

# ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА IFN $\alpha$ -ИНДУЦИРОВАННЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ

Сахно Л.В.<sup>1</sup>, Леплина О.Ю.<sup>1</sup>, Распай Ж.М.<sup>1</sup>, Тихонова М.А.<sup>1</sup>,  
Курганова Е.В.<sup>1</sup>, Гилева И.П.<sup>2</sup>, Никонов С.Д.<sup>2</sup>, Жданов О.А.<sup>2</sup>,  
Останин А.А.<sup>1</sup>, Черных Е.Р.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, г. Новосибирск

<sup>2</sup> ОГУЗ Новосибирская клиническая туберкулезная больница № 1

**Резюме.** В работе исследованы функциональные свойства IFN $\alpha$ -индуцированных дендритных клеток (ДК) больных туберкулезом (ТБ) легких. Установлено, что ДК больных характеризуются сниженной продукцией IFN $\gamma$  и IFN $\alpha$  и сохранным уровнем продукции TNF $\alpha$ . Кроме того, ДК больных отличались более низким уровнем продукции нитрооксида. Наряду с изменением спектра продуцируемых цитокинов ДК больных обладали сниженной аллостимуляторной активностью в смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ). При этом нарушение аллостимуляторной активности ДК было наиболее выраженным в группе PPD-анергичных пациентов. По сравнению с донорами, ДК больных ТБ отличались сниженной способностью к индукции внутриклеточной экспрессии и продукции IFN $\gamma$ , что в наибольшей степени проявлялось у PPD-анергичных больных. Однако ДК больных со сниженным антигенспецифическим ответом обладали повышенной способностью к стимуляции внутриклеточной продукции IL-4 в популяции CD3<sup>+</sup>T-клеток. Таким образом, у больных ТБ легких выявлены изменения функциональной активности ДК, ряд из которых четко ассоциирован с дефектом антигенспецифического ответа.

**Ключевые слова:** дендритные клетки, цитокины, Th1/Th2, туберкулез легких.

*Sakhno L.V., Leplina O.Yu., Raspay Zh.M., Tikhonova M.A., Kurganova E.V., Gileva I.P., Nikonov S.D., Zhdanov O.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R.*

## FUNCTIONAL PROPERTIES OF IFN $\alpha$ -INDUCED DENDRITIC CELLS IN THE PATIENTS WITH PULMONARY TUBERCULOSIS

**Abstract.** Some functional properties of IFN $\alpha$ -induced dendritic cells (DCs) from the patients with pulmonary tuberculosis (PT) were under study. It was revealed that production of IFN $\gamma$  and IFN $\alpha$  by DCs of the patients was decreased, but TNF $\alpha$  production was preserved at normal level. NO production by DCs from the patients was also reduced. In addition, it has been shown, that DCs of PT patients were characterized by low allostimulatory activity in mixed lymphocyte reaction (MLR), and this defect was more marked in the patients with PPD-anergy. As compared to healthy donors, DCs from the patients with PT (in particular, with PPD-anergy) exhibited a decreased capacity for induction of intracellular expression and production of IFN $\gamma$  by T-cells. However, DCs from the patients with PPD-anergy were able to stimulate intracellular expression of IL-4 in CD3<sup>+</sup>T-cell subset. Hence, the results suggest that functional activity of DCs in the patients with PT is altered, and some of these changes are distinctly associated with decreased antigen-specific response. (*Med. Immunol.*, 2008, vol. 10, N 2-3, pp 151-158)

### Адрес для переписки:

Черных Елена Рэмовна  
630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская 14,  
НИИ клинической иммунологии СО РАМН.  
Тел.: (383) 236-03-29.  
Факс: (383) 222-70-28.  
E-mail: ct\_lab@mail.ru

Туберкулез является проблемным заболеванием во всем мире. Ежегодно от этой инфекции погибает около 3 млн человек [12]. Первоначальный ответ против *M. tuberculosis* на уровне врожден-

ного иммунитета опосредуется активированными макрофагами [10, 14]. Однако последующий контроль над инфекцией осуществляется с вовлечением клеточных механизмов приобретенного иммунитета и инициируется дендритными клетками (ДК) [9]. Дендритные клетки являются наиболее профессиональными антигенпрезентирующими клетками, способными представлять бактериальные антигены в ассоциации с антигенами главного комплекса гистосовместимости II класса или CD1 молекулами и активировать антигенспецифический Т-клеточный ответ [6]. Соответственно эффективность иммунного ответа при туберкулезной инфекции во многом определяется функциональной активностью дендритных клеток и характером их взаимодействия с Т-лимфоцитами [18, 21, 28].

Хотя ДК не являются первичными мишенями инфицирования [23], они могут подвергаться негативному действию со стороны *M. tuberculosis*. Так, взаимодействие микобактерии с DC-SIGN лектином на поверхности ДК приводит к подавлению их созревания и усилению продукции IL-10, что способствует формированию иммуносупрессивного статуса и выживанию микобактерий [13]. Кроме того, изменение функциональной активности моноцитов также может влиять на свойства генерируемых ДК. При туберкулезе (ТБ) легких циркулирующие моноциты характеризуются повышенной продукцией иммуносупрессивных цитокинов [11, 25]. В то же время хорошо известно, что добавление PGE2 или IL-10 при культивировании моноцитов с GM-CSF и IL-4 приводит к нарушению созревания ДК и снижению продукции IL-12 [17].

Согласно полученным нами ранее данным, около 40% больных ТБ легких характеризуются дефектом антигенспецифического ответа, что проявляется снижением пролиферации мононуклеарных клеток в культурах, стимулированных очищенным туберкулином (PPD) [1-5]. Причем помимо повышенного апоптоза и анергии Т-клеток [5], дефект антигенспецифического ответа ассоциировался с дисфункциями моноцитов, в частности, с усилением супрессорной активности моноцитов, увеличением доли CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> клеток и моноцитов с внутриклеточной экспрессией IL-10 [1]. Поскольку циркулирующие моноциты являются источником генерируемых *in vitro* миелоидных ДК, было высказано предположение, что свойства ДК при ТБ также могут быть изменены.

Проведенный нами предварительный анализ частично-зрелых ДК, полученных при культивировании моноцитов в присутствии GM-CSF и IFN $\alpha$  (IFNДК), выявил ряд фенотипических особенностей этих клеток у больных ТБ легких [4]. Не было обнаружено различий в содержании зрелых дендритных клеток (CD83<sup>+</sup>) в груп-

пах больных и доноров. Тем не менее, увеличение числа CD14<sup>+</sup> клеток, особенно в группе больных со сниженным ответом на PPD, и уменьшение количества активированных дендритных клеток (CD25<sup>+</sup>) у больных свидетельствовало о снижении эффективности генерации ДК при туберкулезной инфекции. Эти данные явились еще одним аргументом в пользу предположения о дисфункциях ДК, как возможной причины нарушения антигенспецифического ответа у больных ТБ. Целью настоящей работы стало изучение функциональной активности интерферон- $\alpha$ -индуцированных ДК, в том числе у больных с сохранным и сниженным пролиферативным ответом на PPD.

## Материалы и методы

В исследование было включено 90 больных ТБ легких: 65 (72%) мужчин и 25 (28%) женщин в возрасте от 20 до 64 лет. Обследованная группа состояла из 41 (46%) пациента с фиброзно-кавернозной, 39 (43%) пациентов с инфильтративной и 10 (11%) пациентов с диссеминированной формами туберкулеза. Активное бацилловыделение было выявлено у 77 больных (БК<sup>+</sup> в 85,6% случаев). При лабораторном исследовании лекарственная резистентность (MDR) регистрировалась у 36 из 90 (40%) обследованных пациентов. В зависимости от уровня пролиферативного ответа мононуклеарных клеток (МНК) на PPD больные были разделены на 2 группы: с сохранным ответом (> 12 500 имп/мин, n = 50) и сниженным ответом (< 12 500 имп/мин, n = 40). Обследование всех пациентов проводилось при получении информированного согласия. Контрольную группу составили 38 здоровых доноров крови, сопоставимых по полу и возрасту.

МНК, выделенные из гепаринизированной венозной крови путем центрифугирования в градиенте плотности фиколла-верографина, культивировали (0,1 x 10<sup>6</sup>/лунку) в 96-луночных планшетах для иммунологических исследований в среде RPMI-1640 («Sigma», США), дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 5 ммоль HEPES-буфера, 100 мкг/мл гентамицина и 10% инактивированной сыворотки доноров IV (AB) группы при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Для стимуляции клеток использовали очищенный туберкулин (PPD) в концентрации 50 мкг/мл. Интенсивность пролиферации оценивали на 6 сутки по включению <sup>3</sup>H-тимидина, добавленного за 18 ч до окончания культивирования.

Моноциты выделяли в 6-луночных планшетах («Nunclon», Дания) путем прилипания к пластике МНК (3 x 10<sup>6</sup> клеток/мл) в присутствии 5% сыворотки AB (IV) группы. ДК получали путем культивирования прилипающей фракции МНК в течение 4 суток в среде RPMI-1640 с 10% сыворотки плодов коровы («Биолот», Санкт-

Петербург) в присутствии GM-CSF 40 нг/мл и IFN $\alpha$  (Роферон-А, «Roche», Швейцария) 1000 Ед/мл с последующим дозреванием в течение 24 ч в присутствии 10 мкг/мл липополисахарида (LPS *E. coli* 0111:B4, «Sigma»). Аллостимуляторную активность ДК оценивали в смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ) при культивировании МНК доноров (0,1 x 10<sup>6</sup>/лунку) в присутствии ДК (в соотношении 10 : 1, 50 : 1, 100 : 1) больных ТБ и здоровых доноров в течение 5 суток. Интенсивность пролиферации оценивали по включению <sup>3</sup>H-тимидина.

Уровень продукции оксида азота (NO) определяли в 3-суточных культурах ДК с помощью оценки содержания стабильного конечного продукта NO<sup>2-</sup>. Для этого клетки культивировали в 96-луночных планшетах в концентрации 0,1 x 10<sup>6</sup>/лунку в стандартной среде с 10% сыворотки плодов коровы. После окончания культивирования собирали 100 мкл супернатанта и инкубировали со 100 мкл реактива Грисса в течение 10 мин, затем измеряли оптическую плотность при длине волны 540 нм. Для построения калибровочной кривой использовали разведения 1 ммоль раствора NaNO<sub>2</sub>.

Содержание цитокинов определяли в супернатантах 5-суточных культур ДК и в 48-часовых супернатантах нестимулированных и стимулированных LPS дендритных клеток с помощью наборов для иммуноферментного анализа (ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск). Оценку экспрессии внутриклеточных цитокинов в популяции Т-клеток, стимулированных аллогенными ДК, проводили методом трехцветной проточной цитометрии (FASCCalibur, «Becton Dickinson»). Для этого МНК здоровых доноров, истощенные от прилипающих клеток, культивировали в присутствии (опыт) и в отсутствие (контроль) ДК здоровых доноров и больных ТБ в соотношении 10 : 1 в течение 5 суток. Затем в опытных пробах проводили рестимуляцию анало-

гичными ДК в течение 48 ч (вторичная СКЛ). За 18 ч до конца инкубации в культуру добавляли 10 мкг/мл брефелдина (ISN). МНК обрабатывали APC-меченными анти-CD3 моноклональными антителами и фиксировали 1% раствором параформальдегида. Пермеабиллизацию клеток проводили с использованием 0,2% раствора Твин-20. Для идентификации внутриклеточных детерминант клетки обрабатывали FITC-меченными анти-IFN $\gamma$  моноклональными антителами и PE-меченными анти-IL-4 моноклональными антителами («Becton Dickinson», США). Образцы анализировали на проточном цитометре с использованием программы Cellquest.

Математическую обработку полученных результатов проводили методами описательной, параметрической и непараметрической статистики на персональном компьютере с использованием программы «Statistica 5.0».

## Результаты и обсуждение

Исследование продукции цитокинов в супернатантах 5-суточных культур ДК, активированных в течение последних 24 ч LPS, показало, что IFN-ДК здоровых доноров характеризуются высоким уровнем продукции TNF $\alpha$ , способны секретировать IFN $\gamma$  и практически не продуцируют IL-4 (табл. 1). По сравнению со здоровыми донорами уровень продукции IFN $\gamma$  ДК больных ТБ был снижен в 6 раз. В то же время продукция TNF $\alpha$  и IL-4 в культурах ДК больных и доноров не различалась. Не было выявлено различий в уровне продукции исследуемых цитокинов в подгруппах больных, оппозитных по уровню PPD-индуцированного пролиферативного ответа. Тем не менее, некоторые особенности выявлялись при анализе больных с различными клиническими формами ТБ легких. Так, содержание IFN $\gamma$  было наиболее низким у больных с инфильтративной формой ТБ (13,2 $\pm$ 2,0 пкг/мл) и статистически значимо отличалось от аналогич-

**ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ (пкг/мл) В СУПЕРНАТАНТАХ 5-СУТОЧНЫХ КУЛЬТУР ДК ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ ТБ ЛЕГКИХ**

Группы	IFN $\gamma$	IL-4	TNF $\alpha$
Здоровые доноры	110,5 $\pm$ 59,8 (13)	4,4 $\pm$ 1,8 (13)	817,7 $\pm$ 63,1 (13)
Больные ТБ	18,3 $\pm$ 1,8 (29)*	5,7 $\pm$ 2,3 (20)	933,6 $\pm$ 36,3 (21)
PPD-анергичные больные	13,9 $\pm$ 3,7 (6)*	1,4 $\pm$ 0,6 (5)	911,7 $\pm$ 44,7 (7)
PPD-отвечающие больные	19,5 $\pm$ 2,1 (23)*	7,1 $\pm$ 3,0 (15)	944,5 $\pm$ 50,5 (14)
Фиброзно-кавернозный ТБ (1 группа)	22,5 $\pm$ 3,4 (10)*	9,6 $\pm$ 5,9 (7)	969,2 $\pm$ 70,0 (9)
Инфильтративный ТБ (2 группа)	13,2 $\pm$ 2,0 (12)*, **	1,6 $\pm$ 0,4 (7)	853,5 $\pm$ 32,9 (8)
Диссеминированная формой ТБ (3 группа)	21,6 $\pm$ 3,9 (4)*	5,1 $\pm$ 4,9 (3)	1065,6 $\pm$ 55,8 (3)*, #

**Примечания:** в скобках здесь и в следующих таблицах указано число наблюдений (n).

\* –  $p_0 < 0,05$  – достоверность различий по сравнению с группой здоровых доноров здесь и в последующих таблицах по критерию Вилкоксона–Манна–Уитни;

\*\* –  $p_0 < 0,05$  – достоверность различий по сравнению с группой 1;

# –  $p_0 < 0,05$  – достоверность различий по сравнению с группой 2.

ТАБЛИЦА 2. ПРОДУКЦИЯ IFN $\alpha$  (пкг/мл) И ОКСИДА АЗОТА (мкмоль) ДЕНДРИТНЫМИ КЛЕТКАМИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ ТБ ЛЕГКИХ

Группы	Продукция IFN $\alpha$		Продукция NO
	Спонтанная	LPS-стимулированная	
Здоровые доноры	82,7 $\pm$ 7,5 (4)	82,9 $\pm$ 5,9 (4)	17,6 $\pm$ 2,5 (11)
Больные ТБ	44,5 $\pm$ 8,8 (13)	39,3 $\pm$ 7,7 (16)*	11,1 $\pm$ 1,5 (13)*
PPD-анергичные больные	30,5 $\pm$ 7,0 (8)*	29,5 $\pm$ 5,5 (11)*	10,0 $\pm$ 1,7 (3)*
PPD-отвечающие больные	67,0 $\pm$ 16,2 (5)#	60,9 $\pm$ 19,2 (5)	11,9 $\pm$ 2,1 (9)*

**Примечания.** ДК были культивированы в течение 4 суток в присутствии GM-CSF и IFN $\alpha$ , затем клетки отмывали и дополнительно культивировали в отсутствие и присутствии LPS в течение 48 ч, после чего в супернатантах определяли концентрацию IFN $\alpha$ . Для оценки продукции NO ДК культивировали 4 суток в присутствии GM-CSF и IFN $\alpha$ , затем добавляли LPS и дополнительно культивировали 24 ч. После этого ДК отмывали, и дополнительно культивировали 3 суток в концентрации 0,1 x 10<sup>6</sup>/лунку, после чего в супернатантах измеряли содержание NO.

\* –  $p_U < 0,05$  – достоверность различий по сравнению с донорами;

# –  $p_U < 0,05$  – достоверность различий по сравнению с группой PPD-анергичных больных.

ного показателя у здоровых доноров и больных с фиброзно-кавернозной формой ТБ. С другой стороны, больные с диссеминированной формой ТБ отличались более высоким содержанием TNF $\alpha$  по сравнению с донорами и пациентами с инфильтративной формой ТБ.

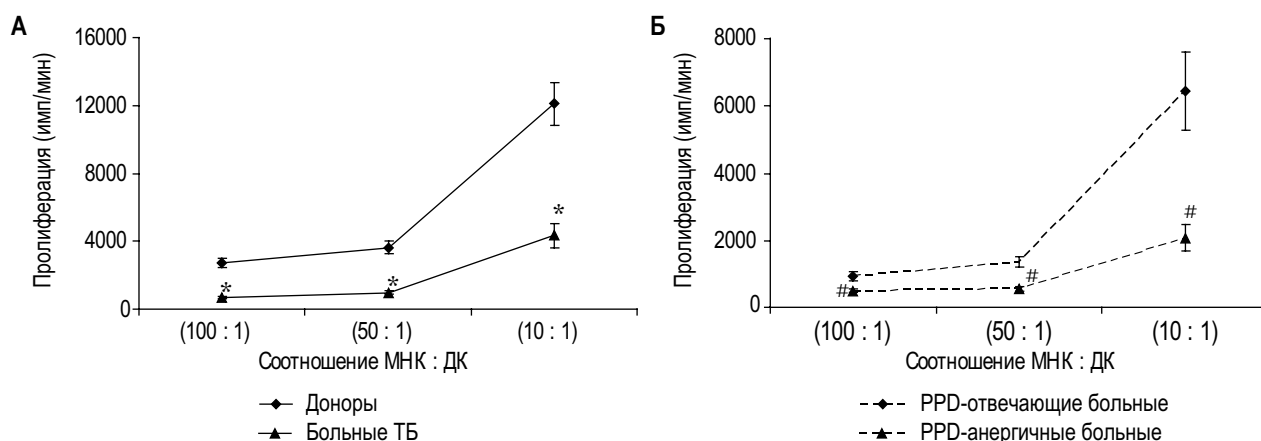
Одной из особенностей IFN-ДК является их способность к продукции IFN $\alpha$ . Известно, что основными продуцентами IFN $\alpha$  в периферической крови являются плазматикоидные ДК, экспрессирующие рецептор к IL-3 (CD123) [7, 8, 20]. Индуцированные в присутствии GM-CSF и IL-4 ДК не несут данный маркер и практически не продуцируют IFN $\alpha$  [26]. В то же время популяция IFN-ДК содержит определенное количество плазматикоидно-подобных клеток с фенотипом CD11c<sup>+</sup>CD123<sup>+</sup> и продуцирует (хотя и в меньшей степени) IFN $\alpha$ . Ранее было показано, что у больных ТБ по сравнению со здоровыми донорами количество этих клеток было сниженным (12,2 $\pm$ 1,1 и 17,5 $\pm$ 1,2% соответственно;  $p_U < 0,05$ ) [4]. Поэтому представлялось интересным оценить продукцию IFN $\alpha$  в исследуемых группах. Поскольку в культуральной среде генерируемых *in vitro* ДК содержится экзогенный IFN $\alpha$  (Роферон-А, 1000 Ед/мл), для оценки продукции данного цитокина ДК после 4 дней культивирования отмывали и дополнительно культивировали (0,1 x 10<sup>6</sup> клеток/лунку) в течение 48 ч в присутствии или отсутствии LPS. Как видно из данных таблицы 2, у больных ТБ легких отмечалось снижение продукции IFN $\alpha$ , которое было наиболее выраженным в группе пациентов с PPD-анергией. В то же время у PPD-реактивных больных продукция IFN $\alpha$  оставалась сохранной. При этом следует отметить, что добавление LPS в культуры ДК доноров и больных не оказывало дополнительного стимулирующего влияния на продукцию IFN $\alpha$ .

Наряду с цитокинами иммунорегуляторная активность ДК может опосредоваться через продукцию оксида азота (NO) [30], который в низ-

ких концентрациях оказывает стимулирующий эффект на пролиферацию Т-клеток [3]. Сравнительная оценка концентрации NO в 3-суточных культурах ДК показала, что у больных ТБ легких, независимо от уровня ответа на PPD, продукция нитрооксида была достоверно ниже, чем у здоровых доноров (табл. 2).

Одной из важных функций ДК является презентация антигена, в том числе аллоантигенов гистосовместимости в смешанной культуре лимфоцитов. Для оценки данной функции ДК было проведено сравнительное исследование аллостимуляторной активности ДК больных ТБ и доноров в СКЛ, которую индуцировали при различных соотношениях МНК и ДК (10 : 1, 50 : 1 и 100 : 1). В целом по группе больные ТБ легких отличались сниженной аллостимуляторной активностью ДК, что проявлялось более низким уровнем пролиферации в СКЛ при всех исследуемых соотношениях МНК и ДК (рис. 1А). При этом анализ больных, опозитных по уровню PPD-ответа, показал, что угнетение аллостимуляторной активности выявлялось именно в подгруппе PPD-анергичных пациентов (рис. 1Б).

На следующем этапе была проведена сравнительная оценка способности ДК доноров и больных ТБ активировать Т-хелперные клетки 1-го и 2-го типа (Th1 и Th2). Для этого исследовалось количество Т-клеток с внутриклеточной экспрессией IFN $\gamma$  и IL-4 во вторичной СКЛ, индуцированной ДК больных ТБ или здоровых доноров (табл. 3). Относительное содержание CD3<sup>+</sup>Т-клеток с внутриклеточным содержанием IFN $\gamma$  в присутствии ДК здоровых доноров возрастало более чем в 4 раза, тогда как количество CD3<sup>+</sup>Т-клеток с внутриклеточной экспрессией IL-4 увеличивалось незначительно. ДК больных также усиливали внутриклеточную продукцию IFN $\gamma$ , однако, в меньшей степени. При этом отмечалась тенденция к более выраженной стимуляции внутриклеточной про-



**Рисунок 1.** Аллостимуляторная активность ДК здоровых доноров и больных ТБ легких в смешанной культуре лимфоцитов

**Примечания.** Представлены средние значения ( $M \pm S.E.$ ) пролиферативного ответа (имп/мин) МНК здоровых доноров в СКЛ, которую индуцировали в присутствии ДК доноров ( $n = 24$ ) или больных ТБ легких ( $n = 55$ ), в том числе PPD-отвечающих ( $n = 31$ ) и PPD-анергичных ( $n = 21$ ) больных, при соотношении МНК : ДК 10 : 1, 50 : 1 и 100 : 1.

\* –  $p_U < 0,05$  – достоверность различий по сравнению с донорами;

# –  $p_U < 0,05$  – достоверность различий по сравнению с PPD-отвечающими больными.

дукции IL-4. Наибольшие различия выявлялись в группе PPD-анергичных больных. ДК этих больных характеризовались наиболее низкой Th1- и повышенной Th2-стимулирующей активностью и значимо отличались по этим параметрам от ДК больных с сохранным ответом на PPD.

Для оценки Th1/Th2-стимулирующей активности ДК был проведен также анализ цитокинов, продуцируемых во вторичной СКЛ. Как видно из данных таблицы 4, продукция IFN $\gamma$ Т-клетками при стимуляции ДК больных ТБ была значимо ниже, чем при стимуляции ДК здоровых доноров. Наиболее низкая способность ДК стимулировать продукцию IFN $\gamma$  в СКЛ выявлялась в подгруппе PPD-анергичных больных, тогда как у пациентов с сохранным антигенспецифическим ответом снижение Th1-стимулирующей активности ДК проявлялось в виде тенденции, и не было статистически достоверным. Так же как и у доноров,

ДК больных не стимулировали продукцию IL-4 в данных культуральных условиях.

Изменение содержания и функциональной активности ДК при туберкулезной инфекции в качестве возможной причины снижения иммунного контроля обсуждается и другими авторами [15, 20, 27, 29]. Так, Lichtner M. с соавт. выявили снижение количества миелоидных и плазматическ-идных ДК и продукции IFN $\alpha$  в периферической крови больных с активными формами туберкулеза легких. Причем после элиминации возбудителя и клинического улучшения на фоне проводимой терапии содержание ДК и продукция IFN $\alpha$  восстанавливались [20]. Рядом авторов также показано, что микобактерия туберкулеза может ингибировать дифференцировку и созревание ДК, генерируемых *in vitro*. Например, в условиях инфицирования *M. tuberculosis* ДК, генерируемые из моноцитов в присутствии GM-CSF и IL-4, характеризуются сниженной экспрессией CD1

**ТАБЛИЦА 3.** ВЛИЯНИЕ ДК ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ ТБ ЛЕГКИХ НА ВНУТРИКЛЕТОЧНУЮ ПРОДУКЦИЮ Т-КЛЕТКАМИ IFN $\gamma$  И IL-4

Источник ДК	IFN $\gamma$			IL-4		
	МНК(0)	МНК(+ДК)	ИБ	МНК(0)	МНК(+ДК)	ИБ
Здоровые доноры ( $n = 20$ )	1,9 $\pm$ 0,3	6,1 $\pm$ 0,5	4,8 $\pm$ 0,9	1,8 $\pm$ 0,1	2,2 $\pm$ 0,3	1,3 $\pm$ 0,2
Больные ТБ ( $n = 36$ )	1,9 $\pm$ 0,1	3,1 $\pm$ 0,4*	1,8 $\pm$ 0,2*	2,0 $\pm$ 0,2	4,7 $\pm$ 0,6*	2,2 $\pm$ 0,2*
PPD-анергичные больные ( $n = 19$ )	2,1 $\pm$ 0,1	2,7 $\pm$ 0,5*	1,3 $\pm$ 0,2*	2,4 $\pm$ 0,3	6,7 $\pm$ 1,1*	2,8 $\pm$ 0,3*
PPD-отвечающие больные ( $n = 17$ )	1,7 $\pm$ 0,1	3,7 $\pm$ 0,6#	2,4 $\pm$ 0,3*.#	1,8 $\pm$ 0,2	2,8 $\pm$ 0,4#	1,6 $\pm$ 0,1#

**Примечания.** Представлено процентное содержание CD3<sup>+</sup>T-клеток здоровых доноров с внутриклеточной экспрессией IFN $\gamma$  и IL-4 в культурах МНК, лишенных моноцитов [МНК(0)] и активированных дендритными клетками [МНК(+ДК)] здоровых доноров или больных ТБ легких в течение 5 суток и затем повторно стимулированных соответствующими ДК в течение 48 ч.

\* –  $p_U < 0,05$  – достоверность различий по сравнению с донорами;

# –  $p_U < 0,05$  – достоверность различий по сравнению с PPD-анергичными больными.

ТАБЛИЦА 4. ВЛИЯНИЕ ДК ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ ТБ НА СЕКРЕЦИЮ ЦИТОКИНОВ ВО ВТОРИЧНОЙ СКЛ

Цитокины, пкг/мл	МНК (0) n = 4	МНК(+ДК) доноров n = 13	МНК(+ДК) больных ТБ n = 22	МНК(+ДК) PPD-анергичных больных n = 12	МНК(+ДК) PPD-отвечающих больных n = 10
IFN $\gamma$	85 $\pm$ 48	1834 $\pm$ 351 (21,6 $\pm$ 4,1)	807 $\pm$ 185* (9,5 $\pm$ 2,2*)	598 $\pm$ 149* (7,0 $\pm$ 1,8*)	1057 $\pm$ 361 (12,4 $\pm$ 4,2*)
IL-4	0,23 $\pm$ 0,15	2,0 $\pm$ 1,0	1,7 $\pm$ 1,6	2,0 $\pm$ 0,8	0,7 $\pm$ 0,7

**Примечания.** Представлены средние значения концентрации IFN $\gamma$  и IL-4, а также в скобках – индексы влияния ДК на продукцию IFN $\gamma$ . МНК здоровых доноров, истощенные от прилипающих к пластику клеток, культивировали 5 суток в присутствии ДК доноров и больных ТБ, после чего проводили рестимуляцию соответствующими ДК в течение последующих 48 ч и определяли содержание цитокинов в супернатантах вторичной СКЛ. В качестве контроля МНК(0) оценивали спонтанную продукцию цитокинов в супернатантах МНК, лишенных моноцитов, которые культивировали 5 суток, отмывали и дополнительно культивировали 48 ч.

\* –  $p_0 < 0,05$  – достоверность различий по сравнению с донорами.

и нарушением аллостимуляторной активности [15, 27].

В проведенных нами исследованиях больных ТБ легких впервые изучены свойства ДК, генерируемых в присутствии GM-CSF и IFN $\alpha$ . Данный путь генерации ДК представляется более физиологичным. Кроме того, генерируемые в присутствии IFN $\alpha$  ДК характеризуются высокой способностью к миграции и активации Th1-ответа за счет экспрессии СС-хемокиновых рецепторов R5 (CCR5) и R7 (CCR7) [24, 26].

В целом полученные нами данные свидетельствуют об изменении функциональной активности IFN $\alpha$ -индуцированных ДК при туберкулезной инфекции. Так, ДК больных ТБ характеризуются сниженной продукцией IFN $\gamma$ , IFN $\alpha$  и нитрооксида; угнетением аллостимуляторной активности, а также способности к активации продукции Th1-цитокинов. Выявленные изменения, возможно, связаны с нарушением созревания ДК. Так, хорошо известно, что незрелые ДК отличаются низкой аллостимуляторной активностью и менее выраженной продукцией иммуностимулирующих цитокинов [15]. Что касается продукции нитрооксида, то хорошо известно, что индукторами NO-синтазы служат различные стимулы, в том числе IFN $\gamma$  и эндотоксин (LPS), стимулирующие процесс созревания ДК [19, 30]. Поэтому снижение продукции оксида азота ДК больных ТБ также может отражать задержку их созревания.

Важно отметить, что ряд выявленных нарушений функциональной активности ДК четко ассоциировался с угнетением антигенспецифического ответа, поскольку выявлялся или был более выражен в группе больных с PPD-анергией. Так, снижение продукции IFN $\alpha$  дендритными клетками, а также угнетение аллостимуляторной и Th1-стимулирующей активности ДК наблюдалось именно у больных со сниженным ответом на PPD. Кроме того, ДК больных с PPD-анергией обладали более выраженной Th2-стимулирующей активностью по сравнению с ДК больных с сохранным ответом на PPD.

В то же время снижение продукции дендритными клетками IFN $\gamma$  и нитрооксида было характерно для всех больных ТБ легких независимо от уровня PPD-стимулированной пролиферации. Нарушение антигенспецифического ответа могло быть обусловлено не только изменением Th1/Th2-стимулирующей активности, но и приобретением толерогенных свойств ДК. Так, известно, что в условиях иммуносупрессии ДК способны индуцировать генерацию регуляторных CD4<sup>+</sup>T-клеток с супрессорной активностью [16]. Действительно, проведенные нами ранее исследования показали, что у больных с PPD-анергией регистрируется повышенное содержание CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T-клеток, количество которых обратно коррелировало с уровнем PPD-ответа [2].

Следует отметить, что большинство исследований посвящено изучению влияния *M. tuberculosis* на процесс генерации ДК, а также анализу функциональных особенностей инфицированных клеток [13, 14, 21]. В настоящей работе исследовались функциональные свойства ДК, генерируемых из моноцитов периферической крови больных ТБ, которые не имели непосредственного контакта с патогеном. Поэтому выявленные дисфункции ДК, скорее всего, являются результатом изменения свойств циркулирующих моноцитов, нежели следствием инфицирования моноцитов микобактерией туберкулеза.

Исследование функции ДК при туберкулезной инфекции представляет интерес не только с точки зрения иммунопатогенеза данной инфекции, но и в аспекте потенциального использования ДК для иммунотерапии больных ТБ легких, особенно с наличием лекарственной полирезистентности. В этом плане IFN $\alpha$ -индуцированные ДК представляют особый интерес, поскольку имеют ряд преимуществ по сравнению с ДК, индуцированными в присутствии GM-CSF и IL-4. Эти клетки быстрее генерируются, характеризуются более высокой миграционной активностью, стабильны в отсутствии ростовых факторов и характеризуются гораздо более низкой экспрессией

молекул DC-SIGN, через которые осуществляется связывание с *M. tuberculosis* [7, 22]. Полученные нами данные свидетельствуют об изменении IFN-ДК у больных ТБ. Тем не менее, эти клетки интенсивно продуцируют TNF $\alpha$ , и обладают Th1-стимулирующей активностью (хотя и в меньшей степени, чем ДК здоровых доноров), и, следовательно, могут использоваться для активации Th1-ответа. При этом, учитывая измененный профиль цитокинов, продуцируемых ДК, можно полагать, что адьювантная цитокинотерапия может повысить стимулирующий эффект ДК.

## Список литературы

1. Сахно Л.В., Тихонова М.А., Кожевников В.С., Сенюков В.В., Пронкина Н.В., Никонов С.Д., Жданов О.А., Останин А.А., Черных Е.Р. Фенотипическая и функциональная характеристика моноцитов у больных туберкулезом легких // Мед. иммунология. — 2005. — Т. 7, № 1. — С. 49-56.
2. Сахно Л.В., Тихонова М.А., Курганова Е.В., Шевела Е.Я., Никонов С.Д., Жданов О.А., Мостовая Г.В., Останин А.А., Черных Е.Р. Т-клеточная анергия в патогенезе иммунной недостаточности при туберкулезе легких // Пробл. туберкулеза — 2004. — № 5. — С. 23-27.
3. Сахно Л.В., Хонина Н.А., Норкина О.В., Мостовая Г.В., Никонов С.Д., Огиренко А.П., Черных Е.Р., Останин А.А. Участие оксида азота в развитии туберкулиновой анергии у пациентов с туберкулезом легких // Пробл. туберкулеза. — 2001. — № 8. — С. 42-46.
4. Сахно Л.В., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Распай Ж.М., Гилева И.П., Никонов С.Д., Жданов О.А., Останин А.А., Черных Е.Р. Характеристика дендритных клеток, генерируемых в присутствии интерферона- $\alpha$ , у больных туберкулезом легких // Пробл. туберкулеза. — 2007. — № 6.
5. Черных Е.Р., Сахно Л.В., Хонина Н.А., Тихонова М.А., Кожевников В.С., Никонов С.Д., Жданов О.А., Останин А.А. Субпопуляционная принадлежность Т-клеток, подверженных анергии и апоптозу, у больных туберкулезом легких // Пробл. туберкулеза. — 2002. — № 7. — С. 43-48.
6. Banchereau J., Steinman R.M. Dendritic cells and the control of immunity // Nature. — 1998 — Vol. 392. — P. 245-252.
7. Bella S.D., Nicola S., Riva A., Biasin M., Clerici M., Villa M.L. Functional repertoire of dendritic cells generated in granulocyte macrophage-colony stimulating factor and interferon- $\alpha$  // J. Leukoc. Biol. — 2001. — Vol. 75. — P. 106-116.
8. Cox K., North M., Burke M., Singhal H., Renton S., Agel N., Islam S., Knight S.C. Plasmacytoid dendritic cells (PDC) are the major DC subset innately producing cytokines in human lymph nodes // J. Leukoc. Biol. — 2005. — Vol. 75. — P. 1142-1152.
9. Demangel C., Britton W.J. Interaction of dendritic cells with mycobacteria: where the action starts // Immunol. Cell Biol. — 2000. — Vol. 78. — P. 318-324.
10. Fenton M.J., Vermeulen M.W. Immunopathology of tuberculosis: roles of macrophages and monocytes // Infect. Immun. — 1996. — Vol. 64. — P. 683-690.
11. Fietta A., Meloni F., Francioli C., Morosini M., Bulgheroni A., Casali L., Gialdroni G.G. Virulence of *Mycobacterium tuberculosis* affects interleukin-monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-10 production by human mononuclear phagocytes // Int. J. Tissue React. — 2001. — Vol. 23. — P. 113-125.
12. Flynn J.L., Chan J. Immunology of tuberculosis // Annu. Rev. Immunol. — 2001. — Vol. 19. — P. 93-129.
13. Geijtenbeek T.B.H., van Vliet S.J., Koppel E.A., Sanchez-Hernandez M., Vandenbroucke-Gras C.M.J.E., Appelmek B., van Kooyk V. *Mycobacteria* target DC-SIGN to suppress dendritic cell function // J. Exp. Med. — 2003. — Vol. 197. — P. 7-17.
14. Giacomini E., Iona E., Ferroni L., Miettinen M., Fattoni L., Orefici G., Julkunen I., Coccia E.M. Infection of human macrophages and dendritic cells with *Mycobacterium tuberculosis* induces a differential cytokine gene expression that modulates T-cell response // J. Immunology. — 2001. — Vol. 166. — P. 7033-7041.
15. Hanekom W.A., Mendillo M., Manca C., Haslett P.A.J., Siddiqui M.R., Barry C., Kaplan G. *Mycobacterium tuberculosis* inhibits maturation of human monocyte-derived dendritic cells *in vitro* // J. Infect. Diseases. — 2003. — Vol. 188. — P. 257-266.
16. Jonuleit H., Schmitt E., Schuler G., Knop J., Enk A.H. Induction of Interleukin 10-producing, nonproliferating CD4 T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells // J. Exp. Med. — 2000. — Vol. 192. — P. 1213-1222.
17. Kalinski P., Schuitemaker J.H., Hilkens C.M., Kapsenberg M.L. Prostaglandin E2 induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a<sup>+</sup>CD83<sup>+</sup> dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation // J. Immunol. — 1998. — Vol. 161. — P. 2804-2809.
18. Kapsenberg M.L. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization // Nature Rev. Immunol. — 2003. — Vol. 3. — P. 984-993.
19. Koul A., Herget T., Klebl B., Ullrich A. Interplay between mycobacteria and host signaling pathways // Nature Rev. Microbiol. — 2004. — Vol. 2. — P. 189-202.
20. Lichtner M., Rossi R., Mengoni F., Vignoli S., Colacchia B., Massetti A.P., Kamga I., Hosmalin A., Vullo V., Mastroiani C.M. Circulating dendritic

cells and interferon- $\alpha$  production in patients with tuberculosis: correlation with clinical outcome and treatment response // Clin. Exp. Immunol. – 2005. – Vol. 143. – P. 329-337.

21. Mariotti M., Teloni R., Iona E., Fattorini L., Romagnoli G., Gagliardi M.C., Orefici G., Nisini R. Mycobacterium tuberculosis diverts alpha interferon-induced monocyte differentiation from dendritic cells into immunoprivileged macrophage-like host cells // Infect. Immun. – 2004. – Vol. 72. – P. 4385-4392.

22. Mohty M., Vialle-Castellano A., Nunes J.A., Isnardon D., Olive D., Gaugler B. IFN $\alpha$  skews monocyte differentiation into toll-like receptor 7-expressing dendritic cells with potent functional activities // J. Immunol. – 2003. – Vol. 171. – P. 3385-3393.

23. Nigou J., Zelle-Rieser C., Gilleron M., Thurnher M., Puzo G. Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor // J. Immunol. – 2001. – Vol. 166. – P. 7477-7485.

24. Parlato S., Santini S.M., Lapenta C., Pucchio T.D., Logozzi M., Spada M., Giammarioli A.M., Malorni W., Eais S., Belardelli F. Expression of CCR-7, MIP-3 $\beta$  and Th1 chemokines in type I IFN induced monocyte-derived dendritic cells – importance for the rapid acquisition of potent migratory and functional activities // Blood. – 2001. – Vol. 98. – P. 3022-3029.

25. Pereira C.B., Palaci M., Leite O.H., Duarte A.J., Benard G. Monocyte cytokine secretion in patients

with pulmonary tuberculosis differs from that of healthy infected subjects and correlates with clinical manifestations // Microbes Infect. – 2004. – Vol. 6. – P. 25-33.

26. Santini S.M., Pucchio T.D., Lapenta C., Parlato S., Logozzi M., Belardelli F. A new type I IFN-mediated pathway for the rapid differentiation of monocytes into highly active dendritic cells // Stem cells. – 2003. – Vol. 21. – P. 357-362.

27. Stenger S., Niaz K.R., Modlin R.L. Down-regulation of CD1 on antigen-presenting cells by infection with Mycobacterium tuberculosis // J. Immunol. – 1998. – Vol. 161. – P. 3582-3588.

28. Tailleux L., Neyrolles O., Honore-Bouakline S., Perret E., Sanchez F., Abastado J.-P., Lagrange P.H., Gluckman J.C., Rosenzweig M., Herrmann J.-L. Constrained intracellular survival of Mycobacterium tuberculosis in human dendritic cells // J. Immunol. – 2003. – Vol. 170. – P. 1939-1948.

29. Ulrichs T., Moody D.B., Grant E., Kaufmann S.H.E., Porcelli S.A. T-cell responses to CD1-presented lipid antigens in humans with Mycobacterium tuberculosis infection // Infection & Immunity. – 2003. – Vol. 71. – P. 3076-3087.

30. Wang F.-S., Xing L.-H., Liu M.-X., Zhu C.-L., Liu H.-G., Wang H.-F., Lei Z.-Y. Dysfunction of peripheral blood dendritic cells from patients with chronic hepatitis B virus infection // World J. Gastroenterol. – 2001. – Vol. 7. – P. 537-541.

поступила в редакцию 07.07.2007

принята к печати 12.09.2007