

## ВЗАИМОСВЯЗЬ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ГЕНЕРИРУЕМЫХ *IN VITRO* ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК С СОДЕРЖАНИЕМ CD16<sup>+</sup> КЛЕТОК В ПОПУЛЯЦИИ МОНОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

Тыринова Т.В.<sup>1, 2</sup>, Леплина О.Ю.<sup>1</sup>, Тихонова М.А.<sup>1</sup>, Сахно Л.В.<sup>1</sup>,  
Максимова А.А.<sup>1</sup>, Останин А.А.<sup>1</sup>, Черных Е.Р.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»,  
г. Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Институт медицины и психологии ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский  
государственный университет», г. Новосибирск, Россия

**Резюме.** Циркулирующие моноциты представляют собой гетерогенную популяцию клеток, часть которых, наряду с классическим моноцитарным маркером CD14, экспрессирует молекулу CD16. Различия в фенотипе между субпопуляциями моноцитов могут сказываться на их функциональной активности, а также способности к дальнейшей дифференцировке в дендритные клетки (ДК), которые представляют собой профессиональные антигенпрезентирующие клетки и обеспечивают активацию иммунного ответа или, наоборот, поддерживают состояние иммунологической толерантности. Целью настоящего исследования явилось изучение взаимосвязи между субпопуляционной принадлежностью моноцитов и функциональной активностью генерируемых из них дендритных клеток, а также их чувствительности к толерогенному действию дексаметазона. ДК генерировали в присутствии GM-CSF и IFN $\alpha$  из полученной методом магнитной сепарации обогащенной популяции CD14<sup>+</sup> моноцитов периферической крови с деплецией (CD16<sup>-</sup>Мо-ДК) и без деплеции CD16<sup>+</sup> клеток (CD16<sup>+</sup>Мо-ДК). CD16<sup>+</sup>Мо-ДК характеризовались более низкой способностью поглощать FITC-меченный декстран и более высокой способностью индуцировать пролиферативный ответ Т-клеток на аллоантигены по сравнению с CD16<sup>-</sup>Мо-ДК. Кроме того, CD16<sup>+</sup>Мо-ДК проявляли более выраженную апоптоз-индуцирующую активность против аутологичных CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов и против аллогенных CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов, но были сопоставимы с CD16<sup>-</sup>Мо-ДК по способности индуцировать апоптоз в аллогенных CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитах. Уровень продукции TNF $\alpha$ , сходный для обоих типов ДК, находился в обратной взаимосвязи с аллостимуляторной активностью CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и прямо коррелировал с апоптоз-индуцирующей активностью CD16<sup>+</sup>Мо-ДК против аллогенных CD4<sup>+</sup>Т-клеток. CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК были также сопоставимы по уровню продукции IL-10, который обратно коррелировал с показателями аллостимуляторной активности обоих типов ДК. CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК были подвержены супрессорному эффекту дексаметазона, который проявлялся увеличением фагоцитарной активности, снижением способности стимулировать пролиферацию аутологичных и аллогенных Т-клеток и подавлением продукции TNF $\alpha$ . При этом в популяции CD16<sup>+</sup>Мо-ДК

### Адрес для переписки:

Тыринова Тамара Викторовна  
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт  
фундаментальной и клинической иммунологии»  
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.  
Тел.: 8 (383) 228-21-01.  
Факс: 8 (383) 222-70-28.  
E-mail: ct\_lab@mail.ru; tyrinova@bk.ru

### Address for correspondence:

Tyrinova Tamara V.  
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology  
630099, Russian Federation, Novosibirsk,  
Yadrintsevskaia str., 14.  
Phone: 7 (383) 228-21-01.  
Fax: 7 (383) 222-70-28.  
E-mail: ct\_lab@mail.ru; tyrinova@bk.ru

### Образец цитирования:

Тыринова Т.В., О.Ю. Леплина, М.А. Тихонова,  
Л.В. Сахно, А.А. Максимова, А.А. Останин,  
Е.Р. Черных «Взаимосвязь функциональной  
активности генерируемых *in vitro* дендритных клеток  
с содержанием CD16<sup>+</sup> клеток в популяции моноцитов  
периферической крови» // Медицинская иммунология,  
2020. Т. 22, № 2. С. 269–280.  
doi: 10.15789/1563-0625-RBT-1924

© Тыринова Т.В. и соавт., 2020

### For citation:

T.V. Tyrinova, O.Yu. Leplina, M.A. Tikhonova, L.V. Sakhno,  
A.A. Maximova, A.A. Ostanin, E.R. Chernykh "Relationship  
between the functional activity of *in vitro* generated monocyte-  
derived dendritic cells and the presence of CD16<sup>+</sup> cells among  
peripheral blood monocytes", Medical Immunology (Russia)/  
Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 2,  
pp. 269–280. doi: 10.15789/1563-0625-RBT-1924

DOI: 10.15789/1563-0625-RBT-1924

регистрировались более выраженное увеличение эндоцитозной активности и снижение способности ДК стимулировать пролиферацию CD4<sup>+</sup>T-клеток в ауто-СКЛ. Кроме того, обработка дексаметазоном CD16<sup>+</sup>Mo-ДК сопровождалась увеличением проапоптогенной активности ДК против аутологичных CD8<sup>+</sup>T-лимфоцитов. Таким образом, присутствие в пуле моноцитов CD16<sup>+</sup> клеток влияет на свойства генерируемых из них IFN $\alpha$ -индуцированных ДК и их чувствительность к иммунорегуляторному действию дексаметазона.

**Ключевые слова:** дендритные клетки, классические моноциты, альтернативные моноциты, интерферон альфа, дексаметазон

## RELATIONSHIP BETWEEN THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF *IN VITRO* GENERATED MONOCYTE-DERIVED DENDRITIC CELLS AND THE PRESENCE OF CD16<sup>+</sup> CELLS AMONG PERIPHERAL BLOOD MONOCYTES

Tyrinova T.V.<sup>a, b</sup>, Leplina O.Yu.<sup>a</sup>, Tikhonova M.A.<sup>a</sup>, Sakhno L.V.<sup>a</sup>, Maximova A.A.<sup>a</sup>, Ostanin A.A.<sup>a</sup>, Chernykh E.R.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

<sup>b</sup> Institute of Medicine and Psychology, Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russian Federation

**Abstract.** Peripheral blood monocytes are heterogeneous CD14<sup>+</sup> cell population, some of which also express CD16 molecule. Differences in phenotype between monocyte subpopulations can affect their functional activity, as well as the ability to further differentiate into dendritic cells (DCs). DCs are professional antigen-presenting cells which induce the immune response or, conversely, maintain the immunological tolerance. The aim of the present study was to analyze the relationship between monocyte subpopulations and the functional activity of monocyte-derived DCs, as well as DC sensitivity to the tolerogenic effect of dexamethasone. DCs were generated by cultivating enriched fractions of CD14<sup>+</sup> monocytes with or without CD16<sup>+</sup> cell depletion (CD16<sup>-</sup>Mo-DCs or CD16<sup>+</sup>Mo-DCs, respectively) in the presence of IFN $\alpha$  and GM-CSF. Monocyte subpopulations were obtained by immunomagnetic negative selection. CD16<sup>+</sup>Mo-DCs were characterized by lower ability to take up FITC-dextran and higher allostimulatory activity compared to CD16<sup>-</sup>Mo-DCs. In addition, CD16<sup>+</sup>Mo-DCs showed higher apoptosis-inducing activity against autologous CD4<sup>+</sup>T lymphocytes and allogeneic CD8<sup>+</sup>T lymphocytes, but were similar to CD16<sup>-</sup>Mo-DCs in their ability to induce apoptosis in allogeneic CD4<sup>+</sup>T lymphocytes. TNF $\alpha$  production level, similar for both types of DCs, was negatively correlated with CD16<sup>-</sup>Mo-DC allostimulatory activity and directly correlated with apoptosis-inducing activity of CD16<sup>+</sup>Mo-DCs towards allogeneic CD4<sup>+</sup>T cells. CD16<sup>-</sup>Mo-DCs and CD16<sup>+</sup>Mo-DCs were similar by their IL-10 production, which was inversely related to allostimulatory activity of both types of DCs. Dexamethasone increased endocytic activity, decreased the ability to stimulate autologous and allogeneic T cells, inhibited TNF $\alpha$  production of CD16<sup>-</sup>Mo-DCs and CD16<sup>+</sup>Mo-DCs. However, CD16<sup>+</sup>Mo-DCs demonstrated a more pronounced increase in endocytic activity and more dramatic decrease in their ability to stimulate the proliferation of CD4<sup>+</sup>T cells in auto-MLR. Also, addition of dexamethasone into CD16<sup>+</sup>Mo-DCs cultures led to the increase in DC pro-apoptogenic activity against autologous CD8<sup>+</sup>T lymphocytes. Thus, the presence of CD16<sup>+</sup> cells among monocyte population affects the properties of IFN $\alpha$ -induced monocyte-derived DCs and DC sensitivity to the immunomodulatory effects of dexamethasone.

**Keywords:** dendritic cells, classical monocytes, non-classical monocytes, interferon-alpha, dexamethasone

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-015-00215 А.

### Введение

Моноциты представляют собой гетерогенную популяцию клеток костномозгового происхождения, которые играют важную роль в поддержа-

нии тканевого гомеостаза и иммунитета и являются системным резервуаром предшественников для клеток миелоидной линии, прежде всего дендритных клеток (ДК) [6, 22]. Моноциты дифференцируются в ДК *in vivo* при различных патологических состояниях, ассоциированных с воспалением, включая инфекции и аутоиммунные заболевания [17, 22]. В настоящее время выделя-

ют три основные субпопуляции циркулирующих моноцитов. Основную долю составляют классические моноциты с фенотипом CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> клеток, которые способны поддерживать пул ДК в норме и первыми мигрировать в зону воспаления или повреждения [19]. Два других типа, включая промежуточные (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, 2-8%) и неклассические (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>, 2-11%) моноциты, экспрессирующие молекулу CD16, составляют минорную долю моноцитов. Роль этих моноцитов до конца не изучена, однако показано, что при различных патологиях (аутоиммунные заболевания, вирусная инфекция, опухолевый рост, хроническое воспаление) количество CD16<sup>+</sup> моноцитов возрастает [6, 12]. Несмотря на проводимые исследования, до сих пор неясно, могут ли различные субпопуляции моноцитов детерминировать функциональные особенности генерируемых из них ДК. Этот вопрос имеет важное значение, поскольку ДК, будучи высокоспециализированными антигенпрезентирующими клетками, играют важную роль как в запуске иммунного ответа, так и индукции толерантности. Однако взаимосвязь отдельных субпопуляций моноцитов с формированием иммуностимуляторных и толерогенных свойств ДК остается малоизученной.

Проведенные нами ранее исследования показали, что в присутствии IFN $\alpha$  ДК, полученные из моноцитов, содержащих CD16<sup>+</sup> клетки (CD16<sup>+</sup>Мо-ДК), характеризовались более зрелым фенотипом по сравнению с ДК, полученными из популяции моноцитов с деплецией CD16<sup>+</sup> клеток (CD16<sup>-</sup>Мо-ДК), что может обуславливать более высокую иммуностимуляторную активность ДК и иметь важное значение для индукции иммунного ответа. С другой стороны, было показано, что ингибирующий эффект дексаметазона на дифференцировку и созревание ДК более выражен в культурах CD16<sup>+</sup>Мо-ДК [2]. В связи с этим можно предположить, что переключение иммуностимуляторных свойств IFN-ДК в сторону регуляторных свойств под влиянием дексаметазона связано с популяцией CD16<sup>+</sup> моноцитов.

**Целью настоящей работы** явилось дальнейшее сравнительное исследование функциональной активности CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК и их чувствительности к толерогенному действию дексаметазона. Выбор в качестве толерогенного стимула глюкокортикоидов был обусловлен их важной ролью в стресс-индуцированной иммуносупрессии и активном использовании в качестве терапевтического средства [7].

## Материалы и методы

В исследование были включены 39 здоровых доноров обоего пола в возрасте от 20 до 62 лет. Забор крови и все исследования проводили по-

сле получения письменного информированного согласия. Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли центрифугированием гепаринизированной венозной крови в градиенте плотности фиколла-верографина. Для выделения моноцитов из полученной взвеси МНК использовали наборы магнитных бус (Easy Sep<sup>TM</sup>, STEMCELL Technologies Inc.), позволяющие получить популяции CD14<sup>+</sup> моноцитов с деплецией (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> моноциты) и без деплеции CD16<sup>+</sup> клеток (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноциты). Магнитную сепарацию осуществляли согласно инструкциям производителя. Контроль чистоты выделенных субпопуляций моноцитов проводили методом проточной цитофлуориметрии с использованием FITC-конъюгированных анти-CD14- и Ре-конъюгированных анти-CD16-антител (BD PharMingen, США). Содержание CD14<sup>+</sup> и CD16<sup>+</sup> моноцитов во фракции CD14<sup>+</sup> моноцитов с деплецией CD16<sup>+</sup> клеток составляло 81,1 $\pm$ 3,2 и 3,4 $\pm$ 0,8% соответственно, а во фракции CD14<sup>+</sup> моноцитов без деплеции CD16<sup>+</sup> клеток — 73,6 $\pm$ 4,5 и 22,3 $\pm$ 2,9% соответственно.

ДК генерировали путем культивирования выделенных CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> и CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитов в 6-луночных планшетах (Nuncclon, Дания) в течение 3-4 суток в среде RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, США), дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 5 мМ HEPES-буфера, 100 мкг/мл гентамицина и 2,5% эмбриональной телячьей сыворотки (FCS, БиолоТ, Санкт-Петербург), в присутствии GM-CSF (40 нг/мл, Sigma-Aldrich) и IFN $\alpha$  (1000 Ед/мл, Роферон-А, Roche, Швейцария). Для индукции созревания ДК на 4 сутки вносили липополисахарид (ЛПС, 10 мкг/мл, LPS *E. coli* 0114:B4, Sigma-Aldrich) и продолжали культивировать в течение 24 ч. В отдельной серии экспериментов на этапе дифференцировки за сутки до внесения ЛПС в культуры ДК добавляли дексаметазон (10<sup>-6</sup> М).

Способность ДК к захвату антигена оценивали по поглощению полимера глюкозы FITC-декстран (1 мкг/мл; Sigma, США) при +4 °С (контроль) и при +37 °С в течение 1 ч. После инкубации ДК трижды отмывали холодным забуференным физиологическим раствором (ЗФР), окрашивали Ре-меченными анти-HLA-DR-антителами (BD PharMingen, США) и оценивали внутриклеточную экспрессию FITC-Декстрана в гейте HLA-DR<sup>+</sup> клеток методом проточной цитометрии.

Стимуляторную активность IFN-ДК оценивали в аутологичной и аллогенной смешанной культуре лейкоцитов (ауто- и алло-СКЛ, соответственно), используя в качестве отвечающих клеток аутологичные или аллогенные МНК доноров (0,1  $\times$  10<sup>6</sup>/лунку), которые культивировали в 96-луночных круглодонных планшетах в среде



RPMI-1640 в присутствии 10% инактивированной сыворотки крови АВ(IV) группы при 37 °С в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Стимуляторами служили ДК в соотношении МНК:ДК = 10:1. Пролиферативный ответ оценивали на 5 сутки радиометрически по включению <sup>3</sup>H-тимидина (1 мКю/лунку), вносимого за 18 ч до окончания культивирования.

Для оценки влияния ДК на пролиферативную активность субпопуляций CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>Т-клеток аутологичные и аллогенные МНК окрашивали витальным красителем CFSE (5(6)-carboxyfluoresceindiacetate N-succinimidyl ester; 2 мМ, Sigma-Aldrich, США) и сокультивировали в СКЛ (0,1 × 10<sup>6</sup>/лунку) с ДК в соотношении МНК:ДК = 10:1 в 96-луночных круглодонных планшетах в среде RPMI-1640 в присутствии 10% инактивированной сыворотки крови АВ(IV) группы при 37 °С в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение 5 суток. Культуры дублировали в 12 идентичных повторях с целью получения клеток в количестве, достаточном для проведения цитофлуориметрического анализа. По завершении культивирования клетки окрашивали PE-меченными анти-CD3-, APC-меченными анти-CD4- и PerCP-меченными анти-CD8-антителами (BD Pharmingen, США). Анализ пролиферативного ответа МНК проводили методом проточной цитометрии в гейтах CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> лимфоцитов по уменьшению интенсивности флуоресценции красителя CFSE. Результат выражали в виде процентного содержания делящихся клеток к общему количеству клеток в исследуемой области.

Уровень апоптоза Т-лимфоцитов оценивали в ауто- и алло-СКЛ при культивировании в течение 72 ч МНК доноров (0,1 × 10<sup>6</sup>/лунку) в 96-луночных круглодонных планшетах в присутствии ДК в соотношении МНК:ДК = 10:1. Культуры дублировали в 12 идентичных повторях с целью получения клеток в количестве, достаточном для проведения цитофлуориметрического анализа. Апоптоз Т-клеток оценивали после окончания культивирования методом проточной цитометрии в гейте CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> клеток по связыванию с APC-меченным Annexin V (признак раннего апоптоза) и PI (признак позднего апоптоза/некроза) согласно инструкции фирмы-производителя (BD Pharmingen, США).

Концентрацию продуцируемых цитокинов TNFα и IL-10 в супернатантах полученных ДК определяли методом иммуноферментного анализа, используя соответствующие тест-системы (АО «Вектор-Бест», Россия). Анализ уровня продукции цитокинов в цельных супернатантах культур IFN-ДК проводился в пересчете на 10<sup>5</sup> ДК.

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета прикладных программ

Statistica 6.0. Для выявления значимых различий сравниваемых показателей использовали непараметрический W-критерий Вилкоксона (для связанных парных выборок). Для анализа взаимосвязей между исследуемыми параметрами использовали коэффициент корреляции Спирмена (r<sub>s</sub>). Различия считали достоверными при уровне значимости p < 0,05.

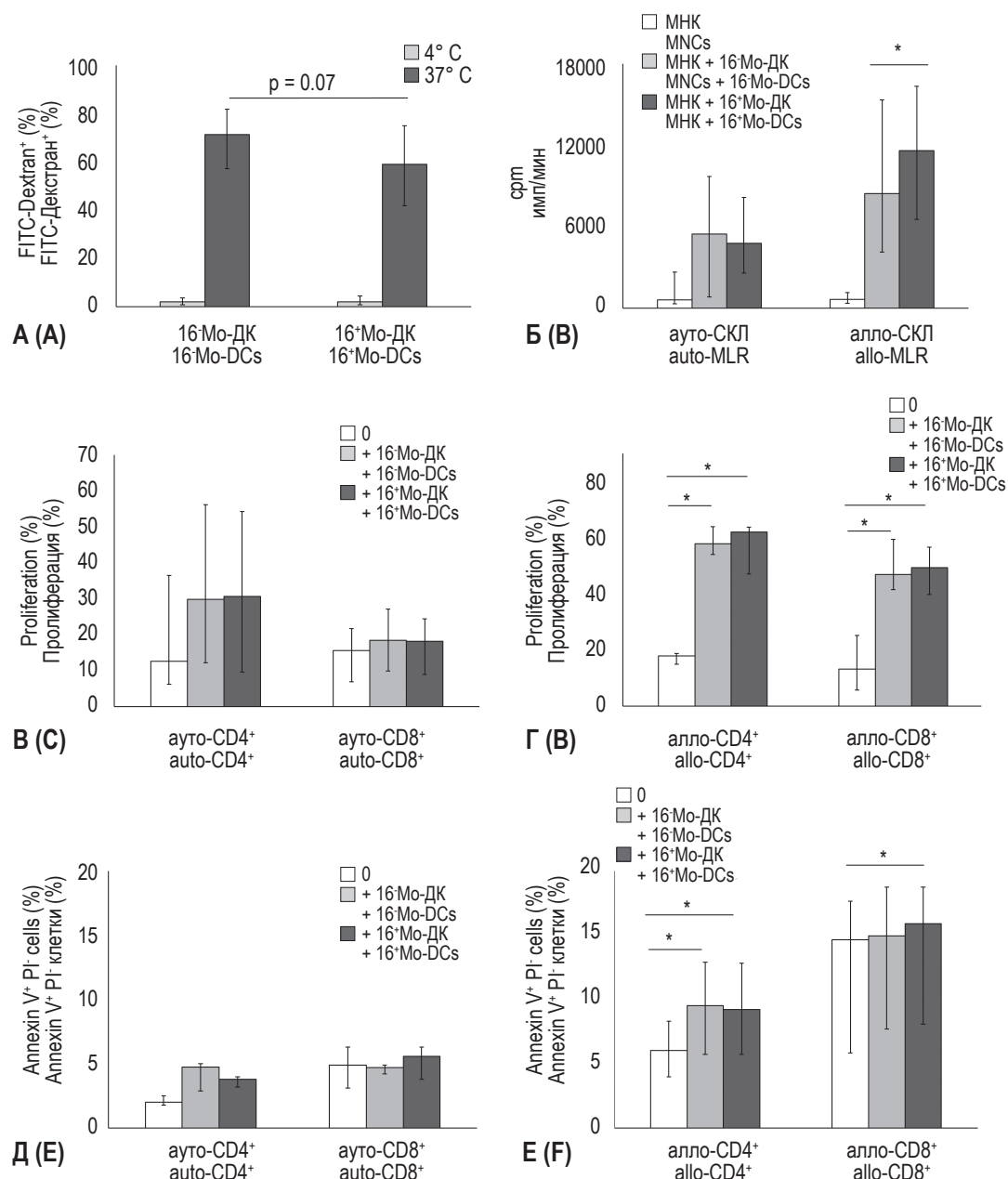
## Результаты

Поскольку одним из функциональных признаков зрелости ДК является их поглотительная активность, нами была проведена оценка способности CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК к эндцитозу. Несмотря на то, что оба типа ДК активно захватывали FITC-меченный декстран (рис. 1А), популяция CD16<sup>+</sup>Мо-ДК отличалась меньшим относительным количеством ДК, содержащих внутриклеточно декстран (p = 0,07). При этом интенсивность флуоресценции внутриклеточного содержания FITC-декстрана в сравниваемых типах ДК была сопоставима (Ме 443 vs 475 ед. фл.).

Одна из ключевых функций ДК в иммунном ответе заключается в их способности презентировать антигены и активировать Т-клетки. Как видно из рисунка 1Б, CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК эффективно стимулировали пролиферативную активность Т-клеток в ауто- и алло-СКЛ. Стимуляторная активность изучаемых типов ДК была сопоставима в ауто-СКЛ, однако CD16<sup>+</sup>Мо-ДК отличались значимо более высокой способностью индуцировать пролиферативный ответ Т-клеток на аллоантигены по сравнению с CD16<sup>-</sup>Мо-ДК (p = 0,037).

Анализ пролиферативного ответа в субпопуляциях лимфоцитов показал, что в культурах ауто-СКЛ CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК с одинаковой интенсивностью стимулировали пролиферацию CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов и практически не индуцировали пролиферации CD8<sup>+</sup>Т-клеток (рис. 1В). Индекс пролиферации CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов составлял 1,08 и 1,09 расч. ед. (Ме) в случае активации CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК соответственно. При этом CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК эффективно (индекс пролиферации > 3,5 расч. ед.) стимулировали пролиферацию аллогенных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов в алло-СКЛ (рис. 1Г).

Наряду со стимулирующим эффектом ДК обладают способностью ограничивать иммунный ответ, одним из механизмов которой является активационно-индуцированный апоптоз Т-клеток при их взаимодействии с ДК [5]. Как видно из рисунка 1Д, Е, стимуляция МНК дендритными клетками сопровождалась возрастанием доли апоптотических CD4<sup>+</sup>Т-клеток в ауто- и алло-СКЛ. Эти изменения были более выражены и статистически значимы в алло-СКЛ (рис. 1Е), тогда как в ауто-СКЛ проявлялись в виде отчет-



**Рисунок 1. Функциональная активность IFN-ДК, генерированных из CD16<sup>+</sup> и CD16<sup>+</sup> моноцитов**

Примечание. В виде медианных (Me) и интерквартильного диапазона значений представлены: А – относительное количество клеток (%) указанных типов IFN-ДК (n = 5), поглотивших в течение 1 ч FITC-меченный декстран при 4 °C (контроль) и 37 °C; Б – пролиферативный ответ (имп/мин) МНК в ауто-СКЛ (n = 12) и алло-СКЛ (n = 20) в отсутствие IFN-ДК (МНК) и присутствии указанных типов IFN-ДК; В, Г – пролиферативный ответ CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов в ауто-СКЛ (В; n = 4) и алло-СКЛ (Г; n = 9), оцениваемый цитофлуориметрически по окраске CFSE в отсутствие IFN-ДК (0) и присутствии указанных типов IFN-ДК; Д, Е – относительное количество (%) апоптотических CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов среди нестимулированных МНК (0), а также в присутствии указанных типов аутологических (Д; n = 5) и аллогенных (Е; n = 11) IFN-ДК. \* p<sub>w</sub> < 0,05 – достоверность различий между показателями.

Figure 1. The functional activity of CD16<sup>+</sup> and CD16<sup>+</sup> monocyte-derived IFN-DCs

Note. The data are presented in the form of median (Me) and interquartile range (IQR) of (A) the relative number (%) of signed subtypes of IFN-DCs (n = 5) captured FITC-conjugated dextran for 1 h at a temperature of 4 °C (control) and 37 °C; (B) the proliferative response of MNCs in auto-MLR (n = 12) and allo-MLR (n = 20) test (cpm) in the absence of IFN-DCs (MNCs) and in the presence of signed subtypes of IFN-DCs; (C, D) the proliferative response of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T lymphocytes in auto-MLR (C; n = 4) and allo-MLR (D; n = 9) evaluated using CFSE dye in the absence of IFN-DCs (0) and in the presence of signed subtypes of IFN-DCs; (E, F) the relative number (%) of apoptotic CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T lymphocytes among non-stimulated MNCs (0) and in the presence of signed subtypes of autologous (E; n = 5) and allogeneic (F; n = 11) IFN-DCs. \* p<sub>w</sub> < 0.05, differences between groups.

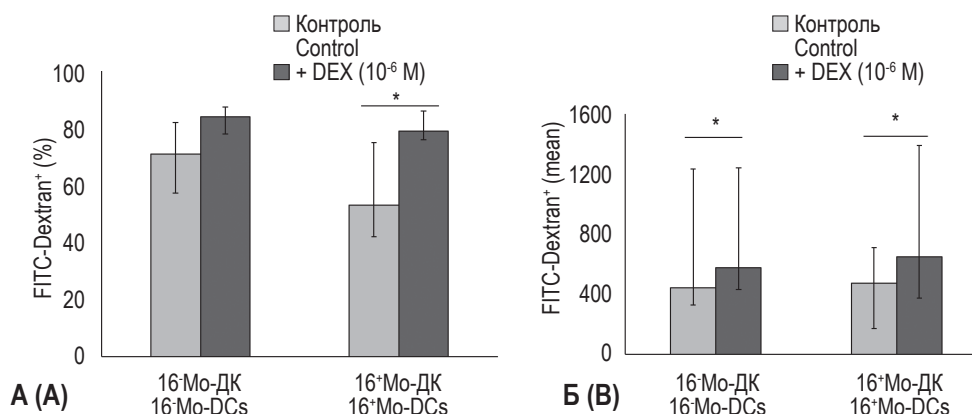


Рисунок 2. Поглощательная активность IFN-ДК, генерированных из CD16<sup>-</sup> и CD16<sup>+</sup> моноцитов

Примечание. Данные представлены в виде медианных (Me) и интерквартильного диапазона значений относительного количества клеток (А) и средней интенсивности флуоресценции (Б) в популяциях CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК, генерированных в стандартных условиях (контр) и в присутствии дексаметазона [+ DEX (10<sup>-6</sup> M)], поглотивших в течение 1 ч FITC-меченный декстран при 37 °С (контроль поглощательной активности ДК при 4 °С не указан). n = 6; \* p<sub>w</sub> < 0,05 – достоверность различий между показателями.

Figure 2. Endocytic activity of CD16<sup>-</sup> and CD16<sup>+</sup> monocytic IFN-DCs

Note. The data are presented in the form of median (Me) and interquartile range (IQR) of the relative cell number (A) and mean fluorescence (B) in CD16<sup>-</sup>Mo-DCs and CD16<sup>+</sup>Mo-DCs generated under standard conditions (control) and in the presence of dexamethasone [+ DEX (10<sup>-6</sup> M)] captured FITC-conjugated dextran for 1 h at a temperature 37 °C (negative control cells at 4 °C not shown). n = 6; \* p<sub>w</sub> < 0.05, differences between groups.

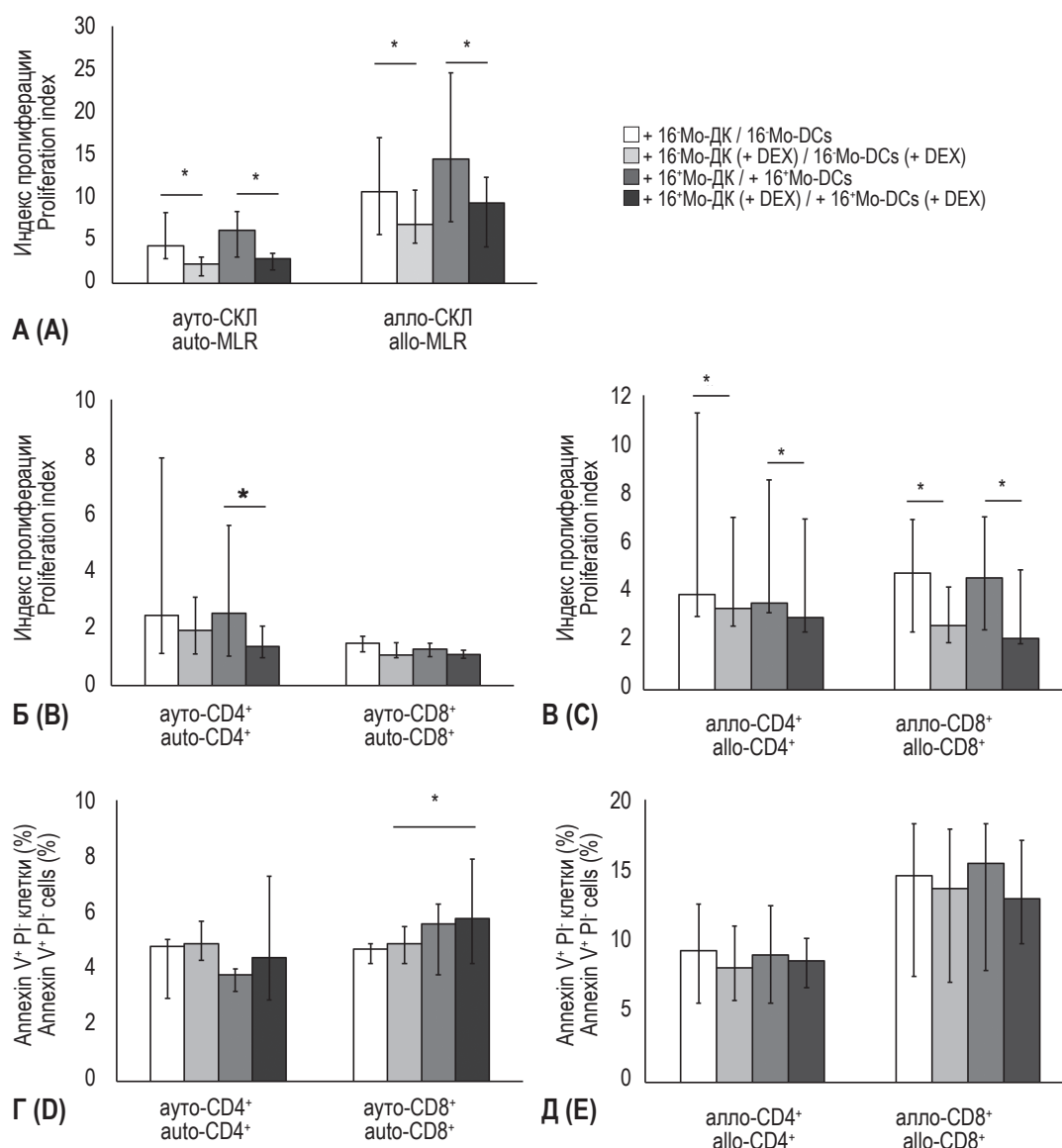
ливого тренда (рис. 1Д; p = 0,07 для обоих типов ДК). Оба типа ДК не индуцировали апоптоз CD8<sup>+</sup>T-клеток в ауто-СКЛ, поскольку не активировали пролиферацию этих клеток (рис. 1 Д). В алло-СКЛ количество апоптотических CD8<sup>+</sup>T-клеток значимо возрастало при сокультивировании с CD16<sup>+</sup>Мо-ДК (p = 0,03) и на уровне тренда – с CD16<sup>-</sup>Мо-ДК (p = 0,09).

Важным фактором в развитии иммунного ответа является способность ДК продуцировать цитокины, во многом определяющих стимуляторный или толерогенный потенциал ДК. CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК были сопоставимы по продукции провоспалительного цитокина TNFα (Me 1027 и 1104 пг/мл, соответственно) и противовоспалительного цитокина IL-10 (Me 108 и 105 пг/мл, соответственно). Отметим, что уровень продукции IL-10 обратно коррелировал с показателями аллостимуляторной активности как CD16<sup>-</sup>Мо-ДК, так и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК (r<sub>s</sub> = -0,780; p = 0,013 и r<sub>s</sub> = -0,703; p = 0,034 соответственно). В то же время значимая обратная корреляционная связь между продукцией TNFα и аллостимуляторной активностью выявлялась только для CD16<sup>-</sup>Мо-ДК (r<sub>s</sub> = -0,695; p = 0,038), а прямая взаимосвязь между уровнем продукции TNFα и апоптоз-индуцирующей активностью ДК против аллогенных CD4<sup>+</sup>T-клеток (r<sub>s</sub> = 0,677; p = 0,022) регистрировалась для CD16<sup>+</sup>Мо-ДК.

Вторая часть исследования была посвящена сравнительному анализу влияния дексаметазона на свойства CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК. До-

бавление дексаметазона в культуры ДК сопровождалось увеличением их способности к эндоцитозу (рис. 2А). Наиболее выраженные изменения были характерны для CD16<sup>+</sup>Мо-ДК, среди которых количество FITC-декстран-позитивных клеток возрастало в среднем на 50% (IQR 15-81%; p = 0,04). CD16<sup>-</sup>Мо-ДК были менее чувствительны к действию дексаметазона, и их способность поглощать декстран возрастала в среднем только на 23% (IQR 2-49%; p = 0,068). Наряду с увеличением доли FITC-декстран-позитивных ДК добавление дексаметазона приводило к увеличению средней интенсивности флуоресценции FITC-меченного декстрана в обоих типах ДК (p = 0,043 и p = 0,043; рис. 2Б). Следует отметить, что если интактные CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК различались по поглощательной способности, то после обработки дексаметазоном указанные типы ДК становились сопоставимыми по поглощательной активности (Me 84 и 79%). Соответственно, влияние дексаметазона на эндоцитозную активность CD16<sup>+</sup>Мо-ДК было значимо выше по сравнению с таковым для CD16<sup>-</sup>Мо-ДК (Me индекса влияния дексаметазона 1,97 vs 1,3 расч. ед.; p = 0,043).

Анализ стимуляторной активности интактных и дексаметазон-модифицированных ДК в радиометрическом тесте (рис. 3А) показал, что дексаметазон подавлял способность обоих типов ДК стимулировать пролиферативный ответ МНК в ауто- и алло-СКЛ (p < 0,05 для всех типов СКЛ). При исследовании эффектов дексаметазона на пролиферацию отдельных субпопуляций

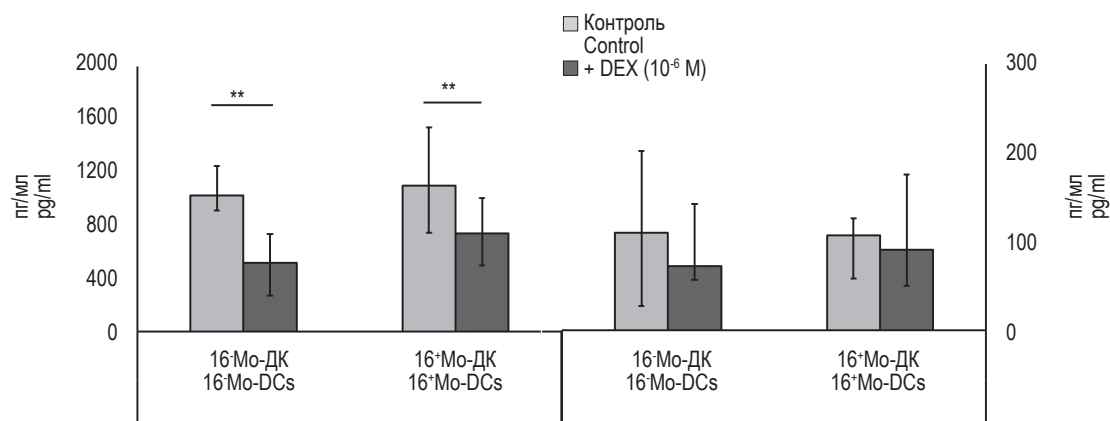


**Рисунок 3. Влияние дексаметазона на функциональную активность IFN-ДК, генерированных из CD16<sup>+</sup> и CD16<sup>+</sup> моноцитов**

**Примечание.** Для популяций CD16<sup>+</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК, генерированных в стандартных условиях и в присутствии дексаметазона (+ DEX), в виде медианных (Me) и интерквартильного диапазона значений представлены данные: А – индексов пролиферации МНК в ауто-СКЛ (n = 12) и алло-СКЛ (n = 20) в присутствии указанных типов IFN-ДК; Б, В – индексов пролиферации CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов в ауто-СКЛ (Б; n = 4) и алло-СКЛ (В; n = 9), оцениваемой цитофлуориметрически по окраске CFSE в присутствии указанных типов IFN-ДК; Г, Д – относительного количества апоптотических CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов в присутствии указанных типов аутологичных (Г; n = 5) и аллогенных (Д; n = 11) IFN-ДК. Индекс пролиферации рассчитывался индивидуально как отношение пролиферативного ответа МНК в присутствии указанных типов ДК к пролиферативному ответу МНК в отсутствие ДК. \* p<sub>w</sub> < 0,05 – достоверность различий между показателями.

Figure 3. The effect of dexamethasone on the functional activity of CD16<sup>+</sup> and CD16<sup>+</sup> monocyte-derived IFN-DCs

Note. For CD16<sup>+</sup>Mo-DCs and CD16<sup>+</sup>Mo-DCs generated under standard conditions and in the presence of dexamethasone (+ DEX), the data are presented in the form of median (Me) and interquartile range (IQR) of (A) the indexes of proliferation of MNCs in auto-MLR (n = 12) and allo-MLR (n = 20) in the presence of signed subtypes of IFN-DCs; (B, C) the indexes of proliferation of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T lymphocytes in auto-MLR (B; n = 4) and allo-MLR (C; n = 9) in the presence of signed subtypes of IFN-DCs; (D, E) the relative number of apoptotic CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T lymphocytes in the presence of signed subtypes of autologous (D; n = 5) and allogeneic (E; n = 11) IFN-DCs. The proliferation index was calculated as the ratio of the proliferative response of MNCs in the presence of DCs to the proliferative response of MNCs in the absence of DCs. \* p<sub>w</sub> < 0.05, differences between groups.



**Рисунок 4.** Влияние дексаметазона на продукцию цитокинов в культурах IFN-ДК, генерированных из CD16<sup>+</sup> и CD16<sup>-</sup> моноцитов

**Примечание.** Данные представлены в виде медианных (Me) и интерквартильного диапазона значений концентрации TNFα (n = 13) и IL-10 (n = 11) в супернатантах цельных культур CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК, генерированных в стандартных условиях (контр) и в присутствии дексаметазона [+ DEX (10<sup>-6</sup> M)]. \*\* p<sub>w</sub> < 0,01 – достоверность различий между показателями.

Figure 4. The effect of dexamethasone on the cytokine production by CD16<sup>-</sup> and CD16<sup>+</sup> monocyte-derived IFN-DCs

Note. The data are presented in the form of median (Me) and interquartile range (IQR) of TNFα (n = 13) and IL-10 (n = 11) concentration in the culture supernatants of CD16<sup>-</sup>Mo-DCs and CD16<sup>+</sup>Mo-DCs generated under standard conditions (control) and in the presence of dexamethasone [+ DEX (10<sup>-6</sup> M)]. \*\* p<sub>w</sub> < 0.01, differences between groups.

Т-клеток было показано, что обработка дексаметазоном CD16<sup>+</sup>Мо-ДК достоверно подавляла их способность стимулировать пролиферацию CD4<sup>+</sup>Т-клеток в ауто-СКЛ (Me супрессии 31% (IQR 5-58%); p = 0,043), тогда как модификация дексаметазоном CD16<sup>-</sup>Мо-ДК значимо не снижала их стимуляторную активность (рис. 3Б). Соответственно, CD16<sup>+</sup>Мо-ДК, генерированные в присутствии дексаметазона, обладали меньшей стимуляторной активностью по сравнению с аналогичными культурами CD16<sup>-</sup>Мо-ДК (Me индекса пролиферации 1,37 vs 1,94 расч. ед.; p = 0,06). При этом как интактные, так и дексаметазон-модифицированные CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК не индуцировали пролиферацию аутологичных CD8<sup>+</sup>Т-клеток (рис. 3Б).

В алло-СКЛ дексаметазон-модифицированные CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК характеризовались умеренным (но статистически значимым) уменьшением стимуляторной активности в отношении CD4<sup>+</sup>Т-клеток и более выраженным снижением способности стимулировать пролиферацию CD8<sup>+</sup>Т-клеток (рис. 3В). Снижение аллостимуляторной активности CD16<sup>-</sup>Мо-ДК (p = 0,008) и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК (p = 0,008) в последнем случае составляло, соответственно, 26 и 32%.

Обработка CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК дексаметазоном не влияла на способность ДК индуцировать апоптоз CD4<sup>+</sup>Т-клеток в ауто-СКЛ (рис. 3Г). В то же время отмечалась тенденция к усилению проапоптогенной активности CD16<sup>-</sup>Мо-ДК (p = 0,1) и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК (p = 0,08) в от-

ношении аутологичных CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов. При этом относительное количество апоптотических CD8<sup>+</sup>Т-клеток в присутствии CD16<sup>+</sup>Мо-ДК было выше, чем в присутствии CD16<sup>-</sup>Мо-ДК (Me 5,8 vs 4,9%; p = 0,05). В культурах алло-СКЛ различий в проапоптогенной активности интактных и дексаметазон-модифицированных CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК против аллогенных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>Т-клеток не наблюдалось (рис. 3Д).

Сравнение эффекта дексаметазона на продукцию цитокинов в исследуемых субпопуляциях ДК выявило снижение TNFα в культурах CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК в 2 (p = 0,007) и 1,5 (p = 0,009) раза, соответственно (рис. 4), при отсутствии значимого эффекта на продукцию IL-10. При этом, учитывая, что более чем в половине случаев (6/11, 55%) дексаметазон усиливал продукцию IL-10, соотношение TNFα/IL-10 в культурах CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК снижалось с 16,1 до 6,0 расч.ед (p = 0,013) и с 8,9 до 5,0 расч. ед. (p = 0,02), соответственно, что в целом указывало на смещение баланса цитокинов в сторону противовоспалительного ответа.

Корреляционный анализ выявил наличие отрицательной взаимосвязи между ингибирующим эффектом дексаметазона на продукцию TNFα в культурах CD16<sup>+</sup>Мо-ДК и индексом стимулирующего влияния дексаметазона на апоптоз-индуцирующую активность CD16<sup>+</sup>Мо-ДК против аллогенных CD4<sup>+</sup>Т-клеток (r<sub>s</sub> = -0,593; p = 0,05). Полученные данные указывают на то, что дексаметазон-индуцированное снижение продукции



TNF $\alpha$  под действием дексаметазона ослабляет проапоптогенную активность ДК.

Для продукции IL-10 корреляционных взаимосвязей не было выявлено.

## Обсуждение

Настоящее исследование продемонстрировало, что IFN $\alpha$ -индуцированные ДК могут дифференцироваться из циркулирующих CD14<sup>+</sup> моноцитов, как обогащенных, так и истощенных по CD16<sup>+</sup> клеткам. Однако популяционный состав моноцитов влияет на свойства генерируемых из них ДК, и присутствие в пуле моноцитов CD16<sup>+</sup> клеток способствует дифференцировке IFN-ДК с более низкой эндоцитозной способностью и более высокой стимуляторной активностью, что указывает на их степень зрелости. В то же время как CD16<sup>-</sup>, так и CD16<sup>+</sup> моноциты являются мишенями для ингибирующего влияния дексаметазона, и генерируемые в дальнейшем IFN-ДК характеризуются свойствами толерогенных клеток. При этом ДК, полученные из общего пула моноцитов без деплеции CD16<sup>+</sup> клеток, демонстрируют большую чувствительность к иммунорегуляторному действию дексаметазона.

Ранее нами было показано, что CD16<sup>+</sup>Мо-ДК отличаются от CD16<sup>-</sup>Мо-ДК более зрелым фенотипом [2]. Согласно данным литературы, классические моноциты выступают в роли предшественников промежуточных и неклассических моноцитов, экспрессирующих CD16-антиген [10, 19]. Кроме того, для неклассических CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> моноцитов характерна экспрессия проапоптотических и антипролиферативных генов, ассоциированных с высокодифференцированным статусом клеток, более высокая экспрессия антигенов МНС II класса и костимуляторных молекул, низкая фагоцитарная и повышенная аллостимуляторная активности [4, 26]. В этом аспекте использование всего пула моноцитов, содержащих в том числе CD16<sup>+</sup> клетки с большей степенью зрелости, позволяет получить IFN-ДК с более выраженными иммуногенными свойствами, характерными для более зрелых ДК.

Проведенное нами исследование позволило оценить, какие популяции Т-лимфоцитов отвечают на антигены, представленные на CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК. Продemonстрировано, что оба типа ДК в ауто-СКЛ стимулировали пролиферацию аутологичных Т-клеток преимущественно за счет активации CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов, тогда как пролиферативный ответ аллогенных Т-клеток был связан с активацией CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>Т-клеток.

Способность ДК индуцировать апоптоз Т-клеток рассматривается в качестве механизма ограничения иммунного ответа и предупрежде-

ния о чрезмерной активации [14]. Действительно, в отличие от CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов, CD8<sup>+</sup>Т-лимфоциты почти не отвечали на аутоантигены, представленные на CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК. Поэтому уровень апоптоза в них не увеличивался по сравнению с интактными Т-клетками. Несмотря на то, что CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК эффективно стимулировали в алло-СКЛ пролиферацию CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>Т-клеток, апоптоз в обеих популяциях статистически значимо возрастал только при сокультивировании с CD16<sup>+</sup>Мо-ДК. При этом для CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов была характерна большая по сравнению с CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитами чувствительность к апоптозу, индуцированному CD16<sup>+</sup>Мо-ДК. CD16<sup>-</sup>Мо-ДК активировали апоптоз только в CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитах. В данном случае высокую чувствительность CD4<sup>+</sup>Т-клеток к апоптозу можно объяснить тем фактом, что молекула CD4 является не только корецептором в TCR/CD3-зависимой активации Т-клеток, но и выступает в роли негативного регулятора, участвуя в проведении апоптотического сигнала, опосредованного через Fas/FasL- (при участии протеинкиназы С) и TNF $\alpha$ /TNF-R-зависимый механизмы [3]. В то же время более широкий спектр цитотоксического действия CD16<sup>+</sup>Мо-ДК по сравнению с CD16<sup>-</sup>Мо-ДК, по-видимому, связан со свойствами исходной популяции моноцитов-предшественников. Для CD16<sup>+</sup> моноцитов показана более высокая экспрессия проапоптогенных молекул [26] и более выраженная цитотоксическая активность [23] по сравнению с классическими CD16<sup>-</sup> моноцитами.

Согласно полученным нами данным, CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК не различались по продукции TNF $\alpha$  и IL-10. Эти результаты частично расходятся с данными литературы, поскольку принято считать, что основными продуцентами TNF $\alpha$  среди пула моноцитов являются неклассические моноциты и генерированные из них ДК [25]. По-видимому, отсутствие различий в продукции TNF $\alpha$  между CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК связано с особенностями генерации ДК в присутствии IFN $\alpha$  и его стимулирующим влиянием на гены провоспалительных молекул [13], тогда как предыдущие работы были проведены на IL-4-индуцированных ДК [25].

В то же время именно для CD16<sup>+</sup>Мо-ДК нами выявлена обратная корреляционная зависимость между продукцией TNF $\alpha$  и индукцией апоптоза в аллогенных CD4<sup>+</sup>Т-клетках. TNF $\alpha$  является плеiotропным цитокином, который поддерживает активацию и пролиферацию наивных и эффекторных Т-клеток, а также индуцирует их апоптоз [3, 16]. TNF $\alpha$  может напрямую вызывать гибель Т-клеток или действовать опосредованно, повышая чувствительность Т-клеток

к FasL-зависимому апоптозу [11]. Причем именно CD4<sup>+</sup>T-клетки, но не CD8<sup>+</sup>T-клетки, чувствительны к FasL-медируемой цитотоксической активности IFN-ДК [1]. Полученные нами данные расширяют представления о цитотоксической активности ДК, генерированных из CD16<sup>+</sup> моноцитов, а также подтверждают значимость TNF $\alpha$  в реализации данной функции ДК.

По данным литературы, для IFN-ДК характерна высокая продукция IL-10 [9]. Исходя из проведенного нами корреляционного анализа, IL-10 участвует в ограничении аллостимуляторной активности CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК. Этот эффект может быть связан с тем, что IL-10 по аутокринному механизму снижает на IFN-ДК экспрессию молекул, ассоциированных с антигенной презентацией — МНС II класса, DC-LAMP/CD208 — приводя в конечном итоге к снижению аллостимуляторной активности ДК в отношении CD4<sup>+</sup>T-клеток [9].

Важной частью нашего исследования было выяснение причастности субпопуляций моноцитов к толерогенному влиянию глюкокортикоидов на IFN-ДК. Полученные в настоящем исследовании результаты продемонстрировали, что CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК подвержены супрессорному эффекту дексаметазона, который проявляется увеличением поглотительной активности, характерной для незрелых ДК, снижением способности стимулировать пролиферацию аутологических и аллогенных Т-клеток и подавлением продукции TNF $\alpha$ . При этом для CD16<sup>+</sup>Мо-ДК было характерно более выраженное увеличение эндоцитозной активности и снижение способности ДК стимулировать пролиферацию CD4<sup>+</sup>T-клеток в ауто-СКЛ. Кроме того, обработка дексаметазоном CD16<sup>+</sup>Мо-ДК сопровождалась увеличением проапоптогенной активности ДК против аутологических CD8<sup>+</sup>T-лимфоцитов. Эти результаты указывают на то, что CD16<sup>+</sup> моноциты участвуют в формировании толерогенных свойств IFN-ДК. Зачастую проявление толерогенной активности ассоциируется с менее зрелым статусом ДК [15]. Полученные данные согласуются с установленным нами ранее фактом ингибирующего действия дексаметазона на созревание CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК, более выраженного в отношении CD16<sup>+</sup>Мо-ДК [2].

Как известно, толерогенное действие ДК на Т-лимфоциты реализуется через индукцию анергии и апоптоза Т-клеток, а также путем подавления функциональной активности Т-клеток иммуносупрессивными цитокинами и генерации регуляторных Т-клеток (Treg) [18, 24]. Обращает на себя внимание, что при добавлении дексаметазона снижение способности CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК стимулировать пролиферацию аллогенных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>T-лимфоцитов не сопровождалось усилением апоптоза Т-клеток. По-видимому, толерогенное действие дексаметазон-обработанных ДК опосредуется через индукцию анергии и блокирование клеточного цикла Т-лимфоцитов, но не вызывает гибель последних. Действительно, учитывая возможное участие TNF $\alpha$  в реализации цитотоксического эффекта ДК против аллогенных CD4<sup>+</sup>T-клеток и снижение продукции анализируемого медиатора в ответ на обработку дексаметазоном, механизм стимуляции апоптоза Т-клеток не является ключевым в реализации регуляторной функции толерогенных IFN-ДК.

Характерно, что в ответ на добавление дексаметазона CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК не усиливали продукцию IL-10. Несмотря на то, что в литературе есть данные о стимулирующем влиянии дексаметазона на продукцию IL-10 дендритными клетками [8, 20, 21], полученные нами результаты могут отражать особенности цитокин-секреторной активности IFN-ДК. Кроме того, снижение соотношения TNF $\alpha$ /IL-10 в культурах CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК указывает на смещение баланса в сторону Th2/противовоспалительной активности.

В целом проведенное нами исследование свидетельствует о том, что выявленные различия в свойствах IFN $\alpha$ -индуцированных ДК, генерируемых из общего пула моноцитов и моноцитов с деплецией CD16<sup>+</sup> клеток, могут иметь важное значение для объяснения особенностей функциональной активности ДК моноцитарного происхождения при различных патологических состояниях, ассоциированных с изменением соотношения классических, промежуточных и неклассических моноцитов.

## Список литературы / References

1. Тыринова Т.В., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Сахно Л.В., Останин А.А., Черных Е.Р. Характеристика сигнальных путей, опосредующих цитотоксический эффект дендритных клеток против активированных Т-лимфоцитов и NK-клеток // Медицинская иммунология, 2012. Т. 14, № 1-2. С. 43-50. [Tyrinova T.V., Leplina O.Yu., Tikhonova M.A., Sakhno L.V., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Characteristics of signaling pathways mediating a cytotoxic effect of dendritic cells upon activated T lymphocytes and NK cells. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, Vol. 14, no. 1-2, pp. 43-50. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2012-1-2-43-50.

2. Черных Е.Р., Тыринова Т.В., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Курочкина Ю.Д., Олейник Е.А., Сахно Л.В., Останин А.А. Фенотип и функции дендритных клеток человека, генерированных из субпопуляций моноцитов CD14<sup>+</sup>, оппозитных по экспрессии CD16 // Бюллетень сибирской медицины, 2019. Т. 18, № 1. С. 266-276. [Chernykh E.R., Tyrinova T.V., Leplina O.Yu., Tikhonova M.A., Kurochkina Yu.D., Oleynik E.A., Sakhno L.V., Ostanin A.A. Phenotype and functions of human dendritic cells derived from CD14<sup>+</sup> monocyte subsets opposed to CD16 expression. *Byulleten sibirskoy meditsiny* = *Bulletin of Siberian Medicine*, 2019, Vol. 18, no. 1, pp. 266-276. (In Russ.)]
3. Algeciras A., Dockrell D.H., Lynch D.H., Paya C.V. CD4 regulates susceptibility to Fas ligand- and tumor necrosis factor-mediated apoptosis. *J. Exp. Med.*, 1998, Vol. 187, no. 5, pp. 711-720.
4. Ancuta P., Liu K.-Y., Misra V., Wacleche V., Gosselin A., Zhou X., Gabuzda D. Transcriptional profiling reveals developmental relationship and distinct biological functions of CD16<sup>+</sup> and CD16<sup>-</sup> monocyte subsets. *BMC Genomics*, 2009, Vol. 10, 403. doi: 10.1186/1471-2164-10-403.
5. Bakdash G., Sittig S.P., van Dijk T., Figdor C.G., de Vries I.J. The nature of activatory and tolerogenic dendritic cell-derived signal II. *Front. Immunol.*, 2013, Vol. 4, 53. doi: 10.3389/fimmu.2013.00053.
6. Boyette L.B., Macedo C., Hadi K., Elinoff B.D., Walters J.T., Ramaswami B., Chalasani G., Taboas J.M., Lakkis F.G., Metes D.M. Phenotype, function, and differentiation potential of human monocyte subsets. *PLoS ONE*, 2017, Vol. 12, no. 4, e0176460. doi:10.1371/journal.pone.0176460.
7. Cain D., Cidlowski J. Immune regulation by glucocorticoids. *Nat. Rev. Immunol.*, 2017, Vol. 17, no. 4, pp. 233-247.
8. Canning M.O., Grotenhuis K., de Wit H.J., Drexhage H.A. Opposing effects of dehydroepiandrosterone and dexamethasone on the generation of monocyte-derived dendritic cells. *Eur. J. Endocrinol.*, 2000, Vol. 143, no. 5, pp. 687-695.
9. Carbonneil C., Saidi H., Donkova-Petrini V., Weiss L. Dendritic cells generated in the presence of interferon- $\alpha$  stimulate allogeneic CD4<sup>+</sup> T-cell proliferation: modulation by autocrine IL-10, enhanced T-cell apoptosis and T regulatory type 1 cells. *Int. Immunol.*, 2004, Vol. 16, no. 7, pp. 1037-1052.
10. Coillard A., Segura E. *In vivo* differentiation of human monocytes. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 1907. doi:10.3389/fimmu.2019.01907.
11. Elzey B.D., Griffith T.S., Herndon J.M., Barreiro R., Tschopp J., Ferguson T.A. Regulation of Fas ligand-induced apoptosis by TNF. *J. Immunol.*, 2001, Vol. 167, no. 6, pp. 3049-3056.
12. Feng A.-L., Zhu J.-K., Sun J.-T., Yang M.X., Neckenig M.R., Wang X.W., Shao Q.Q., Song B.F., Yang Q.F., Kong B.H., Qu X. CD16<sup>+</sup> monocytes in breast cancer patients: expanded by monocyte chemoattractant protein-1 and may be useful for early diagnosis. *Clin. Exp. Immunol.*, 2011, Vol. 164, no. 1, pp. 57-65.
13. Gessani S., Conti L., del Cornò M., Belardelli F. Type I interferons as regulators of human antigen presenting cell functions. *Toxins (Basel)*, 2014, Vol. 6, no. 6, pp. 1696-1723.
14. Hasegawa H., Matsumoto T. Mechanisms of tolerance induction by dendritic cells *in vivo*. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 350. doi:10.3389/fimmu.2018.00350.
15. Lutz M.B., Schuler G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol.*, 2002, Vol. 23, no. 9, pp. 445-449.
16. Mehta A.K., Gracias D.T., Croft M. TNF activity and T cells. *Cytokine*, 2018, Vol. 101, pp. 14-18.
17. Mildner A.A., Yona S., Jing S. Close encounter of the third kind: monocyte-derived cells. *Adv. Immunol.*, 2013, Vol. 120, pp. 69-103.
18. Naranjo-Gómez M., Raïch-Regué D., Oñate C., Grau-López L., Ramo-Tello C., Pujol-Borrell R., Martínez-Cáceres E., Borràs F.E. Comparative study of clinical grade human tolerogenic dendritic cells. *J. Transl. Med.*, 2011, Vol. 9, no. 1, 89. doi: 10.1186/1479-5876-9-89.
19. Patel A.A., Zhang Y., Fullerton J.N., Boelen L., Rongvaux A., Maini A.A., Bigley V., Flavell R.A., Gilroy D.W., Asquith B., Macallan D., Yona S. The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. *J. Exp. Med.*, 2017, Vol. 214, no. 7, pp. 1913-1923.
20. Rea D., van Kooten C., van Meijgaarden K.E., Melief C.J.M., Offringa R. Glucocorticoids transform CD40-triggering of dendritic cells into an alternative activation pathway resulting in antigen presenting cells that secrete IL-10. *Blood*, 2000, Vol. 95, no. 10, pp. 3162-3167.
21. Rönnblom L., Eloranta M.L. The interferon signature in autoimmune diseases. *Curr. Opin. Rheumatol.*, 2013, Vol. 25, no. 2, pp. 248-253.
22. Segura E., Amigorena S. Inflammatory dendritic cells in mice and humans. *Trends Immunol.*, 2013, Vol. 3, no. 9, pp. 440-445.
23. Stec M., Mytar B., Weglarczyk K., Ruggiero I., Zembala M. Characterization of monocyte subpopulations (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> and CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>) generated from cord blood haematopoietic progenitor CD34<sup>+</sup>. *Blood*, 2008, Vol. 112, no. 11, 3551. doi:10.1182/blood.V112.11.3551.3551.
24. Unger W.W.J., Laban S., Kleijwegt F.S., van der Slik A.R., Roep B.O. Induction of Treg by monocyte-derived DC modulated by vitamin D 3 or dexamethasone: Differential role for PD-L1. *Eur. J. Immunol.*, 2009, Vol. 39, no. 11, pp. 3147-3159.



25. Wacleche W.S., Cattin A., Goulet J.-Ph., Gauchat D., Gosselin A., Cleret-Buhot A., Zhang Y., Tremblay C.L., Routy J.P., Ancuta P. CD16<sup>+</sup> monocytes give rise to CD103<sup>+</sup>RALDH2<sup>+</sup>TCF4<sup>+</sup> dendritic cells with unique transcriptional and immunological features. *Blood Adv.*, 2018, Vol. 2, no. 21, pp. 2862-2878.

26. Wong K.L., Tai J.J.-Y., Wong W.-C., Han H., Sem X., Yeap W.H., Kourilsky P., Wong S.C. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood*, 2011, Vol. 118, pp. e16-e31.

---

**Авторы:**

**Тыринова Т.В.** — к.б.н., научный сотрудник лаборатории клеточной иммуноterapiи ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»; старший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий иммуноterapiи Институт медицины и психологии ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», г. Новосибирск, Россия

**Леплина О.Ю.** — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммуноterapiи ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Тихонова М.А.** — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммуноterapiи ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Сахно Л.В.** — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммуноterapiи ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Максимова А.А.** — аспирант 3 года лаборатории клеточной иммуноterapiи ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Останин А.А.** — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории клеточной иммуноterapiи ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Черных Е.Р.** — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, заведующая лабораторией клеточной иммуноterapiи ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

---

**Authors:**

**Tyrinova T.V.**, PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology; Senior Research Associate, Laboratory of Cell Technologies of Immunotherapy, Institute of Medicine and Psychology, Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russian Federation

**Leplina O. Yu.**, PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Tikhonova M.A.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Sakhno L.V.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Maximova A.A.**, Postgraduate Student, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Ostanin A.A.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Main Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Chernykh E.R.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

---

Поступила 07.01.2020  
Принята к печати 10.01.2020

---

Received 07.01.2020  
Accepted 10.01.2020