

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ IFN α - И IL-4-ИНДУЦИРОВАННЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА: СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Леплина О.Ю.¹, Тихонова М.А.¹, Тыринова Т.В.¹,
Алямкина Е.А.², Богачев С.С.², Останин А.А.¹,
Черных Е.Р.¹

¹ ФГБУ «Научно-исследовательский институт клинической иммунологии» СО РАМН, г. Новосибирск, Россия

² ФГБУН «Институт цитологии и генетики» СО РАН, г. Новосибирск, Россия

Резюме. В работе проведена сравнительная оценка аллостимуляторной, Th1-/Th2-стимулирующей и толерогенной активности дендритных клеток здоровых доноров (n = 52), генерированных *in vitro* в присутствии IFN α (IFN-ДК) и IL-4 (IL-4-ДК). Установлено, что IL-4-ДК и IFN-ДК не различаются между собой по ключевым функциональным характеристикам (способности стимулировать пролиферацию Т-клеток на аллоантигенах, индуцировать генерацию Treg в СКЛ и способности активировать Т-клетки к продукции Th1/провоспалительных (IFN γ , IL-2, IL-1 β , TNF α , IL-12, IL-17) и Th2/противовоспалительных цитокинов (IL-4, IL-6, IL-10, IL-13), ростовых факторов (G-CSF, GM-CSF, IL-7) и хемокинов (IL-8, MIP-1 β). Тем не менее, IFN-ДК оказывают более выраженный стимулирующий эффект на Th1- и Th2-клетки, что проявляется достоверно более высоким уровнем продукции IFN γ , IL-5 и MIP-1 β , а также обладают более выраженной Th1-стимуляторной и умеренной Th2-стимуляторной активностью (которая отсутствует у IL-4-ДК). Полученные данные обосновывают целесообразность использования IFN-ДК в качестве клеточной основы при создании лечебных вакцин для индукции/усиления иммунного ответа.

Ключевые слова: дендритные клетки, аллостимуляторная активность, Th1-/Th2-цитокины, регуляторные Т-клетки

Адрес для переписки:

Леплина Ольга Юрьевна
д.м.н., ведущий научный сотрудник ФГБУ «НИИ
клинической иммунологии» СО РАМН
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская,
14.

Тел.: 8 (383) 236-03-29.

E-mail: ct_lab@mail.ru

Авторы:

Леплина О.Ю. — д.м.н., ведущий научный
сотрудник ФГБУ «НИИ клинической
иммунологии» СО РАМН, г. Новосибирск, Россия

Тихонова М.А. — к.б.н., старший научный
сотрудник, ФГБУ «НИИ клинической
иммунологии» СО РАМН, г. Новосибирск, Россия

Тыринова Т.В. — к.б.н., научный сотрудник, ФГБУ
«НИИ клинической иммунологии» СО РАМН,
г. Новосибирск, Россия

Алямкина Е.А. — к.б.н., научный сотрудник,
ФГБУН «Институт цитологии и генетики»
СО РАН, г. Новосибирск, Россия

Богачев С.С. — д.б.н., заведующий лабораторией
ФГБУН «Институт цитологии и генетики»
СО РАН, г. Новосибирск, Россия

Останин А.А. — д.м.н., профессор, главный
научный сотрудник ФГБУ «НИИ клинической
иммунологии» СО РАМН, г. Новосибирск, Россия

Черных Е.Р. — д.м.н., профессор, член-
корреспондент РАМН, заведующая лабораторией
ФГБУ «НИИ клинической иммунологии»
СО РАМН, г. Новосибирск, Россия

Поступила 07.05.2013

Отправлена на доработку 13.05.2013

Принята к печати 14.05.2013

FUNCTIONAL ACTIVITY OF IFN α - AND IL-4-INDUCED HUMAN DENDRITIC CELLS: A COMPARATIVE STUDY

Leplina O.Yu.^a, Tikhonova M.A.^a, Tyrinova T.V.^a,
Alyamkina E.A.^b, Bogachev S.S.^b, Ostanin A.A.^a,
Chernykh E.R.^a

^a Research Institute of Clinical Immunology, Russian Academy of Medical Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, Russian Federation

^b Institute of Cytology and Genetics, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. We have performed a comparative analysis of allostimulatory, Th1/Th2-stimulatory and tolerogenic activities of dendritic cells (DCs) derived from healthy donors (n = 52). The DCs were generated *in vitro* with IFN- α (IFN-DCs) or IL-4 (IL-4-DCs). It was shown that IL-4-DCs and IFN-DCs did not differ in their key functional characteristics, i.e., in their ability to stimulate proliferation of T-cells in response to alloantigens, and to induce generation of T-regulatory cells in mixed leukocyte culture. IFN- and IL-4-induced DCs possess similar ability of boosting T cells to produce Th1/proinflammatory (IFN γ , IL-2, IL-1 β , TNF α , IL-12, IL-17) and Th2/antiinflammatory cytokines (IL-4, IL-6, IL-10, IL-13), growth factors (G-CSF, GM-CSF, IL-7) and chemokines (IL-8, MIP-1 β). Nevertheless, IFN-DCs have more pronounced stimulatory effect upon Th1 and Th2 cells, thus manifesting as a significantly higher IFN γ , IL-5 and MIP-1 β production. IFN-DCs were characterized by more prominent ability to activate Th1-cells, and by moderate Th2-stimulatory activity, which is absent in IL-4-DCs. These data strongly suggest that IFN-DCs may present a quite promising cellular tool for development of therapeutic vaccines aiming to induce/enhance the immune response. (*Med. Immunol.*, 2014, vol. 16, N 1, pp 43-52)

Keywords: dendritic cells, allostimulatory activity, Th1-/Th2-cytokines, regulatory T-cells

Address for correspondence:

Leplina Olga Yu.
PhD, MD, Senior Researcher Fellow,
Institute of Clinical Immunology, Russian
Academy of Medical Sciences, Siberian
Branch Institute of Clinical Immunology,
Russian Academy of Medical Sciences,
Siberian Branch,
630099, Russian Federation, Novosibirsk,
Yadrintsevskaya str., 14.
Phone: 7 (383) 236-03-29.
E-mail: ct_lab@mail.ru

Authors:

Leplina O.Yu., PhD, MD (Medicine), Senior Researcher Fellow,
Research Institute of Clinical Immunology, Russian Academy
of Medical Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, Russian
Federation
Tikhonova M.A., PhD (Biology), Senior Researcher, Research
Institute of Clinical Immunology, Russian Academy of Medical
Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, Russian Federation
Tyrinova T.V., PhD (Biology), Research Associate, Research
Institute of Clinical Immunology, Russian Academy of Medical
Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, Russian Federation
Alyamkina E.A., PhD (Biology), Research Associate, Institute of
Cytology and Genetics, Russian Academy of Sciences, Siberian
Branch, Novosibirsk, Russian Federation
Bogachev S.S., PhD, MD (Biology), Head of the Laboratory,
Institute of Cytology and Genetics, Russian Academy of Sciences,
Siberian Branch, Novosibirsk, Russian Federation
Ostanin A.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research
Associate, Research Institute of Clinical Immunology, Russian
Academy of Medical Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk,
Russian Federation
Chernykh E.R., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding
member, Russian Academy of Medical Sciences, Head of
Laboratory, Research Institute of Clinical Immunology, Russian
Academy of Medical Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk,
Russian Federation

Received 07.05.2013

Revision received 13.05.2013

Accepted 14.05.2013

Введение

Дендритные клетки (ДК) относятся к классу антигенпрезентирующих клеток, обладающих высокой способностью представлять различные антигены (антигенные детерминанты патогенных возбудителей, опухолевые антигены, аллоантигены) Т-клеткам и индуцировать адаптивный антигенспецифический иммунный ответ [6]. Предшественники ДК в организме локализованы в костном мозге. Кроме того, существенным источником ДК являются циркулирующие моноциты, способные дифференцироваться в ДК под влиянием различных цитокинов. Так, в условиях *in vitro* ДК эффективно генерируются из моноцитов крови при добавлении в культуральную среду GM-CSF в комбинации с IL-4 (IL-4-ДК) [22] или интерфероном- α (IFN-ДК) [12, 18]. Указанные типы ДК различаются по срокам генерации и фенотипическим характеристикам. В частности, IFN-ДК представлены преимущественно «частично зрелыми» (semi-mature) клетками, которые по сравнению с IL-4-ДК отличаются более высоким цитотоксическим потенциалом, за счет экспрессии молекул B7-H1 и TRAIL [3, 13]. Кроме того, IFN-ДК характеризуются более высокой продукцией Th1/провоспалительных (IFN γ , IL-2, IL-17, IL-1 β) и Th2/противовоспалительных цитокинов (IL-10, IL-5) [3], а также низким уровнем секреции IL-12 и высоким – IFN α , IL-6, IL-1 β , IL-18, IL-4, IL-10, IL-17 [12, 19, 21]. Очевидно, указанные типы ДК (IFN-ДК и IL-4-ДК) могут различаться между собой и по способности активировать Т-клеточный иммунный ответ по Th1-, или Th2-типу, что является важной регуляторной функцией ДК [16, 10].

Известно, что IL-4-ДК способны индуцировать Th1-ответ, однако отличаются относительно низкой миграционной активностью. В то же время IFN-ДК обладают более высоким миграционным потенциалом [17] и способны активировать не только Th1-, но и Th2-ответ, что свидетельствует об их более широком функциональном репертуаре [19, 20].

ДК хорошо известны как стимуляторы иммунного ответа, но не менее важна их роль в поддержании иммунного гомеостаза и предотвращении аутоиммунных реакций. Развитие периферической толерантности дендритными клетками осуществляется путем индукции анергии Т-клеток, генерации регуляторных Т-клеток (Treg) и делеции аутореактивных клонов. Толерогенную активность ДК, как правило, связывают с «незрелостью» ДК, низкой экспрессией ко-стимуляторных молекул и повышенной секрецией IL-10 [8]. Кроме того, толерогенные ДК могут опосредовать свои эффекты через другие

механизмы – секрецию IP-10, усиление апоптоза Т-клеток и генерацию Treg [14].

Таким образом, функциональная характеристика IL-4-ДК и IFN-ДК представляет большой интерес в плане обоснования выбора наиболее оптимального типа ДК для клинической практики. Однако сравнительная оценка IL-4-ДК и IFN-ДК в отношении определения их аллостимуляторной и толерогенной активности, а также способности активировать Th1- и Th2-клетки, ранее не проводилась, что и определило **цель настоящего исследования**.

Материалы и методы

В исследование были включены 52 практически здоровых донора крови, представленных лицами обоего пола (25 мужчин и 27 женщин) в возрасте от 20 до 58 лет (средний возраст 37 ± 2 лет). Мононуклеарные клетки (МНК) из гепаринизированной венозной крови получали центрифугированием в градиенте плотности фиколла-верографина. IFN-ДК генерировали путем культивирования прилипающей фракции МНК при 37 °C в CO₂-инкубаторе во флаконах для культивирования (BD Biosciences Falcon, UK) в течение 3 сут. в среде RPMI-1640 (Sigma, США), дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 5 мМ HEPES-буфера, 100 мкг/мл гентамицина и 5% сыворотки плодов коровы (БиолоТ, Санкт-Петербург), в присутствии GM-CSF (Sigma-Aldrich, 40 нг/мл) и IFN α (Роферон-А, Roche, Швейцария, 1000 Ед/мл) с последующим дозреванием с липополисахаридом (LPS *E. coli* 0111:B4, Sigma-Aldrich, 10 мкг/мл) в течение 24 ч.

Для генерации IL-4-ДК прилипающую фракцию МНК инкубировали в полной культуральной среде в присутствии GM-CSF (Sigma-Aldrich, 40 нг/мл), IL-4 (Sigma-Aldrich, 40 нг/мл) и 2,5% сыворотки плодов коровы (БиолоТ, Санкт-Петербург) в течение 5 сут. с последующим дозреванием с LPS (*E. coli* 0111:B4, Sigma-Aldrich, 10 мкг/мл) в течение 48 ч.

Аллостимуляторную активность ДК оценивали в реакции смешанной культуры лимфоцитов (СКЛ). В качестве отвечающих клеток использовали МНК доноров ($0,1 \times 10^6$ /лунку), которые культивировали в 96-луночных круглодонных планшетах для иммунологических исследований (Медполимер, Санкт-Петербург) в среде RPMI-1640 в присутствии 10% инактивированной сыворотки крови АВ(IV) группы при 37 °C в CO₂-инкубаторе. Стимуляторами служили аллогенные дендритные клетки в соотношении МНК: ДК = 10:1. Пролиферативный ответ оценивался на 5 сут. радиометрически по включению ³H-тимидина (1 мкКю/лунку), вносимого за 18 ч до окончания культивирования.

Способность IFN-ДК и IL-4-ДК активировать Th1- и Th2-ответ оценивали в СКЛ (как описано выше). В качестве отвечающих клеток использовали МНК доноров ($0,1 \times 10^6$ МНК/лунку), истощенных от фракции адгезивных клеток. Культуральные супернатанты СКЛ собирали на 5 сут., и оценивали содержание Th1-/Th2-цитокинов (IL-1 β , IL-6, IL-7, IL-8, IL-12p70, TNF α , IFN γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17, G-CSF, GM-CSF MCP, MIP-1 β) методом проточной флуориметрии на 2-лучевом лазерном автоматизированном анализаторе (Bio-Plex Protein Assay System, Bio-Rad, США) с использованием коммерческих тест-систем в соответствии с инструкцией фирмы-производителя (определяемый динамический диапазон 2-32000 пкг/мл). При статистической обработке значения цитокинов, выходящие за нижнюю границу чувствительности метода (< 2 пкг/мл), принимались за 1 пкг/мл.

Анализ содержания Т-клеток с внутриклеточной экспрессией IL-4 и IFN γ , индуцированных IL-4-ДК и IFN-ДК в СКЛ, проводили методом трехцветной проточной цитометрии (FACSCalibur, "Becton Dickinson", США). Для этого МНК, истощенные от моноцитов, культивировали в 96-луночных планшетах в полной культуральной среде с 10% сыворотки плодов коровы в отсутствие и в присутствии ДК в соотношении 10:1 в течение 72 ч. За 18 ч до конца инкубации в культуру добавляли брэфелдин (10 мкг/мл, "ICN", США), затем клетки отмывали и инкубировали 15 мин при комнатной температуре с APC-меченными моноклональными анти-CD3-антителами (Becton Dickinson, США). Далее проводили пермеабиллизацию клеток с помощью 0,2% раствора Твин-20 и инкубировали их с моноклональными FITC-конъюгированными анти-IFN γ и PE-меченными анти-IL-4 антителами (Becton Dickinson, США). При этом рассчитывали соответствующие индексы влияния ДК (ИВ_{ДК}) на количество Т-клеток, экспрессирующих IFN γ и IL-4.

Толерогенные свойства IFN-ДК и IL-4-ДК оценивали по их способности индуцировать Treg в аллогенной СКЛ (как описано выше). После 5-суточного культивирования в полученной популяции клеток оценивали количество CD4⁺FoxP3⁺, CD8⁺FoxP3⁺ и CD4⁺IL-10⁺Т-клеток. Для оценки внутриклеточной экспрессии FoxP3 и IL-10 в CD4⁺ и в CD8⁺Т-клетках, МНК обрабатывали FITC-меченными анти-CD4 или анти-CD8 МАТ («Сорбент», Москва). Пермеабиллизацию клеток проводили с использованием 0,2% раствора Твин-20, после чего клетки культивировали 30 мин с PE-меченными анти-FoxP3 и анти-IL-10 антителами (Becton Dickinson, США). Образцы анализировали на проточном

цитофлюориметре FACSCalibur с использованием программы Cellquest.

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета прикладных программ «Statistica 6.0 для Windows. Для выявления значимых различий сравниваемых показателей использовали непараметрический U-критерий Вилкоксона–Манна–Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Одним из интегральных показателей функциональной активности ДК является их способность к стимуляции пролиферативного ответа аллогенных Т-лимфоцитов в СКЛ, поскольку аллостимуляторная активность ДК ассоциирована со степенью зрелости ДК, а также спектром и уровнем продуцируемых ими цитокинов. Данные рисунка 1 демонстрируют, что IFN-ДК обладали сходной с IL-4-ДК способностью стимулировать пролиферативный ответ Т-клеток в СКЛ. Средние значения уровня пролиферации Т-клеток в культурах СКЛ, индуцированной в присутствии IL-4-ДК и IFN-ДК, составляли, соответственно, 18625 ± 909 и 18922 ± 1743 имп/мин, а индексы стимуляции – $16,8 \pm 1,1$ и $16,3 \pm 1,5$ расч.ед.

Для оценки способности ДК активировать Th1-/Th2 ответ исследовали относительное количество CD3⁺Т-клеток с внутриклеточным содержанием IFN γ и IL-4 в СКЛ, индуцированной IFN-ДК или IL-4-ДК, которые получали от одних и тех же доноров. При постановке СКЛ использовали аллогенные МНК, также полученные от одного и того же донора, чтобы исключить возможные различия, связанные с экспрессией антигенов гистосовместимости. Содержание CD3⁺IFN γ ⁺Т-лимфоцитов (Th1-клеток) в СКЛ, индуцированной в присутствии IFN-ДК, возрастало в среднем в 6,2 раза по сравнению с контролем (табл. 1). Способность IL-4-ДК активировать Т-клетки к продукции IFN γ была менее выражена ($p_U < 0,05$), поскольку в этом случае регистрировалось 4,5-кратное возрастание относительного содержания CD3⁺IFN γ ⁺Т-клеток. Следует отметить, что активация Т-клеток в алло-СКЛ «интерфероновыми» ДК сопровождалась также статистически достоверным увеличением относительного количества CD3⁺IL-4⁺Т-лимфоцитов (Th2-клеток), в то время как «интерлейкиновые» ДК практически не влияли на уровень Т-клеток с внутриклеточным содержанием IL-4. Таким образом, IFN-ДК по сравнению с IL-4-ДК обладают более выраженной способностью активировать Т-клетки к продукции IFN γ и в отличие от IL-4-ДК индуцируют также прирост CD3⁺IL-4⁺Т-лимфоцитов.

ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ Т-КЛЕТОК С ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ IFN γ И IL-4 В СКЛ, ИНДУЦИРОВАННОЙ IL-4-ДК ИЛИ IFN-ДК

% Т-клеток	Контроль ДК (-)	СКЛ, индуцированная IL-4-ДК (n = 21)		СКЛ, индуцированная IFN-ДК (n = 21)	
		ДК(+)	ИБ _{ДК}	ДК (+)	ИБ _{ДК}
CD3 ⁺ IFN γ ⁺	1,8 \pm 0,11 (2,0) (1,5-2,1)	7,5 \pm 0,6* (8,0) (5,5-9,0)	4,9 \pm 0,8 (4,5) (3,1-5,5)	10,5 \pm 0,5 *.# (10,7) (8,8-12,3)	11,1 \pm 2,2# (6,2) (4,4-13,0)
CD3 ⁺ IL-4 ⁺	1,75 \pm 0,2 (2,0) (1,3-2,1)	2,96 \pm 0,42 (2,5) (1,8-3,1)	1,9 \pm 0,37 (1,3) (0,9-2,0)	5,1 \pm 0,6*.*# (5,1) (2,9-7,5)	4,8 \pm 1,7# (4,1) (2,0-6,3)

Примечание. Данные представлены в виде средних (M \pm SE), медианных (Median) и диапазона квартильных значений (LQ – UQ). Определяли процентное содержание CD3⁺Т-клеток с внутриклеточной экспрессией IFN γ и IL-4 в СКЛ в присутствии IL-4-ДК или IFN-ДК.

ИБ_{ДК} – индекс влияния ДК (расч. ед.), рассчитанный по формуле ИБ_{ДК} = ДК (+)/ДК (-).

* – $p_0 < 0,05$ – достоверность различий показателей по сравнению с контролем; # – $p_0 < 0,05$ – достоверность различий между IFN-ДК и IL-4-ДК. (U – критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

Чтобы более детально охарактеризовать способность ДК стимулировать Th1- или Th2-ответ, в СКЛ, индуцированной IL-4-ДК или IFN-ДК, исследовали уровень продукции 17 цитокинов, относящихся к различным функциональным группам. Было установлено, что оба типа ДК обладают выраженной способностью активировать Т-клетки к продукции Th1/провоспалительных цитокинов (табл. 2), что проявлялось 5-9-кратным увеличением концентрации IFN γ , IL-2, IL-1 β и TNF α по сравнению с контролем (культуры МНК в отсутствие ДК), а также статистически значимым усилением продукции IL-12 и IL-17. При этом IFN-ДК индуцировали достоверно более высокий уровень секреции IFN γ по сравнению с IL-4-ДК. IFN-ДК и IL-4-ДК также стимулировали Т-клетки к продукции Th2/противовоспалительных цитокинов – IL-4, IL-6, IL-10 и IL-13. При этом, в отличие от IL-4-ДК, которые не активировали Т-клетки к продукции IL-5, IFN-ДК индуцировали в СКЛ более чем 3-кратное увеличение уровня IL-5 ($p_0 < 0,05$).

В отношении ростовых факторов было установлено, что как IL-4-ДК, так и IFN-ДК стимулировали Т-клетки к продукции G-CSF, концентрация которого увеличивалась в 15-19 раз по сравнению с контрольными значениями. Стимулирующий эффект ДК в отношении секреции IL-7 и GM-CSF был менее выраженным (регистрировалось 3-6-кратное увеличение).

Оценка уровня продукции хемокинов показала, что ДК не влияли на исходно высокую базальную секрецию MCP-1, умеренно стимулировали продукцию IL-8 и значительно усиливали секрецию MIP-1 β . При этом стимулирующий эффект IFN-ДК на продукцию MIP-1 β был более выраженным, чем IL-4-ДК ($p_0 < 0,05$).

Заключительный этап исследования был посвящен анализу толерогенной активности IL-4-ДК и IFN-ДК, которую оценивали по их способности индуцировать Treg в алло-СКЛ. При этом определяли количество не только «классических» CD4⁺FoxP3⁺Treg, но и CD8⁺Т-клеток, экспрессирующих FoxP3, которые также обладают супрессорной активностью [9], и CD4⁺клеток, экспрессирующих IL-10, которые могли отражать изменения в популяции индуцибельных Treg (Tr1-клеток) [11]. Из данных таблицы 3 видно, что IL-4-ДК индуцировали достоверное увеличение относительного содержания CD8⁺FoxP3⁺ и CD4⁺IL-10⁺Treg. Прирост количества CD4⁺FoxP3⁺Т-клеток не был статистически значимым. В алло-СКЛ, индуцированной в присутствии IFN-ДК, также регистрировалось достоверное увеличение относительного количества CD4⁺FoxP3⁺, CD8⁺FoxP3⁺ и CD4⁺IL10⁺Treg. Таким образом, IL-4-ДК и IFN-ДК были сопоставимы между собой по уровню толерогенной активности, которая проявлялась в культуре *in vitro* их способностью индуцировать генерацию Treg. Данное свойство ДК, очевидно, отражает их функциональный потенциал к негативной «feed-back» регуляции, который в данных культуральных условиях не является определяющим, поскольку оба типа ДК проявляли схожую алло-стимуляторную активность в СКЛ и эффективно индуцировали пролиферативный ответ Т-клеток на аллоантигены (см. рис. 1).

Обсуждение

ДК, являясь «профессиональными» антиген-презентирующими клетками, не только обеспечивают инициацию специфического иммунного ответа, но наряду с этим способны выполнять регуляторные функции, контролируя силу и на-

ТАБЛИЦА 2. ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ В СКЛ, ИНДУЦИРОВАННОЙ IL-4-ДК ИЛИ IFN-ДК

Цитокины (пг/мл)	Контроль ДК (-)	СКЛ, индуцированная IL-4-ДК (n = 18)		СКЛ, индуцированная IFN-ДК (n = 18)	
		ДК (+)	ИБ _{ДК}	ДК (+)	ИБ _{ДК}
Th1/провоспалительные цитокины					
IFN _γ	513±94	3700±1005*	6,9±0,9	4680±1018*.*	8,7±0,7 [#]
IL-2	36±4,9	167±15,4*	5,2±0,7	168±9,8*	5,3±0,7
IL-1β	147±13	1460±181*	7,4±1,8	1312±137*	9,1±0,7
TNFα	49,5±7,4	375±15,0*	8,7±1,1	356±93*	7,6±1,3
IL-12 (p70)	16,5±1,7	45,6±3,7*	2,9±0,2	41,6±1,8*	2,8±0,4
IL-17	338±78	1160±174*	4,8±0,7	1161±90*	4,9±0,9
Th2/противовоспалительные цитокины					
IL-4	51,5±10,4	271±18,4*	7,2±1,4	255±8,5*	6,9±1,4
IL-5	29±4,9	36±9,3	1,2±0,2	50,5±16,8*.*	3,7±0,7 [#]
IL-6	4602±573	22462±3156*	5,7±1,1	23911±1186*	5,7±0,7
IL-10	69±3,2	702±49,3*	10±1,2	650±84*	9,9±1,7
IL-13	53±6,0	332±83*	6,0±1,0	352±64,6*	6,3±0,6
Ростовые факторы иммуногемопозза					
IL-7	2,0±0,01	7,9±2,0*	3,9±1,0	18,0±10,7*	9,0±5,3
G-CSF	519±13,6	10255±953*	19 ±1,7	8114±1012*	15,6±2,0
GM-CSF	495±44,9	1548±187*	3,4±0,5	1470±104*	3,1±0,3
Хемокины					
IL-8	27193±2715	46954±6665*	1,8±0,3	53278±2075*	2,1±0,2
MCP-1	4887±329	6581±527	1,4±0,1	5868±398	1,2±0,03
MIP-1β	3994±484	20448±2462*	5,5±0,5	28525±1373*.*	8,0±1,1 [#]

Примечание. Представлены средние значения (M \pm SE) уровня продукции цитокинов в алло-СКЛ. ДК(-) – спонтанная продукция цитокинов в отсутствие ДК. ДК(+) – продукция цитокинов Т-клетками в алло-СКЛ в присутствии IL-4-ДК или IFN-ДК (в соотношении МНК/ДК = 10:1).

ИБ_{ДК} – индекс влияния ДК, рассчитанный по формуле ИБ_{ДК} = ДК(+)/ДК(-).

* – достоверность различий между спонтанной и ДК-индуцированной продукцией; # – достоверность различий между продукцией цитокинов в присутствии IFN-ДК по сравнению с IL-4-ДК; (p₀ < 0,05, U- критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

правленность иммунных реакций. Многочисленные экспериментальные исследования *in vivo* и *in vitro* показали, что ДК, нагруженные опухолевыми антигенами или антигенами инфекционных возбудителей, индуцируют эффективный противоопухолевый и противои инфекционный иммунный ответ. Эти данные обосновывают целесообразность применения ДК в качестве кандидатных клеток при разработке новых клеточных технологий иммунотерапии и иммунопрофилактики. Активному развитию данного направления во многом способствовали успехи в области лабораторного процессинга ДК, что позволило полу-

чать их в количестве, достаточном для клинического использования в виде дендритноклеточных вакцин при лечении различных онкологических и инфекционных заболеваний.

Традиционно для генерации ДК *in vitro* используют GM-CSF в комбинации с IL-4 [22]. Однако данный подход представляется мало физиологичным, поскольку генерируемые IL-4-ДК в условиях дефицита ростовых факторов быстро теряют свои функции. Замена IL-4 на интерферон- α , на наш взгляд, в большей степени отражает физиологические условия в организме *in situ*, поскольку IFN α является ранним медиатором врожден-

ТАБЛИЦА 3. СОДЕРЖАНИЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-КЛЕТОК В СКЛ, ИНДУЦИРОВАННОЙ IL-4-ДК ИЛИ IFN-ДК

% Treg		Контроль	СКЛ, индуцированная IL-4-ДК (n = 12)	СКЛ, индуцированная IFN-ДК (n = 14)
CD4 ⁺ FoxP3 ⁺	M±SE	3,7±0,4	4,8±0,6	5,8±0,8*
	Median	3,0	7,0	5,0
	LQ-UQ	3,0-6,0	3,5-5,5	4,0-6,0
CD8 ⁺ FoxP3 ⁺	M±SE	6,6±1,7	10,1±2,0*	13,4±2,6*
	Median	7,0	9,0	11,0
	LQ-UQ	3,0-9,5	6,0-14,0	5,0-18,0
CD4 ⁺ IL-10 ⁺	M±SE	2,2±0,5	5,0±1,8*	5,6±0,9*
	Median	2,0	4,0	5,0
	LQ-UQ	1,0-4,0	2,5-7,5	3,0-8,0

Примечание. Представлены средние (M±SE), медианные (Median) и диапазон квартильных значений (LQ – UQ) процентного содержания CD4⁺FoxP3⁺, CD8⁺FoxP3⁺ и CD4⁺IL-10⁺ регуляторных Т-клеток в СКЛ в присутствии IL-4-ДК или IFN-ДК. Контроль – содержание Treg среди свежесыведенных МНК периферической крови.

* – $p_0 < 0,05$, достоверность различий по сравнению с контролем; * – $p_0 < 0,05$, достоверность различий между IFN-ДК и IL-4-ДК; (U-критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

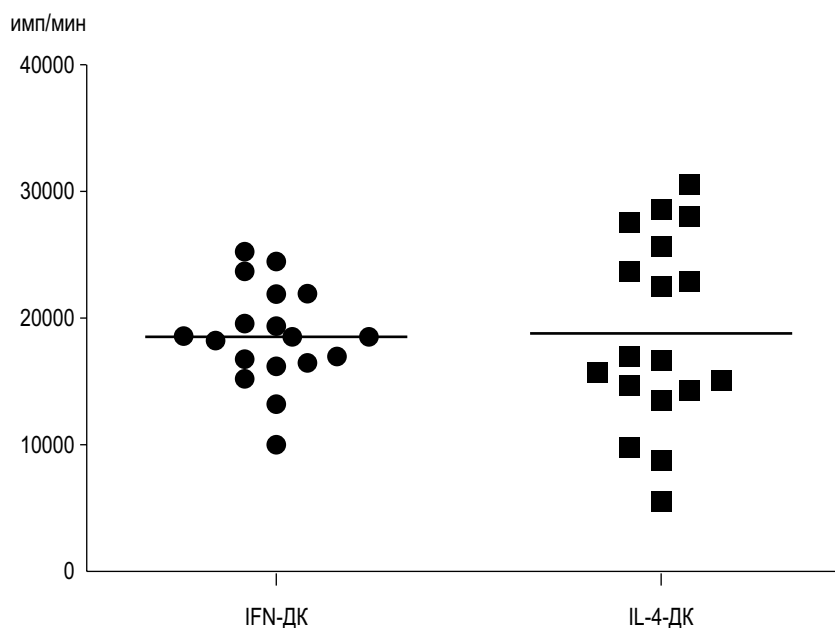


Рисунок 1. Аллостимуляторная активность IL-4-ДК и IFN-ДК в СКЛ

Примечание. МНК доноров ($0,1 \times 10^6$) культивировали в присутствии IFN-ДК или IL-4-ДК в соотношении 10:1. Интенсивность пролиферации (имп/мин) оценивали радиометрически по включению ³H-тимидина на 5 сут. Данные представлены в виде индивидуальных значений, сплошная горизонтальная линия – медианные значения (n = 18).

ного иммунного ответа, продуцируется в больших количествах в ответ на стимуляцию инфекционными антигенами и провоспалительными цитокинами и обладает выраженным стимулирующим эффектом на клеточный и гуморальный иммунитет. Очевидно, что активация интерфероновой системы является наиболее ранним механизмом, запускающим индукцию и созревание ДК. Соответственно, использование IFN α для генерации

ДК представляется более предпочтительным подходом по сравнению с применением IL-4 [7, 15].

Проведенное нами сравнительное исследование показало, что получаемые в различных протоколах IL-4-ДК и IFN-ДК не различаются между собой по ключевым функциональным характеристикам, а именно – по способности 1) стимулировать пролиферацию Т-клеток на аллоантигены и 2) индуцировать генерацию Treg

в СКЛ. Тем не менее, наши данные в совокупности с проведенными ранее работами [3, 5, 13] свидетельствуют об определенных преимуществах ДК, полученных с использованием именно «интерферонового» протокола.

В частности, IFN-ДК:

1) генерируются быстрее по времени (4 vs 7 сут.);

2) характеризуются высокой способностью к захвату антигена (поскольку имеют фенотип «частично зрелых» клеток), сохраняя при этом антиген-презентирующую активность (т.к. экспрессируют костимуляторные молекулы [CD86] и молекулы главного комплекса гистосовместимости [HLA-DR]);

3) экспрессируют молекулы B7-H1 и TRAIL [3] и отличаются более выраженной прямой цитотоксической активностью против клеток опухолевой линии Jurkat [13];

4) сохраняют функциональную стабильность и способны эффективно индуцировать реакции клеточного и гуморального иммунитета, поскольку активно секретируют Th1/провоспалительные (IFN γ , IL-2, IL-17, IL-1 β) и Th2/противовоспалительные цитокины (IL-10, IL-5), а также ростовые гемопоэтические факторы (G-CSF) и хемокины (MCP-1);

5) обладают более выраженной способностью активировать Th1-клетки и индуцируют 6-крат-

ный прирост количества CD3⁺IFN γ ⁺T-клеток в СКЛ;

6) оказывают более выраженный стимулирующий эффект не только на Th1-, но и Th2-клетки, что проявляется достоверно более высоким уровнем продукции IFN γ и IL-5, а также СС хемокина — MIP-1 β ;

7) характеризуются наличием умеренной Th2-стимуляторной активности (индуцируют увеличение количества CD3⁺IL-4⁺T-клеток в СКЛ), которая практически отсутствует у IL-4-ДК;

8) характеризуются способностью к активации цитотоксических CD8⁺T-лимфоцитов, экспрессирующих внутриклеточно перфорин, при этом данная функциональная активность IFN-ДК может быть дополнительно усилена при использовании в качестве дозревающего стимула нативной ДНК человека [5].

Таким образом, полученные нами результаты обосновывают целесообразность использования IFN-ДК в качестве клеточной основы при создании индивидуальных лечебных вакцин, которые могут быть включены в программы комплексной терапии больных с онкопатологией или хроническими вирусными заболеваниями для индукции/усиления противоопухолевого или противоинфекционного иммунного ответа [1, 2, 4].

Список литературы

1. Леплина О.Ю., Ступак В.В., Козлов Ю.П., Пендюрин И.В., Никонов С.Д., Тихонова М.А., Сычева Н.В., Останин А.А., Черных Е.Р. Применение интерферон- α -индуцированных дендритных клеток при лечении больных со злокачественными глиомами головного мозга // Клеточные технологии в биологии и медицине. — 2007. — № 2. — С. 92-98.
2. Леплина О.Ю., Желтова О.И., Борисова А.Е., Старостина Н.М., Останин А.А. Вакцины на основе дендритных клеток в лечении герпетической инфекции // Вестник Уральской медицинской академической науки. — 2011. — Т. 35, № 2/2. — С. 38-39.
3. Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Тыринова Т.В., Алямкина Е.А., Долгова Е.В., Богачев С.С., Останин А.А., Черных Е.Р. Сравнительная характеристика фенотипа и цитокин-секреторной активности дендритных клеток человека, генерированных *in vitro* в присутствии IFN-альфа и IL-4 // Иммунология. — 2012. — Т. 33, № 2. — С. 60-65.
4. Черных Е.Р., Леплина О.Ю., Ступак В.В., Пендюрин И.В., Никонов С.Д., Тихонова М.А., Останин А.А. Клеточные технологии в лечении злокачественных глиом головного мозга // «Клеточные технологии. Теоретические и прикладные аспекты», Сборник трудов под ред. Козлова В.А., Сеникова С.В., Черных Е.Р., Останина А.А. — Новосибирск: Наука, 2009. — С. 240-276.

Ссылки 5-22 см. в References (cmp. 51-52). See References for numbers 5-22 at pp. 51-52.

References

1. Leplina O.Yu., Stupak V.V., Kozlov Yu.P., Pendyurin I.V., Nikonov S.D., Tikhonova M.A., Sycheva N.V., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Primenenie interferon- α -indutsirovannykh dendritnykh kletok pri lechenii bol'nykh so zlokachestvennyimi gliomami golovnogogo mozga [Use of Interferon- α -Induced Dendritic Cells in the Therapy of Patients with Malignant Brain Gliomas]. *Kletochnye tekhnologii v biologii i meditsine — Cell Technologies in Biology and Medicine*, 2007, no. 2, pp. 92-98.

2. Leplina O.Yu., Zheltova O.I., Borisova A.E., Starostina N.M., Ostanin A.A., Vaksiny na osnove dendritnykh kletok v lechenii gerpeticheskoy infektsii [Dendritic cells vaccines in the treatment of herpetic infections]. *Vestnik Ural'skoy meditsinskoy akademicheskoy nauki – Journal of the Ural Academic Science*, 2011, vol. 35, no. 2/2, pp. 38-39.
3. Leplina O.Yu., Tikhonova M.A., Tyrinova T.V., Alyamkina E.A., Dolgova E.V., Bogachev S.S., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Sravnitel'naya kharakteristika fenotipa i tsitokin-sekretornoy aktivnosti dendritnykh kletok cheloveka, generirovannykh *in vitro* v prisutstvii IFN- α i IL-4 [Comparative characteristic of phenotype and cytokine-secretory activity of human dendritic cells generated *in vitro* with IFN-alpha and IL-4]. *Immunologiya – Immunology*, 2012, vol. 33, no. 2, pp. 60-65.
4. Chernykh E.R., Leplina O.Yu., Stupak V.V., Pendyurin I.V., Nikonov S.D., Tikhonova M.A., Ostanin A.A. Kletochnye tekhnologii v lechenii zlokachestvennykh gliom golovnogogo mozga. "Kletochnye tekhnologii. Teoreticheskie i prikladnye aspekty", Sbornik trudov pod red. Kozlova V.A., Sennikova S.V., Chernykh E.R., Ostanina A.A. [Cell technologies in malignant brain gliomas treatment. Proceedings. Eds.: V.A. Kozlov, S.V. Sennikov, E.R. Chernykh, A.A. Ostanina]. *Novosibirsk: Science*, 2009, pp. 240-276.
5. Alyamkina E.A., Leplina O.Y., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Nikolin V.P., Popova N.A., Proskurina A.S., Gvozdeva T.S., Dolgova E.V., Orishchenko K.E., Rogachev V.A., Sidorov S.V., Varaksin N.A., Ryabicheva T.G., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Effects of human exogenous DNA on production of perforin-containing CD8⁺ cytotoxic lymphocytes in laboratory setting and clinical practice. *Cell Immunol.*, 2012, vol. 276, no. 1-2, pp. 59-66.
6. Banchereau J., Steinman R.M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 1998, vol. 392, pp. 245-252.
7. Belardelli F., Gresser I. The neglected role of type I interferon in the T-cell response: implications for its clinical use. *Immunol. Today*, 1996, vol. 17, pp. 369-375.
8. Belkaid Y., Oldenhove G. Tuning microenvironments: induction of regulatory T cells by dendritic cells. *Immunity*, 2008, vol. 29, pp. 362-371.
9. Billerbeck E., Blum H.E., Thimme R. Parallel expansion of human virus-specific FoxP3 effector memory and de novo-generated FoxP3⁺ regulatory CD8⁺ T cells upon antigen recognition *in vitro*. *Immunol.*, 2007, vol. 179, pp. 1039-1048.
10. Cicinnati V.R., Kang J., Hou J., Lindemann M., Koop K., Tüting T., Gerken G., Beckebaum S. Interferon-alpha differentially affects homeostasis of human plasmacytoid and myeloid dendritic cells. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2009, vol. 29, pp. 145-160.
11. Dieckmann D., Bruett C.H., Ploettner H., Lutz M.B., Schuler G. Human CD4⁺CD25⁺ regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells. *J. Exp. Med.*, 2002, vol. 196, no. 2, pp. 247-253.
12. Della Bella S., 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- α . *J. Leuk. Biol.*, 2004, vol. 75, pp. 106-116.
13. Leplina O.Yu., Tyrinova T.V., Tikhonova M.A., Shevela E.Ya., Stupak V.V., Mishinov S.V., Pendyurin I., Sadovoy M., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Direct antitumor activity of interferon-induced dendritic cells of healthy donors and patients with primary brain tumors. In book: "Glioma – exploring it's biology and practical relevance" edited by Anirban Ghosh, 2011, pp. 325-342.
14. Lutz M.B., Schuler G. Immature, semi-mature, and fully mature dendritic cells: Which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol.*, 2002, vol. 23, pp. 445-449.
15. Mohty M., Vialle-Castellano A., Nunes J.A., Isnardon D., Olive D., Gaugler B. IFN- α skews monocyte differentiation into Toll-like receptor 7-expressing dendritic cells with potent functional activities. *J. Immunol.*, 2003, vol. 171, pp. 3385-3393.
16. Moser M., Murphy K.M. Dendritic cell regulation of Th1-Th2 development. *Nat. Immunol.*, 2000, vol. 1, pp. 199-205.
17. Parlato S., Santini S., Lapenta C., Di Pucchio T., Logozzi M., Spada M., Giammarioly A., Malorni W., Fais S., Bellardelli F. Expression of CCR-7, MIP-3 β , 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, pp. 3022-3029.
18. Santini S., Lapenta C., Logozzi M., Parlato S., Spada M., Di Pucchio T., Bellardelli F. Type I Interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cells development and activity *in vitro* and in HU-PBL-SCID mice. *J. Exp. Med.*, 2000, vol. 191, pp. 1777-1788.

19. Santini S., Puccini T., Lapenta C., Parlato S., Logozzi M., Belardelli F. A new type 1 IFN-mediated pathway for the rapid differentiation of monocytes into highly active dendritic cells. *Stem cells*, 2003, vol. 21, pp. 357-362.
20. Santini S., Lapenta C., Santodonato L., D'Agostino G, Belardelli F, Ferrantini M. IFN α in the generation of dendritic cells for cancer immunotherapy. *Handb. Exp. Pharmacol.*, 2009, vol. 188, pp. 295-317.
21. Santini S., Lapenta C., Donati S., Spadaro F., Belardelli F., Ferrantini M. Interferon- α -conditioned human monocytes combine Th1-orienting attitude with the induction of autologous Th17 responses: role of IL-23 and IL-12. *PLoS ONE*, 2011, vol. 6, e 17364, doi 10.1371.
22. Thurner B., Roder C., Dieckmann D., Heuer M., Kruse M., Glaser A., Keikavoussi P., Kampgen E., Bender A., Schuler G. Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical applications. *J. Immunol. Meth.*, 1999, vol. 223, pp. 1-15.