badaniach, zarówno w I, jak i w II fazie badań klinicznych. U pacjentów poddanych terapii

**Tabela 1.** Badania kliniczne (faza III) wykorzystujące w terapii przeciwnowotworowej szczepionki na bazie DCs

Identyfikator i status badań	Nowotwór	Nazwa szczepionki	Stymulacja DC	Droga podania DC	Inne typy zastosowanej terapii	Rezultaty kliniczne
NCT01875653 zakończone	czerniak	eltrapuldencel-T	GM-CSF; napromieniowane autologiczne komórki nowotworowe	s.c.	-	po zastosowaniu szczepionki eltrapuldencel-T odnotowano zwiększenie odsetka 2-letniego (72%) oraz 5-letniego (54%) przeżycia pacjentów podczas występowania przerzutów [41]
NCT02993315; zakończone	czerniak	-	pulsowanie syntetycznymi peptydami	i.n.	-	b.d.*
NCT01983748; trwające	czerniak błony naczyniowej oka	-	autologiczne nowotworowe RNA	i.v.	-	b.d.
NCT00779402; zakończone	nieprzerzutujący rak stercza	Sipuleucel-T (Provenge)	rekombinowane białko fuzyjne PAP-GM-CSF	i.v.	-	nie wykazano obniżenia QoF* u pacjentów otrzymujących Sipuleucel-T [7]
NCT00005947; NCT00065442; NCT01133704; zakończone	przerzutujący rak stercza	Sipuleucel-T (Provenge)	rekombinowane białko fuzyjne PAP-GM-CSF	i.v.	-	w odniesieniu do grupy kontrolnej, zastosowanie Sipuleucel-T nie indukowało znaczących zmian w TDRP*, natomiast wpłynęło na wydłużony TFOA* (mediana TFOA wynosiła odpowiednio: 9,7 i 12,6 miesiąca) [22,36,43,100,101]
NCT02111577; trwające	przerzutujący rak stercza oporny na kastrację	DCVAC/PCa	komórki nowotworowe zabite wysokim ciśnieniem hydrostatycznym	s.c.	chemioterapia (docetaksel)	w I/II fazie badań odnotowano, że stosowanie docetakselu oraz szczepionek DCVAX/PCa wydłużyło czas przeżycia pacjentów [77]
NCT02546102; trwające	glejak wielopostaciowy	ICT-107	pulsowanie z syntetycznymi peptydami pochodzącymi z autologicznych TAA	i.d.	chemioterapia (temozolomid)	odnotowano wydłużony czas przeżycia pacjentów otrzymujących ICT-107 [75]
NCT00045968; trwające, nierekrutujące pacjentów	glejak wielopostaciowy	DCVax®-L	autologiczny lizat nowotworowy	i.d.	chirurgiczne usunięcie guza, radioterapia i chemioterapia (temozolomid)	b.d.
NCT01759810; trwające	glejak wielopostaciowy	-	autologiczne antygeny pochodzące z komórek nowotworowych oraz macierzystych komórek nowotworowych	s.c.	immunoterapia (szczepionki komórkowe na bazie CTL oraz HSC)	b.d.
NCT01782287; trwające	nowotwór płuca przerzutujący do mózgu	-	autologiczne antygeny pochodzące z komórek nowotworowych oraz macierzystych komórek nowotworowych	s.c.	immunoterapia (szczepionki komórkowe na bazie CTL oraz HSC)	b.d.
NCT01782274; trwające	nowotwór piersi przerzutujący do mózgu	-	autologiczne antygeny pochodzące z komórek nowotworowych oraz macierzystych komórek nowotworowych	s.c.	immunoterapia (szczepionki komórkowe na bazie CTL oraz HSC)	b.d.
NCT02503150; nierozpoczęte	przerzutujący rak jelita grubego	-	pulsowanie autologicznym lizatem nowotworowym	i.v.	chemioterapia (mFOLFOX6: oksaliplatyna, 5-fluorouracyl i leukoworyna)	b.d.

**cd. Tabela 1.** Badania kliniczne (faza III) wykorzystujące w terapii przeciwnowotworowej szczepionki na bazie DCs

Identyfikator i status badań	Nowotwór	Nazwa szczepionki	Stymulacja DC	Droga podania DC	Inne typy zastosowanej terapii	Rezultaty kliniczne
NCT00006434; zakończone	chłoniak nieziarnicy	-	autologiczny lizat nowotworowy	b.d.	immunoterapia (IL-2)	b.d.
NCT01582672; trwające, nierekrutujące pacjentów	zaawansowany rak nerkowokomórkowy	AGS-003	autologiczne RNA wprowadzane do DC na drodze elektroporacji	i.d.	sunitinib	w II fazie badań odnotowano, że zastosowanie AGS-003 w połączeniu z sunitinibem indukowało odpowiedź odpornościową i wydłużony czas przeżycia pacjentów [3].

\*b.d. – brak danych; QOL – quality of life; TDRP – (time to disease-related pain) czas (wyrażony w miesiącach), po którym występuje ból związany z chorobą;

TFOA – (time to first use of opioid analgesics) czas (wyrażony w miesiącach), po którym następuje pierwsze użycie opioidowych leków przeciwbólowych.

Opracowano na podstawie [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov).

komórkami dendrytycznymi obserwowano jedynie niewielkie objawy grypopodobne, którym oprócz gorączki mogła towarzyszyć reakcja w miejscu iniekcji [11]. Pomimo obiecujących wyników w I oraz II fazie badań klinicznych, większość badań nad wykorzystaniem DCs w postaci monoterapii nie osiągnęła oczekiwanych rezultatów w III fazie badań klinicznych. Przyczyną niezadawalających rezultatów w aktywacji układu odpornościowego mogło być zastosowanie szczepionek dopiero w zaawansowanym stadium rozwoju choroby nowotworowej [11]. Mimo specyficzności TAA, użyte DCs nie były zdolne do prawidłowej jego prezentacji czego skutkiem była utrata możliwości rozpoznania komórek nowotworowych przez aktywowane limfocyty T. Szczególnie ważną przyczyną niezadawalających wyników takiej immunoterapii mogła być zmienność antygenowa między komórkami guza pierwotnego a komórkami zasiedlającymi ogniska przerzutowe zlokalizowane w odległych tkankach w organizmie [14].

Istotnym czynnikiem wpływającym na pomyślny przebieg terapii nowotworowej, poza stopniem zaawansowania choroby, jest także obecność limfocytów T regulatorowych. Jak podaje Wada i wsp. [114] odsetek limfocytów Treg wśród komórek CD4<sup>+</sup> krwi może być czynnikiem predykcyjnym, określającym potencjalny rezultat planowanej terapii. Wada i wsp. odnotowali, że pacjenci, którzy przed rozpoczęciem immunoterapii opartej na DCs charakteryzowali się wysokim odsetkiem limfocytów Treg (>4,98%) przeżywali krócej, niż pacjenci o niskim odsetku komórek T regulatorowych. Co więcej, u tych ostatnich obserwowano obniżenie odsetka wspomnianych limfocytów po zakończeniu terapii [114]. López i wsp. [56] jako pierwsi wykazali dłuższą przeżywalność chorych na zaawansowanego czerniaka skóry, poddanych immunoterapii DCs. Szczepionkowe DCs były pulsowane z allogenicznym lizatem TRIMEL (pochodzącym z trzech linii nowotworowych czerniaka skóry), który indukował reakcję nadwrażliwości typu późnego.

W przytoczonym badaniu klinicznym pojawienie się reakcji nadwrażliwości zostało wykorzystane jako czynnik predykcyjny, ponieważ ta reakcja była skorelowana z dłuższą przeżywalnością pacjentów, brakiem progresji choroby, a także obniżeniem odsetka limfocytów Treg wykazujących ekspresję TGF- $\beta$  [56].

#### KONCEPCJA EGZOGENNEGO WSPOMAGANIA DCs ORGANIZMU

Szczepionki przeciwnowotworowe wygenerowane *ex vivo* na bazie DCs okazały się obiecującą strategią, jednak ich uzyskanie wymagało bardzo żmudnych procedur, zwłaszcza gdy autologiczne szczepionki musiałyby być przygotowywane w warunkach klinicznych wielokrotnie lub na dużą skalę. Ponadto warunki hodowli *ex vivo* DCs nie gwarantują uzyskania całego ich potencjału. Dlatego też dużym przełomem w dziedzinie immunoterapii były badania nad dostarczaniem antygenów do aktywacji DCs w warunkach *in vivo* [102]. Próba ta podejmowana w celu pobudzenia i ukierunkowania działania DCs występujących w organizmie pacjenta, wydawała się atrakcyjnym przeciwieństwem wobec kosztownej i pracochłonnej metody generowania DCs w warunkach *ex vivo* [106]. Pionierskie badania Ralpa Steinmana i Michela Nussenzweiga [12,35,102] wykazały skuteczność sprzęgania antygenów i przeciwciał specyficznych dla receptorów powierzchniowych DCs, takich jak DEC205 lub DCIR na DCs w warunkach *in vivo*. Pierwszym antygenem połączonym z przeciwciałem anti-DEC-205, był peptyd z lizozymu jaja kurzego, który w sposób dominujący indukuje odpowiedź komórek T CD4<sup>+</sup> [35,74,102].

Łączenie antygenów z odpowiednimi nośnikami ułatwia ich prezentację komórkom docelowym. Takimi nośnikami mogą być przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko dokładnie zdefiniowanemu markerom powierzchniowych znajdujących się na DCs (np. receptorom Fc przeciwciał, receptorom lektyn typu C, cząsteczkom CD40) lub wektory lentiwirusowe wyka-



zujące tropizm w kierunku DCs [16]. Do dostarczenia komórkom dendrytycznym odpowiednich stymulatorów wykorzystywane jest także zjawisko fagocytozy. Wprowadzenie antygeny do środowiska umożliwiało jednocześnie dostarczanie go różnym subpopulacjom DCs, co z kolei wzmagало aktywację limfocytów T CD4<sup>+</sup> oraz CD8<sup>+</sup> skierowanych przeciwko temu antygenowi.

Spośród kilku prób klinicznych, które są prowadzone u pacjentów cierpiących z powodu choroby nowotworowej, najczęściej wykorzystywanym receptorem docelowym komórek dendrytycznych jest DEC-205 [16]. Obecnie w badaniach klinicznych, stosuje się szczepionki będące połączeniem przeciwciał anti-DEC205 oraz antygeny nowotworowego NY-ESO-1, a jako adiuwanty są wykorzystywane poli-ICLC (NCT00948961; faza I/II), dectabina (NCT01834248; faza I), inhibitorIDO (NCT02166905, faza I/II) lub rekombinowany Flt3L (NCT02129075; faza II) [16]. Poza wymienionymi rodzajami immunoterapii, badane są również inne rozwiązania wspomagające immunogenne właściwości DCs w terapii przeciwnowotworowej [74]. Jednym z takich przykładów jest szczepionka GVAX, będąca nadal w fazie testów klinicznych (obecnie prowadzone są dwa badania kliniczne znajdujące się w fazie III: NCT00089856; NCT00133224), której istotą są napromieniowane komórki nowotworowe zmodyfikowane do produkcji GM-CSF. Komórki nowotworowe niezbędne do przygotowania szczepionki mogą być pochodzenia autologicznego, gdy są izolowane od pacjenta lub mogą być pozyskiwane z allogenicznymi nowotworowymi liniami komórkowymi. Dzięki obecności GM-CSF komórki odpornościowe, takie jak makrofagi, granulocyty, limfocyty T, a przede wszystkim komórki dendrytyczne organizmu, są przyciągane do tkanki nowotworowej i pobudzane *in situ*. Zastosowanie tej szczepionki w zwalczaniu nowotworów trzustki, stercza oraz skóry (czerniaka) indukowało humoralną i komórkową odpowiedź przeciwnowotworową [74,88]. Wspomnianą szczepionkę zastosowano jako jedną z form immunoterapii podczas leczenia Ralphi Steinmana chorego na raka trzustki [26]. Jedną z wad stosowania tego rodzaju rozwiązania jest ryzyko progresji choroby. Z powodu utrzymującego się wyższego stężenia GM-CSF w środowisku może dochodzić do polaryzacji charakteru komórek układu odpornościowego w kierunku supresywnym [16].

Poza dostarczaniem pożądanego antygenów lub peptydów do DCs, nadal istotną kwestią pozostają czynniki wpływające na dojrzewanie DCs. W tym celu stosuje się adiuwanty, takie jak agoniści receptorów TLR3, TLR7/8 lub ligandy cząsteczek CD40 [102]. Wykorzystanie lektyn powierzchniowych, takich jak DCIR, DC-SIGN, dectin 1, CLEC9A, langeryny lub receptora chemokin XCR1 przyczynia się do aktywacji limfocytów T CD4<sup>+</sup> oraz CD8<sup>+</sup> i wytworzenia humoralnej i komórkowej odpowiedzi odpornościowej [16,72,74].

Alternatywnym sposobem egzogennej wspomagania DCs organizmu jest wykorzystanie biokompatybil-

nych polimerów (np. PLGA) tworzących „rusztowanie”, z którego są uwalniane chemoatraktanty indukujące napływanie DCs. Dzięki kontrolowanemu wydzielaniu z „rusztowania” adiuwantów wspomagających dojrzewanie DCs, a także antygenów nowotworowych (umieszczonych w DCs zarówno w wyniku klasycznej fagocytozy, jak również za pomocą wektorów wirusowych) możliwe jest generowanie dojrzałych DCs prezentujących TAA, które następnie wywołują antygenowością odpowiedź przeciwnowotworową. Takie rozwiązanie jest stosowane w terapii, zarówno w modelu mysiego czerniaka B16 [1,55], jak również w badaniach klinicznych (NCT01753089; faza I). We wspomnianym badaniu klinicznym wykorzystuje się GM-CSF jako czynnik przyciągający DCs organizmu, oligonukleotydy CpG jako adiuwant oraz lizat nowotworowy pochodzący z pobranych od pacjenta autologicznych komórek czerniaka. Taka strategia pozwala na ominięcie niedogodności związanych ze szczepionkami na bazie DCs generowanych *ex vivo*, a indukowana odpowiedź odpornościowa może być silniejsza niż w przypadku jednokrotnej immunizacji antygenem skierowanym przeciwko DCs organizmu [16].

Dzięki badaniom zapoczątkowanym przez Zitvogela i wsp. [117] uwaga naukowców skupiła się na wykorzystaniu egzosomów wydzielanych przez DCs (Dex). Dex, będące pęcherzykami pozakomórkowymi, mają ekspresję cząsteczek MHC klasy I oraz II, a także cząsteczek kostymulujących. Ponadto pulsowanie ich za pomocą TAA pobudza cytotoksyczne limfocyty T prowadząc do hamowania wzrostu mysich nowotworów [117]. Komórki nowotworowe, które pochłonęły egzosomy pochodzące z DCs stają się bardziej immunogenne. Romagnoli i wsp. [80] zaobserwowali, że komórki linii ludzkiego raka piersi SK-BR-3, które pochłonęły Dex, pobudzały swoiste wobec nowotworu limfocyty T, wśród których obserwowano większy odsetek komórek wydzielających IFN- $\gamma$ . W pierwszych próbach klinicznych wykazano bezpieczeństwo podania Dex aktywowanych peptydami MAGE3 oraz cząsteczkami MHC klasy I i II w terapii czerniaka [20] lub peptydami MAGE3/4/10 w terapii niedrobnokomórkowego raka płuca [64]. We wspomnianych próbach klinicznych obserwowano statystycznie większą aktywność komórek NK, jednak indukowana odpowiedź limfocytów CTL okazała się umiarkowana. Niemniej jednak wykorzystanie Dex jako monoterapii lub elementu skojarzonej terapii przeciwnowotworowej wydaje się istotnym zagadnieniem, głównie ze względu na łatwość ich przygotowania, a także możliwość wielokrotnego podawania. Uważa się, że Dex są obiecującą alternatywą w przyszłościowych terapiach przeciwnowotworowych [52].

Jak wspomniano wcześniej, rozwijające się mikrośrodowisko nowotworu nie zapewnia skuteczności szczepionek komórkowych. Podejmowane są próby pogłębienia terapeutycznego efektu stosowania szczepionkowych DCs, które łączy się z innymi strategiami terapeutycznymi. Jedną z najczęściej używanych terapii kombinowanych jest łączenie szczepionkowych DCs z chemioterapią. Na szczególną uwagę zasługują chemioterapeutyki, które

charakteryzują się zależnym od dawki dualizmem działania. Z jednej strony wykazują aktywność cytoredukcyjną wobec komórek nowotworowych, z drugiej – eliminują komórki supresorowe (MDSC lub limfocyty Treg). Do takich chemioterapeutyków należy m.in. cyklofosfamid, który z powodzeniem jest wykorzystywany do zahamowania wzrostu modelowego raka jelita grubego MC38 [82,84,115]. Poza chemioterapią, dużą uwagę naukowców skupia połączenie dwóch rodzajów immunoterapii – szczepionek na bazie DCs oraz przeciwciał anti-PD-1 lub anti-CTLA-4. Dzięki wykorzystaniu szczepionkowych DCs wzmacnia się swoistość odpowiedzi przeciwnowotworowej, a efekt zostaje pogłębiony po zablokowaniu śmierci efektorowych limfocytów T.

### PERSPEKTYWY DALSZEGO WYKORZYSTANIA DCs W TERAPII PRZECIWNOWOTWOROWEJ

W ciągu ostatnich dwóch dziesięcioleci wiedza na temat biologii DCs i kluczowych mechanizmów zaangażowanych w generowanie odpowiedzi odpornościowej dostarczyła cennych narzędzi do ulepszenia szczepionek opartych na DCs. Pozwoliło to na opracowanie podstaw skutecznej strategii zwalczania nowotworu. Dzięki łatwości izolacji komórek, większość uzyskanych informacji pochodzi z badań, w których szczepionkowe DCs wywodzą się z cDCs lub DCs pochodzenia monocytarnego aktywowanych przez antygeny nowotworowe, zarówno w układzie mysim, jak i ludzkim. Pojawia się również coraz więcej danych potwierdzających możliwość wykorzystania takich szczepionek do wspomagania terapii konwencjonalnych. Po połączeniu obu rodzajów terapii możliwe jest bowiem uzyskanie efektu synergistycznego, zwłaszcza gdy DCs nie tylko poddane zostały aktywacji antygenowej, lecz również modyfikacjom genetycznym. Skuteczność kombinowanej terapii może zatem opierać się na zmodyfikowanych gene-

tycznie DCs wydzielających cytokiny (IL-2, IL-4, IL-12, IL-15) [71,85,111,115] wzmacniające skuteczność aktywowanych DCs do indukowania odpowiedzi przeciwnowotworowej.

Otwiera się zatem możliwość wykorzystania DCs do wspomagania odnowy i polaryzacji odpowiedzi odpornościowej po zastosowaniu terapii konwencjonalnej. W przypadku chemioterapii zgromadzone dowody sugerują, że największa skuteczność szczepionek na bazie DCs jest obserwowana po eliminacji limfocytów Treg. Tak więc badacze i klinicyści już niedługo zostaną zmuszeni do opracowania racjonalnych i skutecznych metod leczenia wykorzystujących szczepionki na bazie DCs w celu uzyskania długoterminowej odpowiedzi klinicznej. Dlatego należałoby jak najszybciej odpowiedzieć na od lat otwarte pytania, w tym na:

- jak skrócić pracochłonne i czasochłonne procedury związane z propagowaniem DCs *ex vivo* i jakiej postaci antygeny użyć do najskuteczniejszej aktywacji tych komórek,
- jak ustalić harmonogram i strategię podawania DCs w trakcie monoterapii i w odniesieniu do terapii skojarzonych,
- jak dostarczać swoiste antygeny do DCs *in vivo*, aby zwiększyć skuteczność szczepionek w indukowaniu odpowiedzi przeciwnowotworowych,
- jak zdefiniować kryteria oceniające wrażliwość nowotworu na immunoterapię związaną z DCs.

Znalezienie odpowiedzi na wymienione wyżej pytania, pozwoli na przyspieszenie i ulepszenie badań klinicznych nad wykorzystaniem komórek dendrytycznych jako narzędzi w skutecznej walce z chorobami nowotworowymi.

### PIŚMIENICTWO

- [1] Ali O.A., Huebsch N., Cao L., Dranoff G., Mooney D.J.: Infection-mimicking materials to program dendritic cells *in situ*. *Nat. Mater.*, 2009; 8: 151-158
- [2] Allan R.S., Smith C.M., Belz G.T., van Lint A.L., Wakim L.M., Heath W.R., Carbone F.R.: Epidermal viral immunity induced by CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> dendritic cells but not by Langerhans cells. *Science*, 2003; 301: 1925-1928
- [3] Amin A., Dudek A.Z., Logan T.F., Lance R.S., Holzbeierlein J.M., Knox J.J., Master V.A., Pal S.K., Miller W.H.Jr., Karsh L.I., Tcherepanova I.Y., DeBenedette M.A., Williams W.L., Plessinger D.C., Nicolette C.A. i wsp.: Survival with AGS-003, an autologous dendritic cell-based immunotherapy, in combination with sunitinib in unfavorable risk patients with advanced renal cell carcinoma (RCC): Phase 2 study results. *J. Immunother.* *Cancer*, 2015; 3: 14
- [4] Ardaşın C., Martínez del Hoyo G., Martín P., Anjuère F., Arias C.F., Marín A.R., Ruiz S., Parrillas V., Hernández H.: Origin and differentiation of dendritic cells. *Trends Immunol.*, 2001; 22: 691-700
- [5] Bachem A., Güttler S., Hartung E., Ebstein F., Schaefer M., Tannert A., Salama A., Movassaghi K., Opitz C., Mages H.W., Henn V., Kloetzel P.M., Gurka S., Kroczeck R.A.: Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c<sup>+</sup>CD141<sup>+</sup> cells as homologues of mouse CD8<sup>+</sup> dendritic cells. *J. Exp. Med.*, 2010; 207: 1273-1281
- [6] Banchereau J., Steinman R.M.: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 1998; 392: 245-252
- [7] Beer T.M., Schellhammer P.F., Corman J.M., Glodé L.M., Hall S.J., Whitmore J.B., Frohlich M.W., Penson D.E.: Quality of life after sipuleucel-T therapy: results from a randomized, double-blind study in patients with androgen-dependent prostate cancer. *Urology*, 2013; 82: 410-415
- [8] Belladonna M.L., Volpi C., Bianchi R., Vacca C., Orabona C., Pallotta M.T., Boon L., Gizzi S., Fioretti M.C., Grohmann U., Puccetti P.: Cutting edge: Autocrine TGF- $\beta$  sustains default tolerogenesis by IDO-competent dendritic cells. *J. Immunol.*, 2008; 181: 5194-5198
- [9] Bogunovic M., Ginhoux F., Helft J., Shang L., Hashimoto D., Greter M., Liu K., Jakubczik C., Ingersoll M.A., Leboeuf M., Stanley E.R., Nussenzweig M., Lira S.A., Randolph G.J., Merad M.: Origin of the lamina propria dendritic cell network. *Immunity*, 2009; 31: 513-525
- [10] Boks M.A., Kager-Groenland J.R., Haasjes M.S., Zwaginga J.J., van Ham S.M., ten Brinke A.: IL-10-generated tolerogenic dendritic cells are optimal for functional regulatory T cell induction - a comparative study of human clinical-applicable DC. *Clin. Immunol.*, 2012; 142: 332-342
- [11] Bol K.F., Schreiber G., Gerritsen W.R., de Vries I.J., Figdor C.G.: Dendritic cell-based immunotherapy: state of the art and beyond. *Clin. Cancer Res.*, 2016; 22: 1897-1906

- [12] Bonifaz L., Bonnyay D., Mahnke K., Rivera M., Nussenzweig M.C., Steinman R.M.: Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8<sup>+</sup> T cell tolerance. *J. Exp. Med.*, 2002; 196: 1627-1638
- [13] Bronte V., Brandau S., Chen S.H., Colombo M.P., Frey A.B., Greten T.F., Mandruzzato S., Murray P.J., Ochoa A., Ostrand-Rosenberg S., Rodriguez P.C., Sica A., Umansky V., Vonderheide R.H., Gabrilovich D.I.: Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat. Commun.*, 2016; 7: 12150
- [14] Butterfield L.H.: Dendritic cells in cancer immunotherapy clinical trials: are we making progress? *Front. Immunol.*, 2013; 4: 454
- [15] Collin M., McGovern N., Haniffa M.: Human dendritic cell subsets. *Immunology*, 2013; 140: 22-30
- [16] Constantino J., Gomes C., Falcão A., Cruz M.T., Neves B.M.: Antitumor dendritic cell-based vaccines: lessons from 20 years of clinical trials and future perspectives. *Transl. Res.*, 2016; 168: 74-95
- [17] Curiel T.J., Wei S., Dong H., Alvarez X., Cheng P., Mottram P., Krzysiek R., Knutson K.L., Daniel B., Zimmermann M.C., David O., Burrow M., Gordon A., Dhurandhar N., Myers L. i wsp.: Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. *Nat. Med.*, 2003; 9: 562-567
- [18] Dudek A.M., Martin S., Garg A.D., Agostinis P.: Immature, semi-mature, and fully mature dendritic cells: toward a DC-cancer cells interface that augments anticancer immunity. *Front. Immunol.*, 2013; 4: 438
- [19] Dudziak D., Kamphorst A.O., Heidkamp G.F., Buchholz V.R., Trumpfheller C., Yamazaki S., Cheong C., Liu K., Lee H.W., Park C.G., Steinman R.M., Nussenzweig M.C.: Differential antigen processing by dendritic cell subsets *in vivo*. *Science*, 2007; 315: 107-111
- [20] Escudier B., Dorval T., Chaput N., André F., Caby M.P., Novault S., Flament C., Leboulaire C., Borg C., Amigorena S., Boccaccio C., Bonnerot C., Dhellin O., Movassagh M., Piperno S. i wsp.: Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial. *J. Transl. Med.*, 2005; 3: 10
- [21] Fan Y., Moon J.J.: Nanoparticle drug delivery systems designed to improve cancer vaccines and immunotherapy. *Vaccines*, 2015; 3: 662-685
- [22] Flanigan R.C., Polcari A.J., Shore N.D., Price T.H., Sims R.B., Maher J.C., Whitmore J.B., Corman J.M.: An analysis of leukapheresis and central venous catheter use in the randomized, placebo controlled, phase 3 IMPACT trial of Sipuleucel-T for metastatic castrate resistant prostate cancer. *J. Urol.*, 2013; 189: 521-526
- [23] Gabrilovich D.I., Ostrand-Rosenberg S., Bronte V.: Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat. Rev. Immunol.*, 2012; 12: 253-268
- [24] Galluzzi L., Vacchelli E., Bravo-San Pedro J.M., Buqué A., Senovilla L., Baracco E.E., Bloy N., Castoldi F., Abastado J.P., Agostinis P., Apte R.N., Aranda F., Ayyoub M., Beckhove P., Blay J.Y. i wsp.: Classification of current anticancer immunotherapies. *Oncotarget*, 2014; 5: 12472-12508
- [25] Ghiringhelli F., Puig P.E., Roux S., Parcellier A., Schmitt E., Solary E., Kroemer G., Martin F., Chauffert B., Zitvogel L.: Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF- $\beta$ -secreting cells inducing CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cell proliferation. *J. Exp. Med.*, 2005; 202: 919-929
- [26] Gravit L.: A fight for life that united a field. *Nature*, 2011; 478: 163-164
- [27] Williams M., Dutertre C.A., Scott C.L., McGovern N., Sichert D., Chakarov S., Van Gassen S., Chen J., Poidinger M., De Pijck S., Tavernier S.J., Low I., Irac S.E., Mattar C.N., Sumatoh H.R. i wsp.: Unsupervised high-dimensional analysis aligns dendritic cells across tissues and species. *Immunity*, 2016; 45: 669-684
- [28] Hackstein H., Thomson A.W.: Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs. *Nat. Rev. Immunol.*, 2004; 4: 24-34
- [29] Hanahan D., Weinberg R.A.: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011; 144: 646-674
- [30] Haniffa M., Collin M., Ginhoux F.: Ontogeny and functional specialization of dendritic cells in human and mouse. *Adv. Immunol.*, 2013; 120: 1-49
- [31] Haniffa M., Shin A., Bigley V., McGovern N., Teo P., See P., Wasan P.S., Wang X.N., Malinarich F., Malleret B., Larbi A., Tan P., Zhao H., Poidinger M., Pagan S. i wsp.: Human tissues contain CD141<sup>hi</sup> cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103<sup>+</sup> nonlymphoid dendritic cells. *Immunity*, 2012; 37: 60-73
- [32] Hargadon K.M.: Tumor-altered dendritic cell function: implications for anti-tumor immunity. *Front. Immunol.*, 2013; 4: 192
- [33] Hargadon K.M.: Dysregulation of TGF $\beta$ 1 activity in cancer and its influence on the quality of anti-tumor immunity. *J. Clin. Med.*, 2016; 5: E76
- [34] Hashimoto D., Miller J., Merad M.: Dendritic cell and macrophage heterogeneity *in vivo*. *Immunity*, 2011; 35: 323-335
- [35] Hawiger D., Inaba K., Dorsett Y., Guo M., Mahnke K., Rivera M., Ravetch J.V., Steinman R.M., Nussenzweig M.C.: Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions *in vivo*. *J. Exp. Med.*, 2001; 194: 769-779
- [36] Higano C.S., Schellhammer P.F., Small E.J., Burch P.A., Nemunaitis J., Yuh L., Provost N., Frohlich M.W.: Integrated data from 2 randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trials of active cellular immunotherapy with sipuleucel-T in advanced prostate cancer. *Cancer*, 2009; 115: 3670-3679
- [37] Hoeffel G., Wang Y., Greter M., See P., Teo P., Malleret B., Leboeuf M., Low D., Oller G., Almeida F., Choy S.H., Grisotto M., Renia L., Conway S.J., Stanley E.R. i wsp.: Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *J. Exp. Med.*, 2012; 209: 1167-1181
- [38] Hradilova N., Sadilkova L., Palata O., Mysikova D., Mrazkova H., Lischke R., Spisek R., Adkins I.: Generation of dendritic cell-based vaccine using high hydrostatic pressure for non-small cell lung cancer immunotherapy. *PLoS One*, 2017; 12: e0171539
- [39] Hubo M., Trinschek B., Kryczanowsky F., Tuettenberg A., Steinbrink K., Jonuleit H.: Costimulatory molecules on immunogenic versus tolerogenic human dendritic cells. *Front. Immunol.*, 2013; 4: 82
- [40] Igyártó B.Z., Haley K., Ortner D., Bobr A., Gerami-Nejad M., Edelson B.T., Zurawski S.M., Malissen B., Zurawski G., Berman J., Kaplan D.H.: Skin-resident murine dendritic cell subsets promote distinct and opposing antigen-specific T helper cell responses. *Immunity*, 2011; 35: 260-272
- [41] Javed A., Sato S., Sato T.: Autologous melanoma cell vaccine using monocyte-derived dendritic cells (NBS20/eltrapuldencel-T). *Future Oncol.*, 2016; 12: 751-762
- [42] Kalbasi A., June C.H., Haas N., Vapiwala N.: Radiation and immunotherapy: a synergistic combination. *J. Clin. Invest.*, 2013; 123: 2756-2763
- [43] Kantoff P.W., Higano C.S., Shore N.D., Berger E.R., Small E.J., Penson D.F., Redfern C.H., Ferrari A.C., Dreicer R., Sims R.B., Xu Y., Frohlich M.W., Schellhammer P.F., IMPACT Study Investigators: Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N. Engl. J. Med.*, 2010; 363: 411-422
- [44] Kaplan D.H., Jenison M.C., Saeland S., Shlomchik W.D., Shlomchik M.J.: Epidermal Langerhans cell-deficient mice develop enhanced contact hypersensitivity. *Immunity*, 2005; 23: 611-620
- [45] Kicielińska J., Pajtasz-Piasecka E.: Rola IL-10 w modulowaniu odpornościowej w warunkach prawidłowych oraz w środowisku nowotworu. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2014; 68: 879-892
- [46] Klechevsky E.: Human dendritic cells - stars in the skin. *Eur. J. Immunol.*, 2013; 43: 3147-3155
- [47] Klechevsky E., Banchereau J.: Human dendritic cells subsets as targets and vectors for therapy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2013; 1284: 24-30

- [48] Klechovsky E., Liu M., Morita R., Banchereau R., Thompson-Snipes L., Palucka A.K., Ueno H., Banchereau J.: Understanding human myeloid dendritic cell subsets for the rational design of novel vaccines. *Hum. Immunol.*, 2009; 70: 281-288
- [49] Kocián P., Šedivcová M., Drgáč J., Cerná K., Hoch J., Kodet R., Bartůňková J., Špíšek R., Fialová A.: Tumor-infiltrating lymphocytes and dendritic cells in human colorectal cancer: their relationship to KRAS mutational status and disease recurrence. *Hum. Immunol.*, 2011; 72: 1022-1028
- [50] Krempski J., Karyampudi L., Behrens M.D., Erskine C.L., Hartmann L., Dong H., Goode E.L., Kalli K.R., Knutson K.L.: Tumor-infiltrating programmed death receptor-1<sup>+</sup> dendritic cells mediate immune suppression in ovarian cancer. *J. Immunol.*, 2011; 186: 6905-6913
- [51] Kumar V., Patel S., Tcyganov E., Gabrilovich D.I.: The nature of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *Trends Immunol.*, 2016; 37: 208-220
- [52] Kunigelis K.E., Graner M.W.: The dichotomy of tumor exosomes (TEX) in cancer immunity: is it all in the ConTEXT? *Vaccines*, 2015; 3: 1019-1051
- [53] Li Y., Liu M., Yang S.T.: Dendritic cells derived from pluripotent stem cells: potential of large scale production. *World J. Stem Cells*, 2014; 6: 1-10
- [54] Liu Q., Zhang C., Sun A., Zheng Y., Wang L., Cao X.: Tumor-educated CD11b<sup>high</sup>Ia<sup>low</sup> regulatory dendritic cells suppress T cell response through arginase I. *J. Immunol.*, 2009; 182: 6207-6216
- [55] Liu Y., Xiao L., Joo K.I., Hu B., Fang J., Wang P.: *In situ* modulation of dendritic cells by injectable thermosensitive hydrogels for cancer vaccines in mice. *Biomacromolecules*, 2014; 15: 3836-3845
- [56] López M.N., Pereda C., Segal G., Muñoz L., Aguilera R., González F.E., Escobar A., Ginesta A., Reyes D., González R., Mendoza-Naranjo A., Larondo M., Compán A., Ferrada C., Salazar-Onfray F.: Prolonged survival of dendritic cell-vaccinated melanoma patients correlates with tumor-specific delayed type IV hypersensitivity response and reduction of tumor growth factor  $\beta$ -expressing T cells. *J. Clin. Oncol.*, 2009; 27: 945-952
- [57] Ma Y., Shurin G.V., Gutkin D.W., Shurin M.R.: Tumor associated regulatory dendritic cells. *Semin. Cancer Biol.*, 2012; 22: 298-306
- [58] Ma Y., Shurin G.V., Peiyuan Z., Shurin M.R.: Dendritic cells in the cancer microenvironment. *J. Cancer*, 2013; 4: 36-44
- [59] Marvel D., Gabrilovich D.I.: Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: expect the unexpected. *J. Clin. Invest.*, 2015; 125: 3356-3364
- [60] Mathan T.S., Figdor C.G., Buschow S.I.: Human plasmacytoid dendritic cells: from molecules to intercellular communication network. *Front. Immunol.*, 2013; 4: 372
- [61] Mellman I.: Dendritic cells: master regulators of the immune response. *Cancer Immunol. Res.*, 2013; 1: 145-149
- [62] Merad M., Hoffmann P., Ranheim E., Slaymaker S., Manz M.G., Lira S.A., Charo I., Cook D.N., Weissman I.L., Strober S., Engleman E.G.: Depletion of host Langerhans cells before transplantation of donor alloreactive T cells prevents skin graft-versus-host disease. *Nat. Med.*, 2004; 10: 510-517
- [63] Merad M., Sathe P., Helft J., Miller J., Mortha A.: The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu. Rev. Immunol.*, 2013; 31: 563-604
- [64] Morse M.A., Garst J., Osada T., Khan S., Hobeika A., Clay T.M., Valente N., Shreeniwas R., Sutton M.A., Delcayre A., Hsu D.H., Le Pecq J.B., Lyerly H.K.: A phase I study of dexosome immunotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J. Transl. Med.*, 2005; 3: 9
- [65] Nagy L., Szanto A., Szatmari I., Széles L.: Nuclear hormone receptors enable macrophages and dendritic cells to sense their lipid environment and shape their immune response. *Physiol. Rev.*, 2012; 92: 739-789
- [66] Norian L.A., Rodriguez P.C., O'Mara L.A., Zabaleta J., Ochoa A.C., Cella M., Allen P.M.: Tumor-infiltrating regulatory dendritic cells inhibit CD8<sup>+</sup> T cell function via  $\alpha$ -arginine metabolism. *Cancer Res.*, 2009; 69: 3086-3094
- [67] O'Keefe M., Mok W.H., Radford K.J.: Human dendritic cell subsets and function in health and disease. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2015; 72: 4309-4325
- [68] Osorio F., Fuentes C., López M.N., Salazar-Onfray F., González F.E.: Role of dendritic cells in the induction of lymphocyte tolerance. *Front. Immunol.*, 2015; 6: 535
- [69] Ostrand-Rosenberg S., Sinha P., Beury D.W., Clements V.K.: Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells (MDSC), macrophages, and dendritic cells enhances tumor-induced immune suppression. *Semin. Cancer Biol.*, 2012; 22: 275-281
- [70] Pajtasz-Piasecka E., Indrová M.: Dendritic cell-based vaccines for the therapy of experimental tumors. *Immunotherapy*, 2010; 2: 257-268
- [71] Pajtasz-Piasecka E., Rossowska J., Szyda A., Krawczenko A., Duś D.: Generation of anti-tumor response by JAWS II mouse dendritic cells transduced with murine interleukin 12 genes. *Oncol. Rep.*, 2007; 17: 1249-1257
- [72] Palucka K., Banchereau J.: Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat. Rev. Cancer*, 2012; 12: 265-277
- [73] Palucka K., Banchereau J.: Human dendritic cell subsets in vaccination. *Curr. Opin. Immunol.*, 2013; 25: 396-402
- [74] Palucka K., Banchereau J.: Dendritic-cell-based therapeutic cancer vaccines. *Immunity*, 2013; 39: 38-48
- [75] Phuphanich S., Wheeler C.J., Rudnick J.D., Mazer M., Wang H., Nuño M.A., Richardson J.E., Fan X., Ji J., Chu R.M., Bender J.G., Hawkins E.S., Patil C.G., Black K.L., Yu J.S.: Phase I trial of a multi-epitope-pulsed dendritic cell vaccine for patients with newly diagnosed glioblastoma. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2013; 62: 125-135
- [76] Platt A.M., Randolph G.J.: Dendritic cell migration through the lymphatic vasculature to lymph nodes. *Adv. Immunol.*, 2013; 120: 51-68
- [77] Podrazil M., Horvath R., Becht E., Rozkova D., Bilkova P., Sochorova K., Hromadkova H., Kayserova J., Vavrova K., Lastovicka J., Vrabцова P., Kubackova K., Gasova Z., Jarolim L., Babjuk M. i wsp.: Phase I/II clinical trial of dendritic-cell based immunotherapy (DCVAC/PCa) combined with chemotherapy in patients with metastatic, castration-resistant prostate cancer. *Oncotarget*, 2015; 6: 18192-18205
- [78] Poschke I., Mao Y., Adamson L., Salazar-Onfray F., Masucci G., Kiesling R.: Myeloid-derived suppressor cells impair the quality of dendritic cell vaccines. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2012; 61: 827-838
- [79] Reizis B., Bunin A., Ghosh H.S., Lewis K.L., Sisirak V.: Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. *Annu. Rev. Immunol.*, 2011; 29: 163-183
- [80] Romagnoli G.G., Zelante B.B., Toniolo P.A., Migliori I.K., Barbutto J.A.: Dendritic cell-derived exosomes may be a tool for cancer immunotherapy by converting tumor cells into immunogenic targets. *Front. Immunol.*, 2015; 5: 692
- [81] Romani N., Brunner P.M., Stingl G.: Changing views of the role of Langerhans cells. *J. Invest. Dermatol.*, 2012; 132: 872-881
- [82] Rossowska J., Anger N., Kicielińska J., Pajtasz-Piasecka E., Bielawska-Pohl A., Wojas-Turek J., Duś D.: Temporary elimination of IL-10 enhanced the effectiveness of cyclophosphamide and BMDC-based therapy by decrease of the suppressor activity of MDSCs and activation of antitumor immune response. *Immunobiology*, 2015; 220: 389-398
- [83] Rossowska J., Pajtasz-Piasecka E.: Zastosowanie komórek dendrytycznych w immunologii nowotworów – osiągnięcia i perspektywy. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2003; 57: 501-518
- [84] Rossowska J., Pajtasz-Piasecka E., Anger N., Wojas-Turek J., Kicielińska J., Piasecki E., Duś D.: Cyclophosphamide and IL-12-transduced DCs enhance the antitumor activity of tumor antigen-stimulated DCs



and reduce Tregs and MDSCs number. *J. Immunother.*, 2014; 37: 427-439

[85] Rossowska J., Pajtasz-Piasecka E., Ryśnik O., Wojas J., Krawczyński A., Szyda A., Duś D.: Generation of antitumor response by IL-2-transduced JAWS II dendritic cells. *Immunobiology*, 2011; 216: 1074-1084

[86] Rossowska J., Pajtasz-Piasecka E., Szyda A., Krawczyński A., Zietara N., Duś D.: Tumour antigen-loaded mouse dendritic cells maturing in the presence of inflammatory cytokines are potent activators of immune response *in vitro* but not *in vivo*. *Oncol. Rep.*, 2009; 21: 1539-1549

[87] Ruffell B., Chang-Strachan D., Chan V., Rosenbusch A., Ho C.M., Pryer N., Daniel D., Hwang E.S., Rugo H.S., Coussens L.M.: Macrophage IL-10 blocks CD8<sup>+</sup> T cell-dependent responses to chemotherapy by suppressing IL-12 expression in intratumoral dendritic cells. *Cancer Cell*, 2014; 26: 623-637

[88] Sabado R.L., Balan S., Bhardwaj N.: Dendritic cell-based immunotherapy. *Cell Res.*, 2017; 27: 74-95

[89] Sachamit P., Hackett S., Fairchild P.J.: Induced pluripotent stem cells: challenges and opportunities for cancer immunotherapy. *Front. Immunol.*, 2014; 5: 176

[90] Salmon H., Idoyaga J., Rahman A., Leboeuf M., Remark R., Jordan S., Casanova-Acebes M., Khudoynazarova M., Agudo J., Tung N., Chakarov S., Rivera C., Hogstad B., Bosenberg M., Hashimoto D. i wsp.: Expansion and activation of CD103<sup>+</sup> dendritic cell progenitors at the tumor site enhances tumor responses to therapeutic PD-L1 and BRAF inhibition. *Immunity*, 2016; 44: 924-938

[91] Sandel M.H., Dadabayev A.R., Menon A.G., Morreau H., Melief C.J., Offringa R., van der Burg S.H., Janssen-van Rhijn C.M., Ensink N.G., Tolenaar R.A., van de Velde C.J., Kuppen P.J.: Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells in colorectal cancer: role of maturation status and intratumoral localization. *Clin. Cancer Res.*, 2005; 11: 2576-2582

[92] Schmidt S.V., Nino-Castro A.C., Schultze J.L.: Regulatory dendritic cells: there is more than just immune activation. *Front. Immunol.*, 2012; 3: 274

[93] Scholz M., Yep S., Chancey M., Kelly C., Chau K., Turner J., Lam R., Drake C.G.: Phase I clinical trial of sipuleucel-T combined with escalating doses of ipilimumab in progressive metastatic castrate-resistant prostate cancer. *Immunotargets Ther.*, 2017; 6: 11-16

[94] Segura E., Amigorena S.: Cross-presentation by human dendritic cell subsets. *Immunol. Lett.*, 2014; 158: 73-78

[95] Shortman K., Heath W.R.: The CD8<sup>+</sup> dendritic cell subset. *Immunol. Rev.*, 2010; 234: 18-31

[96] Shortman K., Sathé P., Vremec D., Naik S., O'Keefe M.: Plasmacytoid dendritic cell development. *Adv. Immunol.*, 2013; 120: 105-126

[97] Shurin M.R.: Cancer as an immune-mediated disease. *Immunotargets Ther.*, 2012; 1: 1-6

[98] Shurin M.R., Naiditch H., Zhong H., Shurin G.V.: Regulatory dendritic cells: new targets for cancer immunotherapy. *Cancer Biol. Ther.*, 2011; 11: 988-992

[99] Silk K.M., Silk J.D., Ichiryu N., Davies T.J., Nolan K.F., Leishman A.J., Carpenter L., Watt S.M., Cerundolo V., Fairchild P.J.: Cross-presentation of tumour antigens by human induced pluripotent stem cell-derived CD141<sup>+</sup> XCR1<sup>+</sup> dendritic cells. *Gene Ther.*, 2012; 19: 1035-1040

[100] Small E.J., Higano C.S., Kantoff P.W., Whitmore J.B., Frohlich M.W., Petrylak D.P.: Time to disease-related pain and first opioid use in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer treated with sipuleucel-T. *Prostate Cancer Prostatic Dis.*, 2014; 17: 259-264

[101] Small E.J., Schellhammer P.F., Higano C.S., Redfern C.H., Nemunaitis J.J., Valone F.H., Verjee S.S., Jones L.A., Hershberg R.M.: Placebo-controlled phase III trial of immunologic therapy with sipuleucel-T (APC8015) in patients with metastatic, asymptomatic hormone refractory prostate cancer. *J. Clin. Oncol.*, 2006; 24: 3089-3094

[102] Steinman R.M.: Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annu. Rev. Immunol.*, 2012; 30: 1-22

[103] Steinman R.M., Cohn Z.A.: Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.*, 1973; 137: 1142-1162

[104] Steinman R.M., Idoyaga J.: Features of the dendritic cell lineage. *Immunol. Rev.*, 2010; 234: 5-17

[105] Świąt K., Pajtasz-Piasecka E.: Wpływ czynników transkrypcyjnych na różnicowanie limfocytów T CD4<sup>+</sup>. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2011; 65: 414-426

[106] Tacke P.J., Figdor C.G.: Targeted antigen delivery and activation of dendritic cells *in vivo*: steps towards cost effective vaccines. *Semin. Immunol.*, 2011; 23: 12-20

[107] Tran Janco J.M., Lamichhane P., Karyampudi L., Knutson K.L.: Tumor-infiltrating dendritic cells in cancer pathogenesis. *J. Immunol.*, 2015; 194: 2985-2991

[108] Ueno H., Schmitt N., Palucka A.K., Banchereau J.: Dendritic cells and humoral immunity in humans. *Immunol. Cell Biol.*, 2010; 88: 376-380

[109] Urbanova L., Hradilova N., Moserova I., Vosahlikova S., Sadilkova L., Hensler M., Spisek R., Adkins I.: High hydrostatic pressure affects antigenic pool in tumor cells: Implication for dendritic cell-based cancer immunotherapy. *Immunol. Lett.*, 2017; 187: 27-34

[110] Van Brussel I., Berneman Z.N., Cools N.: Optimizing dendritic cell-based immunotherapy: tackling the complexity of different arms of the immune system. *Mediators Inflamm.*, 2012; 2012: 690643

[111] Van den Bergh J., Willems Y., Lion E., Van Acker H., De Reu H., Anguille S., Goossens H., Berneman Z., Van Tendeloo V., Smits E.: Trans-presentation of interleukin-15 by IL-15/IL-15R $\alpha$  mRNA-engineered human dendritic cells boosts antitumoral natural killer cell activity. *Oncotarget*, 2015; 6: 44123-44133

[112] Varol C., Vallon-Eberhard A., Elinav E., Aychek T., Shapira Y., Luche H., Fehling H.J., Hardt W.D., Shakhar G., Jung S.: Intestinal lamina propria dendritic cell subsets have different origin and functions. *Immunity*, 2009; 31: 502-512

[113] Veglia F., Gabrilovich D.I.: Dendritic cells in cancer: the role revisited. *Curr. Opin. Immunol.*, 2017; 45: 43-51

[114] Wada J., Yamasaki A., Nagai S., Yanai K., Fuchino K., Kameda C., Tanaka H., Koga K., Nakashima H., Nakamura M., Tanaka M., Katano M., Morisaki T.: Regulatory T-cells are possible effect prediction markers of immunotherapy for cancer patients. *Anticancer Res.*, 2008; 28: 2401-2408

[115] Wojas-Turek J., Szczygieł A., Kicielińska J., Rossowska J., Piasecki E., Pajtasz-Piasecka E.: Treatment with cyclophosphamide supported by various dendritic cell-based vaccines induces diversification in CD4<sup>+</sup> T cell response against MC38 colon carcinoma. *Int. J. Oncol.*, 2016; 48: 493-505

[116] Zheng X., Koropatnick J., Chen D., Velenosi T., Ling H., Zhang X., Jiang N., Navarro B., Ichim T.E., Urquhart B., Min W.: Silencing IDO in dendritic cells: a novel approach to enhance cancer immunotherapy in a murine breast cancer model. *Int. J. Cancer*, 2013; 132: 967-977

[117] Zitvogel L., Regnault A., Lozier A., Wolfers J., Flament C., Tenza D., Ricciardi-Castagnoli P., Raposo G., Amigorena S.: Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat. Med.*, 1998; 4: 594-600

[118] Zyzak J., Matuszyk J., Siednienko J.: Multilevel maturation of Toll-like receptor 9. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2013; 67: 1034-1046

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.