

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

**Государственное учреждение «Республиканский
научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»**

**СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ
ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА**

Сборник научных трудов

выпуск 6

Минск

2013

ИММУНОФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК, КУЛЬТИВИРОВАННЫХ В ТОЛЕРОГЕННОМ НАПРАВЛЕНИИ

Романова И.В., Гончаров А.Е., Титов Л.П.

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

Резюме. Использование толерогенных дендритных клеток (тДК) представляет собой перспективное направление специфической клеточной терапии аутоиммунных заболеваний. тДК также могут быть в перспективе использованы в трансплантологии с целью предупреждения отторжения органов и тканей. На сегодняшний день проводятся несколько клинических испытаний, целью которых является оценка безопасности и эффективности применения тДК. Однако разработка оптимального протокола получения ДК со стойкими толерогенными свойствами остается весьма актуальной. В данном исследовании было изучено влияние веществ с иммуносупрессирующими свойствами — интерлейкина-10, дексаметазона и витамина Д₃ — на функциональное состояние ДК, полученных из моноцитов крови. Полученные нами данные указывают, что все исследованные вещества способны к направленной дифференцировке ДК в толерогенном направлении, что подтверждается функциональной незрелостью ДК, снижением антигенпрезентирующего потенциала, значимым усилением экспрессии коингибиторных молекул.

Ключевые слова: толерогенные дендритные клетки, аутоиммунные заболевания, глюкокортикостероиды, витамин Д, интерлейкин-10.

Введение. В настоящее время дендритные клетки (ДК), благодаря своим иммунофенотипическим и функциональным особенностям, по праву считаются главным связующим и направляющим звеном в развитии иммунного ответа. ДК в «незрелом» состоянии, находясь в лимфоидных тканях, постоянно захватывают антигены путем микропиноцитоза. Поглощенные антигены подвергаются процессированию и связыванию с молекулами главного комплекса гистосовместимости (ГКС) I или II класса. Одновременно с этим начинается процесс созревания ДК, проявляющийся в изменении поверхностного иммунофенотипа, морфологии клеток, что приводит к приобретению способности ДК мигрировать в регионарные лимфоузлы. В Т-зависимых зонах лимфатических узлов происходит представление расщепленного антигена МНС-рестриктированным CD4⁺ или CD8⁺ Т-лимфоцитам [1].

Поскольку происходит одновременный захват как собственных, так и чужеродных антигенов, ДК выполняют сложную функцию распознавания опасного и неопасного сигнала. Внутриклеточные механизмы данного процесса изучены недостаточно, но именно благодаря этой функции ДК, становится возможным избежать развития аутоиммунного или хронического воспалительного процесса, ассоциированного с данным антигеном [2].

Благодаря возможности получать ДК *in vitro* из моноцитов периферической крови и стволовых клеток костного мозга, ДК активно используются в иммунотерапии многих онкологических и инфекционных заболеваний, то есть там, где необходима целенаправленная активация иммунной системы [3].

С начала 90-х гг. прошлого столетия ведется активное изучение ДК в свете выполнения ими толерогенной функции и участия в формировании периферической толерантности к антигенам. Идея использования толерогенных свойств ДК для иммунотерапии теоретически оправдана, так как в физиологических условиях в отсутствие инфекционного агента в организме человека преимущественно происходят процессы подавления иммунной реакции. Однако данный подход сталкивается с рядом проблем. Так, до конца не решен вопрос, ДК с какими характеристиками следует считать толерогенными: незрелые ДК, полузрелые ДК, либо существует отдельная субпопуляция ДК со стойкими толерогенными свойствами, способствующих формированию регуляторных Т-клеток [4].

Первым и наиболее подробно изученным веществом, способствующим получению ДК с толерогенными свойствами, является противовоспалительный цитокин ИЛ-10 [5]. В настоящее время существует множество протоколов, с помощью которых в лабораторных условиях можно получить тДК, включающих воздействие иммуоингибирующих цитокинов или ростовых факторов, противовоспалительных лекарственных средств, а также использование генетической модификации ДК с целью продукции ими иммуносупрессивных белков [6].

Что касается использования тДК в практической медицине, то к настоящему времени опубликованы результаты трех клинических испытаний I фазы, в которых предпринимались попытки терапии аутоиммунных заболеваний при помощи тДК. Так, опубликованы результаты первых клинических испытаний вакцины на основе толерогенных ДК для лечения пациентов с сахарным диабетом 1-го типа [7], ревматоидным артритом [8]. Исследования показали безопасность и отсутствие серьезных побочных эффектов данной терапии, включая усиление проявлений болезни. В то же время полноценно оценить клиническую эффективность не представилось возможным. Опубликованы также результаты введения культур незрелых ИЛ-10 модифицированных ДК пациентам с рассеянным склерозом с целью подавления аутоиммунного ответа [9]. Результаты испытаний обнадеживающие: было отмечено снижение титра антител к миелину, увеличение числа регуляторных Т-клеток в крови.

Цель работы: изучение иммунофенотипа ДК, полученных из моноцитов периферической крови и культивированных в присутствии различных иммуносупрессивных веществ.

Материалы и методы. Получение ДК. Исследование проводили с использованием гепаринизированной венозной донорской крови, доставленной из ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий». Кровь наслаивали на градиент фиколл-пака с плотностью 1,077 г/л для последующего выделения мононуклеарных клеток (МНК). Моноциты были выделены из фракции МНК путем адгезии на поверхности пластика с последующим культивированием в питательной среде AIM-V. Добавление цитокинов для дифференцировки ДК осуществляли по следующей схеме: 1-й образец (контроль) — ИЛ-4 (25 нг/мл), GM-CSF (100 нг/мл); 2-й образец (VitD3-DC) — ИЛ-4 (25 нг/мл), GM-CSF (100 нг/мл), витамин D3 (10 нМ); 3-й образец (Dex-DC) — ИЛ-4 (25 нг/мл), GM-CSF (100 нг/мл), дексаметазон (10 нМ); 4-й образец (IL10-DC) — ИЛ-4 (25 нг/мл), GM-CSF (100 нг/мл), ИЛ-10 (50 нг/мл). Культуры клеток инкубировали при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂ в течение 6 сут. Добавление/смену питательной среды и цитокинов проводили в каждой культуре на 3 сут.

Проточная цитофлуориметрия. На поверхности незрелых ДК (6 сут культивирования) исследовали экспрессию следующих молекул: CD1a, CD14, CD16, HLA-DR, CD83, CD80, CD86, CD205, CD206, CD208, CD209, CD273 и CD274. Учет иммунофенотипа проводили на проточном цитофлуориметре «FACSCalibur». Анализ полученных данных осуществляли с помощью программного обеспечения «FACSDiva».

Статистический анализ. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программ «Statistica» версии 10 и «StatPlus» версии 4.9. Значения показателей представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха между 25 и 75-й процентилями. Нормальность распределения величин оценивали с использованием W-критерия Шапиро–Вилка. Учитывая отсутствие в большинстве исследованных выборок нормального распределения, для сравнения независимых выборок использовали непараметрические критерии (Kruskal–Wallis, Mann–Whitney). В качестве критерия достоверности различий показателей принимали уровень значимости $p < 0,05$.

Результаты. С целью исследования иммунофенотипа полученных культур были использованы маркеры для оценки различных стадий дифференцировки и функционального состояния ДК (таблица 1).

Оценивали процент экспрессии молекулы, а также относительную интенсивность флуоресценции (ОИФ), рассчитанную как отношение средней интенсивности исследуемого антигена к средней интенсивности негативного образца. На рисунках 1 и 2 представлены гистограммы наиболее репрезентативных образцов, построенные по интенсивности флуоресценции исследуемых маркеров (сплошная линия) в сравнении с контрольной пробой (пунктирная линия).

Так, в сравнении с контрольным образцом, ДК, культивированные в присутствии витамина Д3, дексаметазона и ИЛ-10, характеризовались более незрелым фенотипом, что проявлялось в высокой экспрессии молекул CD14 (контроль — 2,6 (1,7–4,3)%; VitD3-DC — 6,7 (5,1–8,3)%, $p < 0,0001$; Dex-DC — 95,1 (93,8–99,5)%, $p < 0,0001$; IL10-DC — 18,7 (16,4–20,1)%, $p < 0,01$;) и CD16 (контроль — 2,2 (1,8–4,9)%; VitD3-DC — 9,1 (7,7–12,1)%, $p < 0,01$; Dex-DC — 62,1 (60,0–66,1)%, $p < 0,0001$; IL10-DC — 18,9 (17,9–22,1)%, $p < 0,001$;) , а также в снижении относительной интенсивности экспрессии молекулы CD1a (рисунок 1).

Таблица 1 — Характеристика исследуемых CD антигенов

Молекула	Экспрессия на клетках	Функция
CD1a	Кортикальные тимоциты, незрелые ДК, клетки Лангерганса	Является структурным аналогом молекулы МНСI класса, участвует в презентации липидных антигенов
CD14	Специфический маркер макрофагов/моноцитов	Рецептор для липополисахарид-связывающего белка
CD16	Моноциты, макрофаги, натуральные киллеры, нейтрофилы	Низкоаффинный Fc-рецептор (FcγRIIIa и FcγRIIIb)
HLA-DR	АПК, активированные Т-лимфоциты	ГКС 2-го класса, участие в антигенпрезентации
CD83	ДК, клетки Лангерганса	Высокоспецифичный маркер зрелых ДК — молекулы, участвующей в процессах активации Т-лимфоцитов
CD80(B7-1), CD86 (B7-2)	АПК: ДК, активированные В- лимфоциты, моноциты	Рецепторы для молекул CD28 и CD152 (CTLA-4), участвуют в активации Т-лимфоцитов
CD205	ДК, кортикальные тимоциты	Рецептор, отвечающий за распознавание и кросс-презентацию антигенов клеток, находящихся в апоптозе или некрозе
CD206	ДК, макрофаги, моноциты	Фагоцитоз и пиноцитоз маннозосодержащих молекул
CD208 (DC-LAMP)	Активированные ДК	Участвует в процессировании экзогенных антигенов
CD209 (DC-SIGN)	ДК, макрофаги	Лектин типа C, связывается с ICAM-3, ICAM-2; активирует фагоцитоз, опосредует взаимодействие ДК с эндотелием, активацию Т-клеток, а также распознавание патогенных гаптен
CD273(B7-DC), CD274 (B7-H1)	Незрелые и зрелые ДК, фолликулярные ДК	Рецепторы для PD-1, снижают пролиферативную активность Т-лимфоцитов

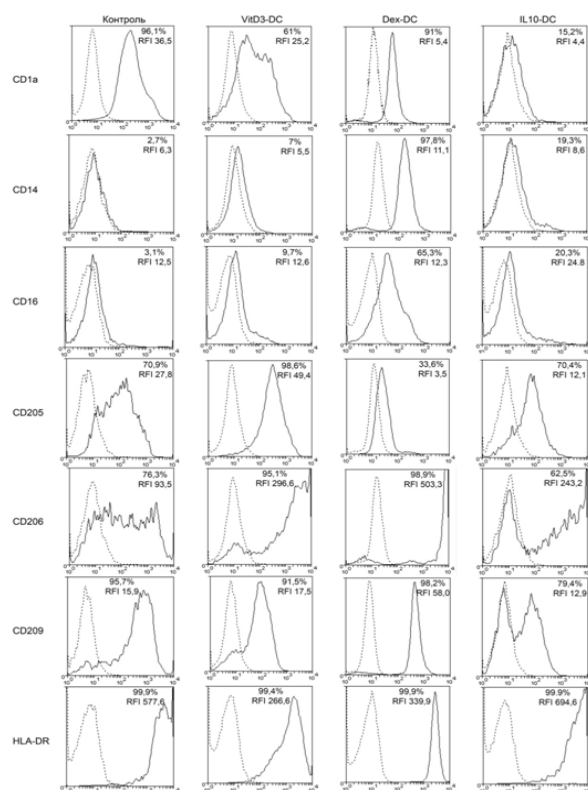


Рисунок 1 — Влияние ИЛ-10, дексаметазона и витамина Д3 на экспрессию молекул CD1a, CD14, CD16, CD205, CD206, CD209 и HLA-DR

Относительная интенсивность экспрессии патоген-распознающего рецептора молекулы CD209, ответственной за процесс эндоцитоза, в контрольной культуре практически не отличалась от показателей в VitD3-DC и IL10-DC, при этом ДК, полученные с добавлением дексаметазона, характеризовались более высоким показателем (рисунок 1). Также следует отметить значительное повышение ОИФ маннозного рецептора CD206 в культурах с ингибирующими веществами в отличие от контроля, что доказывает незрелость полученных ДК.

Процент экспрессии HLA-DR в исследуемых культурах значительно не отличался и оставался на высоком уровне, однако ОИФ в культурах с дексаметазоном и витамином Д3 в сравнении с контрольной оказалась меньше, что может указывать на нарушение функции антигенпрезентации (рисунок 1).

Экспрессия важного рецептора для формирования периферической толерантности отвечающий за кросс-презентацию пептидов клеток, находящихся в состоянии апоптоза или некроза, CD205 была выше в сравнении с контролем в культуре VitdD3-DC, но при этом нарушена при оценке культур Dex-DC и IL10-DC (рисунок 2).

Оценка экспрессии коингибиторных молекул CD273 и CD274, негативно влияющих на активацию специфических Т-клеток, показала увеличение процента экспрессии во всех культурах с супрессирующими веществами (CD273: контроль — 84,6 (82,8–88,1)%; VitD3-DC — 97,7 (95,9–99,7)%, $p < 0,05$; Dex-DC — 98,3 (96,1 – 99,9)%, $p < 0,05$; IL10-DC — 88,7 (86,1–93,5)%, $p < 0,05$; CD274: (контроль — 55,9 (52,7–59,1)%; VitD3-DC — 96,1 (95,8–99,1)%, $p < 0,001$; Dex-DC — 95,3 (92,7–98,7)%, $p < 0,001$; IL10-DC — 89,1 (86,4–92,5)%, $p < 0,001$).

В дополнение следует отметить снижение относительной интенсивности экспрессии костимуляторной молекулы CD80 (рисунок 2), усиливающейся в процессе активации и созревания ДК, в культурах, полученных в толерогенном направлении.

Оценка маркеров активации и созревания ДК CD83 и CD208 не выявило значительных изменений их экспрессии в сравнении с контрольной культурой.

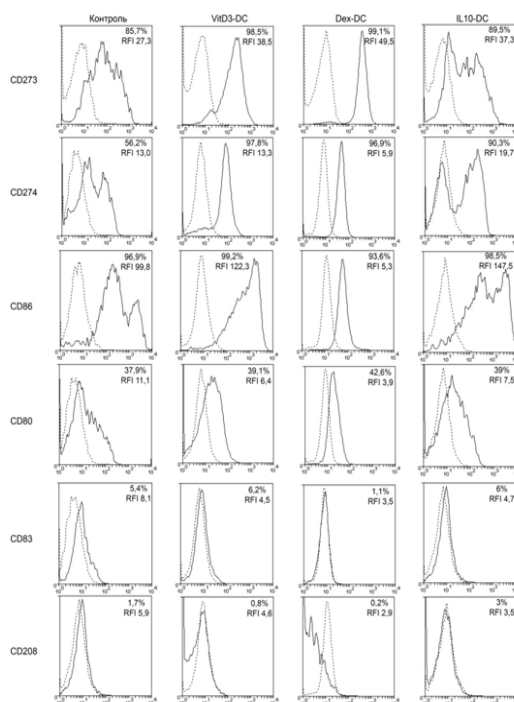


Рисунок 2 — Влияние ИЛ-10, дексаметазона и витамина Д3 на экспрессию коstimуляторных, коингибиторных молекул и маркеров зрелости ДК

Выводы. Исследования в направлении поиска оптимальной комбинации цитокинов, способной привести к воспроизводимому получению толерогенных ДК, являются важными для прикладной иммунологии в лечении аутоиммунных заболеваний, а также при пересадке органов.

Полученные нами данные указывают, что все исследованные вещества способны вызывать направленную дифференцировку ДК в толерогенном направлении, что подтверждается функциональной незрелостью ДК, снижением антигенпрезентирующего потенциала, значимым усилением экспрессии коингибиторных молекул. Вместе с тем, выявлены существенные различия в экспрессии молекул CD1a, CD14, CD205 и CD209 тДК под действием дексаметазона, витамина Д3 и интерлейкина-10, что может приводить к различиям в функциональной активности тДК, и требует проведения дополнительных функциональных исследований.

Литература

1. Steinman, R.M. Tolerogenic dendritic cells / R.M. Steinman [et al.] // *Ann. Rev. Immunol.* — 2003. — Vol. 21. — P. 685–711.
2. Adrian, E.M. Dendritic cells: regulators of alloimmunity and opportunities for tolerance induction / E.M. Adrian, W.T. Angus // *Immunol. Rev.* — 2003. — Vol. 196. — P. 125–146.
3. On dendritic cell-based therapy for cancers / O. Morikazu [et al.] // *J. Zhejiang Univ. SCI.* — 2005. — Vol. 6B, № 1. — P. 1–3.
4. Lutz, M.B. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? / M.B. Lutz, G. Schuler // *Trends Immunol.* — 2002. — Vol. 23. — P. 445–449.
5. IL-10-generated tolerogenic dendritic cells are optimal for functional regulatory T cell induction — A comparative study of human clinical-applicable DC / A. Martine [et al.] // *Clin. Immunol.* — 2012. — Vol. 142. — P. 332–342.
6. Generation of immunogenic and tolerogenic clinical-grade dendritic cells / T. Kalantari [et al.] // *Immunol Res.* — 2011. — Vol. 51. — P. 153–160.
7. Phase I (Safety) Study of Autologous Tolerogenic Dendritic Cells in Type 1 Diabetic Patients / N. Giannoukakis [et al.] // *Diabetes Care.* — 2011. — Vol. 34. — P. 2026–2032.
8. Safety and preliminary evidence of efficacy in a phase I clinical trial of autologous tolerising dendritic cells exposed to citrullinated peptides (Rheumavax) in patients with rheumatoid arthritis / R. Thomas [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* — 2011. — Vol. 70, Suppl. 3. — P. 169.
9. Аутогенные IL-10 модифицированные дендритные клетки в иммунотерапии рассеянного склероза: первый клинический опыт / М.М. Одинак [и др.] // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.* — 2008. — Т. 3, № 4. — С. 60–65.

IMMUNOPHENOTYPE OF DENDRITIC CELLS CULTURED TOWARDS TOLEROGENTIC PROFILE

Ramanava I.U., Hancharou A.Y., Titov L.P.

Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Belarus

The usage of tolerogenic dendritic cells (TDC) is a promising in specific cell therapy of autoimmune diseases. TDC may also potentially be used in transplantation to prevent rejection of organs and tissues. To date, several clinical trials are conducted, the purpose of which is to evaluate the safety and efficacy of TDC. However, the development of optimal protocol for obtaining of TDCs with persistent properties is very important. In this study we investigated the effects of substances with immunosuppressive properties on the functional state of DCs derived from blood monocytes, which include interleukin-10, dexamethasone and vitamin D3. Our data indicate that all of the investigated substances were capable to direct the differentiation of DCs into tolerogenic profile that was proved by the functional immaturity of DC, impairment of antigen presenting capacity and a significant increase of the expression of co-inhibitory molecules.

Keywords: tolerogenic dendritic cells, autoimmune diseases, glucocorticosteroids, vitamin D, interleukin-10.

Поступила 04.09.2013