

ВЛИЯНИЕ ДЕКСАМЕТАЗОНА НА ИНТЕРФЕРОН- α -ИНДУЦИРОВАННУЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ МОНОЦИТОВ В ДЕНДРИТНЫЕ КЛЕТКИ

Курочкина Ю.Д., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Тыринова Т.В., Баторов Е.В., Сизиков А.Э., Останин А.А., Черных Е.Р.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Резюме. Интерфероны I типа являются мощными индукторами дифференцировки моноцитов в дендритные клетки (ДК), однако чувствительность таких ДК к толерогенному эффекту глюкокортикоидов ранее не исследовалась. Целью работы явилось изучение влияния дексаметазона на созревание и функции интерферон-альфа-индуцированных ДК (IFN-ДК) здоровых доноров. ДК генерировали из моноцитов крови, которые культивировали в течение 5 суток с GM-CSF и IFN α в отсутствие и присутствии дексаметазона (10^{-6} М), вносимого на 3 сутки. Добавление дексаметазона блокировало созревание IFN-ДК, что проявлялось возрастанием доли CD14⁺ клеток и снижением содержания CD83⁺ клеток. Дексаметазон не оказывал значимого влияния на экспрессию HLA-DR, CD86 и B7-H1, однако 2-кратно усиливал экспрессию толерогенной молекулы TLR-2. Наряду с подавлением созревания IFN-ДК, дексаметазон ингибировал продукцию ими провоспалительных/Th1-цитокинов (TNF α , IL-1, IL-2, IFN γ , IL-12) и хемокинов (MIP-1 α , RANTES). IFN-ДК, генерированные в присутствии дексаметазона, отличались 2-кратным снижением аллостимуляторной активности в смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ). При этом способность IFN-ДК стимулировать пролиферативный ответ Т-клеток в алло-СКЛ прямо коррелирует с экспрессией на ДК молекулы CD83 и обратно – с экспрессией CD14 и TLR-2. Оценка Th1-/Th2-поляризирующей активности IFN-ДК показала, что дексаметазон оказывал выраженное ингибирующее влияние на способность ДК стимулировать Т-клетки к продукции IFN γ , тогда как супрессорный эффект на способность ДК стимулировать продукцию IL-6 был менее выраженным, что свидетельствует о доминировании Th2-поляризирующей активности IFN-ДК под влиянием дексаметазона. В целом показано, что IFN-ДК чувствительны к толерогенному действию дексаметазона и, следовательно, могут опосредовать иммуномодулирующий эффект глюкокортикоидной терапии, а также рассматриваться в качестве новых кандидатов для разработки толерогенных лечебных ДК-вакцин при аутоиммунной патологии.

Ключевые слова: дендритные клетки, интерферон- α , дексаметазон, алло-СКЛ, цитокины

Адрес для переписки:

Курочкина Юлия Дмитриевна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск, Ядринцевская ул., 14.
Тел.: 8 (383) 228-21-01.
Факс: 8 (383) 222-70-28.
E-mail: juli_k@bk.ru; ct_lab@mail.ru

Address for correspondence:

Kurochkina Yuliya D.
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
630099, Russian Federation, Novosibirsk,
Yadrintsevskaya str., 14.
Phone: 7 (383) 228-21-01.
Fax: 7 (383) 222-70-28.
E-mail: juli_k@bk.ru; ct_lab@mail.ru

Образец цитирования:

Ю.Д. Курочкина, О.Ю. Леплина, М.А. Тихонова,
Т.В. Тыринова, Е.В. Баторов, А.Э. Сизиков,
А.А. Останин, Е.Р. Черных «Влияние дексаметазона
на интерферон- α -индуцированную дифференцировку
моноцитов в дендритные клетки» // Медицинская
иммунология, 2016. Т. 18, № 4. С. 347-356.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-4-347-356

For citation:

Yu.D. Kurochkina, O.Yu. Leplina, M.A. Tikhonova,
T.V. Tyrinova, E.V. Batorov, A.E. Sizikov, A.A. Ostanin,
E.R. Chernykh "Effect of dexamethasone on interferon- α -induced
differentiation of monocytes to dendritic cells", *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2016, Vol. 18, no. 4,
pp. 347-356. doi: 10.15789/1563-0625-2016-4-347-356

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-4-347-356>

© Курочкина Ю.Д. и соавт., 2016

EFFECT OF DEXAMETHASONE ON INTERFERON- α -INDUCED DIFFERENTIATION OF MONOCYTES TO DENDRITIC CELLS

Kurochkina Yu.D., Leplina O.Yu., Tikhonova M.A., Tyrinova T.V., Batorov E.V., Sizikov A.E., Ostanin A.A., Chernykh E.R.

Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. Type I Interferons are potent inducers of monocyte's differentiation into dendritic cells (DCs). However, sensitivity of these DCs to tolerogenic effect of glucocorticoids has not been previously investigated. The aim of this study was to investigate the effect of dexamethasone upon maturation and functions of interferon-alpha-induced DCs (IFN-DC) derived from healthy donors. DCs were generated from blood monocytes cultured for 5 days with GM-CSF and IFN α , in absence or with addition of dexamethasone (10^{-6} M), applied on the 3rd day. Addition of dexamethasone inhibited IFN-DC maturation, which manifested with increasing numbers of CD14⁺ cells and decreased percentage of CD83⁺ DCs. Dexamethasone did not significantly influence HLA-DR, CD86 and B7H1 expression. However, it caused a 2-fold increase of tolerogenic TLR-2 molecule expression. Along with suppression of IFN-DC maturation, dexamethasone inhibited production of proinflammatory/Th1 cytokines (TNF α , IL-1, IL-2, IFN γ , IL-12), and some chemokines (MIP-1 α , RANTES). Dexamethasone-treated IFN-DCs exhibited a 2-fold lower allostimulatory activity in mixed lymphocyte culture (MLC). Worth of note, the capacity of IFN-DCs to stimulate T cell proliferative response in allo-MLC showed direct correlation with CD83 expression on DCs, and an inverse correlation with CD14 and TLR-2. Evaluation of Th1/Th2-polarizing activity of IFN-DCs showed that dexamethasone exerted a pronounced inhibitory effect upon ability of DCs to stimulate T cells for IFN γ production, along with low-grade suppressive effect upon ability of DCs to induce IL-6 production, thus being indicative for a dominance of Th2-polarizing activity of IFN-DCs under the influence of dexamethasone. In general, the data obtained show that IFN-DCs are sensitive to tolerogenic action of dexamethasone, and, hence, the IFN-DCs may mediate the immunomodulatory effect of glucocorticosteroids and represent novel candidate cells for the development of therapeutic tolerogenic DC-based vaccines applicable for management of autoimmune disorders.

Keywords: dendritic cells, interferon- α , dexamethasone, allo-MLC, cytokines

Введение

Дендритные клетки (ДК) являются наиболее эффективными антиген-презентирующими клетками, которые могут индуцировать развитие как иммунного ответа, так и иммунологической толерантности. Толерогенные свойства ДК, которые связывают с их способностью вызывать анергию и апоптоз Т-лимфоцитов, Th1-Th2-переключение и генерацию регуляторных Т-клеток, опосредуются с вовлечением различных механизмов, включая экспрессию поверхностных проапоптогенных/коингибиторных молекул (PD-L1, FasL, TLR-2, ILT-2,4 и др.), активацию индоламин-2,3-диоксигеназы и продукцию противовоспалительных цитокинов [1, 14, 15].

Интерес к толерогенным ДК, прежде всего, обусловлен потенциальной возможностью их использования в лечении аутоиммунных заболеваний (АИЗ). Стратегии применения тДК обсуждаются как в аспекте вакцинации пациентов генерированными *ex vivo* тДК, так и индукции толерогенного потенциала ДК *in vivo*, либо усиления толерогенных свойств вводимых ДК с помо-

щью фармакологических средств [11, 13, 20]. ДК *in vitro* обычно получают путем культивирования моноцитов крови в присутствии GM-CSF и IL-4 (так называемые IL4-ДК) [28], используя для индукции стабильного толерогенного потенциала ДК дексаметазон и/или рецепторные агонисты витамина D [14].

Дифференцировка моноцитов в ДК может также индуцироваться интерферонами I типа, которые продуцируются в ответ на инфекционные и воспалительные стимулы, являются сигналами опасности и способны вызывать быструю дифференцировку циркулирующих моноцитов в ДК [10]. Генерируемые в присутствии GM-CSF и IFN α ДК (IFN-ДК) представляют уникальную популяцию функционально активных клеток, комбинирующих свойства миелоидных ДК, плазмацитоидных ДК и НК-клеток. Более высокая миграционная активность IFN-ДК и их более стабильный фенотип (в отсутствие цитокинов) по сравнению с IL4-ДК [6, 19, 25] делает эти клетки привлекательными кандидатами для использования в качестве ДК-вакцин. Однако чув-

ствительность IFN-ДК к толерогенным сигналам ранее не исследовалась.

Интерес к IFN-ДК и их чувствительности к толерогенным сигналам связан не только с перспективами их использования в качестве новой клеточной платформы при создании ДК-вакцин, но важной патогенетической ролью IFN α при аутоиммунной патологии. Действительно, терапия препаратами интерферонов сопровождается частым развитием аутоиммунных осложнений, при этом многие аутоиммунные заболевания ассоциированы с повышенным уровнем интерферонов I типа и контролируемых ими генов [2, 23]. Таким образом, у больных АИЗ интерферон-альфа может играть важную роль в дифференцировке ДК из моноцитов и поддержании активированного статуса циркулирующих ДК [3, 12]. Используемые в комплексном лечении АИЗ глюкокортикоиды, по данным литературы, способны индуцировать толерогенный фенотип ИЛ4-ДК [17, 21]. В то же время вопрос о чувствительности IFN-ДК к действию глюкокортикоидов, остается открытым.

Исходя из вышесказанного, **целью настоящей работы** явилось исследование влияния дексаметазона на IFN α -индуцированную дифференцировку моноцитов в ДК.

Материалы и методы

Исследования были проведены в группе 25 здоровых доноров. Забор крови и все иммунологические исследования проводили после получения письменного информированного согласия.

Мононуклеарные клетки (МНК) из венозной гепаринизированной крови выделяли стандартным методом градиентного центрифугирования на фиколе-верографине. Для генерации ДК прилипающую фракцию МНК культивировали в течение 4 сут. при 37 °С в CO₂-инкубаторе в 6-луночных планшетах (Nunclon, Дания) в среде RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 5мМ HEPES-буфера, 100 мкг/мл гентамицина и 5% сыворотки плодов коровы (FCS, Биолот, Санкт-Петербург), в присутствии GM-CSF (40 нг/мл, Sigma-Aldrich) и IFN α (1000 Ед/мл, Роферон-А, Roche, Швейцария). Для индукции созревания на 4 сут. вносили липополисахарид (ЛПС, 10 мкг/мл, LPS *E. coli* 0114:B4, Sigma-Aldrich) и продолжали культивирование в течение последующих 24 часов. Генерацию IFN-ДК проводили в отсутствие (контрольные культуры) и присутствии дексаметазона (10⁻⁶ М), который добавляли на 3 сут. Фенотипический анализ ДК проводили методом проточной цитофлуориметрии (FACSCalibur, Becton Dickinson, США) с использованием FITS-

или PE-меченных моноклональных анти-CD14, -CD83, -CD86, -HLA-DR, -TLR-2, -B7H1 антител (BD PharMingen, США).

Концентрацию цитокинов TNF α и IL-10, а также IFN γ и IL-6 в супернатантах соответствующих клеточных культур оценивали методом иммуоферментного анализа, используя коммерческие тест-системы («Вектор-Бест», г. Новосибирск).

Расширенный спектр цитокинов, включая про-/противовоспалительные цитокины (TNF α , IL-1 β , IL-1ra, IL-10), иммунорегуляторные цитокины (IL-2, IFN γ , IL-12, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13, IL-15, IL-17), ростовые факторы (G-CSF, IL-7, FGF- β , PDGF, VEGF) и хемокины (IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , RANTES, Eotaxin), в культурах генерированных IFN-ДК оценивали методом проточной флуориметрии на 2-лучевом лазерном автоматизированном анализаторе (BioPlex Protein Assay System, Bio-Rad, США) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

Алlostимуляторную активность IFN-ДК оценивали в смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ). В качестве отвечающих клеток использовали МНК доноров (0,1 × 10⁶/лунку), которые культивировали в 96-луночных круглодонных планшетах в среде RPMI-1640 в присутствии 10% инактивированной сыворотки крови АВ(IV) группы при 37 °С в CO₂-инкубаторе. Стимуляторами служили аллогенные IFN-ДК в соотношении МНК:ДК = 10:1. Пролиферативный ответ оценивали на 5 сут. радиометрически по включению ³H-тимидина (1 мКю/лунку), вносимого за 18 ч до окончания культивирования. Индекс влияния ДК (ИВ) в алло-СКЛ рассчитывали как отношение пролиферативного ответа МНК в присутствии ДК к уровню спонтанной пролиферации МНК.

Способность IFN-ДК активировать Th1- и Th2-клетки также оценивали в алло-СКЛ (как описано выше). Культуральные супернатанты собирали на 5 сут., и измеряли концентрацию Th1 (IFN γ) и Th2 (IL-6) цитокинов методом ИФА.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета программ Statistica 6.0. Данные представлены в виде медианных значений (Me) и интерквартильного размаха в виде 25 и 75 перцентилей (Q_{0,25}-Q_{0,75}). Для выявления значимых различий сравниваемых показателей использовали непараметрические критерии: U-критерий Вилкоксона—Манна—Уитни и парный критерий знаков. Корреляционный анализ проводили с помощью ранговой корреляции Спирмена (Rs). Различия считали достоверными при уровне значимости p < 0,05.

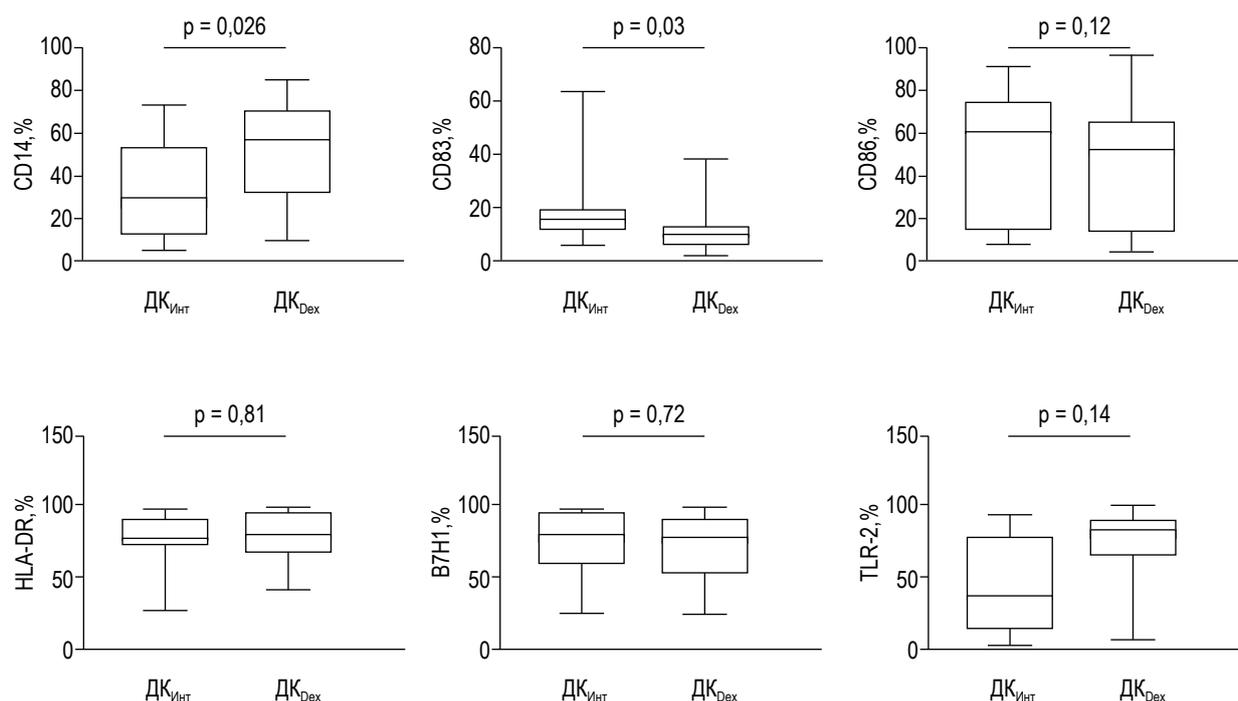


Рисунок 1. Влияние дексаметазона на фенотип IFN-ДК

Примечание. Данные представлены в виде медиан (сплошная горизонтальная линия), интерквартильного диапазона, диапазона минимальных и максимальных значений. На диаграммах показано относительное (%) содержание CD14⁺ (n = 15), CD83⁺ (n = 20), HLA-DR⁺ (n = 20), CD86⁺ (n = 15), B7-H1⁺ (n = 8) и TLR-2⁺ (n = 20) клеток в популяции IFN-ДК, генерированных в стандартных условиях (ДК_{Инт}) и в присутствии 10⁻⁶ М дексаметазона (ДК_{Дек}). p – непараметрический парный критерий знаков.

ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ ДЕКСАМЕТАЗОНА НА ПРОДУКЦИЮ TNF α И IL-10 В КУЛЬТУРАХ IFN-ДК

Цитокины		Контроль	Dex+	p _U
TNF α (пг/мл)	Медиана	3660	415	0,035
	Q _{0,25} -Q _{0,75}	1495-4446	270-1455	
IL-10 (пг/мл)	Медиана	1834	1020	0,4
	Q _{0,25} -Q _{0,75}	666-2224	750-1540	
TNF α /IL-10 (расч. ед.)	Медиана	2,0	0,33	0,04
	Q _{0,25} -Q _{0,75}	1,2-2,8	0,2-2,8	

Примечание. С помощью ИФА оценивали концентрацию цитокинов в супернатантах IFN-ДК доноров (n = 9), генерированных в отсутствие (контроль) и присутствии (Dex+) дексаметазона (10⁻⁶ М). p_U – критерий Вилкоксона–Манна–Уитни.

Результаты

Известно, что толерогенный эффект глюкокортикоидов на IL4-ДК связан с подавлением их созревания [21]. Поэтому первоначально было исследовано влияние дексаметазона на экспрессию поверхностных молекул, включая маркеры зрелости, а также антигены гистосовместимости, костимуляторные и коингибиторные молекулы (рис. 1). Одной из особенностей IFN-ДК по сравнению с IL4-ДК является сохранение значитель-

ной частью этих клеток (даже после индукции их созревания) моноцитарного маркера CD14 [10]. Генерируемые в присутствии дексаметазона IFN-ДК (ДК_{Дек}) отличались от контрольных, интактных ДК (ДК_{Инт}) еще более высоким содержанием CD14⁺ клеток и меньшей долей CD83⁺ клеток, что свидетельствовало о подавлении созревания IFN-ДК. Относительное содержание HLA-DR⁺ и CD86⁺ клеток в популяции IFN-ДК значимо не менялось под влиянием дексаметазона. Вместе с тем, дексаметазон более чем в 2

ТАБЛИЦА 2. ВЛИЯНИЕ ДЕКСАМЕТАЗОНА НА ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ IFN-ДК

Группы	Цитокины (пг/мл)	Контроль		Dex+	
		Медиана	Q _{0,25} -Q _{0,75}	Медиана	Q _{0,25} -Q _{0,75}
Про- и противовоспалительные	TNF α	64970	36190-96750	7003*	385-7240
	IL-1 β	610	600-1120	140*	100-160
	IL1-ra	8730	8620-11530	7934	5750-8050
	IL-10	2215	1030-3075	2198	735-2770
Иммунорегуляторные (Th1, Th2, Th9, Th17)	IL-2	190	150-198	32*	12-35
	IFN γ	4790	3620-4970	2292*	1480-3180
	IL-12(p70)	390	210-460	47*	40-85
	IL-4	61	60-71	41	24-50
	IL-5	5,6	5-8,5	5,6	2,2-6,2
	IL-6	19520	18480-20960	14940	10080-19420
	IL-9	104	84-124	64	60-105
	IL-13	85	70-106	64	40-74
	IL-15	213	200-340	247	240-280
	IL-17	530	440-610	447	260-550
Ростовые факторы	G-CSF	8079	7580-12180	4795	2320-10220
	IL-7	35	35-40	16	13-60
	FGF- β	145	140-220	78	70-102
	PDGF	3055	2955-3630	2510	1835-2770
	VEGF	1420	1080-19210	958*	950-960
СХС- и СС-хемокины	IL-8	155370	144070-171170	126670	122350-152885
	IP-10	170600	134290-190320	137640	18990-168530
	MCP-1	57430	29180-74960	33965	5720-53560
	MIP-1 α	77000	76000-80000	53561*	5710-75000
	RANTES	26160	13260-48430	2804*	1265-13560
	Eotaxin	880	610-950	385	225-535

Примечание. С помощью мультиплексного анализа оценивали концентрацию цитокинов в супернатантах IFN-ДК доноров (n = 5), генерированных в отсутствие (контроль) и присутствии (Dex+) дексаметазона (10^{-6} М). * – $p_U < 0,05$ достоверность различий по сравнению с контролем, U-критерий Вилкоксона–Манна–Уитни.

раза усиливал экспрессию TLR2 ($p_U = 0,14$), ассоциированного с толерогенной активностью ДК. Эффект дексаметазона на коингибиторную молекулу B7-H1 (PD-L1) был менее выраженным и статистически недостоверным.

Поскольку созревание ДК индуцируется провоспалительными цитокинами (в первую очередь TNF α), продукция которых усиливается при стимуляции ЛПС, ингибирующий эффект дексаметазона на IFN-ДК мог быть обусловлен подавлением синтеза TNF α . Действительно, из данных таблицы 1 видно, что в присутствии дексаметазона эндогенная продукция TNF α снижалась в среднем с 3660 до 415 пг/мл ($p_U = 0,035$).

При этом дексаметазон не оказывал выраженного ингибирующего эффекта на секрецию IL-10. В результате индекс соотношения TNF α /IL-10 в культурах ДК_{Dex} был в 6 раз ниже, чем в культурах интактных IFN-ДК (0,33 против 2,0 расч. ед. соответственно), что свидетельствовало о доминировании активности противовоспалительных цитокинов. Важно отметить, что выявленное снижение концентрации TNF α не было связано с токсическим действием дексаметазона на IFN-ДК, поскольку выход клеток в культурах ДК_{Int} и ДК_{Dex} значимо не различался, составляя в среднем $0,12$ и $0,19 \times 10^6/1$ млн МНК соответственно ($p_U = 0,06$).

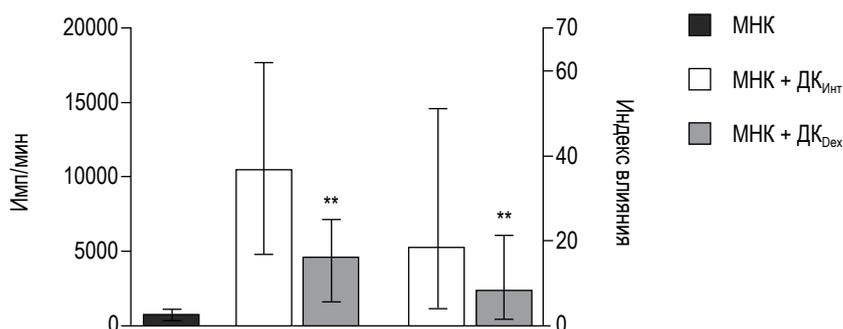


Рисунок 2. Супрессорный эффект дексаметазона на аллостимуляторную активность IFN-ДК

Примечание. Представлены данные (Me; IQR; n = 21) по пролиферации (имп/мин) МНК в отсутствие IFN-ДК, а также в алло-СКЛ в присутствии интактных ИФН-ДК, генерированных в стандартных условиях (МНК + ДК_{Инт}) или с дексаметазоном в дозе 10⁻⁶ М (МНК + ДК_{Дек}). По правой оси ординат представлены индексы влияния (расч. ед.) IFN-ДК в алло-СКЛ. ** – p < 0,01 – достоверность различия показателей по сравнению с интактными ДК (U-критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

ТАБЛИЦА 3. ВЛИЯНИЕ ДЕКСАМЕТАЗОНА НА Th1- И Th2-ПОЛЯРИЗУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ IFN-ДК В АЛЛО-СКЛ

Цитокины МНК ₀		Условия культивирования		
		МНК + ДК _{Инт}	МНК + ДК _{Дек}	МНК ₀
IFN _γ (пг/мл)	Медиана	30	1100	80**
	Q _{0,25} -Q _{0,75}	9-46	580-1420	8-270
IL-6 (пг/мл)	Медиана	750	10020	8320*
	Q _{0,25} -Q _{0,75}	240-7225	9280-10690	7090-8960
IL-6/IFN _γ (расч. ед.)	Медиана	42	11	162**
	Q _{0,25} -Q _{0,75}	22-150	6-19	24-1090

Примечание. МНК культивировали в отсутствие (МНК₀) или присутствии аллогенных IFN-ДК доноров (n = 13), генерированных в стандартных условиях (МНК + ДК_{Инт}) или с дексаметазоном в дозе 10⁻⁶ М (МНК + ДК_{Дек}). Концентрацию IFN_γ и IL-6 в 5-суточных супернатантах алло-СКЛ оценивали с помощью ИФА. * – p < 0,05; ** – p < 0,01 – достоверность различия показателей по сравнению с интактными ДК (U-критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

Чтобы более полно охарактеризовать влияние дексаметазона на цитокиновый профиль IFN-ДК, в отдельной серии экспериментов был проведен мультиплексный анализ 25 различных цитокинов, включая про-/противовоспалительные цитокины (TNF α , IL-1 β , IL-1ra, IL-10), иммунорегуляторные цитокины (IL-2, IFN γ , IL-12, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13, IL-15, IL-17), ростовые факторы (G-CSF, IL-7, FGF- β , PDGF, VEGF) и хемокины (IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , RANTES, Eotaxin). Видно (табл. 2), что интактные IFN-ДК являются активными продуцентами широкого спектра цитокинов, интенсивность секреции которых отличается значительной вариабельностью. Так, часть цитокинов (TNF α , IL-6) и хемокинов (IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , RANTES) синтезируются на исключительно высоком уровне (> 10000 пг/мл). Продукция относительно небольшой группы интерлейкинов (IL-4, IL-5, IL-13 и IL-7) не превышает 100 пг/мл. Оставшаяся часть цитокинов, ростовых факторов

и хемокинов детектируется в диапазоне от 100 до 10000 пг/мл. Среди них продукция IL-1ra, IFN γ , IL-10, G-CSF, PDGF, VEGF и Eotaxin превышает 1000 пг/мл.

В присутствии дексаметазона продукция не только TNF α , но и другого провоспалительного медиатора – IL-1 β , а также Th1-цитокинов (IFN γ , IL-2, IL-12) значительно снижалась. Характерно, что при этом дексаметазон не оказывал заметного влияния на секрецию IL-10, IL-1ra, IL-4 и IL-13, смещая тем самым баланс в сторону противовоспалительных/Th2-медиаторов. IFN-ДК, генерируемые в присутствии дексаметазона, отличались также более низкой продукцией хемокинов. Эти различия были достоверны в отношении MIP-1 α и RANTES и проявлялись в виде тенденции в отношении IP-10 и Eotaxin. Под влиянием дексаметазона регистрировался также отчетливый тренд на снижение продукции ростовых факторов (G-CSF, IL-7, FGF- β ,

PDGF), который в отношении VEGF достигал статистически значимого уровня.

Способность ДК стимулировать пролиферацию Т-клеток в ответ на аллоантигены в СКЛ является интегральным показателем функциональной активности ДК, которая во многом детерминирована экспрессией различных ко-стимуляторных или коингибиторных молекул, а также балансом и уровнем продуцируемых цитокинов. Учитывая, что дексаметазон оказывал выраженный супрессорный эффект на созревание IFN-ДК, а также на продукцию ими провоспалительных и Th1-цитокинов, представлялось важным оценить, влияние дексаметазона на аллостимуляторную активность IFN-ДК в СКЛ. Из данных рисунка 2 видно, что по сравнению с контролем IFN-ДК, генерированные в присутствии дексаметазона, отличались 2-кратным снижением способности стимулировать пролиферативный ответ Т-клеток в алло-СКЛ. Поскольку ДК_{Инт} и ДК_{Дек} у каждого из обследованных доноров были тестированы в идентичных условиях, т.е. в СКЛ с одними и теми же клетками-респондерами, то выявленное снижение аллостимуляторной активности ДК_{Дек} не было связано с эффективностью распознавания CD4⁺Т-лимфоцитами аллоантигенов, представленных на HLA-DR⁺ДК. В то же время корреляционный анализ показал, что способность интактных IFN-ДК стимулировать пролиферативный ответ Т-клеток в алло-СКЛ находится в прямой взаимосвязи с содержанием среди них CD83⁺ клеток ($r_s = 0,57$; $p = 0,04$), и в обратной – с количеством CD14⁺ и TLR2⁺ клеток ($r_s = -0,68$; $p = 0,005$ и $r_s = -0,65$; $p = 0,0005$ соответственно). С этой точки зрения низкая аллостимуляторная активность IFN-ДК_{Дек} во многом объясняется возрастанием среди них доли CD14⁺ и TLR2⁺ клеток и снижением относительного количества CD83⁺ДК (рис. 1).

В заключение, чтобы выяснить, влияет ли дексаметазон на способность IFN-ДК активировать Th1- и Th2-клетки, оценили содержание Th1 (IFN γ) и Th2 (IL-6) цитокинов в супернатантах 5-суточной алло-СКЛ, индуцированной ДК_{Инт} и ДК_{Дек} (табл. 3). Видно, что в культурах МНК в отсутствие стимуляции аллоантигенами продукция IL-6 существенно выше, чем уровень секреции IFN γ (индекс соотношения IL-6/IFN γ составляет в среднем 42 расч. ед.). Культивирование МНК с аллогенными интактными IFN-ДК сопровождалось увеличением концентрации как IL-6, так и IFN γ . Уровень продукции IFN γ в алло-СКЛ увеличивался в среднем в 39 раз, что свидетельствовало о выраженной Th1-стимуляторной активности IFN-ДК, которые при этом стимулировали также и Th2-клетки, поскольку продукция IL-6 возрастала в сред-

нем в 13 раз. Под влиянием дексаметазона Th1-стимуляторная активность IFN-ДК практически полностью блокировалась, что проявлялось достоверным снижением концентрации IFN γ в среднем на 93% (с 1100 до 80 пг/мл, $p_U < 0,01$). Супрессорный эффект дексаметазона в отношении Th2-стимуляторной активности IFN-ДК был менее выраженным, поскольку продукция IL-6 снижалась только на 17% (с 10020 до 8320 пг/мл, $p_U < 0,05$). В результате индекс соотношения IL-6/IFN γ в культурах СКЛ, индуцированных IFN-ДК_{Дек}, возрастал практически в 15 раз (до 162 против 11 расч. ед., $p_U < 0,01$), свидетельствуя о доминировании Th2-поляризирующей активности IFN-ДК под влиянием дексаметазона.

Обсуждение

В настоящем исследовании впервые охарактеризовано влияние дексаметазона на созревание и функции ДК, генерируемых в присутствии IFN α . Интерес к этим клеткам связан с тем, что интерфероны I типа являются мощными индукторами дифференцировки и созревания ДК [10], и такие ДК могут генерироваться *in vivo* при аутоиммунной патологии на фоне повышенного уровня интерферонов [3]. Соответственно, исследование их чувствительности к глюкокортикоидам представляет большой интерес как с точки зрения создания ДК-вакцин, так и раскрытия новых иммуноопосредованных механизмов действия глюкокортикоидной терапии. Проведенные нами исследования продемонстрировали, что дексаметазон подавляет созревание IFN-ДК и усиливает экспрессию TLR2; угнетает продукцию провоспалительных/Th1-цитокинов (TNF α , IL-1 β , IL-2, IFN γ , IL-12) и хемокинов (MIP-1 α , RANTES); ингибирует аллостимуляторную активность ДК, а также блокирует Th1-стимуляторную активность, смещая баланс в сторону доминирования Th2-поляризирующей активности IFN-ДК.

Исследования эффектов глюкокортикоидов на ДК, генерируемые из моноцитов в присутствии IL-4, показали, что глюкокортикоиды ингибируют NF- κ B зависимую дифференцировку и созревание IL4-ДК [14, 17, 21]. Такие «толерогенные» IL4-ДК характеризуются менее зрелым фенотипом, сниженной экспрессией ко-стимуляторных молекул, а также угнетением продукции провоспалительных (TNF α , IL-1 β) и Th1 (IL-12) цитокинов и повышенной продукцией IL-10 [21, 22, 31]; отличаются низкой аллостимуляторной активностью, что обусловлено повышенной экспрессией PD-L1 (B7-H1) и продукцией IL-10; не способны активировать Th1-ответ; индуцируют

анергию наивных Т-клеток и Т-клеток памяти и генерацию регуляторных Т_H1-клеток [30, 32, 33].

Полученные нами результаты демонстрируют во многом сходные эффекты глюкокортикоидов на IFN α -индуцированные ДК. В то же время дексаметазон не оказывал значимого ингибирующего эффекта на экспрессию антигенов гистосовместимости (HLA-DR) и костимуляторных молекул (CD86) IFN-ДК и не вызывал повышения экспрессии коингибиторной молекулы PD-L1 (B7-H1), как это было выявлено в культурах ИЛ4-ДК [21, 31, 32]. Подобные расхождения могут быть обусловлены не столько особенностями IFN-ДК, сколько методическими различиями (доза дексаметазона, времени внесения глюкокортикоидов в культуру ДК, стадия зрелости ДК). Так, например, возрастание экспрессии PD-L1 было продемонстрировано в культурах незрелых ИЛ4-ДК при добавлении дексаметазона с начала культивирования клеток [32]. В то же время, при анализе LPS-активированных ИЛ4-ДК и более позднем внесении дексаметазона, стимулирующий эффект дексаметазона на экспрессию PD-L1 не выявлялся [8, 29].

Несмотря на отсутствие значимого эффекта на экспрессию PD-L1, дексаметазон в 2 раза усиливал экспрессию TLR2 в культурах IFN-ДК. Аналогичный эффект глюкокортикоидов описан в отношении ИЛ4-ДК [5, 24]. Согласно данным литературы, высокая экспрессия TLR-2 на ДК ассоциирована с высокой продукцией ИЛ-10 и низкой секрецией TNF α и IFN γ при стимуляции LPS, что позволяет рассматривать данную молекулу в качестве маркера толерогенной активности ДК [5]. Полученные нами результаты подтвердили сопряженность высокой экспрессии TLR-2 со снижением провоспалительных и Th1 цитокинов LPS-активированными IFN-ДК, однако не выявили ассоциации с усилением продукции ИЛ-10. Данные о влиянии глюкокортикоидов на продукцию ИЛ-10 неоднозначны. Так, ряд авторов демонстрируют стимулирующий эффект дексаметазона на продукцию ИЛ-10 дендритными клетками [4, 22, 33], тогда как по данным других, глюкокортикоиды не оказывают значимого эффекта на секрецию ИЛ-10 [21, 29, 31]. Возможно, отсутствие стимулирующего действия дексаметазона на продукцию ИЛ-10 связано с особенностями генерируемых в присутствии интерфе-

рона-альфа ДК, которые исходно отличаются более высокой продукцией ИЛ-10 по сравнению с ИЛ4-ДК [16]. Схожие данные, о том, что толерогенная активность IFN-ДК не связана с усилением продукции ИЛ-10, были продемонстрированы в культурах ДК, генерируемых в присутствии активных метаболитов витамина D3 [9]. Так или иначе, между содержанием TLR2-позитивных IFN-ДК и их аллостимуляторной активностью выявлялась значимая обратная корреляционная связь, подтверждающая роль данной молекулы в реализации толерогенной активности ДК.

Одним из возможных механизмов ингибирующего действия дексаметазона на способность IFN-ДК стимулировать пролиферацию Т-клеток и активировать Th1-ответ может быть снижение продукции IFN-ДК провоспалительных и Th1-цитокинов, необходимых для поддержания пролиферации Т-клеток. Поскольку мы не выявили стимулирующего действия дексаметазона на экспрессию PD-L1 и продукцию ИЛ-10 в культурах IFN-ДК, вопрос о способности этих клеток индуцировать анергию/апоптоз Т-клеток, а также генерацию регуляторных Т-клеток, остается открытым и требует дальнейших исследований. Тем не менее, данные об ингибирующем влиянии дексаметазона на продукцию IFN-ДК хемокинов (MIP-1 α и RANTES) позволяет предполагать, что эти клетки могут быть дефектны в отношении рекрутирования Т-лимфоцитов. Известно, что RANTES и MIP-1 α являются лигандами CCR5, который экспрессируется Th1-клетками, а также антигенспецифическими CD8 эффекторными Т-лимфоцитами и Т-клетками памяти [7, 27]. MIP-1 α является также лигандом для CCR3, экспрессируемого Th2-клетками [27]. Таким образом, снижение продукции этих хемокинов может негативным образом сказываться на способности ДК к рекрутированию и активации хелперных и эффекторных Т-лимфоцитов.

В целом полученные данные свидетельствуют о том, что ДК, генерируемые в присутствии интерферона-альфа, чувствительны к толерогенному действию дексаметазона и, следовательно, могут опосредовать иммуномодулирующий эффект глюкокортикоидной терапии, а также рассматриваться в качестве новых кандидатов для разработки толерогенных лечебных ДК-вакцин при аутоиммунной патологии.

Список литературы / References

1. Bakdash G., Sittig S.P., van Dijk T., Figdor C.G., de Vries I.J. The nature of activatory and tolerogenic dendritic cell-derived signal II. *Front Immunol.*, 2013, Vol. 4, p. 53.
2. Biggioggero M., Gabbriellini L., Meroni P.L. Type I interferon therapy and its role in autoimmunity. *Autoimmunity*, 2010, Vol. 43, no. 3, pp. 248-254.
3. Blanco P., Palucka A.K., Gill M., Pascual V., Banchereau J. Induction of dendritic cell differentiation by IFN-alpha in systemic lupus erythematosus. *Science*, 2001, Vol. 294, no. 5546, pp. 1540-1543.

4. Canning M.O., Grotenhuis K., de Wit H.J., Drexhage H.A. Opposing effects of dehydroepiandrosterone and dexamethasone on the generation of monocyte-derived dendritic cells. *Eur. J. Endocrinol.*, 2000, Vol. 143, no. 5, pp. 687-695.
5. Chamorro S. TLR triggering on tolerogenic dendritic cells results in TLR2 up-regulation and a reduced proinflammatory immune program. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 183, no. 5, pp. 2984-2994.
6. 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-alpha. *J. Leukoc. Biol.*, 2004, Vol. 75, no. 1, pp. 106-116.
7. Fukada K., Sobao Y., Tomiyama H., Oka S., Takiguchi M. Functional expression of the chemokine receptor CCR5 on virus epitope-specific memory and effector CD8⁺ T cells. *J. Immunol.*, 2002, Vol. 168, no. 5, pp. 2225-2232.
8. García-González P., Morales R., Hoyos L., Maggi J., Campos J., Pesce B., Gárate D., Larrondo M., González R., Soto L., Ramos V., Tobar P., Molina M.C., Pino-Lagos K., Catalán D., Aguillón J.C. A short protocol using dexamethasone and monophosphoryl lipid A generates tolerogenic dendritic cells that display a potent migratory capacity to lymphoid chemokines. *J. Transl. Med.*, 2013, Vol. 11, p. 128.
9. Gauzzi M.C., Maghazachi G., Belardelli F., Adorini L., Jin S.Y., Wang L., Daniel K.C., Maghazachi A.A., Belardelli F., Adorini L., Gessani S. Suppressive effect of 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3 on type I IFN-mediated monocyte differentiation into dendritic cells: impairment of functional activities and chemotaxis. *J. Immunol.*, 2005, Vol. 174, no. 1, pp. 270-276.
10. Gessani S., Conti L., Del Cornò M., Belardelli F. Type I interferons as regulators of human antigen presenting cell functions. *Toxins (Basel)*, 2014, Vol. 6, no. 6, pp. 1696-1723.
11. Gordon J.R., Ma Y., Churchman L., Gordon S.A., Dawicki W. Regulatory dendritic cells for immunotherapy in immunologic diseases. *Front Immunol.*, 2014, Vol. 5, p. 7.
12. Gottenberg J.E., Chiochia G. Dendritic cells and interferon-mediated autoimmunity. *Biochimie*, 2007, Vol. 89, no. 6-7, pp. 856-871.
13. Harry R.A., Anderson A.E., Isaacs J.D., Hilkens C.M. Generation and characterization of therapeutic tolerogenic dendritic cells for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.*, 2010, Vol. 69, no. 11, pp. 2042-2050.
14. Hilkens C.M.U., Isaacs J.D. Tolerogenic dendritic cells in clinical practice. *Open Arthritis Journal*, 2010, Vol. 3, pp. 8-12.
15. Hubo M., Trinschek B., Kryczanowsky F., Tuettenberg A., Steinbrink K., Jonuleit H. Costimulatory molecules on immunogenic versus tolerogenic human dendritic cells. *Front Immunol.*, 2013, Vol. 4, p. 82.
16. Leplina O.Y., Tyrinova T.V., Tikhonova M.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Interferon alpha induces generation of semi-mature dendritic cells with high pro-inflammatory and cytotoxic potential. *Cytokine*, 2015, Vol. 71, no. 1, pp. 1-7.
17. Matasic R., Dietz A.B., Vuk-Pavlovic S. Dexamethasone inhibits dendritic cell maturation by redirecting differentiation of a subset of cells. *J. Leukoc Biol.*, 1999, Vol. 66, no. 6, pp. 909-914.
18. Matyszak M.K., Citterio S., Rescigno M., Ricciardi-Castagnoli P. Differential effects of corticosteroids during different stages of dendritic cell maturation. *Eur. J. Immunol.*, 2000, Vol. 30, no. 4, pp. 1233-1242.
19. Paquette R.L., Hsu N.C., Kiertscher S.M., Park A.N., Tran L., Roth M.D., Glaspy J.A. Interferon-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor differentiate peripheral blood monocytes into potent antigen-presenting cells. *J. Leukoc. Biol.*, 1998, Vol. 64, no. 3, pp. 358-367.
20. Peña C., Gárate D., Contreras-Levicoy J., Aravena O., Catalán D., Aguillón J.C. Dexamethasone preconditioning improves the response of collagen-induced arthritis to treatment with short-term lipopolysaccharide-stimulated collagen-loaded dendritic cells. *Clin. Dev. Immunol.*, 2013, Vol. 2013, Article ID 296031.
21. Piemonti L., Monti P., Allavena P., Sironi M., Soldini L., Leone B.E., Soggi C., Di Carlo V. Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation. *J. Immunol.*, 1999, Vol. 162, no. 11, pp. 6473-6481.
22. Rea D., van Kooten C., van Meijgaarden K.E., Melief C.J.M., Ofringa R. Glucocorticoids transform CD40-triggering of dendritic cells into an alternative activation pathway resulting in antigen presenting cells that secrete IL-10. *Blood*, 2000, Vol. 95, no. 10, pp. 3162-3167.
23. Rönnblom L., Eloranta M.L. The interferon signature in autoimmune diseases. *Curr Opin Rheumatol.*, 2013, Vol. 25, no. 2, pp. 248-253.
24. Rozkova D., Horvath R., Bartunkova J., Spisek R. Glucocorticoids severely impair differentiation and antigen presenting function of dendritic cells despite up-regulation of Toll-like receptors. *Clin. Immunol.*, 2006, Vol. 120, no. 3, pp. 260-271.
25. Santini S.M., Lapenta C., Logozzi M., Parlato S., Spada M., di Pucchio T., Belardelli F. Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in hu-pbl-scld mice. *J. Exp. Med.*, 2000, Vol. 191, no. 10, pp. 1777-1788.
26. Steinman R.M., Hawiger D., Liu K., Bonifaz L., Bonnyay D., Mahnke K., Iyoda T., Ravetch J., Dhodapkar M., Inaba K., Nussenzweig M. Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance. *Ann N Y Acad Sci.*, 2003, Vol. 987, no. 1, pp. 15-25.
27. Syrbe U., Siveke J., Hamann A. Th1/Th2 subsets: distinct differences in homing and chemokine receptor expression? *Springer Semin Immunopathol.*, 1999, Vol. 21, no. 3, pp. 263-285.

28. Thurner B., Röder C., Dieckmann D., Heuer M., Kruse M., Glaser A., Keikavoussi P., Kämpgen E., Bender A., Schuler G. Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application. *J. Immunol. Methods*, 1999, Vol. 223, no. 1, pp. 1-15.

29. Unger W.W., Laban S., Kleijwegt F.S., van der Slik A.R., Roep B.O. Induction of T-reg by monocyte-derived DC modulated by vitamin D3 or dexamethasone: differential role for PD-L1. *Eur. J. Immunol.*, 2009, Vol. 39, no. 11, pp. 3147-3159.

30. Van Kooten C., Stax A.S., Woltman A.M., Gelderman K.A. Handbook of experimental pharmacology "dendritic cells": the use of dexamethasone in the induction of tolerogenic DCs. *Handb. Exp. Pharmacol.*, 2009, Vol. 188, pp. 233-249.

31. Woltman A.M., de Fijter J.W., Kamerling S.W., Paul L.C., Daha M.R., van Kooten C. The effect of calcineurin inhibitors and corticosteroids on the differentiation of human dendritic cells. *Eur. J. Immunol.*, 2000, Vol. 30, no. 7, pp. 1807-1812.

32. Woltman A.M., Vander Kooij S.W., De Fijter J.W., van Kooten C. Maturation-resistant dendritic cells induce hyporesponsiveness in alloreactive CD45RA⁺ and CD45RO⁺T-cell populations. *Am. J. Transplant.*, 2006, Vol. 6, no. 11, pp. 2580-2591.

33. Xia C.Q., Peng R., Beato F., Clare-Salzler M.J. Dexamethasone induces IL-10-producing monocyte-derived dendritic cells with durable immaturity. *Scand. J. Immunol.*, 2005, Vol. 62, no. 1, pp. 45-54.

Авторы:

Курочкина Ю.Д. — аспирант лаборатории клеточной иммуноterapiи, врач-ревматолог клиники иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

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

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

Тыринова Т.В. — к.м.н., научный сотрудник лаборатории клеточной иммуноterapiи ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Баторов Е.В. — к.м.н., научный сотрудник лаборатории клеточной иммуноterapiи ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Сизиков А.Э. — к.м.н., заведующий отделением ревматологии Клиники иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

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

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

Authors:

Kurochkina Yu.D., Postgraduate Student, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Physician (Rheumatology), Immunopathology Clinics, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

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

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

Tyrinova T.V., PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Batorov E.V., PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Sizikov A.E., PhD (Medicine), Head, Rheumatology Department, Immunopathology Clinics, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

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

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

Поступила 23.03.2016
Принята к печати 31.05.2016

Received 23.03.2016
Accepted 31.05.2016