

# PD-1/B7-H1-ОПОСРЕДОВАННАЯ ПРО-АПОПТОГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК КАК ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ НАРУШЕНИЯ АНТИГЕН- СПЕЦИФИЧЕСКОГО ОТВЕТА У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ

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

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

<sup>2</sup> ОГУЗ Новосибирская клиническая туберкулезная больница № 1, г. Новосибирск

**Резюме.** Целью работы явилось изучение PD-1/B7-H1-сигнального пути индукции апоптоза и анергии Т-клеток, как одного из возможных механизмов снижения антиген-специфического ответа против *M. tuberculosis*. Было обследовано 76 больных туберкулезом легких (ТБЛ), различающихся по уровню ответа на туберкулиновый очищенный белковый дериват (PPD). Установлено, что у больных ТБЛ дендритные клетки (ДК), генерированные *in vitro* из моноцитов крови в присутствии GM-CSF+IFN $\alpha$ , характеризуются повышенной экспрессией B7-H1, высоким уровнем продукции IL-10 и низкой аллостимуляторной активностью в СКЛ. Показано также, что ДК больных ТБЛ усиливают апоптоз и блокируют клеточное деление Т-лимфоцитов в алло-СКЛ. Таким образом, ДК больных ТБЛ обладают повышенным толерогенным потенциалом, поскольку через PD-1/B7-H1-сигнальный путь в комбинации с IL-10 индуцируют апоптоз/анергию отвечающих Т-клеток. Нейтрализующие анти-PD1-антитела частично отменяют про-апоптогенный/толерогенный эффект ДК. Выявленный феномен, очевидно, имеет клиническое значение, поскольку наиболее ярко проявляется у больных ТБЛ с низким антиген-специфическим ответом на PPD.

**Ключевые слова:** B7-H1, дендритные клетки, PD-1, Т-клетки, апоптоз, туберкулез легких.

Sakhno L.V., Tikhonova M.A., Tyrinova T.V., Leplina O.Yu., Nikonov S.D., Zhdanov O.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R.

**THE PD-1/B7-H1-MEDIATED PRO-APOPTOTIC ACTIVITY OF DENDRITIC CELLS AS A POSSIBLE MECHANISM OF ANTIGEN-SPECIFIC RESPONSE FAILURE IN PATIENTS WITH PULMONARY TUBERCULOSIS**

**Abstract.** The aim of present study was to investigate PD-1/B7-H1-mediated induction of T-cell apoptosis/ anergy, a suggested mechanism of reduced antigen-specific immune response against *M. tuberculosis*. We examined 76 patients with pulmonary tuberculosis (PT) who differed in levels of proliferative response to specific antigen (purified protein derivative, PPD). It was revealed that *in vitro* generated dendritic cells (DCs) from the patient's blood monocytes with GM-CSF+IFN $\alpha$ , were characterized by increased B7-H1 expression, upregulation of IL-10 production, and

**Адрес для переписки:**

Сахно Людмила Васильевна,  
НИИ клинической иммунологии СО РАМН  
630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.  
Тел.: (383) 236-03-29.  
E-mail: ct\_lab@mail.ru

reduced allostimulatory activity in mixed lymphocyte culture (MLC). Moreover, DCs of PT patients were able to enhance T-cell apoptosis, and to block T-cell division in MLC. Thus, the patients' DCs exhibited the higher tolerogenic potential since these DCs could induce apoptosis/anergy in responsive T-cells *via* PD-1/B7-H1-mediated pathway combined with IL-10 effects. It was shown that neutralizing anti-PD1-antibodies partially abolished the pro-apoptogenic/tolerogenic effect of DCs. The revealed phenomenon of PD-1/B7-H1-mediated pro-apoptogenic activity should be of obvious clinical significance, since the cytotoxic/tolerogenic potential of DCs was especially pronounced in the patients with low antigen-specific response to PPD. (*Med. Immunol.*, 2012, vol. 14, N 1-2, pp 59-66)

*Keywords:* B7-H1, dendritic cells, PD-1, T-cells, apoptosis, pulmonary tuberculosis.

## Введение

Известно, что запуск программы апоптоза Т-лимфоцитов происходит через рецептор программированной клеточной смерти (PD-1), который относится к семейству CD28/CTLA-4 молекул и появляется на мембране CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов после их активации через Т-клеточный рецептор. Идентифицированы два типа лигандов для PD-1, один из которых, обозначенный как PD-L2 (B7-DC или CD273), является индуцибельным и обнаруживается на дендритных клетках (ДК), макрофагах (Мф) и культивированных тучных клетках костно-мозгового происхождения [12]. Другой лиганд — PD-L1 (B7-H1 или CD274) конститутивно экспрессируется на Т- и В-клетках, ДК и Мф, тем не менее уровень экспрессии B7-H1 может также повышаться на активированных клетках [10, 12].

Многие микроорганизмы, которые вызывают хроническую инфекцию, используют PD-1/B7-H1-опосредованный путь индукции апоптоза Т-клеток с целью выключения эффекторных иммунных реакций хозяина [5, 12, 15]. При персистирующих инфекциях генерируются толерогенные ДК/Мф с повышенной экспрессией B7-H1 и низкой экспрессией костимуляторных молекул CD80 и CD86. В свою очередь, на Т-лимфоцитах, активированных антигенами патогенных микроорганизмов, повышается экспрессия рецептора PD-1. Связывание PD-1 с PD-L1 через определенные сигнальные пути может приводить к повышенной гибели антиген-специфических лимфоцитов [7, 12]. Про-апоптогенная/цитотоксическая функция ДК, особенно генерируемых в присутствии интерферона- $\alpha$  (IFN $\alpha$ ), активно обсуждается в последние годы в связи с выявленной способностью ДК лизировать клетки различных опухолевых линий [14]. Однако возможное участие PD-1/B7-H1 сигнального пути в нарушении антиген-специфического ответа у больных туберкулезом легких (ТБЛ) остается практически не изученным.

Многочисленными работами, а также нашими собственными исследованиями показано, что повышенный апоптоз и анергия Т-клеток являются характерным атрибутом туберкулез-

ной инфекции [1, 2, 3, 9]. С другой стороны, ДК больных ТБЛ, генерируемые из моноцитов крови в присутствии IFN $\alpha$ , характеризуются признаками толерогенной активности, в частности повышенной продукцией IL-6 и IL-10 и сниженной аллостимуляторной активностью в смешанной культуре лимфоцитов [1]. Следует отметить, что IL-10 обладает стимулирующим влиянием на экспрессию B7-H1 [6]. Учитывая эти факты, мы предположили, что апоптоз/анергия Т-клеток при туберкулезной инфекции могут быть результатом активации PD-1/B7-H1 сигнального пути при взаимодействии Т-лимфоцитов с ДК. При таком представлении про-апоптогенная/цитотоксическая активность ДК может являться одним из возможных механизмов нарушения антиген-специфического иммунного ответа против *M. tuberculosis*. Настоящая работа была посвящена проверке высказанной гипотезы.

## Материалы и методы

В исследование были включены 76 больных туберкулезом легких, в том числе 47 мужчин и 29 женщин в возрасте от 16 до 63 лет, включая 28 пациентов с фиброзно-кавернозной, 38 пациентов с инфильтративной и 10 пациентов с диссеминированной формой ТБЛ. Активное бацилловыделение (БК<sup>+</sup>) было выявлено у 46 больных, лекарственная резистентность — у 16 пациентов. Обследование больных проводили после получения информированного согласия. Контрольную группу составили 30 здоровых доноров крови, сопоставимых по полу и возрасту.

Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли из гепаринизированной венозной крови центрифугированием в градиенте плотности фиколла-верографина и культивировали ( $0,1 \times 10^6$ /лунку) в 96-луночных планшетах для иммунологических исследований в среде RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, США), дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 5 мМ HEPES-буфера, 100 мкг/мл гентамицина и 10% инактивированной сыворотки доноров крови IV (AB) группы при 37 °C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Для стимуляции клеток использовали туберкулиновый очищенный белковый дериват (PPD) в дозе 50 мкг/мл. Интенсивность

пролиферации оценивали на 6 сут по включению  $^3\text{H}$ -тимидина (1 мкКи/лунку), добавленного за 18 ч до окончания культивирования. В зависимости от уровня пролиферативного ответа больные были разделены на 2 подгруппы – с сохранным ( $> 12500$  имп/мин;  $n = 50$ ; подгруппа 1) и сниженным ( $< 12500$  имп/мин;  $n = 26$ ; подгруппа 2) ответом на PPD.

Моноциты выделяли в 6-луночных планшетах (Nunclon, Дания) путем прилипания к пластику МНК ( $3 \times 10^6$  клеток/мл) в присутствии 5% сыворотки АВ(IV) группы. ДК генерировали из моноцитов в течение 4 сут в среде RPMI-1640 с 5% сыворотки плодов коровы (Биолот, СПб) в присутствии GM-CSF (40 нг/мл, Sigma-Aldrich) и IFN $\alpha$  (1000 Ед/мл, Роферон-А, Roche, Швейцария) с последующим созреванием в течение 24 ч в присутствии 10 мкг/мл липополисахарида (LPS *E. coli* 0111:B4, Sigma-Aldrich).

Оценку экспрессии В7-Н1 на ДК проводили с использованием моноклональных анти-В7-Н1-антител (PharMingen, США), меченных фикоэритрином (PE) методом проточной цитофлуориметрии (FASC Calibur, Becton Dickinson, США). В культуральных супернатантах генерированных ДК определяли концентрацию IL-10 с помощью наборов для иммуноферментного анализа в соответствии с инструкцией фирмы-производителя («Вектор-Бест», г. Новосибирск).

Аллостимуляторную активность ДК оценивали в смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ) при культивировании МНК доноров ( $0,1 \times 10^6$ /лунку) в 96-луночных круглодонных планшетах в присутствии аллогенных ДК здоровых доноров или больных ТБ в соотношении 10:1. Интенсивность пролиферации оценивали на 5 сут радиометрически по включению  $^3\text{H}$ -тимидина. Индекс влияния ДК (ИВ $_{\text{ДК}}$ ) в СКЛ рассчитывали как отношение пролиферативного ответа МНК в присутствии ДК к уровню спонтанной пролиферации МНК. В дополнительной серии экспериментов уровень апоптоза Т-клеток в 3-суточной алло-СКЛ и пролиферативный ответ в 5-суточной алло-СКЛ оценивали в отсутствие (контроль) и в присутствии (опыт) нейтрализующих антител против PD-1 (5 мкг/мл, J116; eBioscience; Functional Grade Purified). Для оценки эффекта анти-PD1-антител на уровень пролиферативного ответа в СКЛ рассчитывали индекс влияния по формуле  $\text{ИВ}_{\text{анти-PD1}} = \text{опыт}/\text{контроль}$ .

Экспрессию PD-1, уровень апоптоза и распределение Т-лимфоцитов по фазам клеточного цикла оценивали в 3-суточной алло-СКЛ (как описано выше). Культуры дублировали в 12 идентичных повторях, с целью получения клеток в количестве, достаточном для проведения цитофлуориметрического анализа. Для оценки экспрес-

сии PD-1 на CD4 $^+$  и CD8 $^+$ (CD4 $^-$ ) Т-лимфоцитах МНК (свежевыделенные или стимулированные в алло-СКЛ) инкубировали с FITC-мечеными анти-CD3, PE-мечеными анти-CD4 (Сорбент, Москва) и APC-мечеными анти-PD-1 антителами (Becton Dickinson). Клеточный цикл и уровень апоптоза CD4 $^+$  и CD8 $^+$ (CD4 $^-$ ) Т-клеток оценивали методом трехцветной проточной цитометрии. Для этого, 25 мкл МНК ( $1,0 \times 10^6$ ), полученные 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 (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 парафармальдегида. 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 G $_0$ /G $_1$  фазах клеточного цикла) и гипердиплоидным (клетки в S, G $_2$ /M фазах клеточного цикла) набором ДНК определяли гейтах CD3 $^+$ CD4 $^+$  или CD3 $^+$ CD8 $^+$  (CD4 $^-$ ) Т-лимфоцитов (зеленая и оранжевая флуоресценция). Апоптотические клетки, ДНК которых подвергалась фрагментации, формировали характерный гиподиплоидный пик. Результаты выражались в виде процентного соотношения позитивных клеток к общему количеству CD3 $^+$ CD4 $^+$  и CD3 $^+$ CD8 $^+$ Т-лимфоцитов (не менее 10000).

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета прикладных программ «Statistica 6.0». Для выявления значимых различий сравниваемых показателей использовали непараметрический U-критерий Вилкоксона–Манна–Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ . Для исследования корреляционных взаимосвязей между признаками использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена

## Результаты

Для того чтобы оценить участие PD-1/В7-Н1-сигнального пути, как одного из возможных механизмов снижения антиген-специфического ответа против *M. tuberculosis*, нами был проведен сравнительный анализ относительного содер-

жания PD-1<sup>+</sup>T-клеток среди свежевыделенных МНК периферической крови доноров и больных ТБЛ, оппозитных по уровню пролиферативного ответа на PPD (табл. 1). Видно, что именно у больных с PPD-анергией (подгруппа № 2) относительное содержание PD-1<sup>+</sup>CD4 и PD-1<sup>+</sup>CD8 T-лимфоцитов было достоверно выше, чем у здоровых доноров. Тогда как у больных ТБЛ с сохранным ответом на PPD увеличение количества CD4 и CD8 T-клеток, экспрессирующих PD-1, не было статистически значимым.

При исследовании ДК, генерированных *in vitro* в присутствии IFN $\alpha$ , было установлено, что PPD-анергичные больные характеризовались наиболее высоким содержанием V7-N1<sup>+</sup>ДК (68,8 $\pm$ 3,9 против 42,3 $\pm$ 4,4% у доноров,  $p_u < 0,05$ ). В подгруппе PPD-реактивных пациентов также отмечалось достоверное, но не такое выраженное, увеличение относительного количества V7-N1<sup>+</sup>ДК (в среднем до 58,0 $\pm$ 3,6%,  $p_u < 0,05$ ). ДК больных ТБЛ в отличие от здоровых доноров активно секретируют IL-10 (табл. 1), при этом уровень продукции IL-10 был максимально высоким у PPD-анергичных пациентов. Важно отметить, что и в группе больных ТБЛ, и в группе здоровых доноров между интенсивностью продукции IL-10 и уровнем экспрессии V7-N1 на ДК обнаруживалась прямая корреляционная взаимосвязь ( $r = 0,51$  и  $r = 0,82$  соответственно;  $p < 0,0001$ ). Наличие такой тесной сопряженности свидетельствует, очевидно, об участии аутокринных механизмов регуляции экспрессии молекулы V7-N1 на ДК через эндогенную продукцию IL-10.

Сравнительная оценка функциональной активности ДК по их способности стимулировать

пролиферацию T-клеток в ответ на аллоантигены в СКЛ, выявила снижение аллостимуляторной активности ДК больных ТБЛ (табл.1), которое у пациентов с PPD-анергией было более значимым.

Известно, что активация T-клеток сопровождается увеличением экспрессии PD-1. Действительно, в алло-СКЛ после со-культивирования МНК с ДК доноров или больных ТБЛ, относительное количество PD-1<sup>+</sup>CD4 T-лимфоцитов увеличивалось соответственно до 5,5 $\pm$ 0,5 и 9,2 $\pm$ 1,2%, а содержание PD-1<sup>+</sup>CD8 T-клеток до 8,3 $\pm$ 1,3 и 7,8 $\pm$ 0,6% ( $p_u < 0,05$ ). Таким образом, низкий пролиферативный ответ T-клеток в алло-СКЛ может быть обусловлен повышенным толерогенным потенциалом ДК больных ТБЛ, которые через PD-1/V7-N1-сигнальный путь в комбинации с IL-10 могут индуцировать апоптоз/анергию отвечающих T-лимфоцитов. Выявленный феномен, очевидно, имеет клиническое значение, поскольку наиболее ярко проявляется у больных ТБЛ с низким антиген-специфическим ответом на PPD.

Чтобы проверить, действительно ли увеличение количества PD-1-позитивных T-лимфоцитов в присутствии ДК в алло-СКЛ сопряжено с клеточной гибелью, провели сравнительную оценку уровня апоптоза и количества пролиферирующих T-лимфоцитов. Из данных таблицы 2 видно, что среди свежевыделенных МНК периферической крови здоровых доноров содержание апоптотических и делящихся CD3<sup>+</sup>CD4 и CD3<sup>+</sup>CD8 T-клеток сбалансировано между собой и не превышает в среднем 3%. Активация T-клеток аллоантигенами, представленными на ДК доноров, сопровождается увеличением относительного

**ТАБЛИЦА 1. СВОЙСТВА ДК, ГЕНЕРИРОВАННЫХ *IN VITRO*, И КОЛИЧЕСТВО PD1<sup>+</sup>T-КЛЕТОК *IN VIVO* В ГРУППАХ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ ТБЛ, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО УРОВНЮ ОТВЕТА НА PPD (M $\pm$ SE)**

Показатель	Здоровые доноры	Больные ТБЛ	
		Подгруппа № 1 (PPD ответ > 12500 имп/мин)	Подгруппа № 2 (PPD ответ < 12500 имп/мин)
Ответ на PPD (имп/мин)	26944 $\pm$ 3393 (30)	33700 $\pm$ 1540 (50)	9340 $\pm$ 670 * # (26)
1. Количество PD1 <sup>+</sup> T-клеток <i>in vivo</i>			
PD1 <sup>+</sup> CD4 T-клетки (%)	3,2 $\pm$ 0,7 (7)	4,8 $\pm$ 1,2 (4)	6,6 $\pm$ 1,6 * (5)
PD1 <sup>+</sup> CD8 T-клетки (%)	2,5 $\pm$ 0,5 (7)	3,8 $\pm$ 1,1(4)	4,3 $\pm$ 0,2 * (5)
2. Свойства ДК <i>in vitro</i>			
V7-N1 <sup>+</sup> ДК (%)	42,3 $\pm$ 4,4 (19)	58,1 $\pm$ 3,6 * (32)	68,8 $\pm$ 3,9 * (12)
Продукция IL-10 (пкг/мл)	347 $\pm$ 92 (20)	797 $\pm$ 70 * (25)	921 $\pm$ 95 * (6)
Аллостимуляторная активность ДК в СКЛ (имп/мин)	12113 $\pm$ 1263 (24)	6173 $\pm$ 1126 * (32)	1983 $\pm$ 366 * # (12)
ИВ <sub>ДК</sub> в алло-СКЛ (расч. ед)	11 $\pm$ 0,8 (24)	8,6 $\pm$ 1,2 * (32)	4,0 $\pm$ 0,7 * # (12)

**Примечание.** В скобках – количество наблюдений. \* –  $p_u < 0,05$  – достоверность различий показателей по сравнению с донорами. # –  $p_u < 0,05$  – достоверность различий показателей по сравнению с подгруппой № 1. Здесь и далее в таблицах: U-критерий Вилкоксона–Манна–Уитни.

количества как апоптотических, так и пролиферирующих CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов до 10 и 13%, соответственно ( $p_u < 0,05$ ). Но и в этом случае, процессы позитивной (индукция пролиферации) и негативной (индукция апоптоза) активации Т-клеток протекают с примерно равной интенсивностью.

По сравнению с донорами дендритные клетки PPD-анергичных пациентов (подгруппа № 2) индуцировали более выраженный апоптоз CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов (соответственно  $19,3 \pm 2,9$  и  $34,9 \pm 5,0\%$ ,  $p_u < 0,05$ ). Про-апоптогенная активность дендритных клеток PPD-реактивных пациентов была менее выраженной, и проявлялась преимущественно в отношении CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>Т-клеток, тогда как в отношении CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов не была статистически значимой ( $p_u = 0,061$ ). Следует отметить, что усиление апоптоза Т-клеток в присутствии ДК больных ТБЛ происходило на фоне незначительного прироста активно пролиферирующих Т-лимфоцитов (менее 10%). Видно, что в этом случае баланс между процессами апоптоза и клеточного деления в CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> популяциях сдвигается в негативную сторону, поскольку количество апоптотических Т-лимфоцитов в алло-СКЛ с ДК больных ТБЛ (особенно в группе PPD-анергичных пациентов) существенно превышает число пролиферирующих Т-клеток.

Чтобы убедиться, что апоптоз Т-клеток при их взаимодействии с ДК опосредуется непосредственно через В7-Н1/PD-1 сигнальный путь, была проведена дополнительная серия экспериментов с использованием блокирующих анти-PD-1 антител (рис. 1). Добавление нейтрализующих анти-PD-1 антител в 3-суточной СКЛ,

стимулированной ДК здоровых доноров, сопровождалось снижением апоптоза CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>Т-клеток на 49 и 44%, соответственно (рис. 1А). В культурах, стимулированных ДК больных ТБЛ, эффект был несколько менее выраженным (снижение в среднем на 35%), но также статистически значимым (рис. 1Б).

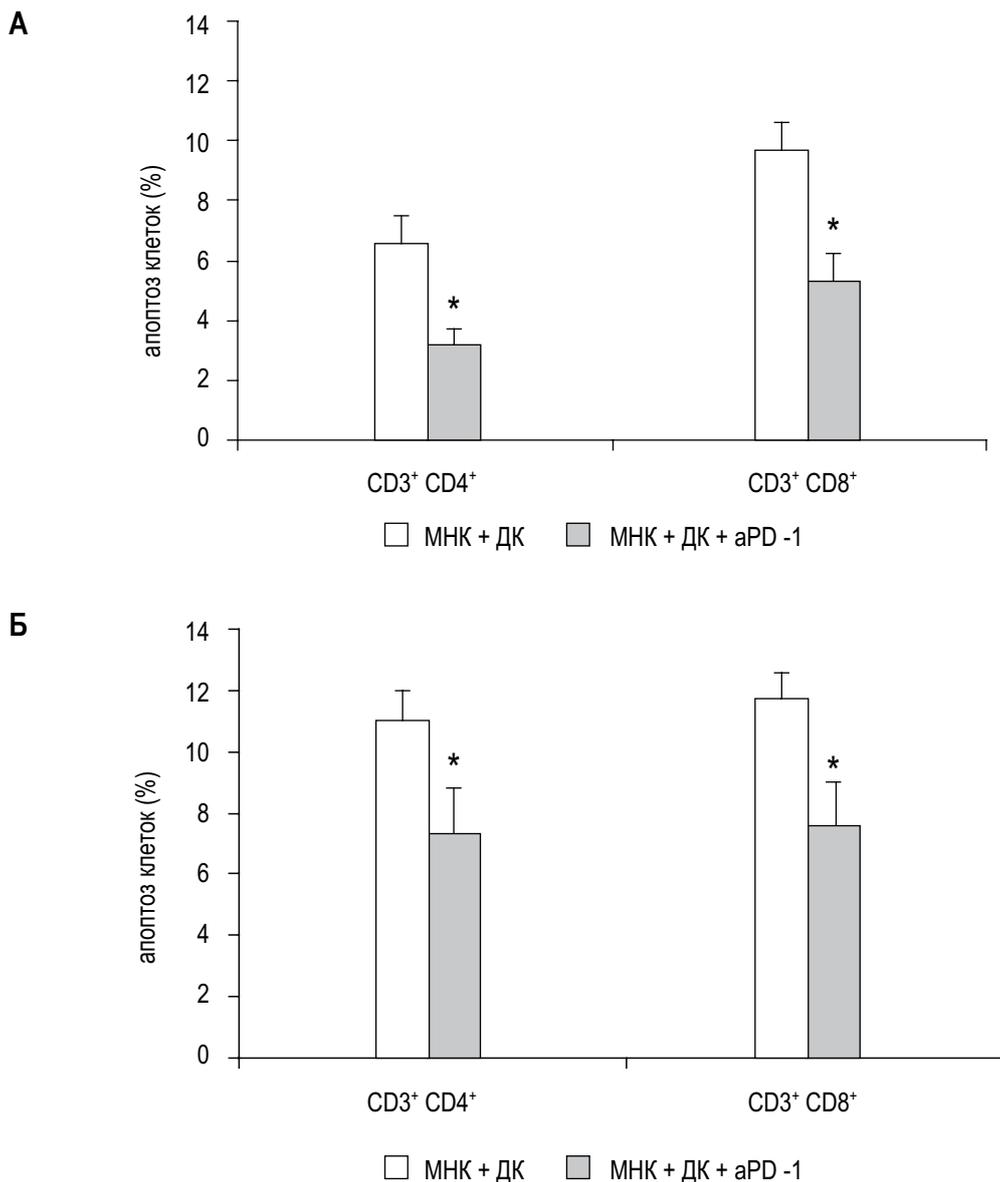
Следует отметить, что блокирование В7-Н1/PD-1 сигнального пути не приводило к достоверному увеличению числа CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>Т-клеток, находящихся в S<sub>2</sub>G<sub>2</sub>/M фазах клеточного цикла (данные не представлены). Тем не менее, анализ влияния анти-PD-1 антител на пролиферативный ответ Т-клеток здоровых доноров в 5-суточной СКЛ показал, что эффект нейтрализующих антител прямо зависел от уровня экспрессии В7-Н1 на ДК больных ТБЛ ( $r = 0,65$ ;  $p < 0,05$ ;  $n = 10$ ). Так, у пациентов, у которых среди генерированных *in vitro* ДК количество В7-Н1<sup>+</sup>клеток выходило за верхнюю квартильную границу нормативного диапазона (> 67%) и составляло в среднем  $81 \pm 6\%$ , добавление анти-PD-1 антител сопровождалось 2-кратным усилением пролиферации отвечающих Т-клеток ( $ИВ_{АНТИ-PD1} = 1,8 \pm 0,2$  расч. ед.). В свою очередь, в оппозитной группе больных ТБЛ, у которых количество генерированных В7-Н1<sup>+</sup>ДК было достоверно меньше и составляло в среднем  $49 \pm 5\%$ , нейтрализующие антитела не влияли на уровень пролиферативного ответа Т-клеток в СКЛ ( $ИВ_{АНТИ-PD1} = 0,92 \pm 0,06$  расч. ед.;  $p_u = 0,016$ ).

Полученные в целом данные подтверждают предположение о том, что ДК, генерируемые *in vitro* в присутствии IFN $\alpha$ , способны индуцировать апоптоз/анергию Т-клеток через В7-Н1/PD-1 сигнальный путь. При этом усиление экспрессии В7-Н1 на ДК больных ТБЛ обуслов-

**ТАБЛИЦА 2. ОТНОСИТЕЛЬНОЕ КОЛИЧЕСТВО АПОПТОТИЧЕСКИХ И ПРОЛИФЕРИРУЮЩИХ CD4<sup>+</sup> И CD8<sup>+</sup>Т-ЛИМФОЦИТОВ СРЕДИ МНК ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ**

Показатель	Свежевыделенные МНК (n = 7)	МНК, стимулированные в алло-СКЛ		
		МНК+ДК доноров (n = 11)	МНК+ДК больных ТБЛ (подгруппа № 1, n = 21)	МНК+ДК больных ТБЛ (подгруппа № 2, n = 13)
1. Количество апоптотических Т-клеток (%)				
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> Т-клетки	2,8 $\pm$ 0,4	10,5 $\pm$ 2,2	14,7 $\pm$ 2,8	19,3 $\pm$ 2,9 *
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> Т-клетки	3,0 $\pm$ 0,5	10,3 $\pm$ 2,6	21,6 $\pm$ 3,3 *	34,9 $\pm$ 5,0 * #
2. Количество пролиферирующих (в S <sub>2</sub> G <sub>2</sub> /M фазе цикла) Т-клеток (%)				
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> Т-клетки	2,2 $\pm$ 0,4	12,9 $\pm$ 2,0	8,7 $\pm$ 1,5	7,9 $\pm$ 1,1
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> Т-клетки	2,4 $\pm$ 0,9	12,9 $\pm$ 2,6	9,6 $\pm$ 1,8	7,3 $\pm$ 3,0

**Примечание.** Представлено относительное (%) содержание апоптотических и пролиферирующих CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>Т-клеток среди свежевыделенных МНК здоровых доноров, а также среди МНК, активированных в течение 3 сут в алло-СКЛ в присутствии ДК доноров или больных ТБ в соотношении 10:1. \* –  $p_u < 0,05$  – достоверность различий показателей по сравнению с ДК доноров. # –  $p_u < 0,05$  – достоверность различий показателей между группами больных ТБ со сниженным (подгруппа № 2) и сохранным ответом на PPD (подгруппа № 1).



**Рисунок 1. Влияние нейтрализующих анти-PD1-антител на уровень апоптоза Т-клеток ( $M \pm SE$ )**

**Примечание.** Представлены средние значения относительного количества апоптотических CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>Т-клеток в алло-СКЛ в присутствии ДК здоровых доноров ( $n = 12$ , рис. 1А) и больных ТБЛ ( $n = 10$ , рис. 1Б) в отсутствие и в присутствии нейтрализующих анти-PD1-антител (5 мкг/мл).

\*  $p < 0,05$  – достоверность различий показателей.

ливают их повышенную про-апоптогенную активность, что может являться одной из причин снижения антиген-специфического ответа при туберкулезной инфекции.

## Обсуждение

Усиление апоптоза Т-клеток при туберкулезе легких является известным фактом [3, 9]. Недавно Jugado J.O. с соавт. показали, что этому может способствовать увеличение в периферической крови и в плевральной жидкости больных CD3<sup>+</sup>Т-лимфоцитов, экспрессирующих PD-1 [10]. Дан-

ный рецептор «смерти» взаимодействует с 2 лигандами, одним из которых является молекула В7-Н1, которая экспрессируется на поверхности лимфоцитов, макрофагов и дендритных клеток [7, 12]. Участие PD-1/В7-Н1 сигнального пути в развитии Т-клеточных дисфункций (апоптоза, анергии) обсуждается при ряде иммунопатологических процессов инфекционной и аутоиммунной природы [7, 11, 12]. Усиление экспрессии молекулы В7-Н1 на опухоль-инфильтрирующих миелоидных ДК рассматривается в качестве механизма подавления противоопухолевого иммунного ответа [6].

Полученные нами данные впервые демонстрируют, что ДК больных ТБЛ, генерируемые *in vitro* в присутствии GM-CSF+IFN $\alpha$ , характеризуются повышенной экспрессией В7-Н1 и высоким уровнем продукции IL-10. Curiel T.J. с соавт., а также другие исследователи показали, что экспрессия В7-Н1 на ДК может усиливаться под действием IL-10 (например, в опухолевом микроокружении) [6], или под влиянием IFN $\alpha$  и IFN $\gamma$  [5]. При исследовании ДК здоровых доноров и больных ТБЛ нами также была выявлена прямая сопряженность между интенсивностью продукции IL-10 и уровнем экспрессии В7-Н1, что указывает на участие IL-10 в аутокринных механизмах регуляции экспрессии молекулы В7-Н1 на ДК.

Вторым важным моментом, который следует из полученных результатов, является тот факт, что описанная нами ранее и другими авторами сниженная аллостимуляторная активность ДК больных ТБЛ в СКЛ ассоциирована с более высоким уровнем апоптоза и блоком клеточного цикла Т-лимфоцитов [1, 8, 13]. Это позволяет предположить, что более высокая экспрессия В7-Н1 на ДК больных ТБЛ сопряжена с усилением про-апоптогенной/толерогенной активности ДК. Подтверждением тому служат данные об усилении экспрессии PD-1 на Т-клетках в ответ на активацию аллоантигенами в СКЛ, а также то, что нейтрализующие анти-PD-1 антитела, блокируя PD-1/В7-Н1 сигнальный путь, частично отменяют про-апоптогенный/толерогенный эффект ДК. Причем поскольку ДК доноров и больных ТБЛ практически в равной степени индуцируют экспрессию PD-1 на CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитах, то усиление апоптоза Т-клеток в СКЛ, индуцированной ДК больных, очевидно, связано именно с повышенным уровнем экспрессии В7-Н1. Участие миелоидных ДК с повышенной экспрессией В7-Н1 в супрессии Т-клеточных иммунных реакций отмечается у больных с хроническим гепатитом В [5]. Причем блокирование В7-Н1-опосредуемого сигнала приводит к снижению продукции IL-10 дендритными клетками и усилению их аллостимуляторной активности и секреции IL-12.

Важно также отметить, что, несмотря на более высокий уровень про-апоптогенной активности ДК больных туберкулезом, ДК доноров также индуцируют апоптоз Т-клеток, который значимо снижался в присутствии нейтрализующих анти-PD-1 антител. Можно полагать, что цитотоксическая активность ДК имеет определенное значение и в физиологических условиях, например при ограничении иммунного ответа.

Однако чрезмерно высокий уровень экспрессии В7-Н1 на ДК четко ассоциируется с уси-

нием их про-апоптогенной активности, а также индуцирует появление толерогенных свойств в виде способности блокировать прохождение Т-лимфоцитами клеточного цикла. В целом, взаимодействие Т-клеток с такими ДК может приводить к нарушению антиген-специфического ответа. Действительно, полученные нами данные свидетельствуют что, ДК PPD-анергичных больных, имеющих наиболее высокий уровень экспрессии В7-Н1, характеризуются в СКЛ более низкой способностью стимулировать пролиферацию Т-клеток и более высокой способностью индуцировать апоптоз Т-лимфоцитов по сравнению с ДК пациентов с сохранным ответом на PPD.

В заключении следует отметить, что анти-PD1 антитела не полностью отменяют апоптоз Т-клеток, индуцированный ДК доноров и больных ТБЛ. Это указывает на возможное участие и других механизмов апоптоза, которые могут опосредоваться, например, через Fas-L, TRAIL/TNF $\alpha$  или перфорин. Роль указанных молекул в запуске запрограммированной клеточной гибели продемонстрирована при исследовании цитотоксической активности ДК против клеток опухолевых линий [4]. Возможно, что этим фактом (т.е. вовлечением других механизмов) объясняется и различная чувствительность CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>Т-клеток к апоптогенному эффекту ДК больных ТБЛ, несмотря на сопоставимый уровень экспрессии молекулы PD-1 на указанных субпопуляциях Т-лимфоцитов.

## Благодарности

Работа поддержана грантом РФФИ № 10-04-00280.

## Список литературы

1. Сахно Л.В., Распай Ж.М., Тихонова М.А., Никонов С.Д., Жданов О.А., Останин А.А., Черных Е.Р. Дефект антигенпрезентирующих клеток у больных туберкулезом легких // Мед. иммунология. — 2009. — Т. 11, № 2-3. — С. 245-254.
2. Сахно Л.В., Тихонова М.А., Останин А.А., Никонов С.Д., Жданов О.А., Черных Е.Р. Интерлейкин-2 в коррекции анергии Т-клеток у больных туберкулезом легких // Пробл. туб. — 2006. — № 1. — С. 48-52.
3. Черных Е.Р., Сахно Л.В., Хонина Н.А., Тихонова М.А., Кожевников В.С., Никонов С.Д., Жданов О.А., Останин А.А. Субпопуляционная принадлежность Т-клеток, подверженных анергии и апоптозу, у больных туберкулезом легких // Пробл. туб. — 2002. — № 7. — С. 43-48.
4. Chauvin C., Josien R. Dendritic cells as killers: mechanistic aspects and potential roles // J. Immunol. — 2008. — Vol. 181. — P. 11-16.

5. Chen L., Zhang Z., Chen W., Zhang Z., Li Y., Shi M., Zhang J., Chen L., Wang S., Wang F.-S. B7-H1 up-regulation on myeloid dendritic cells significantly suppresses T cell immune function in patients with chronic hepatitis B // *J. Immunol.* – 2007. – Vol. 178. – P. 6634-6641.
6. Curiel T.J., Wei S., Dong H., Alvarez X., Cheng P., Mottram P., Krzysiek R., Knutson K.L., Daniel B., Zimmermann M.C. Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity // *Nat. Med.* – 2003. – Vol. 9. – P. 562-567.
7. Dong H., Chen X. Immunoregulatory role of B7-H1 in chronicity of inflammatory responses // *Cell. Mol. Immunology.* – 2006. – Vol. 3. – P. 179-187.
8. Hanekom W.A., Mendillo M., Manca C., Haslett P., Siddiqui M., Barry C., Kaplan G. Mycobacterium tuberculosis inhibits maturation of human monocyte-derived dendritic cells *in vitro* // *J. Infect. Diseases.* – 2003. – Vol. 188. – P. 257-266.
9. Hirsch C.S., Johnson J.L., Okwera A., Kanost R.A., Wu M., Peters P., Muhumuza M., Mayanja-Kizza H., Mugerwa R.D., Mugenyi P., Ellner J.J., Toossi Z. Mechanisms of apoptosis of T-cells in human tuberculosis // *J. Clin. Immunol.* – 2005. – Vol. 25. – P. 353-364.
10. Jurado J.O., Alvarez I.B., Pasquinelli V., Martínez G.J., Quiroga M.F., Abbate E., Musella R.M., Chuluyan H.E., García V.E. Programmed death (PD)-1:PD-Ligand 1/PD-Ligand 2 pathway inhibits T cell effector functions during human tuberculosis // *J. Immunol.* – 2008. – Vol. 181. – P. 116-125.
11. Selenko-Gebauer N., Majdic O., Szekeres A., Hofler G., Guthann E., Korthauer U., Zlabinger G., Steinberger P., Pickl W.F., Stockinger H., Knapp W., Stockl J. B7-H1 (Programmed death-1 ligand) on dendritic cells is involved in the induction and maintenance of T cell anergy // *J. Immunol.* – 2003. – Vol. 170. – P. 3637-3644.
12. 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.
13. Stenger S., Niazi K.R., Modlin R.L. Down-regulation of CD1 on antigen-presenting cells by infection with Mycobacterium tuberculosis // *J. Immunol.* – 1998. – Vol. 161. – P. 3582-3588.
14. Wesa A.K., Storkus W.J. Killer dendritic cells: mechanisms of action and therapeutic implications for cancer // *Cell Death and Differentiation.* – 2008. – Vol. 15. – P. 51-57.
15. Ye P., Weng Z.-H., Zhang S.-L. Zhang J.-A., Zhao L., Dong J.-H., Jie S.-H., Pang R., Wei R.-H. Programmed death-1 expression is associated with the disease status in hepatitis B virus infection // *World J. Gastroenterol.* – 2008. – Vol. 14. – P. 551-4557.

поступила в редакцию 13.04.2011  
принята к печати 25.04.2011