

ХАРАКТЕРИСТИКА СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ, ОПОСРЕДУЮЩИХ ЦИТОТОКСИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ПРОТИВ АКТИВИРОВАННЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ И НК-КЛЕТОК

Тыринова Т.В., Леплина О.Ю., Тихонова М.А.,
Сахно Л.В., Останин А.А., Черных Е.Р.

НИИ клинической иммунологии СО РАМН, г. Новосибирск

Резюме. В работе проведено исследование цитотоксического/проапоптогенного эффекта IFN α -индуцированных дендритных клеток (ИФН-ДК) здоровых доноров, направленного против Т-лимфоцитов и НК-клеток. Установлено, что в аллогенной СКЛ ИФН-ДК индуцируют апоптоз активированных CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитов и НК-клеток. При этом индукция апоптоза CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитов при их взаимодействии с ДК реализуется с вовлечением различных сигнальных путей. В частности, активированные CD4⁺Т-лимфоциты в наибольшей степени чувствительны к TRAIL- и Fas/FasL-сигнальному пути, тогда как активированные CD8⁺ лимфоциты – к TNF α -сигнальному пути индукции апоптоза. Определенную роль в реализации цитотоксической активности ИФН-ДК против обоих типов Т-лимфоцитов, а также активированных НК-клеток играет также PD-1/B7-H1 сигнальный путь. Проапоптогенная/цитотоксическая активность ИФН-ДК против активированных лимфоцитов может рассматриваться как механизм feed-back регуляции, направленный на ограничение иммунного ответа и поддержание иммунного гомеостаза. С другой стороны, в условиях патологии повышенная экспрессия проапоптогенных молекул на ДК может приводить к подавлению антигенспецифического ответа и способствовать прогрессии заболевания.

Ключевые слова: дендритные клетки, TRAIL, FasL, B7-H1/PD-1, Т-лимфоциты, НК-клетки, апоптоз.

Tyrinova T.V., Lepkina 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

Abstract. Cytotoxic/pro-apoptogenic effects of IFN α -induced dendritic cells (IFN-DCs) directed against T-lymphocytes and NK cells were investigated in healthy donors. Using an allogenic MLC system, it was revealed that IFN-DCs induce apoptosis of both activated CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes, and NK cells. Apoptosis of CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes induced by their interaction with IFN-DCs was mediated by various signaling pathways. In particular, activated CD4⁺Т-lymphocytes were most sensitive to TRAIL- и Fas/FasL-transduction pathways, whereas activated CD8⁺ T-lymphocytes were induced to apoptosis via TNF α -mediated pathway. PD-1/B7-H1-signaling pathway also played a distinct role in cytotoxic activity of IFN-DCs towards both types of T lymphocytes and activated NK cells. The pro-apoptogenic/cytotoxic activity of IFN-DC against activated lymphocytes may be regarded as a mechanism of a feedback regulation aimed at restriction of immune response and maintenance of immune homeostasis. Moreover, upregulation of pro-apoptogenic molecules on DCs under pathological conditions may lead to suppression of antigen-specific response, thus contributing to the disease progression. (*Med. Immunol.*, 2012, vol. 14, N 1-2, pp 43-50)

Адрес для переписки:

Тыринова Тамара Викторовна,
НИИ клинической иммунологии СО РАМН
630099, Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: (383) 236-03-29.
E-mail: ct_lab@mail.ru

Keywords: dendritic cells, TRAIL, FasL, B7-H1/PD-1, T-lymphocytes, NK-cells, apoptosis.

Недавние исследования продемонстрировали, что выделенные из периферической крови дендритные клетки (ДК), а также миелоидные ДК, генерируемые в присутствии GM-CSF и IL-4, обладают цитотоксической активностью против широкого спектра опухолевых линий [9]. При этом нормальные клетки отличаются резистентностью к цитотоксическому действию ДК [10, 13, 8].

Полученные нами ранее данные показали, что ДК здоровых доноров, генерируемые из моноцитов периферической крови при замене IL-4 на IFN α (ИФН-ДК), обладают более выраженной противоопухолевой активностью, которая проявляется как против TRAIL-чувствительных, так и TRAIL-резистентных опухолевых клеток. В частности ИФН-ДК характеризуются более высоким цитотоксическим эффектом против TRAIL-чувствительных опухолевых клеток линии Jurkat и более высоким цитостатическим эффектом против TRAIL-резистентных опухолевых клеток линии Hep2 [1].

С другой стороны, появились единичные сообщения о том, что клетками-мишенями цитотоксической активности ДК могут быть Т-лимфоциты. Так, плазмацитоидные ДК способны индуцировать апоптоз CD4⁺Т-лимфоцитов ВИЧ-инфицированных больных через TRAIL-зависимый сигнальный путь [16]. Noves S. и др. продемонстрировали, что миелоидные FasL⁺ДК участвуют в элиминации активированных, но не покоящихся CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитов, за счет индукции Fas/FasL-опосредованного механизма апоптоза [9]. Кроме того, нами было показано, что ИФН-ДК обладают цитотоксическим эффектом в отношении активированных NK-клеток [3]. Эти факты позволили предположить, что цитотоксическая активность ДК может быть направлена на ограничение иммунных реакций. Действительно, хорошо известно, что наряду со стимулирующим эффектом ДК обладают толерогенными свойствами. Ингибирующая активность ДК реализуется через различные механизмы — генерацию регуляторных Т-клеток, продукцию супрессорных цитокинов, индукцию анергии Т-клеток [4]. При этом не исключено, что одним из механизмов подавления иммунного ответа может быть индукция апоптоза иммунокомпетентных клеток при их взаимодействии с ДК. Проверке данной гипотезы была посвящена настоящая работа.

Материалы и методы

В исследование были включены 30 здоровых доноров крови. Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли центрифугированием гепаринизированной венозной крови в градиенте плотности

фиколла-верографина. ИФН-ДК получали путем культивирования прилипающей фракции МНК в 6-луночных планшетах (Nunc, Дания) в течение 3–4 сут. 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% сыворотки плодов коровы (БиолоТ, Санкт-Петербург) в присутствии GM-CSF (40 нг/мл, Sigma-Aldrich) и IFN α (1000 Ед/мл, Роферон-А, Roche, Швейцария) с последующим дозреванием в течение 24 ч с липополисахаридом (10 мкг/мл, LPS *E. coli* 0114:B4, Sigma-Aldrich).

Фенотипический анализ ДК проводили методом проточной цитофлуориметрии (FACS Calibur, Becton Dickinson, США) с использованием FITS- или PE-меченных моноклональных анти-HLA-DR, -TRAIL, -FasL, -B7-H1, -perforin антител (BD PharMingen, США).

Уровень апоптоза CD3⁺CD4⁺ и CD3⁺CD8⁺Т-лимфоцитов, а также CD16⁺CD56⁺NK-клеток оценивали в смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ) при культивировании в течение 3 сут. МНК доноров ($0,1 \times 10^6$ /лунку) в 96-луночных круглодонных планшетах в присутствии аллогенных ИФН-ДК в соотношении 10:1. Культуры дублировали в 12 идентичных повторах, с целью получения клеток в количестве, достаточном для проведения цитофлуориметрического анализа. Аллостимуляторную активность ДК также определяли в СКЛ, при этом интенсивность пролиферации оценивали на 5 сут. радиометрически по включению ³H-тимидина.

В отдельных экспериментах ИФН-ДК предварительно инкубировали в течение 60 мин с химерными молекулами rhTNFR1/TNFRSF1A Fc chimera (10 мкг/мл), rhFas/TNFRSF6/CD95 Fc chimera (10 мкг/мл) и rhTRAIL R2/TNFRSF10B Fc chimera (10 мкг/мл; все реактивы R&D Systems, США).

Клеточный цикл и уровень апоптоза CD4⁺ и CD8⁺(CD4⁺)Т-клеток и CD16⁺CD56⁺NK-клеток оценивали методом трехцветной проточной цитофлуориметрии. Для этого, 25 мкл МНК ($1,0 \times 10^6$), полученных после культивирования в алло-СКЛ, инкубировали в течение 45 мин при 4 °С в темноте с 5 мкл FITC-конъюгированных анти-CD3-антител и 5 мкл PE-конъюгированных анти-CD4 или 5 мкл FITC-конъюгированных анти-CD16-антител или 5 мкл PE-конъюгированных анти-CD56 (Сорбент, Москва). После однократной отмывки забуференным физиологическим раствором, содержащим 0,02% ЭДТА и 1% азида натрия (раствор «А») клетки фиксировали в течение 30 мин холодным 0,5% раствором параформальдегида. Фиксированные клетки центрифугировали, осадок ресуспендировали в 0,5 мл раствора А, содержащего РНКазу в концентрации 20 мкг/мл,

после чего клетки инкубировали в темноте в течение 30 мин при 37 °С. Затем клетки обрабатывали 7-амино-актиномицином D (7-AAD, Calbiochem, Германия) в конечной концентрации 2 мкг/мл в темноте в течение 30 мин при 4 °С.

Анализ клеточного цикла проводили по оценке гистограмм ДНК (красная флуоресценция). Относительное содержание клеток с диплоидным (клетки в G₀/G₁ фазах клеточного цикла) и гипердиплоидным (клетки в S, G₂/M фазах клеточного цикла) набором ДНК определяли в гейтах CD3⁺CD4⁺ или CD3⁺CD8⁺ (CD4⁻) Т-лимфоцитов (зеленая и оранжевая флуоресценция), или в гейте CD16⁺CD56⁺ NK-клеток (зеленая флуоресценция). Апоптотические клетки, ДНК которых подвергалась фрагментации, формировали характерный гиподиплоидный пик. Результаты выражались в виде процентного соотношения позитивных клеток к общему количеству CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺ Т-лимфоцитов и CD16⁺CD56⁺ NK-клеток (не менее 10000).

Для оценки участия B7-H1/PD1- сигнального пути определяли уровень апоптоза и распределение по клеточному циклу МНК в 3-суточной алло-СКЛ в отсутствие (контроль) и в присутствии (опыт) нейтрализующих антител против PD-1 (5 мкг/мл, J116; eBioscience).

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 $p < 0,05$. Данные

приведены в виде среднего арифметического значения (M) и стандартной ошибки среднего (S.E.).

Результаты

Оценка распределения клеточного цикла Т-лимфоцитов в СКЛ, индуцированной аллогенными ЛПС-стимулированными ИФН-ДК показала (рис. 1), что относительное количество апоптотических CD3⁺CD4⁺ и CD3⁺CD8⁺ Т-лимфоцитов среди МНК возрастало более чем в 3 раза по сравнению с контролем (нестимулированными МНК) и составляло в среднем 10,5±2,2% и 10,3±2,6% соответственно. Кроме того, стимуляция МНК дендритными клетками сопровождалась практически 3-кратным возрастанием в СКЛ уровня апоптоза в популяции активированных CD16⁺CD56⁺ NK-клеток (с 4,7±0,8 до 12,7±2,0%).

Согласно данным литературы цитотоксическая активность ДК против опухолевых клеток может опосредоваться различными апоптоз-индуцирующими молекулами, относящимся к TNF-семейству (TRAIL, FasL, TNF α), а также перфорины/гранзимами А и В [6, 7]. Наличие на Т-лимфоцитах и NK-клетках рецепторов к соответствующим проапоптогенным лигандам может обуславливать чувствительность иммунокомпетентных клеток к цитотоксическому действию указанных молекул. Кроме того, известно, что активированные через Т-клеточный рецептор CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоциты экспрессируют рецептор программированной клеточной смерти (PD-1) [15], ли-

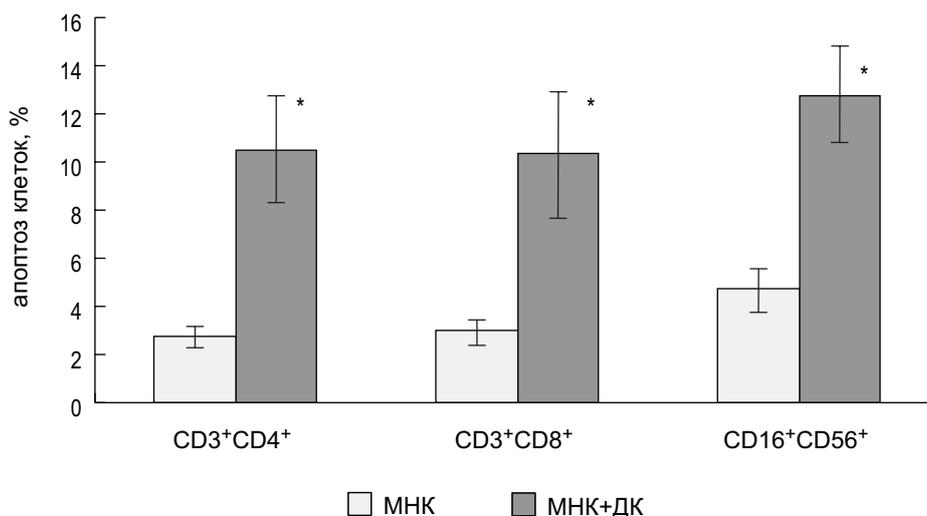


Рисунок 1. Влияние ИФН-ДК на уровень апоптоза CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов и NK-клеток

Примечание. Представлено относительное количество (%), M±SE, n = 11) апоптотических CD3⁺CD4⁺ и CD3⁺CD8⁺ Т-лимфоцитов, а также CD16⁺CD56⁺ NK-клеток среди нестимулированных МНК здоровых доноров (МНК), а также среди МНК, активированных в течение 3 сут. в СКЛ в присутствии аллогенных ИФН-ДК в соотношении 10:1 (МНК + ДК). * – P_U < 0,05 – достоверность различий по сравнению с контролем (U-критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

ТАБЛИЦА 1. ЭКСПРЕССИЯ ПОВЕРХНОСТНЫХ И ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ПРОАПОПТОГЕННЫХ МОЛЕКУЛ ЛПС-СТИМУЛИРОВАННЫМИ ИФН-ДК

Показатель	% позитивных ДК			
	TRAIL ⁺ (n = 8)	FasL ⁺ (n = 23)	B7-H1 ⁺ (n = 12)	Perforin ⁺ (n = 8)
M±S.E.	16,1±1,6	19,4±2,0	27,5±4,7	6,5±1,6
Median	17,0	15,0	22,0	4,5

Примечание. Относительное (%) содержание ЛПС-стимулированных ИФН-ДК, экспрессирующих соответствующие маркеры, представлено в виде средних (M±S.E.) и медианных (Median) значений.

гандом для которого является B7-H1 (PD-L1). Поэтому включение сигнального пути PD-1/B7-H1 при взаимодействии ДК с Т-лимфоцитами может быть еще одним возможным механизмом, посредством которого ДК могут индуцировать апоптоз/анергию Т-лимфоцитов. Учитывая эти данные, представлялось важным исследовать с участием каких из этих известных механизмов реализуется цитотоксический эффект ДК против Т-лимфоцитов и НК-клеток.

Как видно из таблицы 1, в среднем около 17-15% ЛПС-стимулированных ИФН-ДК экспрессируют мембранную форму TRAIL и FasL. Количество ДК с поверхностной экспрессией B7-H1⁺ составляло в среднем 22%. Также небольшая часть ИФН-ДК (4,5%) характеризовалась внутриклеточной экспрессией перфорины. Таким образом, данные фенотипического анализа свидетельствуют, что цитотоксическая активность ИФН-ДК против лимфоцитов может осуществляться с вовлечением различных эффекторных молекул.

Чтобы оценить возможное участие цитотоксических лигандов TNF семейства в индукции апоптоза лимфоцитов при их взаимодействии с ИФН-ДК была проведена серия экспериментов с блокированием указанных лигандов с помощью растворимых рецепторов. Как видно из данных рисунка 2, предварительная обработка ИФН-ДК химерными молекулами TRAIL-R2:Fc и Fas:Fc приводила к статистически достоверному снижению относительного количества апоптотических CD3⁺CD4⁺Т-клеток. Снижение апоптоза CD4⁺Т-лимфоцитов наблюдалось также после предварительной инкубации ДК с TNFR1:Fc, однако в этом случае подавление апоптоза Т-клеток проявлялось в виде тенденции. В то же время блокирование TNFR1-опосредованного пути сопровождалось снижением апоптоза CD8⁺Т-лимфоцитов с 8,6±0,4% до 6,5±0,5% (p < 0,05), тогда как обработка TRAIL-R2:Fc и Fas:Fc не влияла на проапоптогенную активность ИФН-ДК против CD8⁺Т-клеток.

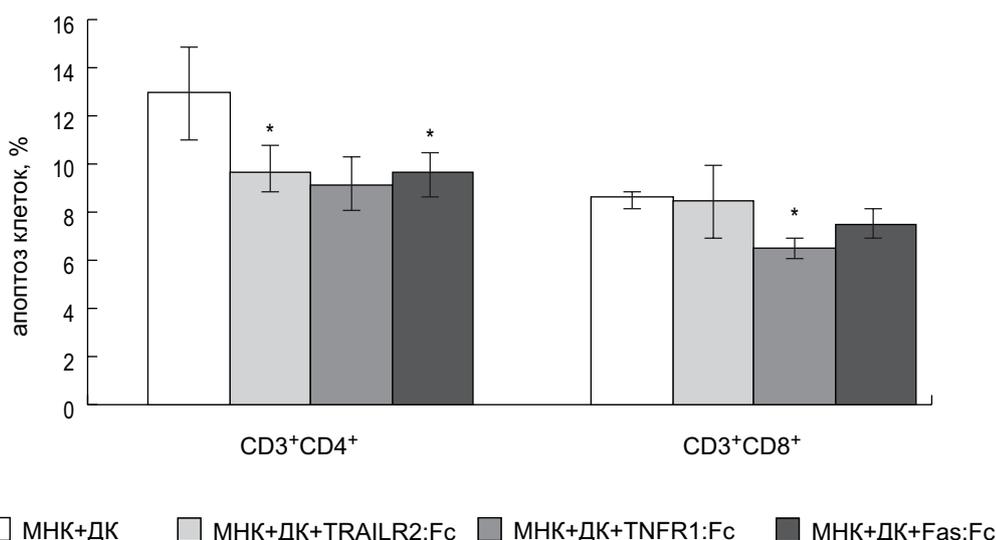


Рисунок 2. Эффект блокирования лигандов семейства TNF на способность ИФН-ДК индуцировать апоптоз CD4⁺ и CD8⁺Т-клеток в СКЛ

Примечание. Представлено относительное количество (%), M±SE, n = 8) апоптотических CD3⁺CD4⁺ и CD3⁺CD8⁺Т-клеток среди МНК здоровых доноров, активированных в алло-СКЛ в присутствии интактных ИФН-ДК (МНК + ДК), и в присутствии ИФН-ДК, преинкубированных в течение 60 мин с TRAIL-R2:Fc, TNFR1:Fc или Fas:Fc. * – P_U < 0,05 – достоверность различий по сравнению с интактными клетками (U-критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

ТАБЛИЦА 2. ЭФФЕКТ БЛОКИРОВАНИЯ ЛИГАНДОВ СЕМЕЙСТВА TNF НА СПОСОБНОСТЬ ИФН-ДК ИНДУЦИРОВАТЬ ПРОЛИФЕРАТИВНЫЙ ОТВЕТ Т-КЛЕТОК В АЛЛО-СКЛ

Показатель	Пролиферативный ответ в алло-СКЛ (n = 7)			
	МНК+ДК _{ИНТ}	МНК+ДК _{TRAIL}	МНК+ДК _{TNF}	МНК+ДК _{FAS}
Пролиферация (имп/мин)	3750±699	7602±1010*	8590±2735*	6049±1854
ИБ		2,26±0,35	2,17±0,46	1,7±0,48

Примечание. Данные представлены в виде $M \pm SE$. СКЛ индуцировали интактными ИФН-ДК (ДК_{ИНТ}), или ИФН-ДК, преинкубированными в течение 60 мин с TRAIL-R2:Fc (ДК_{TRAIL}), TNFR1:Fc (ДК_{TNF}) или Fas:Fc (ДК_{FAS}). Индекс влияния химерных молекул R:Fc (ИБ) рассчитывали как отношение пролиферативного ответа в СКЛ в присутствии преобработанных ИФН-ДК к уровню пролиферации МНК, стимулированных интактными ДК. * – $P_U < 0,05$ – достоверность различий по сравнению с интактными клетками (U-критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

Сравнительный анализ пролиферативной активности МНК в алло-СКЛ, индуцированной интактными и преобработанными ИФН-ДК, показал (табл. 2), что часовая инкубация ДК с TRAIL-R2:Fc и TNFR1:Fc усиливала пролиферативный ответ Т-клеток на аллоантигены более чем в 2 раза ($p < 0,05$). Аналогичная тенденция отмечалась при обработке ИФН-ДК растворимыми Fas-рецепторами. Эти факты являлись дополнительным подтверждением важной роли TRAIL и TNF α в реализации ингибирующего эффекта ИФН-ДК на Т-лимфоциты.

Ранее нами было показано, что CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоциты экспрессируют рецептор программированной клеточной смерти (PD-1), причем активация Т-клеток в алло-СКЛ, индуцированной ИФН-ДК, сопровождается достоверным

увеличением экспрессии PD-1 [2]. Кроме того, согласно нашим данным активированные CD16⁺CD56⁺NK-клетки также экспрессируют молекулу PD-1. Так, относительное количество PD-1⁺CD16⁺CD56⁺ клеток среди свежeweделенных МНК периферической крови доноров составляет в среднем $12,3 \pm 2,7\%$.

Чтобы убедиться, что индукция апоптоза активированных Т-лимфоцитов и NK-клеток при их взаимодействии с ИФН-ДК осуществляется непосредственно через B7-H1/PD-1 сигнальный путь, была проведена серия экспериментов с использованием нейтрализующих анти-PD-1 антител. Из данных рисунка 3 видно, что добавление анти-PD-1 антител в СКЛ, индуцированную аллогенными ИФН-ДК, приводило к статистически достоверному снижению количества апопто-

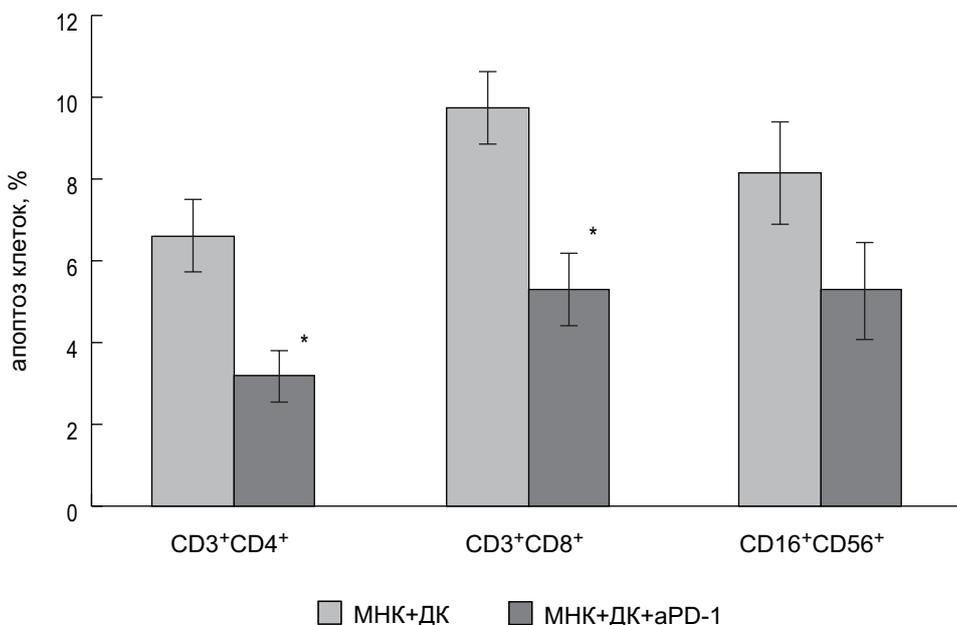


Рисунок 3. Эффект нейтрализующих анти-PD-1-антител на способность ИФН-ДК индуцировать апоптоз CD4⁺/CD8⁺ Т-лимфоцитов и NK-клеток в СКЛ

Примечание. Представлено относительное количество (%), $M \pm SE$, n = 8) апоптотических CD3⁺CD4⁺ и CD3⁺CD8⁺ Т-клеток, также CD16⁺CD56⁺ NK-клеток среди МНК, активированных аллогенными ИФН-ДК в СКЛ в отсутствие и в присутствии нейтрализующих анти-PD1-антител (5 мкг/мл). * $P_U < 0,05$ – достоверность различий показателей (U-критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

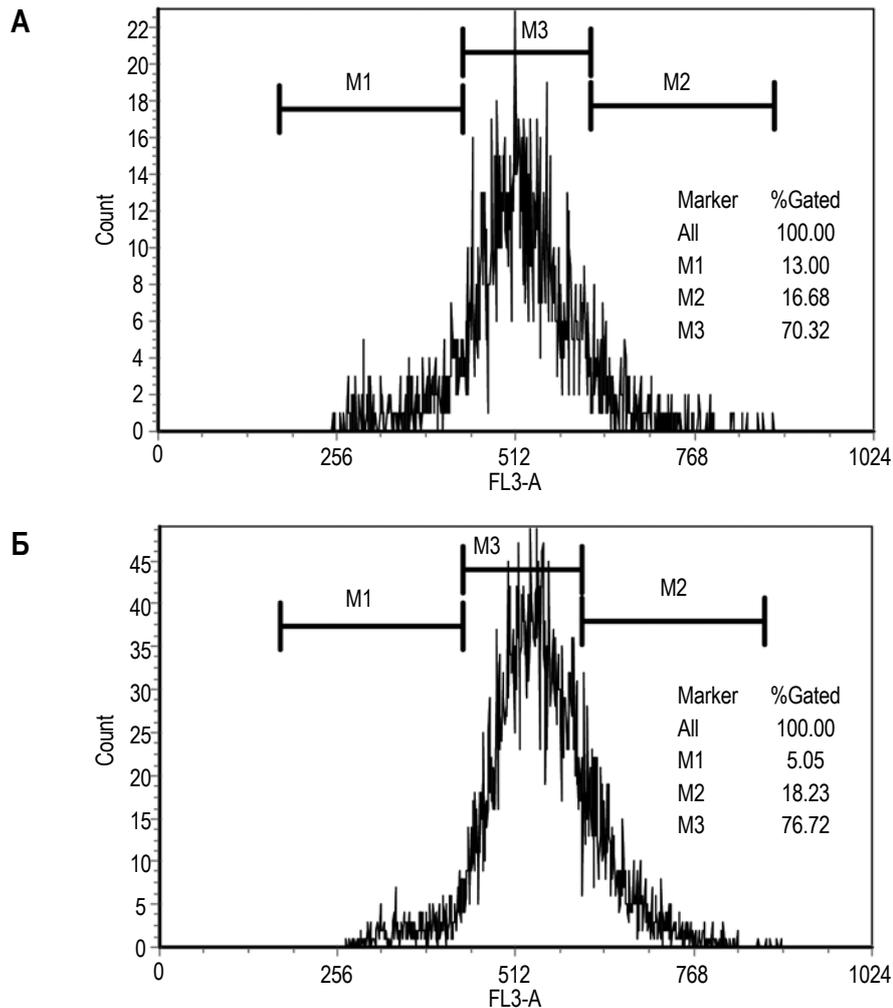


Рисунок 4. Распределение CD8⁺ Т-лимфоцитов по фазам клеточного цикла

Примечание. Представлены индивидуальные значения фаз клеточного цикла и уровня апоптоза CD3⁺CD8⁺ Т-лимфоцитов, активированных аллогенными ИФН-ДК в СКЛ в отсутствие (А) и в присутствии (Б) нейтрализующих анти-PD1-антител (5 мкг/мл). М1 – апоптоз, М2 – клетки в фазе S,G2/M, М3 – клетки в фазе G0/G1.

тических CD3⁺CD4⁺ и CD3⁺CD8⁺Т-лимфоцитов (в среднем на 49 и 44%, соответственно). При этом также регистрировалась отчетливая тенденция к снижению уровня апоптоза в популяции CD16⁺CD56⁺NK-клеток.

Анализ распределения Т-лимфоцитов по фазам клеточного цикла показал, что блокирование В7-Н1/PD-1 сигнального пути не сопровождалось значимым изменением числа покоящихся (G₀/G₁) и/или циклирующих (S+G₂/M) CD3⁺CD4⁺ и CD3⁺CD8⁺Т-клеток. В качестве примера на рисунке 4 приведены индивидуальные значения апоптоза и распределения CD8⁺Т-лимфоцитов по клеточному циклу у одного из обследованных нами доноров. Видно, что количество апоптотических CD8⁺Т-клеток, активированных аллогенными ИФН-ДК в СКЛ в присутствии нейтрализующих анти-PD1-антител, снижалось с 13 до 5%, тогда как доля по-

коящихся и активно пролиферирующих Т-клеток существенно не менялась.

Обсуждение

Цитотоксическая активность является важной эффекторной функцией клеток иммунной системы и играет ключевую роль в элиминации опухолевых и инфицированных вирусом клеток. Недавние исследования показали, что наряду с NK-клетками и цитотоксическими CD8⁺Т-лимфоцитами, прямым цитотоксическим действием обладают также и ДК [14]. Цитотоксический потенциал ДК наиболее хорошо исследован против опухолевых линий. В то же время в литературе имеются лишь отдельные сообщения о том, что клетками-мишенями ДК могут выступать не только трансформированные клетки, но и активированные лимфоциты, включая Т-лимфоциты и NK-клетки.

Исследования на экспериментальных моделях показали, что взаимодействие Т-клеток и ДК через Fas/FasL сигнальный путь приводит к гибели активированных Т-лимфоцитов за счет включения механизма активационно-индуцированной клеточной гибели [18], и данный механизм играет важную роль в поддержании иммунного гомеостаза. Действительно ряд исследователей продемонстрировали, что адоптивный перенос FasL-трансфицированных ДК может контролировать экспансию Т-лимфоцитов при различных патологиях, в том числе при аутоиммунных заболеваниях, опухолях и вирусных инфекциях [11, 18].

В представленной работе, по сути, впервые продемонстрировано, что ДК, генерированные в условиях замены IL-4 на IFN α , так же могут индуцировать апоптоз активированных в аллоСКЛ CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитов и NK-клеток. При этом выявление экспрессии ряда проапоптотических лигандов (TRAIL, FasL, B7-H1) на мембране ИФН-ДК, а также снижение проапоптотической активности ДК, после их обработки растворимыми рецепторами или нейтрализующими антителами к указанным лигандам, позволила сделать заключение о вовлечении молекул семейства TNF и B7-H1/PD-1 сигнального пути в реализации цитотоксического эффекта ИФН-ДК против активированных лимфоцитов. При этом была выявлена различная чувствительность CD4⁺ и CD8⁺Т-клеток к разным проапоптотическим лигандам. Vosque A. и соавт. показали, что IL-2-активированные субпопуляции CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитов характеризуются одинаковой чувствительностью к Fas/FasL регуляции, тогда как CD8⁺ Т-лимфоциты более чувствительны APO2L/TRAIL опосредованному пути [5]. Эти данные подтверждаются также тем фактом, что у пациентов с колоректальным раком наблюдается снижение инфильтрирующих опухоль именно CD8⁺Т-клеток за счет апоптоза, индуцированного опухолевыми клетками через TRAIL-R1/TRAIL взаимодействие [17]. Нами показано, что активированные аллогенными ИФН-ДК в СКЛ CD4⁺Т-лимфоциты в наибольшей степени чувствительны к TRAIL- и Fas/FasL-сигнальному пути индукции апоптоза, тогда как CD8⁺Т-лимфоциты – к TNF α -опосредованному апоптозу. Кроме того установлено, что PD-1/B7-H1 сигнальный путь вносит наибольший вклад в реализации цитотоксической активности ИФН-ДК против обоих типов Т-клеток, а также активированных NK-клеток.

Известно, что активация Т-клеток в СКЛ в ответ на аллоантигены, представленными на ДК, проявляется усилением их пролиферативного ответа. Полученные нами данные позволяют

предположить, что одновременная индукция апоптоза Т-клеток направлена на ограничение пролиферативной активности Т-лимфоцитов и в данном случае может рассматриваться как механизм feed-back регуляции.

Выявленная нами проапоптотическая/цитотоксическая активность ИФН-ДК против активированных лимфоцитов может иметь, по-видимому, двойственное значение. С одной стороны данный механизм может быть направлен на ограничение иммунного ответа и поддержание иммунного гомеостаза. С другой стороны, в условиях патологии повышенная экспрессия проапоптотических молекул на ДК может приводить к подавлению антигенспецифического иммунного ответа и способствовать развитию различных иммунопатологических процессов [12].

Благодарности

Работа поддержана грантом ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (госконтракт № 14.740.11.0007) и грантом РФФИ № 10-04-00280.

Список литературы

1. Леплина О.Ю., Тыринова Т.В., Ступак В.В., Мишинов С.В., Пендюрин И.В., Останин А.А., Черных Е.Р. Эффекторные функции интерферон- α -индуцированных дендритных клеток у здоровых доноров и больных опухолями головного мозга // Российский иммунологический журнал. – 2011. (в печати)
2. Сахно Л.В., Тихонова М.А., Леплина О.Ю., Тыринова Т.В., Никонов С.Д., Жданов О.А., Останин А.А., Черных Е.Р. Роль PD-1/B7-H1-опосредованного пути в нарушении антигенспецифического ответа у больных туберкулезом легких // Иммунология. – 2011. – № 2. – С. 89-95.
3. Селедцова Н.В., Хонина Н.А., Тихонова М.А., Останин А.А., Пасман Н.М., Черных Е.Р. Влияние дегидроэпиандростерона сульфата на фенотип и функции дендритных клеток *in vitro* // Мед. иммунология. – 2007. – Т. 9, № 6. – С. 589-596.
4. Belkaid Y., Oldenhove G. Tuning microenvironments: induction of regulatory T cells by dendritic cells // Immunity. – 2008. – Vol. 29. – P. 362-371.
5. Bosque A., Pardo J., Martinez-Lorenzo M.J., Lasierra P., Larrad L., Marzo I., Naval J., Anel A. Human CD8⁺ T cell blasts are more sensitive than CD4⁺ T cell blasts to regulation by APO2L/TRAIL // Eur. J. Immunol. – 2005. – Vol. 35. – P. 1812-1821.
6. Buonocore S., Haddou N.O., Moore F., Florquin S., Paulart F., Heirman C., Thielemans K., Goldman M., Flamand V. Neutrophil-dependent

tumor rejection and priming of tumoricidal CD8⁺ T cell response induced by dendritic cells overexpressing CD95L // *J. Leukoc. Biol.* – 2008. – Vol. 84. – P. 713-720.

7. Chauvin C., Josien R. Dendritic cells as killers: mechanistic aspects and potential roles // *J. Immunol.* – 2008. – Vol. 181. – P. 11-16.

8. Dudley E., Hornung F., Zheng L., Scherer D., Ballard D., Lenardo M. NF-kappaB regulates Fas/APO-1/CD95- and TCR-mediated apoptosis of T lymphocytes // *Eur. J. Immunol.* – 1999. – Vol. 29. – P. 878-886.

9. Hoves S., Krause S.W., Herfarth H., Halbritter D., Zhang H.G., Mountz J.D., Schirmerich J., Fleck M. Elimination of activated but not resting primary human CD4⁺ and CD8⁺ T cells by Fas ligand (FasL/CD95L)-expressing killer-dendritic cells // *Immunobiology.* – 2004. – Vol. 208. – P. 463-475.

10. Janjic B.M., Lu G., Pimenov A., Whiteside T.L., Storkus W.J., Vujanovic N.L. Innate direct anticancer effector function of human immature dendritic cells. I. Involvement of an apoptosis-inducing pathway // *J. Immunol.* – 2002. – Vol. 168. – P. 1823-1830.

11. Kim S.H., Bianco N., Menon R., Lechman E.R., Shufesky W.J., Morelli A.E., Robbins P.D. Exosomes derived from genetically modified DC expressing FasL are anti-inflammatory and immunosuppressive // *Mol. Ther.* – 2006. – Vol. 13. – P. 289-300.

12. Langlois R.A., Legge K.L. Plasmacytoid dendritic cells enhance mortality during lethal influenza infections by eliminating virus-specific CD8 T-cells // *J. Immunol.* – 2010. – Vol. 184. – P. 4440-4446.

13. Lu G., Janjic B.M., Janjic J., Whiteside T.L., Storkus W.J., Vujanovic N.L. Innate direct anticancer

effector function of human immature dendritic cells. II. Role of TNF, lymphotoxin- α 1 β 2, Fas ligand, and TNF-related apoptosis-inducing ligand // *J. Immunol.* – 2002. – Vol. 168. – P. 1831-1839.

14. Rissoan M.C., Duhon T., Wesa A.K., Storkus W.J. Killer dendritic cells: mechanisms of action and therapeutic implications for cancer // *Cell Death Differ.* – 2008. – Vol. 15. – P. 51-57.

15. Sharpe A.H., Wherry E.J., Ahmed R., Freeman G.J. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection // *Nature Immunology.* – 2007. – Vol. 8. – P. 239-245.

16. Stary G., Klein I., Kohlhofer S., Koszik F., Scherzer T., Mllauer L., Quendler H., Kohrgruber N., Stingl G. Plasmacytoid dendritic cells express TRAIL and induce CD4⁺ T-cell apoptosis in HIV-1 viremic patients // *Blood.* – 2009. – Vol. 114. – P. 3854-3863.

17. Waaga-Gasser A., Grimm M., Kim M., Rosenwald A., Germer C. T., Gasser M. Use of tumor-mediated TRAIL-receptor expression to evaluate apoptotic depletion of infiltrating CD8⁺ immune cells in clinical colorectal cancer // *J. Clin. Oncol.* – 2010. – Vol. 28, N 15 (Suppl. 1). – abstr. E21038.

18. Wolfe T., Asseman C., Hughes A., Matsue H., Takashima A., von Herrath M.G. Reduction of antiviral CD8 lymphocytes in vivo with dendritic cells expressing Fas ligand increased survival of viral (lymphocytic choriomeningitis virus) central nervous system infection // *J. Immunol.* – 2002. – Vol. 169. – P. 4867-4872.

поступила в редакцию 28.07.2011

принята к печати 16.10.2011