

Цатуров Максим Эдуардович

Особенности дендритных клеток, полученных при различных условиях стимуляции моноцитов новорожденных детей *in vitro*

14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва, 2010

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского,
биологический факультет, кафедра молекулярной биологии и иммунологии

Федеральное государственное учреждение науки Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора.

Научный руководитель:

Доктор медицинских наук Талаев Владимир Юрьевич

Официальные оппоненты:

Доктор медицинских наук, профессор Пинегин Борис Владимирович

Доктор биологических наук, профессор Куралесова Альбина Ивановна

Ведущая организация:

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

Защита состоится « ___ » _____ 2010 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.046.02 при ФГУН «Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУН «Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора

Автореферат разослан « ___ » _____ 2010 г.

Ученый секретарь Диссертационного Совета,

кандидат медицинских наук

Новикова Л.И.

Общая характеристика работы

Актуальность темы

Функционирование иммунной системы в ответ на антигенное раздражение и вне его находится под контролем многих молекулярных и клеточных систем. Эти системы призваны обеспечить оптимальный запуск и протекание реакции на антиген и при этом, не дать перейти этому процессу в русло различных системных отклонений, результатом которых может стать развитие аутоиммунной агрессии к собственным клеткам и тканям. Центральную роль в инициации первичного иммунного ответа играют дендритные клетки (ДК) – наиболее активные и высокоспециализированные антигенпрезентирующие клетки организма. Кроме инициации иммунных реакций немаловажной является роль ДК в регуляции иммунных процессов в организме и поддержания гомеостаза иммунокомпетентных клеток. ДК являются важнейшими участниками системы контроля иммунного ответа, так как основа контроля – центральная и периферическая толерантность как к ауто-, так и к аллоантигенам, зависит прежде всего от эффективной работы именно этих клеток (Guermontprez et al., 2002, Machy et al., 2002).

Известно, что процессы иммунного ответа и поддержания клеточного гомеостаза лимфоцитов в раннем постнатальном периоде существенно отличаются от аналогичных процессов у взрослых. В этой связи, особенно интересным аспектом исследования функциональной значимости ДК является изучение последних на ранних этапах развития, т.е. с позиций онтогенетической зрелости иммунной системы (Schönland et al., 2003).

Исследования механизмов регуляции процессов созревания ДК при различных условиях культивирования необходимы для последовательного понимания процессов отклонений в работе иммунной системы человека в целом и, особенно, на ранних этапах развития ребенка. Исследование механизмов выработки толерогенных свойств позволяет оценить возможность применения дендритных клеток с модулированными в ходе

созревания свойствами при решении ряда проблем, возникающих в клинической практике при лечении аутоиммунных заболеваний и предотвращении отторжения трансплантированных органов.

Цель работы

Изучить особенности функционального созревания дендритных клеток новорожденных детей при различных условиях культивирования клеток, а также под действием иммуномодулирующих агентов, способных изменить функциональные свойства ДК в плане выработки толерогенных свойств *in vitro* и определить их участие в выработке толерантности к антигенам.

Задачи исследования

1. Проанализировать особенности фенотипического созревания ДК новорожденных и взрослых в зависимости от условий культивирования.
2. Определить влияние препаратов глюкокортикоидов и различных цитокинов на экспрессию специфических маркеров дендритными клетками новорожденных детей и взрослых.
3. Провести сравнительный анализ продукции цитокинов дендритными клетками новорожденных и взрослых.
4. Исследовать функциональные свойства дендритных клеток новорожденных и взрослых в различных моделях взаимодействия с аллогенными Т-лимфоцитами.
5. Сравнить особенности созревания обычных и потенциально толерогенных дендритных клеток новорожденных и взрослых.

Научная новизна

Были выявлены статистически значимые отличия между фенотипическими и функциональными свойствами ДК, полученных из моноцитов пуповинной крови новорожденных и венозной крови взрослых

здоровых доноров. Показан разный уровень экспрессии на мембране дендритных клеток функционально значимых маркеров, а также выявлены различия в продукции цитокинов дендритными клетками в зависимости от стадии созревания и условий культивирования. Показан сложный характер влияния синтетического глюкокортикоида дексаметазона на уровень продукции интерлейкина-10 дендритными клетками.

В ходе исследований впервые был выявлен стимулирующий эффект глюкокортикоидов, действующих в совокупности с интерлейкином-7, на экспрессию молекул антигенпрезентации на ДК новорожденных и взрослых.

Впервые проведены исследования толерогенных свойств ДК новорожденных в оригинальных моделях *in vitro* с использованием конкурентного и последовательного взаимодействия обычных ДК и ДК, подвергавшихся воздействию противовоспалительными агентами.

Практическая значимость

Разработаны оригинальные схемы культивирования дендритных клеток, предназначенные для выявления специфических свойств ДК.

Проведенные исследования механизмов регуляции процессов созревания ДК при различных условиях культивирования необходимы для разработки методов получения. Разработанные методики получения ДК со специфическими иммуностимулирующими или супрессорными свойствами могут быть использованы при оптимизации условий создания дендритно-клеточных препаратов для цитотерапии патологий как с недостаточностью иммунного ответа (онкологические заболевания), так и связанных с избыточной иммунной реакцией (аллергии, отторжение аллотрансплантата). Толерогенные ДК могут найти применение в качестве основного инструмента при цитотерапии врожденных и приобретенных патологических срывов ауто толерантности организма к собственным антигенам.

Внедрение результатов работы

Материалы диссертационной работы вошли в аналитический обзор “Методы выделения, культивирования и оценки функциональной активности дендритных клеток новорожденных”, рекомендованный для ознакомления и использования в работе специалистам учреждений научного профиля, занимающимся вопросами изучения формирования иммунного ответа Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Апробация материалов диссертации

Диссертация апробирована на совместном заседании 1) Ученого Совета ФГУН “Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной” Роспотребнадзора, 2) кафедры молекулярной биологии и иммунологии биологического факультета ГОУ ВПО «Нижегородский Государственный Университет им. Н.И. Лобачевского» Федерального агентства по образованию 3) расширенного межлабораторного научного семинара ФГУН “Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной” Роспотребнадзора (протокол № 11 от 30.06.10).

Основные материалы работы были доложены на научной конференции молодых ученых «Фундаментальная наука и клиническая медицина» (Санкт-Петербург, 2007), на научной конференции Биосистемы организация поведение управление (Н. Новгород, 2007) и на 2-ой республиканской конференции «Иммунология репродукции: теоретические и клинические аспекты» (Сочи, 2007).

Положения, выносимые на защиту:

1. Выявленные особенности фенотипического созревания дендритных клеток, свидетельствуют о своеобразной последовательности событий этого процесса у новорожденных детей.

2. Характерная продукция цитокинов дендритными клетками новорожденных свидетельствует о специфических функциональных особенностях этих ДК .
3. Модулированные противовоспалительными агентами дендритные клетки новорожденных обладают менее выраженными толерогенными свойствами, что является предпосылкой для более эффективного развертывания периферического отдела иммунной системы организма ребенка.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 13 научных работ, в том числе 7 – в журналах, рекомендованных ВАК для кандидатских диссертаций, одна статья в иностранном журнале, 4 тезисов докладов, 1 статья в сборнике.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 150 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы», главы «Результаты исследований», главы «Обсуждение полученных результатов», выводов и списка цитируемой литературы, который содержит 5 отечественных и 187 зарубежных источника. Диссертация иллюстрирована 29 рисунками.

Содержание работы

Материалы и методы исследования

Исследования, связанные с характеристикой клеток периферической крови проводить на базе лаборатории кафедры молекулярной биологии и иммунологии биологического факультета ГОУ ВПО ННГУ им. Н.И. Лобачевского

Этап экспериментов, связанный с функциональным и фенотипическим анализом лимфоцитов и дендритных клеток в условиях *in vitro* проводить на

базе лаборатории клеточной иммунологии ФГУН ННИИЭМ им. акад. И.Н. Блохиной.

Биологический материал предоставлен родильным домом № 1, г. Нижнего Новгорода.

В работе было проведено исследование ДК, полученных из моноцитов периферической крови здоровых взрослых доноров и пуповинной крови здоровых доношенных новорожденных. За весь период работы были изучены дендритные клетки, полученные из моноцитов от 33 взрослых доноров и 20 новорожденных детей. Все работы с клетками крови проводились в стерильных боксах и ламинарном шкафу. Для выделения МНПК гепаринизированную кровь наслаивали на Гистопак-1077 (Sigma, USA). Выделенные МНПК ресуспендировали в питательной среде DMEM (Sigma, USA) с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Биолот, Санкт-Петербург), L-глутамином и гентамицином. Дендритные клетки получали по стандартному методу культивирования. Клеточные суспензии свежевыделенных МНПК инкубировали 3 часа при 37° С. Затем неадгезировавшиеся клетки осторожно смывали DMEM. Во все лунки вносили полную питательную среду. Также во все лунки кроме контроля (моноциты) добавляли ГМ-КСФ (Biosource, USA) до концентрации 100 нг/мл, а также ИЛ-4 (Sigma, USA) или ИЛ-7 (Sigma, USA) до концентрации 20 нг/мл. Для исследования действия глюкокортикоидов на созревание ДК в отдельные лунки вносили дексаметазон (KRKA, Slovenia) до концентрации 0,4 мкг/мл. Культивировали 4 суток при 37° С и 5% CO₂. В конце 4-х суток проводили пересев культур с заменой 300 мл среды и добавлением цитокинов в тех же концентрациях. На седьмые сутки клетки пересевали в новую среду и добавляли активаторы созревания: ФНО α (Sigma, USA) в концентрации 10 нг/мл, sCD154 (Biosource, USA) – 1 мкг/мл, ЛПС (ГИСК им. Тарасевича Л.А. , Москва) – 1 мкг/мл. По окончании инкубации (в общей сложности 9 суток) часть клеток ($2 - 3 \times 10^5$) отбирали для цитометрического

исследования фенотипа. Оставшиеся клетки использовались для определения их функциональных свойств. Для исследования модулирующего влияния ИЛ-10 на свойства ДК использовался рекомбинантный человеческий ИЛ-10 (Biosource, USA) в двух рабочих концентрациях 20 нг/мл и 100 нг/мл. Получение дендритных клеток в короткой схеме культивирования осуществляли способом, описанным для классической схемы. Только в данном случае сроки культивирования сокращались вдвое. Для исследования фенотипа полученных дендритных клеток в работе использовался метод лазерной проточной цитофлюориметрии. Клетки окрашивались моноклональными антителами, мечеными флюорохромами. Окрашенные клетки анализировали на проточном цитофлюориметре FacsCalibur (BD Biosciences Immunocytometry Systems, USA) в режиме двухцветной цитометрии. Результаты обрабатывали с помощью программного обеспечения CellQuest и WinMDI 2.8. Оценивался процент клеток, несущих маркер и плотность экспрессии данного маркера по геометрической средней яркости свечения окрашенных клеток.

Функциональные свойства дендритных клеток определяли по их способности стимулировать пролиферацию аллогенных лимфоцитов и усиливать продукцию интерферона- γ Т-клетками, а также по способности индуцировать продукцию различных цитокинов (ИЛ-4 и ИЛ-5) лимфоцитами в смешанной лейкоцитарной реакции (СЛР). Для этого дендритные клетки смешивали с аллогенными лимфоцитами крови взрослых здоровых доноров в различных соотношениях (1:25÷1:200). Лимфоциты получали путем смыва неадгезировавшихся мононуклеарных клеток после культивирования МНПК в полистироловых планшетах в течение 2-3 часов при 37 °С и 5 % CO₂. В качестве контроля использовали мононуклеарные клетки без добавления дендритных клеток или стимуляторов. В качестве положительного контроля использовали мононуклеарные клетки, стимулированные митогеном конканавалином А (КонА в концентрации 7,5 мкг/мл). Схемы СЛР были

нескольких типов: обычная СЛР, СЛР-одновременно, двухэтапная СЛР. Обычная СЛР проводилась для выявления стимулирующей способности получаемых при различных условиях дендритных клеток. В СЛР-одновременно оценивалось конкурирующее взаимодействие обычных и модулированных ДК. Двухэтапная СЛР применялась для выявления особенностей воздействия модулированных ДК на аллогенные лимфоциты.

Во всех экспериментах пролиферативный ответ аллогенных лимфоцитов оценивали по включению в ДНК пролиферирующих клеток меченного тритием метилтимидина, который добавляли в лунки на сроки 96 – 120, 120 – 144 или 168 - 192 часа культивирования. Анализ концентрации ИЛ-1 β и ИЛ-10 в надосадках культур ДК; ИЛ-4, ИЛ-5 и ИНФ-гамма в надосадках из СЛР проводили с использованием наборов реагентов для твердофазного иммуноферментного анализа «ИФА-ИЛ-10» (Цитокин, С.-Петербург) и «ИНФ-гамма-, ИЛ-4-, ИЛ-1 β -ИФА-Бест» (Вектор-Бест, Новосибирск), «IL-5 ELISA KIT» (Invitrogen, USA).

Для статистической обработки данных использовали критерий Стьюдента. Данные на рисунках представлены в виде $M \pm m$.

Результаты исследования и их обсуждение

Культивирование моноцитов взрослых доноров и новорожденных детей в течение 2 суток в присутствии ИЛ-4 и ГМ-КСФ с последующей активацией ФНО α (fastДК), а также при культивировании в течении 8 суток (ДК), приводит к изменению морфологических, фенотипических и функциональных свойств клеток. Изменения морфологии касаются, прежде всего, размера клеток и степени гранулированности цитоплазмы.

Сравнение экспрессии мембранных молекул на ДК-4 и fastДК-4 (клетки, стимулированные в ходе созревания интерлейкином-4) выявляет признаки фенотипической незрелости fastДК-4 как у детей, так и у взрослых. Так, fastДК-4 взрослых, несмотря на высокий уровень экспрессии HLA-DR и CD86, отличаются практически полным

отсутствием CD80, низким уровнем экспрессии CD83 и сохранением экспрессии моноцитарного маркера CD14 на существенной части клеток (рис. 1).

FastДК-4, полученные из моноцитов пуповинной крови демонстрируют необычное сочетание фенотипических признаков. Сохранение CD14 на большом количестве клеток свидетельствует о задержке их созревания. В то же время, эти клетки отличаются повышенным уровнем экспрессии костимулирующей молекулы CD86 в отличие от ДК, культивированных в течение 8 суток.

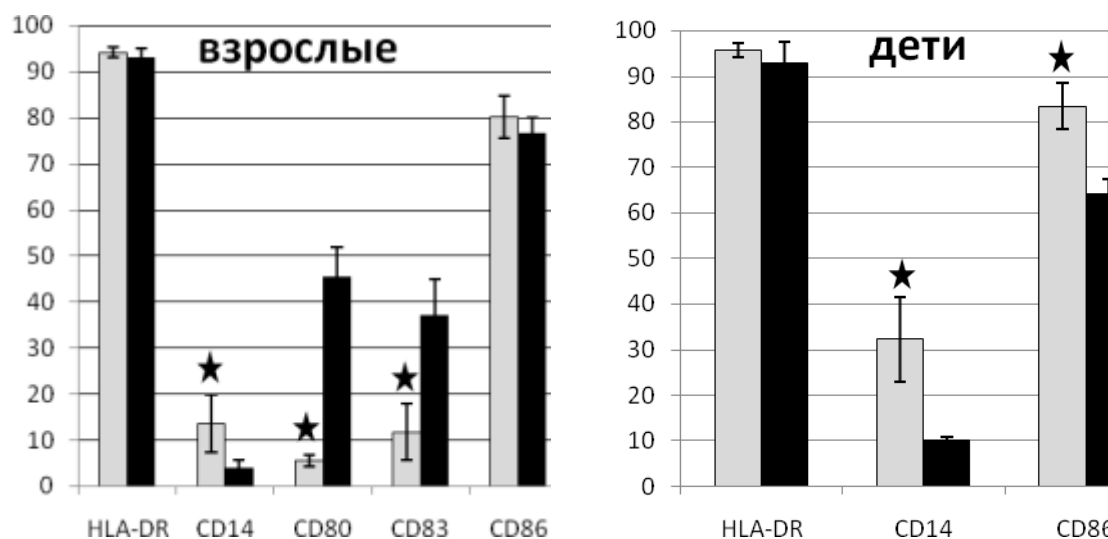


Рис. 1. Сравнение экспрессии маркеров дендритных клеток на fastДК-4 и ДК-4 взрослых и детей. Серые диаграммы – fastДК-4, черные – ДК-4. Звездочкой обозначены статистически значимые отличия fastДК-4 от ДК-4 ($p < 0,05$) в непарном т-тесте. Единицы измерения – процент клеток, несущих соответствующий маркер.

Более детальное рассмотрение фенотипических свойств полученных клеток было проведено при использовании различных условий созревания дендритных клеток. Наиболее характерные различия особенностей созревания дендритных клеток новорожденных и взрослых выявляются при культивировании клеток в присутствии глюкокортикоидов и ИЛ-7.

Экспрессия молекулы HLA-DR статистически достоверно повышается на fastДК-4, росших как без дексаметазона, так и с дексаметазоном (fastДК-4-ДЕКС) по сравнению с моноцитами. FastДК-7 и fastДК-7-ДЕКС обладают значимо меньшим количеством клеток, экспрессирующих HLA-DR. Данный маркер экспрессируется не более чем на 85% fastДК-7 и fastДК-7-ДЕКС, что почти полностью соответствует экспрессии HLA-DR на моноцитах (рис. 2).

В экспрессии моноцитарного маркера CD14 наблюдается иная картина (рис. 2). При культивировании со стимуляторами, количество экспрессирующих данный маркер клеток резко снижается и составляет в среднем 13% fastДК-4; 18% fastДК-4-ДЕКС; 29% fastДК-7 и, около 40% fastДК-7-ДЕКС у взрослых. Как уже было отмечено выше, у новорожденных большее количество fastДК сохраняет экспрессию CD14. Достоверно больше fastДК-4 и fastДК-7 детей сохраняют на своей мембране CD14 (32 и 43% соответственно). Введение в культуру дексаметазона нивелирует эти различия между клетками детей и взрослых за счет снижения экспрессии этого маркера на клетках детей. Плотность экспрессии HLA-DR зависит от типа стимулятора (ИЛ-7 или ИЛ-4), а также от добавления в среду дексаметазона. При использовании в качестве стимулятора ИЛ-7, показатель GMean как для fastДК взрослых, так и fastДК новорожденных является более низким по сравнению с клетками, в вариантах культур которых использовался ИЛ-4 (рис. 3). Добавление дексаметазона приводит к увеличению плотности экспрессии HLA-DR на всех типах fastДК детей и взрослых. Причем наибольшую плотность молекул HLA-DR удается достичь с помощью дексаметазона в культурах fastДК новорожденных, стимулированных ИЛ-7.

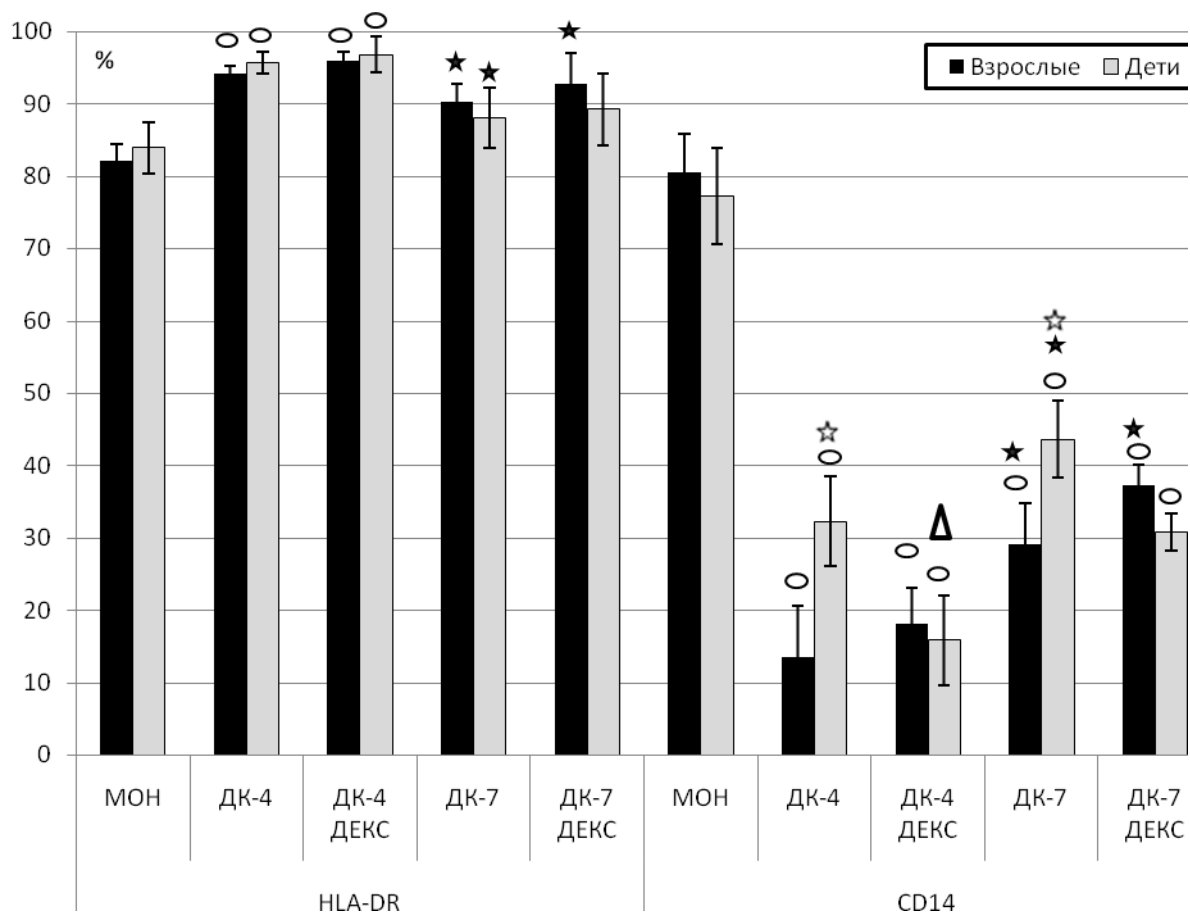


Рис. 2. Количество трехсуточных, активированных ФНО α fastДК (%), несущих на своей поверхности молекулы HLA-DR и CD14. Статистически значимые отличия в парном t-тесте: ДК 4/ДК 7 - ★; ДЕКС/без ДЕКС - Δ; ДК/моноцитарный контроль - ○ ($p < 0,05$); дети/взрослые - ☆.

Культивирование моноцитов в присутствии стимуляторов дифференцировки в течение 2 суток, с последующей активацией ФНО α в течение суток недостаточно для получения полноценно зрелых ДК. Экспрессия CD83 остается на уровне моноцитарного контроля или незначительно отличается от него практически во всех вариантах культур fastДК взрослых, независимо от применения ИЛ-4 или ИЛ-7 при стимуляции созревания. Этого нельзя сказать о fastДК новорожденных. За трое суток культивирования клеток, экспрессия CD83 повышается более чем на трети fastДК новорожденных детей, что заметно отличает их от fastДК взрослых.

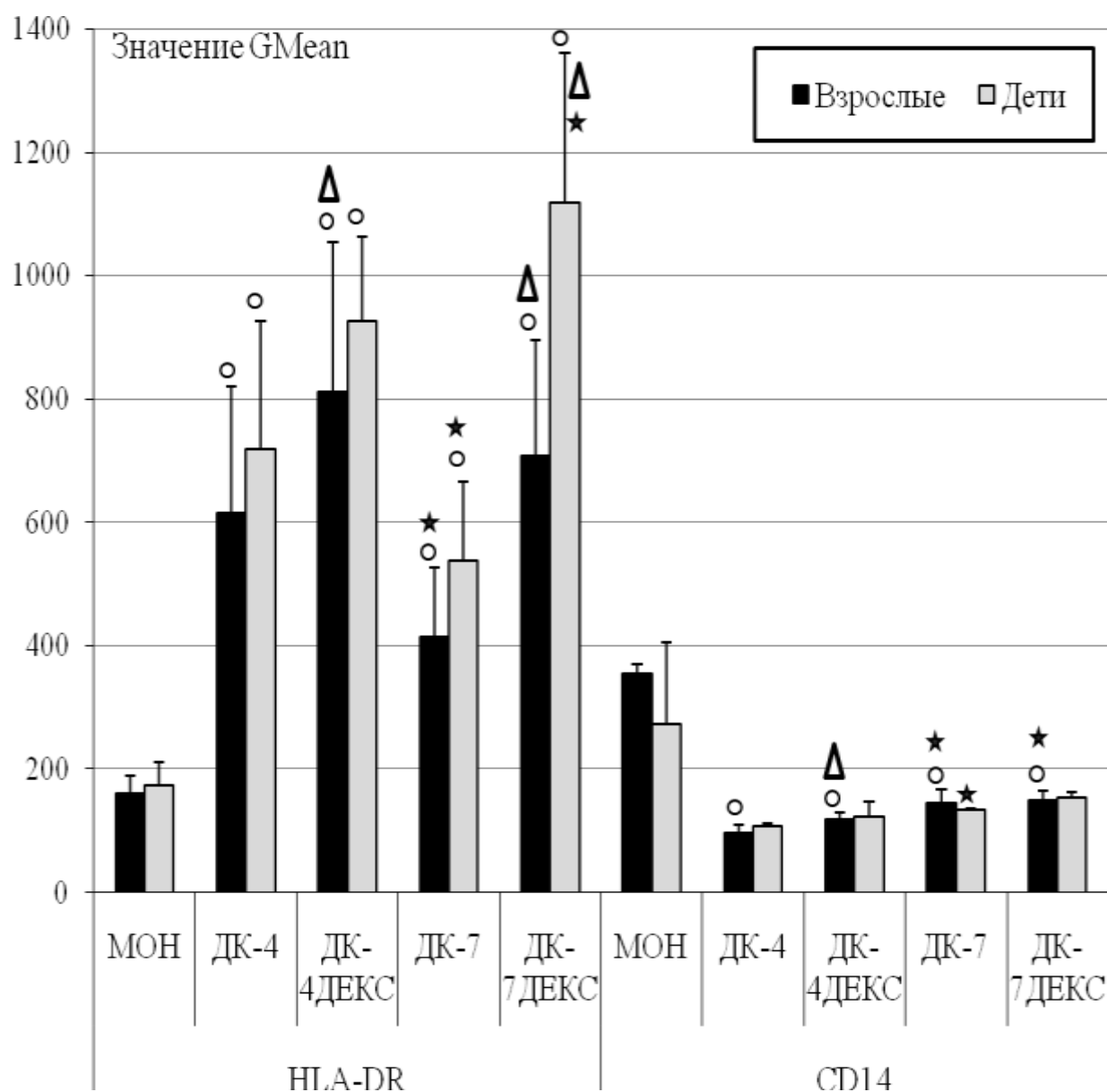


Рис. 3. Плотность экспрессии молекул CD14 и HLA-DR на мембране fastДК (GMean). Статистически значимые отличия в парном т-тесте: ДК 4/ДК 7 - ★; ДЕКС/без ДЕКС - Δ; ДК/моноцитарный контроль - ○ ($p < 0,05$).

Данная закономерность прослеживается во всех вариантах культур fastДК новорожденных, т.е. при культивировании моноцитов в столь короткие сроки со стимуляторами происходит более быстрое фенотипическое созревание fastДК новорожденных. Влияние ИЛ-7 на экспрессию CD83 по сравнению с ИЛ-4 оказывается менее выраженным (рис. 4).

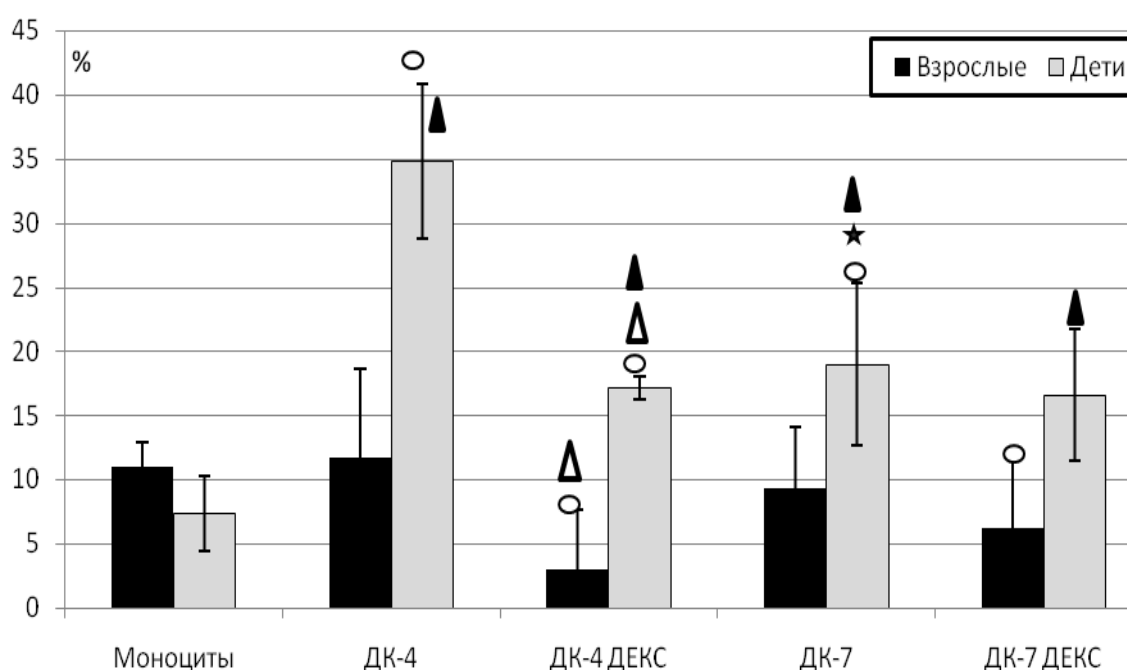


Рис. 4. Количество fastДК, имеющих на своей мембране молекулу CD83. Статистически значимые отличия в парном т-тесте: дети/взрослые - ▲ ($p < 0,05$); ДК 4/ДК 7 - ★; ДЕКС/без ДЕКС - Δ ($p < 0,01$); ДК/моноцитарный контроль - ○ ($p < 0,05$).

Необычным оказывается действие дексаметазона на экспрессию CD83. Дексаметазон вызывает достоверное снижение экспрессии CD83 на fastДК детей, стимулированных ИЛ-4, при этом, не оказывая никакого влияния на fastДК-7 (рис. 4)

Функциональные свойства дендритных клеток новорожденных и взрослых при культивировании в течение 3 суток практически не различаются (рис. 5). Как и следовало ожидать, наибольшая продукция ИФН γ аллогенными Т-лимфоцитами наблюдалась в смешанной лейкоцитарной реакции (СЛР), где применялись fastДК-4.

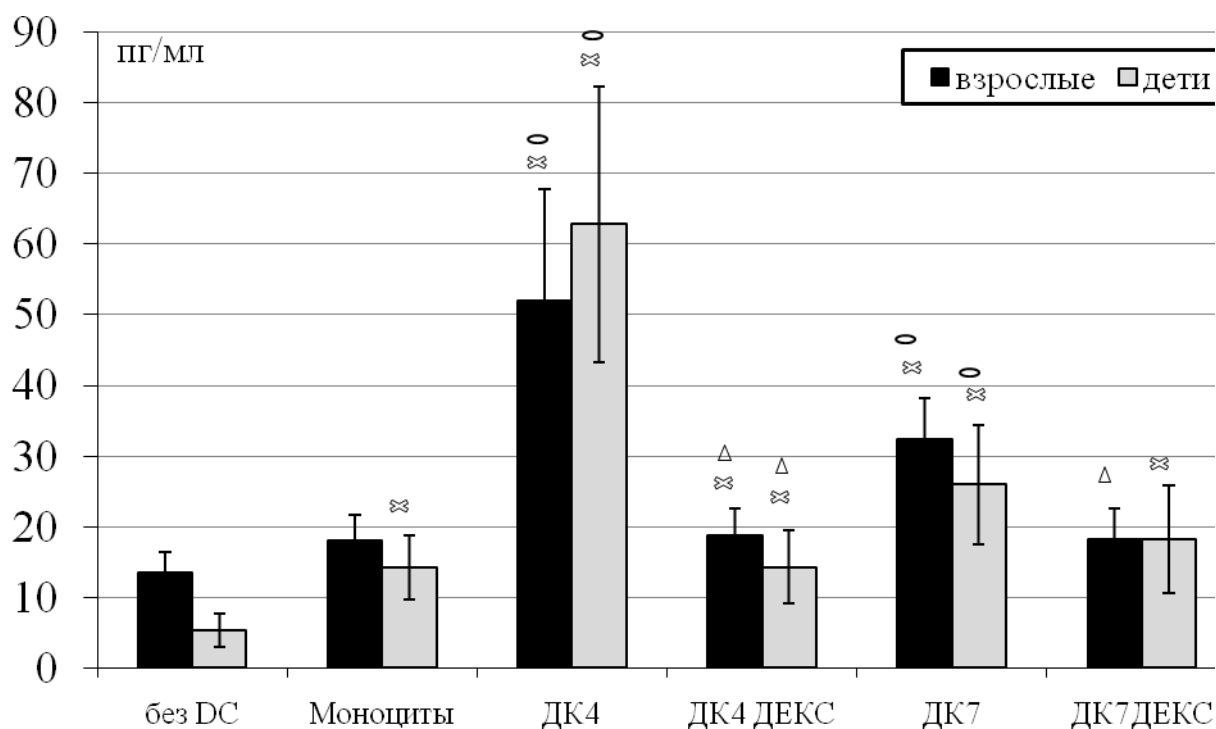


Рис. 5. Концентрация ИФН γ в супернатантах культур клеток в СЛР при взаимодействии fastДК и аллогенных лимфоцитов. Дендритные клетки культивировались с ИЛ-4 и ГМ-КСФ в течение 2 суток и активированы ФНО α в течение одних суток. Длительность СЛР 96 часов. Статистически значимые отличия в парном т-тесте: отличия от лимфоцитарного контроля - \otimes ; отличия от моноцитарного контроля - \circ ДЕКС/без ДЕКС - Δ ($p < 0,05$). Соотношение дендритных клеток и лимфоцитов составляло 1:50.

При использовании fastДК-7 уровень продукции ИФН γ , как правило, был почти вдвое ниже. Добавление в среду дексаметазона снижало стимулирующую способность fastДК-ДЕКС практически до уровня моноцитарного контроля, однако, продукция ИФН γ в этих вариантах культур была несколько выше, чем в культурах нестимулированных лимфоцитов. Митогенная активность fastДК-4 и fastДК-7 была значительно выше, чем у моноцитов, не стимулированных цитокинами.

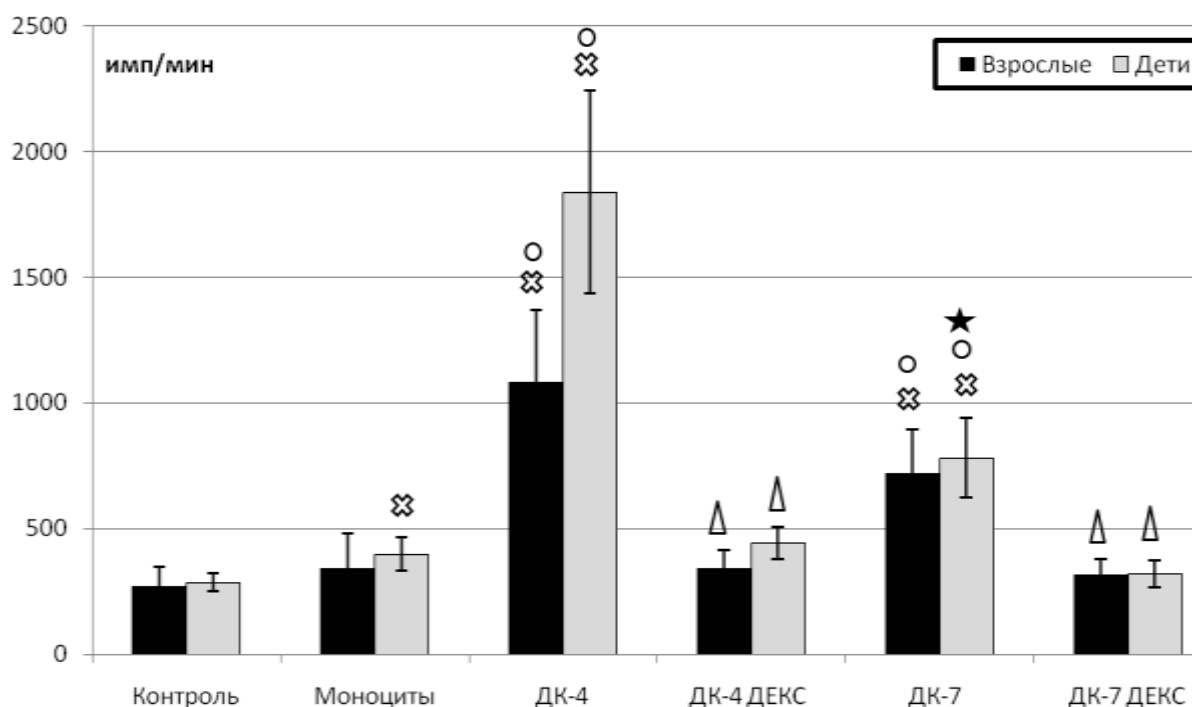


Рис. 6. Индукция пролиферативного ответа у аллогенных лимфоцитов в СЛР посредством fastДК, активированных ФНО α . Длительность СЛР четверо суток, Н³-метка добавлена в конце 3-х суток. Статистически значимые отличия в парном т-тесте: \otimes - отличия от лимфоцитарного контроля; \circ - от моноцитарного контроля; Δ -ДЕКС /без ДЕКС, \star -fastДК-4/fastДК-7.

Применение ИЛ-7 в качестве стимулятора созревания дендритных клеток демонстрирует сниженные функциональные свойства fastДК-7 по сравнению с fastДК-4, однако статистически данный факт подтверждается только на примере fastДК новорожденных. Применение дексаметазона нивелирует эти различия и резко снижает митогенную активность fastДК (рис. 6).

В данной работе наряду с изучением способности получаемых дендритных клеток к индукции пролиферации и интерферонпродукции у аллогенных Т-клеток, исследование функциональных свойств ДК коснулось продукции самими дендритными клетками функционально значимых

цитокинов. Наиболее интересные результаты получены при сравнении продукции ИЛ-10 у взрослых и детей в краткосрочных культурах fastДК (рис. 7).

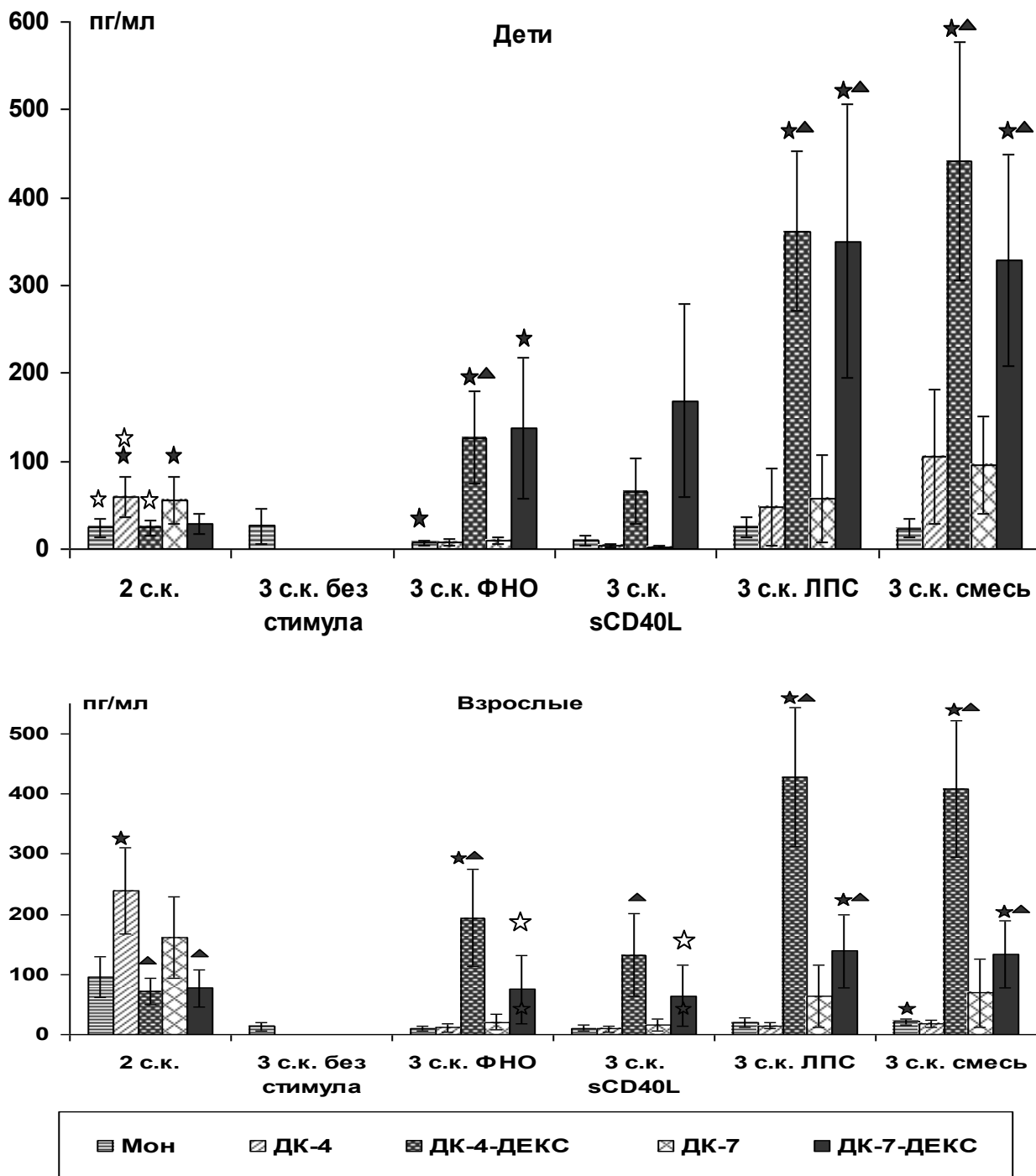


Рис. 7. Продукция ИЛ-10 (пг/мл) моноцитами (Мон) и ДК новорожденных и взрослых. Значимые различия показателей детей и взрослых обозначены - ▲ отличия ДК от нестимулированных моноцитов - ☆, достоверный эффект действия дексаметазона - ★ ($p < 0,05$ в парном т-тесте).

Незрелые fastДК взрослых продуцируют значительные количества ИЛ-10 – цитокина, который, наряду с другими свойствами незрелых ДК, обуславливает их толерогенный потенциал. Наибольшая концентрация этого цитокина обнаруживалась в двухсуточных культурах fastДК-4. FastДК-7 взрослых продуцируют гораздо меньше ИЛ-10 в отличие от fastДК-4. В то же время, моноциты и незрелые ДК новорожденных оказались самыми слабыми продуцентами ИЛ-10. Дексаметазон на этом этапе созревания угнетал продукцию ИЛ-10 дендритными клетками детей и взрослых.

После добавления ФНО α , sCD154, ЛПС или их смеси ситуация с продукцией ИЛ-10 заменялась на зеркально противоположную: fastДК детей и взрослых, ранее подвергавшиеся действию дексаметазона, начинали синтезировать чрезвычайно большие количества ИЛ-10, тогда как продукция ИЛ-10 в необработанных дексаметазоном культурах fastДК оставалась незначительной или прекращалась вовсе.

Дефицит продукции ИЛ-10 незрелыми ДК новорожденных может являться одним из факторов, создающих основу процесса развертывания периферического отдела иммунной системы – бурной поликлональной пролиферации Т-клеток, регистрируемой в раннем детском возрасте. ДК новорожденных, подвергавшиеся действию дексаметазона, после второго этапа созревания продуцируют значительные количества ИЛ-10. Полученные результаты навели нас на предположение, что эти функциональные особенности могут придать модулированным дексаметазоном дендритным клеткам новорожденных выраженные толерогенные свойства.

Для выявления функциональных особенностей дендритных клеток новорожденных, свойства которых модулированы, т.е. изменены в процессе стимуляции дифференцировки и созревания из моноцитов, нами применялись две оригинальных модели взаимодействия клеток *in vitro*. Применялась модель контакта аллогенных лимфоцитов одновременно с двумя типами дендритных клеток: ДК-4 и ДК-4-ДЕКС/ДК-4-ИЛ-10; вторая

модель представляла собой последовательное взаимодействие лимфоцитов сначала с модулированными ДК, а затем в эти культуры добавлялись обычные ДК, сингенные модулированным. В серии данных экспериментов нами использовались как трехсуточные, так и восьмисуточные культуры дендритных клеток. Наиболее выраженные различия между функциональными свойствами дендритных клеток новорожденных и взрослых обнаружены в экспериментах с использованием восьмисуточных культур ДК.

Одновременное использование обычных и модулированных интерлейкином-10 дендритных клеток не оказывает достоверного влияния на пролиферацию аллогенных лимфоцитов, а зачастую лимфоциты пролиферируют несколько активнее именно в культурах с одновременным добавлением обычных ДК и ДК-ИЛ-10. Результаты анализа пролиферации в СЛР, где в качестве стимулирующих антигенпрезентирующих клеток использовалась смесь обычных ДК и ДК-ДЕКС, также не выявили ожидаемого снижения пролиферативного ответа лимфоцитов. Нет различий и в зависимости от выбора типа активатора дендритных клеток (рис. 8).

ДК-ДЕКС детей при одновременном внесении вместе с обычными ДК не снижают продукции ИФН γ . В то же время, продукция ИФН γ в культурах СЛР с одновременным использованием ДК и ДК-ДЕКС взрослых доноров снижается практически в два раза, по сравнению с обычными ДК (рис. 9). Данное явление регистрируется при анализе продукции ИФН γ при использовании ФНО α в качестве активатора дендритных клеток. Применение ЛПС нивелирует подобные различия.

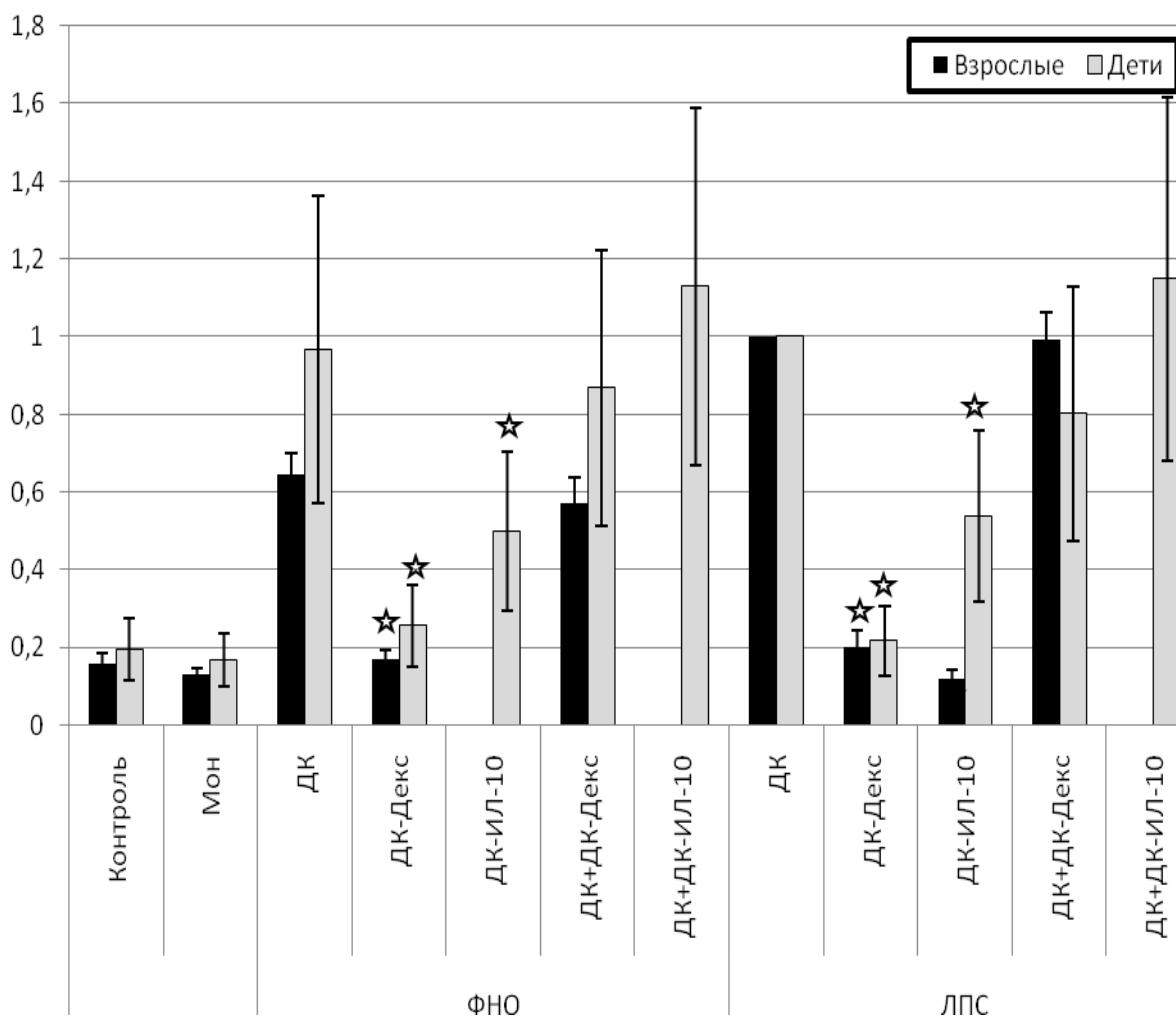


Рис. 8. Пролиферативный ответ аллогенных лимфоцитов в СЛР-одновременно с использованием обычных и модулированных ДК, культивирование которых проходило в течение 8 суток. По оси ординат – индексы подавления пролиферации. Звездочкой обозначено статистически достоверное отличие от вариантов культур, в которых в качестве стимулирующих клеток использовались только обычные ДК. При $p < 0,05$.

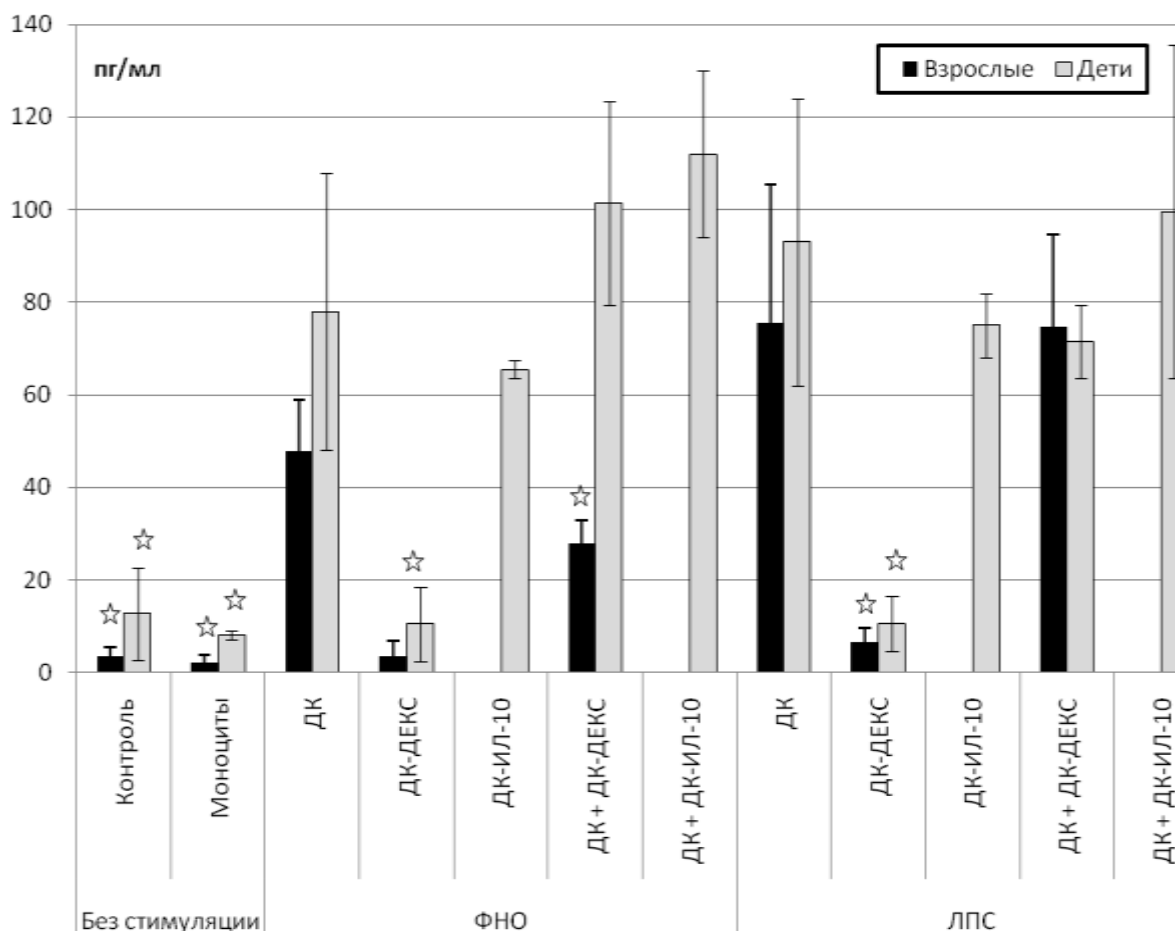


Рис. 9. Продукция ИФН γ в культурах СЛР-одновременно. ДК культивировались в течении 7 суток в присутствии ИЛ-4 и ГМ-КСФ. В соответствующие варианты культур были добавлены дексаметазон и ИЛ-10. Активация дендритных клеток на втором этапе созревания проводилась ФНО α и ЛПС в течение одних суток. СЛР длилась 3 суток. Звездочкой обозначено статистически достоверное отличие от ДК. $p < 0,05$.

Оценка свойств дендритных клеток новорожденных и взрослых осуществлялась также по результатам оригинальной модификации смешанной лимфоцитарной реакции – в двухэтапной СЛР. Для этого ДК получали с помощью культивирования моноцитов с ИЛ-4 и ГМ-КСФ с последующей активацией смесью ФНО α и ЛПС. В качестве модуляторов использовались ИЛ-10 и дексаметазон. ИЛ-10 использовался в концентрации 20 нг/мл (ДК-ИЛ-10(20)) и 100 нг/мл (ДК-ИЛ-10(100)). На первом этапе СЛР

к аллогенным лимфоцитам добавляли обычные, стимулирующие ДК или модулированные ДК, толерогенные свойства которых исследовались. Смешанные культуры растили 5 суток. Затем к лимфоцитам, росшим как с обычными, так и с модулированными ДК, повторно добавляли обычные стимулирующие ДК. ДК, добавляемые в одну культуру на первом и втором этапе, были сингенными и, соответственно, презентировали лимфоцитам одни и те же наборы антигенов. Для описания процессов, происходящих на первом этапе СЛР, использовали параллельный засев обычной одноэтапной 5-суточной СЛР без повторной стимуляции. Вторым этапом СЛР нами применялся для контроля изменений функций лимфоцитов после их первичного контакта с модулированными ДК.

Культивирование лимфоцитов с ДК-ИЛ-10 и незрелыми ДК не снижало способности лимфоцитов к ответу на повторную стимуляцию (рис. 10). В то же время, контакт лимфоцитов с ДК-ДЕКС существенно снижал их возможность к ответу на обычные ДК: концентрация ИФН γ в культурах росших с ДК-ДЕКС на первом этапе СЛР была в 2 раза ниже, чем в культурах, росших с обычными ДК. Различий между ДК взрослых и ДК новорожденных в плане стимуляции продукции ИФН γ в двухэтапной СЛР не выявлено.

Повторная стимуляция лимфоцитов, контактировавших на первом этапе с ДК-ИЛ-10(100) вызывает размножение, в 1,5 раза меньшее, чем в культурах стимулированных обычными ДК на первом этапе СЛР. Это различие характерно как для ДК взрослых, так и ДК детей. Модулирование ДК малыми дозами ИЛ-10 (20 нг/мл) не придает им толерогенных свойств. Более того, внесение ДК-ИЛ-10(20) новорожденных на первом этапе СЛР не снижает, а достоверно увеличивает способность лимфоцитов отвечать на повторную стимуляцию.

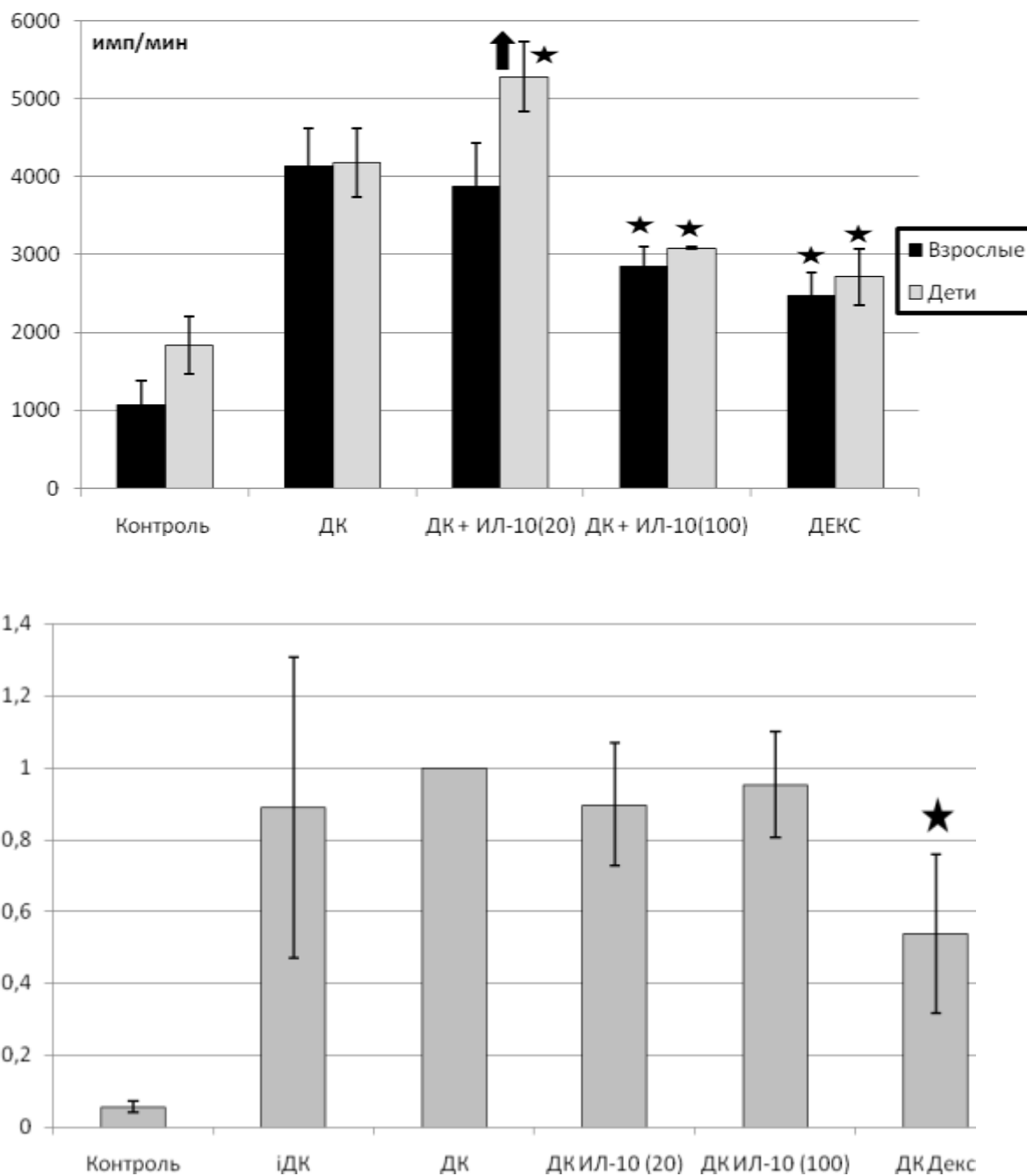


Рис. 10. Результат двухэтапной СЛР. Ответ аллогенных лимфоцитов на повторное добавление стимулирующих ДК. Верхняя диаграмма – пролиферация, нижняя – продукция ИФН γ (рассчитана в индексах подавления). Звездочкой обозначено статистически достоверное отличие от ДК (положительный контроль); на верхней диаграмме стрелкой обозначено достоверное отличие значений пролиферации лимфоцитов в СЛР при взаимодействии с ДК детей от взаимодействия с ДК взрослых. $p < 0,05$.

После контакта с ДК-ДЕКС на первом этапе СЛР, лимфоциты при повторном стимулировании снижают пролиферативную активность. Уровень пролиферации этих культур снижен почти в 2 раза. Здесь также не наблюдается различий в свойствах дендритных клеток детей и взрослых (рис. 10).

Выявленные особенности ДК новорожденных могут иметь непосредственное отношение к специфическим для периода новорожденности процессам формирования периферического отдела иммунной системы. Поскольку в экспериментах, описанных в данной работе, в условиях *in vitro* получаемые модулированные ДК новорожденных приобретают менее выраженный толерогенный характер функциональных свойств, то можно предположить, что эта особенность имеет отношение к реакциям гомеостатического контроля *in vivo*. Вероятно, у новорожденных имеется “лояльный” контроль размножения Т-лимфоцитов на периферии со стороны дендритных клеток. При этом, как показано в экспериментах с использованием одновременного добавления модулированных и обычных ДК, толерогенные свойства дендритных клеток новорожденных не препятствуют клональной пролиферации Т-лимфоцитов. Последовательное взаимодействие лимфоцитов со стимулирующими ДК выявляет снижение отвечающей способности Т-клеток. Данный факт, возможно, находит свое отражение *in vivo* в ограничении в первую очередь реакций клеточного иммунного ответа во избежание развития аутоиммунных процессов, опосредованных активацией аутореактивных клонов Т-лимфоцитов, которые избежали отрицательную селекцию в тимусе и размножились в ходе постстимульной пролиферации на периферии

Выводы

1. Показано, что фенотипическое созревание ДК новорожденных детей обладает определенными особенностями. При изучении динамики экспрессии мембранных молекул ДК новорожденных одновременно

демонстрируют признаки фенотипической зрелости (высокая экспрессия CD83) и признаки отставания в развитии (длительное сохранение CD14 на большей части клеток), что возможно свидетельствует о переходном функциональном состоянии ДК новорожденных между моноцитами/макрофагами и миелоидными ДК взрослого организма.

2. Выявлено, что добавление к созревающим ДК дексаметазона подавляет экспрессию молекул костимуляции, но значительно повышает плотность экспрессии молекул HLA-DR. Усиление экспрессии HLA-DR наиболее выражено на ДК новорожденных, стимулированных ИЛ-7 и ГМ-КСФ.

3. Выявлен низкий дифференцировочный потенциал ИЛ-7 в качестве стимулятора созревания ДК, что свидетельствует о практически полном исключении этого цитокина из необходимых факторов созревания дендритных клеток.

4. Показано, что незрелые ДК новорожденных, в отличие от ДК взрослых, продуцируют крайне мало ИЛ-10. Действие дексаметазона увеличивает способность ДК новорожденных и взрослых продуцировать ИЛ-10 после активации ЛПС, sCD154 и ФНО α .

5. Показано, что ДК детей и взрослых эффективно стимулируют пролиферацию и продукцию Т-лимфоцитами ИФН γ и ИЛ-5. Добавление дексаметазона или ИЛ-10 резко снижает стимулирующие свойства ДК.

6. Показано, что модулированные дексаметазоном ДК взрослых при одновременном конкурентном взаимодействии с обычными ДК подавляют стимулирующее действие последних на продукцию ИФН γ аллогенными Т-лимфоцитами. ДК новорожденных подобными эффектами не обладают.

Список опубликованных работ по теме диссертации

1. В.Ю. Талаев, И.Е. Заиченко, О.Н. Бабайкина, М.А. Ломунова, М.Э. Цатуров, Е.Б. Талаева. Совместное действие дексаметазона и интерлейкина-7 на созревание Т-лимфоцитов и дендритных клеток новорожденных и взрослых *in vitro*. Тезисы доклада на VI Съезде

аллергологов и иммунологов СНГ, Российском национальном конгрессе аллергологов и иммунологов и III Конференции по иммунотерапии, Москва 11 – 13 сентября 2006., С. 183.

2. Талаев В.Ю., Цатуров М.Э., Бабайкина О.Н., Ломунова М.А., Никонова М.Ф., Талаева Е.Б., Матвейчев А.В. Действие интерлейкина-7 и дексаметазона на созревание моноцитарных дендритных клеток новорожденных. Иммунология. – 2007. - Т. 28. - № 4. – С. 208-211. Иммунология. – 2007. - Т. 28. - № 4. – С. 208-211.
3. В.Ю. Талаев, М.Э. Цатуров, О.Н. Бабайкина, М.А. Ломунова, М.Ф. Никонова, Е.Б. Талаева, А.В. Матвейчев. Функциональные свойства моноцитарных дендритных клеток новорожденных. Тезисы доклада на 2-ой республиканской конференции «Иммунология репродукции: теоретические и клинические аспекты». г. Сочи с 15 по 18 мая 2007 года. // Russian Journal of Immunology. - 2007 – V. 9. – Suppl. 4. – P. 116-117.
4. Матвейчев А.В., Цатуров М. Э. , Бабайкина О.Н., Ломунова М. А., Талаев В. Ю., Добротина Н. А. Некоторые аспекты влияния дексаметазона на дендритные клетки. Тезисы доклада на научной конференции Биосистемы организация поведение управление Н. Новгород 12-13 апреля 2007. Материалы конференции. – С. 53-54.
5. Цатуров М.Э., Бабайкина О.Н., Ломунова М.А., Матвейчев А.В. Особенности созревания дендритных клеток новорожденных. Тезисы доклада на научной конференции молодых ученых «Фундаментальная наука и клиническая медицина» (X Всероссийская конференция «Человек и его здоровье») С-Петербург. 20 – 21 апреля 2007. С. 490-491.
6. Талаев В.Ю., Бабайкина О.Н., Ломунова М.А., Цатуров М.Э., Матвейчев А.В., Никонова М.Ф., Талаева Е.Б. Функциональные свойства моноцитарных дендритных клеток новорожденных в краткосрочных культурах. Иммунология. – 2008. – Т. 29. - № 3. – С. 141-147.
7. Талаев В.Ю., Бабайкина О.Н., Ломунова М.А., Цатуров М.Э., Матвейчев А.В., Никонова М.Ф.*, Талаева Е.Б. Функциональные свойства

моноцитарных дендритных клеток новорожденных в краткосрочных культурах. Иммунология. – 2008. – Т. 29. - № 3. – С. 141-147.

8. Цатуров М.Э., Матвейчев А.В., Талаева М.В., Бабайкина О.Н., Ломунова М.А., Талаев В.Ю. Свойства дендритных клеток, модулированных в ходе созревания дексаметазоном. Статья в сборнике «Научное обеспечение противозидемической защиты населения» 2009 С. 199 – 202.
9. Талаев В.Ю., Цатуров М.Э., Матвейчев А.В., Талаева М.В., Бабайкина О.Н., Ломунова М.А., Заиченко И.Е. Миелоидные дендритные клетки как объект исследований в инфекционной иммунологии. Медицинский альманах. 2009 № 2(7) С 47-50.
10. Цатуров М.Э., Талаев В.Ю., А.В. Матвейчев, Талаева М.В., Бабайкина О.Н., Заиченко И.Е., Ломунова М.А. Толерогенные дендритные клетки – созревание и функции в экспериментах *in vitro* Медицинский альманах – 2010 – № 3 (11). – С. 263-265.
11. А.В. Матвейчев, Талаев В.Ю., Ломунова М.А., Талаева М.В., Бабайкина О.Н., Цатуров М.Э., Заиченко И.Е. Роль дендритных клеток в предотвращении иммунологического конфликта матери и плода. Медицинский альманах – 2010 – № 3 (11). – С. 273-276.
12. Талаев В.Ю., Матвейчев А.В., Ломунова М.А., Бабайкина О.Н., Заиченко И.Е., Цатуров М.Э., Талаева Е.Б. Действие клеток плацентарного барьера на созревание дендритных клеток *in vitro*. Иммунология. – 2010. – принята к публикации
13. Talayev V.Yu., Matveichev A.V., Lomunova M.A., Talayeva M.V., Tsaturov M.E., Zaichenko I.Ye., Babaykina O.N., The effect of human placenta cytotrophoblast cells on the maturation and T-cell stimulating ability of dendritic cells *in vitro*. Clinical end Experimental Immunology. – 2010. - принята к публикации.

Список принятых сокращений

ГКГ – главный комплекс гистосовместимости

ГМ-КСФ – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

ДЕКС – дексаметазон

ДК – дендритные клетки

ИЛ – интерлейкин

ИФН – интерферон

КЛ – клетки Лангерганса

ЛПС – липополисахарид

М-КСФ – макрофагальный колониестимулирующий фактор

пДК – плазмацитоидные дендритные клетки

ТФР – трансформирующий фактор роста

ФТ – фактор транскрипции