

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

ИНТЕРЛЕЙКИН-10 КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ РЕГУЛЯТОР PD-1-B7-H1-ОПОСРЕДУЕМОЙ ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК

НИИ клинической иммунологии СО РАМН (Новосибирск)

Целью настоящей работы являлось сравнительное исследование фенотипических и функциональных свойств дендритных клеток (ДК) здоровых доноров и больных туберкулезом легких (ТБ), а также влияние экзогенного IL-10, добавляемого в процессе генерации ДК, на фенотип и апоптоз-индуцирующую активность ДК здоровых доноров. Было обследовано 60 больных туберкулезом легких, различающихся по уровню ответа на туберкулиновый очищенный белковый гериват (PPD), и 40 здоровых доноров крови. Установлено, что у больных ТБ дендритные клетки, генерированные *in vitro* из моноцитов крови в присутствии GM-CSF+IFN- α , характеризуются повышенной экспрессией B7-H1, высоким уровнем продукции IL-10 и низкой аллостимуляторной активностью в СКЛ. В нашем исследовании была выявлена положительная взаимосвязь между эндогенной продукцией IL-10 и экспрессией B7-H1 в общей группе обследованных. Продемонстрировано, что добавление IL-10 в процессе генерации ДК здоровых доноров приводило к повышению содержания ДК экспрессирующих B7-H1, снижению их аллостимуляторной активности и усилению проапоптогенной активности дендритных клеток в СКЛ.

Ключевые слова: B7-H1, дендритные клетки, апоптоз, IL-10

INTERLEUKIN-10 REGULATES PD-1-B7-H1-MEDIATED CYTOTOXIC ACTIVITY OF DENDRITIC CELLS

L.V. Sakhno, M.A. Tikhonova, O.Yu. Lepkina, A.A. Ostanin, E.R. Chernykh

Research Institute of Clinical Immunology SB RAMS, Novosibirsk

In this investigation the phenotypic and functional properties of healthy donor and patient with pulmonary tuberculosis (PT) dendritic cells (DCs) were characterized. We also studied the influence of IL-10 on the phenotype and apoptosis-inducing activity of healthy donor DCs. 60 patients with pulmonary tuberculosis with different proliferative response to antigens of *M. tuberculosis* (purified protein derivative, PPD) and 40 healthy donors were enrolled in this study. It was revealed that DCs, generated *in vitro* from PT patient's blood monocytes with GM-CSF+IFN- α , were characterized by increased B7-H1 expression, up-production of IL-10 and reducing of allostimulatory activity in mixed lymphocyte culture (MLC). The endogenous IL-10 production by DCs was correlated with expression of B7-H1 in the general group of persons. It was revealed that addition of IL-10 to semi-mature DCs of healthy donor results in increasing of B7-H1 expression, diminishing of allostimulatory activity and enlargement of pro-apoptogenic activity of DCs.

Key words: B7-H1, dendritic cells, apoptosis, IL-10

Цитотоксическая функция дендритных клеток, особенно генерируемых в присутствии интерферона- α (IFN-ДК), активно обсуждается в последние годы в связи с выявленной способностью ДК лизировать клетки различных опухолевых линий [7]. Однако участие ДК в индукции апоптоза Т-клеток и возможное значение этого феномена остается практически не изученным.

Известно, что активированные через Т-клеточный рецептор CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки экспрессируют рецептор программированной клеточной смерти (PD-1), а ДК несут на своей поверхности молекулу B7-H1, являющуюся лигандом для PD-1 (PD-L1). Поэтому включение сигнального пути PD-1-B7-H1 при взаимодействии ДК с Т-лимфоцитами может индуцировать апоптоз/анергию Т-лимфоцитов. При персистирующих инфекциях генерируются толерогенные ДК 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 антигенспецифических лимфоцитов [4, 6]. Вероятно, вовлечение PD-1-B7-H1 взаимодействия иммунокомпетентных клеток может приводить к нарушению антигенспецифического ответа при инфекционных заболеваниях.

Известно, что интерлейкин-10 (IL-10) принимает участие в иммуносупрессии и хронизации воспалительного процесса при инфекции. Учитывая известные данные о стимулирующем влиянии IL-10 на экспрессию B7-H1 [3], а также выявленный нами факт повышенной продукции IL-10 моноцитами и генерируемыми из них ДК у больных туберкулезом (ТБ) [1] представляется вероятным предположение о вовлечении IL-10 в процесс повышения апоптоз-индуцирующей активности ДК больных. При таком рассмотрении, активация PD-1-B7-H1 сигнального пути при взаимодействии ДК с Т-лимфоцитами, может являться одним из механизмов подавления антигенспецифического иммунного ответа в целом и толерогенной/супрессорной активности ДК в частности.

Целью настоящей работы являлось сравнительное исследование фенотипических и функциональных свойств ДК здоровых доноров и больных

туберкулезом, а также влияние экзогенного IL-10, добавляемого в процессе генерации ДК, на фенотип и апоптоз-индуцирующую активность ДК здоровых доноров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследованы 60 больных туберкулезом легких: 37 мужчин и 23 женщины в возрасте от 16 до 61 года, включая 23 (38 %) с фиброзно-кавернозной, 31 (52 %) с инфильтративной и 6 (10 %) с диссеминированной формами ТБ. Активное бацилловыделение (БК +) выявили у 36 больных (60 %). При лабораторном исследовании лекарственную резистентность зарегистрировали у 12 из 60 пациентов (20 %). Обследование всех пациентов проводили после получения информированного согласия. В исследование были включены 40 здоровых доноров крови, сопоставимых по полу и возрасту. Обследование проводили после получения информированного согласия.

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 °С в CO₂-инкубаторе. Для стимуляции клеток использовали туберкулиновый очищенный белковый дериват (PPD) в дозе 50 мкг/мл. Интенсивность пролиферации оценивали на 6 сут. по включению ³H-тимидина (1 мКи/лунку), добавленного за 18 ч до окончания культивирования. В зависимости от уровня пролиферативного ответа больные ТБ были разделены на 2 подгруппы – с сохраненным (> 12500 имп./мин; n = 38; подгруппа 1) и сниженным (< 12500 имп./мин; n = 22; подгруппа 2) ответом на PPD.

Моноциты выделяли в 6-луночных планшетах (Nunclo, Дания) путем прилипания к пластику МНК (3×10^6 клеток/мл) в присутствии 5 % инактивированной сыворотки доноров крови IV (AB) группы. ДК генерировали из моноцитов в течение 4 сут. в среде RPMI-1640 с 5 % сыворотки плодов коровы (Биолот, С-Пб) в присутствии GM-CSF (40 нг/мл, Sigma-Aldrich) и IFN-α (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). В серии экспериментов одновременно с LPS добавляли интерлейкин-10 (Sigma, 5 нг/мл).

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», Новосибирск).

Алlostимуляторную активность ДК оценивали в смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ). Для этого МНК доноров ($0,1 \times 10^6$ /лунку) культивировали в 96-луночных круглодонных планшетах в присутствии аллогенных ДК здоровых доноров и больных ТБ в соотношении 10:1 в среде RPMI-1640 и 10% инактивированной сыворотки доноров крови IV (AB) группы. Интенсивность пролиферации оценивали на 5-е сут. радиометрически по включению ³H-тимидина. Индекс стимуляции в СКЛ рассчитывали как отношение пролиферативного ответа МНК в присутствии ДК к уровню спонтанной пролиферации МНК.

Уровень апоптоза и распределение Т-лимфоцитов по фазам клеточного цикла оценивали в 3-суточной алло-СКЛ. Клеточный цикл и уровень апоптоза CD4⁺ и CD8⁺(CD4⁻) Т-клеток оценивали методом трехцветной проточной цитометрии. Для этого, 25 мкл МНК ($1,0 \times 10^6$), 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 (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 минут 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). 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 $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительное исследование экспрессии В7-Н1 на ДК показало, что у здоровых доноров относительное содержание ДК с поверхностной экспрессией В7-Н1 варьировало от 18 до 79, а

медианное значение составляло 38 % (табл. 1). Содержание В7-Н1-позитивных клеток в культурах ДК больных ТБ варьировало от 24 до 90 и медианное значение составляло 67 %. Таким образом, ДК больных ТБ характеризовались достоверно более высоким уровнем экспрессии В7-Н1 по сравнению с ДК здоровых доноров. Согласно данным литературы, а также полученным нами ранее результатам больные ТБ характеризуются выраженной гетерогенностью по уровню пролиферативного ответа Т-клеток на антигены *M. tuberculosis*, например, туберкулиновый очищенный белковый дериват (PPD). При этом часть пациентов характеризуется сохранным ответом на PPD, тогда как у других ответ на PPD резко снижен, что свидетельствует о состоянии PPD-анергии циркулирующих Т-клеток. Эта подгруппа пациентов отличается также более высоким уровнем апоптоза CD4 и CD8-Т-лимфоцитов. Поэтому мы также сравнили содержание В7-Н1⁺ ДК в подгруппах больных с сохранным (подгруппа 1) и сниженным (подгруппа 2) ответом на PPD. Несмотря на отсутствие достоверных различий в подгруппах, ДК PPD-анергичных пациентов характеризовались наиболее выраженным возрастанием доли В7-Н1-позитивных клеток. Действительно, доля пациентов с повышенным содержанием В7-Н1⁺ ДК (превышающим верхнюю квартильную границу нормативного диапазона) в группе анергичных больных была выше, чем у реактивных пациентов (75 против 57 %).

Исследование концентрации ИЛ-10 в супернатантах ДК показало, что ДК больных отличались достоверно повышенным уровнем продукции ИЛ-10. Медианное значение уровня ИЛ-10 в культурах ДК больных практически в 4 раза превышало таковое в культурах ДК доноров, причем наиболее высокая продукция данного цитокина наблюдалась в подгруппе PPD-анергичных пациентов (табл. 1). Сопоставление эндогенной продукции ИЛ-10 и экспрессии В7-Н1 дендритными клетками в общей группе обследованных пациентов, включающей больных ТБ и здоровых доноров, выявило наличие прямой корреляционной связи между указанными пара-

метрами ($R_s = 0,49; p = 0,006; n = 30$). Еще более выраженная достоверная прямая корреляционная связь была выявлена при анализе сопряженности продукции ИЛ-10 и количества В7-Н1-позитивных ДК в группе доноров ($R_s = 0,86; p = 0,003; n = 9$).

Сравнение способности ДК доноров и больных ТБ (с повышенной экспрессией В7-Н1) стимулировать пролиферацию Т-клеток в ответ на аллоантигены в СКЛ продемонстрировало выраженное снижение аллостимуляторной активности ДК больных ТБ (4345 ± 709 против 12113 ± 1263 имп./мин у доноров, $p_u < 0,05$) (табл. 1). Снижение аллостимуляторной активности ДК регистрировалось как у PPD-реактивных, так и PPD-анергичных пациентов, однако в последнем случае было достоверно более выраженным.

В нашем исследовании была выявлена положительная взаимосвязь между эндогенной продукцией ИЛ-10 и экспрессией В7-Н1, поэтому следующей задачей являлось исследование фенотипических и функциональных свойств ДК здоровых доноров при добавлении экзогенного ИЛ-10 в процессе генерации ДК. ИЛ-10 добавляли на стадии дозревания ДК здоровых доноров (одновременно с LPS). Полученные результаты (табл. 2) показали, что добавление ИЛ-10 приводило к повышению содержания ДК экспрессирующих В7-Н1 молекулу на своей поверхности и снижению их аллостимуляторной активности.

Кроме того, было установлено, что добавление ИЛ-10 приводило к усилению проапоптогенной активности дендритных клеток в СКЛ. Так, культуры МНК, стимулированные ДК, генерируемыми в присутствии ИЛ-10, содержали достоверно более высокое количество апоптотических CD3⁺CD8 Т-лимфоцитов (табл. 3). Следует отметить, что количество пролиферирующих (в S, G₂/M фазе цикла) Т-клеток в СКЛ статистически значимо не отличалось при использовании в качестве клеток стимуляторов ДК генерированных в присутствии и отсутствие ИЛ-10 (табл. 3). Следовательно, ДК здоровых доноров, культивируемые в присутствии экзогенного ИЛ-10, не блокировали прохождение клеточного цикла Т-лимфоцитами.

Таблица 1

Сравнительная характеристика ДК здоровых доноров и больных туберкулезом

Показатель	Здоровые доноры	Больные ТБ	Больные ТБ Подгруппа № 1 PPD ответ > 12500 имп./мин	Больные ТБ Подгруппа №2 PPD ответ < 12500 имп./мин
1. Экспрессия В7-Н1 ⁺ (%)				
М ± S.E.	42,3 ± 4,4 (19)	61,0 ± 2,9 (44)*	58,1 ± 3,6 (32)*	68,8 ± 3,9 (12)*
медиана	38	67	62,5	70
2. Продукция ИЛ-10 (пг/мл)				
М ± S.E.	490 ± 125 (13)	821 ± 60 (31)*	797 ± 70 (25)*	921 ± 95 (6)*
медиана	224	975	899	1027
3. Аллостимуляторная активность				
Пролиферативный ответ в СКЛ (имп./мин)	12113 ± 1263 (24)	4345 ± 709 (55)*	6173 ± 1126 (31)*	1983 ± 366 (24)*.#

Примечание: данные представлены в виде М ± S.E. В скобках – количество наблюдений. * – $p_u < 0,05$ – достоверность различий показателей по сравнению с донорами. Здесь и далее в таблицах: U-критерий Вилкоксона – Манна – Уитни.

Таблица 2

Влияние интерлейкина-10, добавляемого на стадии созревания, на фенотипические и функциональные свойства ДК здоровых доноров

Показатель	ДК здоровых доноров	
	LPS (n = 14)	LPS + интерлейкин-10 (n = 14)
B7-H1 ⁺ ДК (%)	40,4 ± 4,1	48,1 ± 5,3*
Аллостимуляторная активность:		
- пролиферативный ответ (имп/мин)	13432 ± 1841	9230 ± 992*
- индекс стимуляции в СКЛ	35,6 ± 6,9	23,7 ± 3,8*

Примечание: данные представлены в виде M ± S.E. В скобках – количество наблюдений. * – $p_u < 0,05$ – достоверность различий показателей в присутствии и отсутствие интерлейкина-10 на стадии дозревания ДК.

Таблица 3

Влияние интерлейкина-10 как дозревающего сигнала на способность ДК стимулировать апоптоз и пролиферацию Т-клеток в смешанной культуре

Показатель	Условия культивирования ДК-стимуляторов	
	LPS (n = 14)	LPS+IL-10 (n = 14)
1. Количество апоптотических Т-клеток (%)		
CD3 ⁺ CD4 Т-клетки	8,3 ± 1,8	10,4 ± 2,3
CD3 ⁺ CD8 Т-клетки	11,2 ± 2,0	17,0 ± 2,8*
2. Количество пролиферирующих (в S,G ₂ /M фазе цикла) Т-клеток (%)		
CD3 ⁺ CD4 Т-клетки	17,9 ± 3,3	15,8 ± 3,2
CD3 ⁺ CD8 Т-клетки	18,6 ± 2,2	18,9 ± 2,5

Примечание: данные представлены в виде M ± S.E. В скобках – количество наблюдений. * – $p_u < 0,05$ – достоверность различий показателей в присутствии и отсутствие IL-10 на стадии дозревания ДК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В предыдущем исследовании было продемонстрировано, что активация Т-клеток в присутствии ДК больных туберкулезом приводила к более выраженному увеличению количества апоптотических и уменьшению доли пролиферирующих Т-лимфоцитов [2]. В аллогенной СКЛ после 3-суточного сокультивирования МНК с ДК увеличивалось количество PD-1⁺ CD4⁻ и CD8⁻Т-клеток, причем относительное количество этих клеток статистически значимо не различалось при стимуляции ДК больных ТБ и здоровых доноров [2]. Учитывая выше сказанное можно предположить, что более высокий уровень апоптоза Т-клеток в присутствии ДК пациентов с туберкулезом в большей степени связан с функциональными особенностями ДК.

Полученные в настоящем исследовании данные демонстрируют, что ДК больных туберкулезом отличаются более высокой экспрессией В7-Н1 и повышенной продукцией IL-10. Выявленные факты согласуются с данными других авторов, которые зарегистрировали вовлечение дендритных клеток с повышенной экспрессией В7-Н1 в развитие Т-клеточных дисфункций при различных заболеваниях [3, 5].

Выявленная прямая корреляционная зависимость между экспрессией В7-Н1 и продукцией IL-10 дендритными клетками позволила предположить важную роль эндогенной продукции IL-10 в регуляции экспрессии В7-Н1 на поверхности ДК. Для более детального выяснения роли IL-10

в регуляции экспрессии В7-Н1 мы исследовали влияние экзогенного IL-10 на экспрессию В7-Н1 молекул и аллостимуляторную способность дендритных клеток здоровых доноров при добавлении данного цитокина на стадии дозревания ДК. Полученные результаты показали, что добавление IL-10 сопровождалось статистически значимым усилением экспрессии В7-Н1 на поверхности ДК здоровых доноров и снижением их аллостимуляторной активности. Кроме того, добавление IL-10 на стадии созревания ДК приводило к усилению их проапоптогенной активности по отношению к популяции CD3⁺CD8 Т-лимфоцитов. Этот факт согласуется с полученными нами ранее данными о большей чувствительности CD8⁺ Т-лимфоцитов к апоптогенному влиянию ДК больных ТБ [2]. Важно отметить, что относительное количество ДК здоровых доноров, экспрессирующих В7-Н1 в присутствии экзогенного IL-10, не достигало значений, характерных для ДК больных ТБ. Также, апоптоз-индуцирующая способность ДК здоровых доноров генерированных в присутствии IL-10 увеличивалась, но не достигала значений характерных для апоптоз-индуцирующей активности ДК больных. Таким образом, IL-10 является важным, но, по-видимому, не единственным фактором, регулирующим проапоптогенную активность ДК. Для ДК, генерированных в присутствии GM-CSF и IL-4, продемонстрировано, что добавление IL-10 приводит к усилению экспрессии В7-Н1, причем связывание моноклональных антител против анти-

гена B7-H1 с ДК усиливало их аллостимуляторную способность [5]. В нашем исследовании впервые продемонстрировано, что усиление экспрессии B7-H1 в присутствии IL-10 регистрируется и для IFN- γ .

ЛИТЕРАТУРА

1. Сахно Л.В., Распай Ж.М., Тихонова М.А. Дефект антигенпрезентирующих клеток у больных туберкулезом легких // Мед. иммунология. – 2009. – Т. 11, № 2–3. – С. 245–254.

2. Сахно Л.В., Тихонова М.А., Леплина О.Ю. Роль PD-1/B7-H1-опосредованного пути в нарушении антигенспецифического ответа у больных туберкулезом легких // Иммунология. – 2011. – Т. 32. – С. 89–93.

3. Curiel T.J., Wei S., Dong H., Alvarez X. et al. Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-

mediated antitumor immunity // Nat Med. – 2003. – Vol. 9. – P. 562–567.

4. Dong H., Chen X. Immunoregulatory role of B7-H1 in chronicity of inflammatory responses // Cell. Mol. Immunology. – 2006. – Vol. 3. – P. 179–187.

5. Selenko-Gebauer N., Majdic O., Szekeres A., Hofler G. et al. 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.

6. 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.

7. 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.

Сведения об авторах

Сахно Людмила Васильевна – старший научный сотрудник НИИ клинической иммунологии СО РАМН, кандидат биологических наук (630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14; тел.: (383)-228-21-01; e-mail: ct_lab@mail.ru)

Тихонова Марина Александровна – ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук ФГБУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск

Леплина Ольга Юрьевна – старший научный сотрудник, кандидат медицинских наук

Останин Александр Анатольевич – главный научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии НИИ клинической иммунологии СО РАМН, доктор медицинских наук, профессор

Черных Елена Рэмовна – заведующая лабораторией клеточной иммунотерапии, заместитель директора НИИКИ СО РАМН по науке НИИ Клинической иммунологии СО РАМН, член-корр. РАМН, доктор медицинских наук, профессор (тел. раб.: 236-03-29; e-mail: ct_lab@mail.ru)