

О.И. АЛЕКСЕЕНКО, Н.Н. ХРАНОВСКАЯ,
Л.С. БОЛГОВА, Ю.А. ГРИНЕВИЧ
Институт онкологии АМН Украины, Киев

ЦИТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК



Установлены пять морфологических степеней зрелости дендритных клеток, индуцированных из моноцитов периферической крови у онкологических больных, по оригинально приготовленным и окрашенным цитологическим препаратам. Цитологическое исследование дендритных клеток может служить методом их идентификации при получении дендритноклеточных противоопухолевых вакцин.

© О.И. АЛЕКСЕЕНКО, Н.Н. ХРАНОВСКАЯ,
Л.С. БОЛГОВА, Ю.А. ГРИНЕВИЧ, 2006

Введение. Дендритные клетки (ДК) являются наиболее эффективными из известных антигенпрезентирующих клеток иммунной системы [1—7]. Основной функцией ДК является захват антигена, экспрессия его на своей поверхности в виде суперантигена и представление последнего Т-лимфоцитам с вовлечением антигенов главного комплекса гистосовместимости, вследствие чего индуцируется их антигенспецифический ответ. Эта особенность определяет ключевую роль ДК в развитии иммунных реакций организма и, в частности, противоопухолевой защиты.

Создание вакцин на основе ДК считается наиболее перспективным направлением иммунотерапии онкологических заболеваний. Известно, что свойство инициирования интенсивного противоопухолевого иммунного ответа присуще зрелым, дифференцированным ДК [1—4, 6, 7]. Определение содержания и степени зрелости ДК в разработанных вакцинальных препаратах является обязательным для их стандартизации.

Основные морфологические признаки ДК были выявлены в нативных препаратах при фазово-контрастной и электронной микроскопии, в то же время при гистологическом исследовании ДК практически не идентифицируются [4, 5], а данные об изучении ДК цитологическим методом в специальной литературе не найдены. Это может быть обусловлено тем, что ДК характеризуются слабыми адгезивными свойствами [4, 6]. Одним из способов изучения ДК является иммуногистохимический метод [4], который позволяет обнаружить ДК, однако их морфологические особенности при этом не выявляются.

Цель исследования — изучение цитоморфологических особенностей ДК по оригинально приготовленным и окрашенным цитологическим препаратам.

Материалы и методы. Исследовали культуру интактных и нагруженных аутоантигеном ДК, индуцированных из моноцитов периферической крови у 10 онкологических больных (6 — рак яичников, 2 — меланома, 1 — рак молочной железы и 1 — рак желудка).

Для генерации ДК у онкологических больных при удовлетворительных клинико-лабораторных показателях производили забор 50 мл периферической крови в стерильный флакон емкостью 250 мл с добавлением 25 Ед/мл гепа-

рина («Биохеми»). Кровь отстаивали в течение 40 мин при 20–22 °С, вследствие чего лейкоцитарная масса с плазмой сепарировалась от эритроцитарной массы. Для разделения лейкоцитарной массы от плазмы полученную жидкость центрифугировали 10 мин при 1500 об/мин. Затем выделяли мононуклеарную фракцию периферической крови с помощью центрифугирования в течение 40 мин при 1500 об/мин в градиенте плотности фиколла ($\rho = 1,077$ г/мл). Полученные клетки отмывали в забуференном физиологическом растворе путем центрифугирования в течение 10 мин при 1500 об/мин. Затем клетки помещали в среду культивирования (среда RPMI 1640, фирмы «Sigma» с 2 мМ L-Gly, 100 мкг/мл стрептомицина и 100 ед/мл пенициллина) и инкубировали в пластиковом флаконе T25 при 37 °С и 5 % CO₂ в течение 3 ч для отделения моноцитов от лимфоцитов. Лимфоциты мягко встряхивали и смывали предварительно прогретой средой культивирования, а моноциты благодаря их более высоким адгезивным свойствам оставались на чашке Петри. В последующем к моноцитам добавляли среду культивирования, 1 % аутологической плазмы и 100 нг/мл гранулоцит-макрофаг колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) («Leucotax» «Novartis»/«Schering-Plough»). Моноциты культивировали при 37 °С и 5 % CO₂ в течение 6 сут, в результате чего получали ДК. Далее полученные ДК нагружали аутологическим опухолевым антигеном, в качестве которого использовали лизат опухолевых клеток (ЛОК), полученный по специальной методике. Так, часть удаленной оперативным путем опухоли измельчали с помощью Medimachine («Becton Dickinson», США) и пропускали через капроновый фильтр. Затем клеточную суспензию разводили средой RPMI 1640 («Sigma») до концентрации 10⁷/мл и подвергали пяти циклам замораживания (при –20 °С) и оттаивания (при 37 °С). Лизированные опухолевые клетки центрифугировали в течение 15 мин при 8000 об/мин и надосадочную жидкость стерилизовали с помощью фильтра с диаметром пор 0,22 мкм. Полученный ЛОК стандартизировали по белку. В среднем ЛОК содержит 1,10 ± ± 0,39 мг/мл белка и 497,22 ± 182,38 мкг/мл суммарной опухолевой РНК. После одних су-

ток инкубации с ЛОК для завершения процесса созревания ДК в культуральную среду добавляли 100 нг/мл фактора некроза опухоли ФНО- α («Sigma») и культивировали в течение 24 ч.

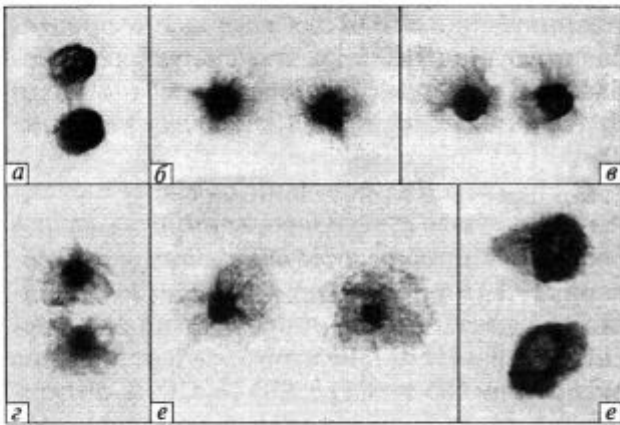
Суспензию ДК, полученных как на 6-е, так и на 8-е сутки культивирования, отмывали в растворе Рингера с помощью центрифугирования в течение 5 мин при 1000 об/мин. Дендритные клетки верифицировали по экспрессии CD 86 и HLA-DR-антигенов и отсутствию экспрессии CD 14, CD 3, CD 16, CD 20-антигенов, что учитывали с помощью проточнocyтoметрического метода и проточного цитофлюориметра «FACScan» фирмы «Becton Dickinson» (США). В культуре фенотип ДК экспрессировали 90 % клеток.

Цитологические препараты ДК готовили следующим образом. На первом этапе суспензию генерированных ДК разводили раствором Рингера до концентрации 1–2 · 10⁶/мл, что обеспечивало достаточную клеточность исследуемого материала в цитограммах. Для приготовления одного мазка к 0,2 мл полученной суспензии ДК постепенно добавляли каплями 0,5 мл 96° этилового спирта. При этом суспензию постоянно пипетировали для предупреждения слипания клеток. Соотношение клеточной суспензии и спирта составляло 1 : 2,5.

Второй этап приготовления цитологического препарата ДК состоял в нанесении слоя ДК из суспензии с фиксирующим раствором на подготовленное предметное стекло с последующим высушиванием мазка на воздухе. Подготовка предметных стекол заключалась в нанесении на них слоя поли-L-лизина или 0,25 % бычьего сывороточного альбумина.

На третьем этапе приготовления цитологического препарата зафиксированные таким образом ДК окрашивали по методу Паппенгейма: сначала на мазок наливали краску-фиксатор Май-Грюнвальда на 3 мин, потом добавляли такое же количество дистиллированной воды, через 1 мин краску сливали и наливали рабочий раствор официальной краски Романовского-Гимза (при pH 6,8) на 2 мин.

Микроскопическое исследование цитологических препаратов ДК проводили при различных увеличениях (×400; ×1000).



Клетки, генерированные из моноцитов периферической крови онкологических больных. Цитологический препарат. Окраска по методу Паппенгейма, $\times 1000$: а — ДК 1-й степени зрелости, б — ДК 2-й степени зрелости, в — ДК 3-й степени зрелости, г — ДК 4-й степени зрелости, д — ДК 5-й степени зрелости, е — гистиоцитарные клетки

При разработанном способе приготовления цитологических препаратов ДК фиксируются методом, который сохраняет их морфологическую структуру, а использование названной методики и времени окрашивания позволяет визуализировать ДК и изучать их цитоморфологические особенности. В отличие от разработанного нами способа, ДК при классической фиксации и окрашивании по методу Паппенгейма или не определялись, или выявлялись с выраженными дистрофическими изменениями в виде ядер-теней. На представленный способ приготовления цитологических препаратов ДК и изучения их цитоморфологических признаков подана заявка на изобретение № 200500906 от 01.02.2005 г.

Результаты исследований и их обсуждение. При цитологическом исследовании ДК, индуцированных из моноцитов периферической крови у онкологических больных, выявляются мелкие округлые клетки, расположенные разрозненно, в группах и пластах. При этом морфологически определяются пять степеней их зрелости.

При 1-й степени зрелости ДК имеют шаровидную форму и узкий ободок интенсивнобазофильной цитоплазмы с небольшим количеством ее коротких тонких отростков и единичными длинными отростками, которые располагаются радиально от ядерной оболочки к периферии цитоплазмы (рисунок, а). В

каждой клетке имеется одно округлое гиперхромное ядро с неровным контуром и с равномерной компактной структурой хроматина. Ядрышки не выявляются. Ядерно-цитоплазматическое соотношение составляет приблизительно 1 : 1,2.

При 2-й степени зрелости для ДК характерно наличие умеренно развитой цитоплазмы с уже многочисленными удлинёнными тонкими радиальными отростками (рисунок, б). Каждая клетка содержит по одному округлому гиперхромному ядру с неровным контуром и равномерной компактной или мелкоглыбчатой структурой хроматина. Ядрышки не определяются. Ядерно-цитоплазматическое соотношение составляет приблизительно 1 : 2.

При 3-й степени зрелости ДК в отличие от ДК 2-й степени зрелости определяется более развитая умереннобазофильная цитоплазма с большим количеством длинных тонких радиальных отростков и отдельными мелкими или крупными вакуолями (рисунок, в). При этом ядерно-цитоплазматическое соотношение составляет приблизительно 1 : 3.

Цитоморфологическая характеристика ДК 4-й степени зрелости подобна предыдущей, однако отличается более развитой цитоплазмой. При этом ядерно-цитоплазматическое соотношение составляет приблизительно 1 : 4 (рисунок, г).

К 5-й степени зрелости отнесены «вуалевидные» ДК округлой формы с развитой тонкой слабобазофильной мелко- и крупновacuолизированной цитоплазмой с отдельными радиально расположенными отростками. В каждой клетке определяется одно более мелкое, чем у ДК 4-й степени зрелости, округлое гиперхромное ядро. Ядрышки также не определяются (рисунок, д). Ядерно-цитоплазматическое соотношение колеблется приблизительно от 1 : 5 до 1 : 6, при этом с увеличением объема цитоплазмы уменьшается количество радиальных отростков, а цитоплазма приобретает «сетчатую» структуру.

При цитологическом исследовании ДК выявлено, что в процессе их созревания размеры ядер постепенно уменьшаются приблизительно в 1,5–2 раза, объем цитоплазмы увеличивается приблизительно в 3,5–4 раза за счет увеличения количества и длины отростков, а также

снижается интенсивность базофильного окрашивания цитоплазмы и появляются вакуоли.

Среди выявленных ДК определяются отдельные овальные или отростчатые гистиоцитарные клетки с четко контурированной интенсивнобазофильной цитоплазмой и преимущественно единичными округлыми или овальными крупными нормохромными ядрами с ровным контуром и равномерной мелкозернистой или мелкоглыбчатой структурой хроматина и четкими ядрышками средних и больших размеров (рисунок, *e*). При этом ядерно-цитоплазматическое соотношение составляет приблизительно 1 : 2. Иногда встречаются двухъядерные клетки.

При цитологическом исследовании ДК, индуцированных из моноцитов периферической крови у онкологических больных без нагрузки аутологичным ЛОК, в цитограммах имеется небольшое количество клеток преимущественно 1-й и 2-й степени зрелости. После нагрузки ЛОК в цитологических препаратах увеличивается общее количество ДК, при этом преобладают клетки 2-й и 3-й степени зрелости с наличием отдельных ДК 4-й и 5-й степени зрелости. Выявленные цитоморфологические особенности ДК свидетельствуют о нарушении их созревания в процессе генерации из моноцитов периферической крови у онкологических больных при использовании стандартного протокола. Этим обусловлено проведение дальнейших исследований по получению клинически эффективной вакцины, основанной на генерации преимущественно зрелых ДК, одним из методов идентификации которой может служить их цитологическое исследование.

Выводы. Разработанный способ приготовления и окраски цитологических препаратов, содержащих ДК, позволяет их визуализировать и изучить цитоморфологические особенности. Описано пять степеней зрелости ДК, индуцированных из моноцитов периферической крови у онкологических больных с характерными отличительными признаками созревания. С повышением степени созревания в ДК увеличивается объем цитоплазмы приблизительно в 3,5—4 раза и снижается интенсивность ее базофильного окрашивания, увеличивается также количество и длина цитоплазматических отростков, появляются вакуоли, тогда как раз-

меры ядер уменьшаются приблизительно в 1,5—2 раза, что является эквивалентом созревания ДК. Цитологическое исследование ДК — один из доступных методов их морфологической идентификации, который может использоваться при разработке дендритноклеточных противоопухолевых вакцин.

SUMMARY. Five morphological degrees of maturity of dendritic cells induced from monocytes of peripheral blood in oncological patients have been revealed using originally prepared and stained cytological preparations. Cytological examination of dendritic cells can be used for their identification in production of dendritic cell antitumor vaccines.

РЕЗЮМЕ. Встановлено пять морфологічних ступенів зрілості дендритних клітин, індукованих з моноцитів периферичної крові у онкологічних хворих, за оригінально приготовленими і пофарбованими цитологічними препаратами. Цитологічне дослідження дендритних клітин може слугувати методом їх ідентифікації при одержанні дендритноклітинних протипухлинних вакцин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балдуева И.А., Моисеенко В.М., Хансон К.П. Система дендритных клеток и ее роль в регуляции функциональной активности Т- и В-лимфоцитов человека // *Вопр. онкологии.* — 1999. — **45**, № 5. — С. 473—483.
2. Гантievская Ю.А., Селяvко В.В. Дендритные клетки: роль в системе иммунитета // *Имунопатология, аллергология, инфектология.* — 2001. — № 4. — С. 5—23.
3. Гриневич Ю.А., Храновская Н.Н. Дендритные клетки и перспективы их использования в иммунотерапии больных со злокачественными новообразованиями (обзор литературы) // *Журн. АМН України.* — 2003. — **9**, № 4. — С. 736—753.
4. Макаренкова В.П., Кост Н.В., Шурип М.Р. Система дендритных клеток: роль в индукции иммунитета и в патогенезе инфекционных, аутоиммунных и онкологических заболеваний // *Имунология.* — 2002. — № 2. — С. 68—76.
5. Delneste Y., Charbonnier P., Herbault N. et al. Interferon switches monocyte differentiation from dendritic cells to macrophages // *Blood.* — 2003. — **101**, № 1. — P. 143—150.
6. Guermonprez P., Valladeau T., Zitvogel L. et al. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells // *Annu. Rev. Immunol.* — 2002. — № 20. — P. 261—267.
7. Reid C.D.L. Dendritic cells and immunotherapy for malignant disease // *Brit. J. Haematol.* — 2001. — **112**, № 4. — P. 874—887.

Поступила 16.06.05