

На правах рукописи



Фалалеева Светлана Алексеевна

**ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ
ХАРАКТЕРИСТИКА МИЕЛОИДНЫХ И ПЛАЗМОЦИТОИДНЫХ
ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ**

14.03.09 –Клиническая иммунология, аллергология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Новосибирск-2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении "Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии" (НИИФКИ)

Научный руководитель:

доктор медицинских наук,
профессор

Сенников Сергей Витальевич

Официальные оппоненты:

Королев Максим Александрович, кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией патологии соединительной ткани, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии»

Талаев Владимир Юрьевич доктор медицинских наук, заведующий лабораторией клеточной иммунологии, Федеральное бюджетное учреждение науки «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Академика И. Н. Блохиной»

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

Защита диссертации состоится «_____» 2016 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 001.001.01 в НИИФКИ по адресу: 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИИФКИ и на сайте <http://niikim.ru/ru/диссовет/объявления-диссовета>

Автореферат разослан «___» _____ 2016 г.

**Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат медицинских наук**



Белгородцев С.Н.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

Дендритные клетки являются антиген-презентирующими клетками костномозгового происхождения, способными инициировать и регулировать как первичный, так и вторичный Т- и В- клеточный иммунный ответ [Santigo-Schwarz, 2001]. Дендритные клетки играют важную роль в процессах нарушения естественной толерантности тканей и запуске аутоагрессии в отношении собственных клеток и тканей организма при ревматоидном артрите. Это обусловлено измененной функциональной активностью дендритных клеток, нарушением их способности поддерживать невосприимчивость Т-лимфоцитов и NK- клеток к собственным тканям организма и активацией клеточного и гуморального провоспалительного иммунного ответа [Boissier, 2008].

В периферической крови выделяют два основных подтипа ДК, которые несут на своей поверхности специфические маркеры: миелоидные и плазмоцитоидные ДК. Незрелые дендритные клетки, независимо от подтипа имеют фенотип, характеризующийся низким уровнем экспрессии CD80, CD83, CD86 [Sarkar, 2005]. Миелоидные ДК имеют мощный потенциал для захвата и презентации антигенов, что позволяет им эффективно стимулировать Т-клетки [Radstake, 2004]. Плазмоцитоидные ДК обладают уникальным свойством продуцировать большое количество IFN- α/β при воздействии на них вирусными компонентами [MacDonald, 2002].

Благодаря своей ключевой роли в развитии и поддержании воспалительных процессов, ДК являются объектом для пристального изучения при ряде заболеваний. Большинство исследований, посвященных дендритным клеткам у больных ревматоидным артритом, указывают на то, что ДК играют важную роль в инициации и поддержании воспалительного процесса посредством презентации антигенов аутореактивным Т-клеткам [Lande, 2004; Yudoh, 2000]. Одним из механизмов позволяющим ДК регулировать аутоиммунный процесс при РА является продукция ряда цитокинов, от которых зависит дифференцировка Т-хелперных клеток. Разные подтипы ДК продуцируют как воспалительные, так и противовоспалительные цитокины, которые по разному воздействуют на течение аутоиммунного заболевания, что может определять характер и степень нарушений иммунной регуляции при РА.

Поскольку ДК активно участвуют в развитии аутоиммунного воспаления, исследователи рассматривают их как в качестве клеток-мишеней для таргетных подходов терапии ревматоидного артрита, так и как клетки-кандидаты для разработки клеточных технологий в лечении аутоиммунных заболеваний [Stoop, 2011]. Подтипы дендритных клеток характеризуются различным фенотипом, свойствами и преимущественным участием в регуляции иммунологических процессов. Однако, вклад миелоидных и плазмоцитоидных субпопуляций в воспалительные процессы различной этиологии мало изучен. Для разработки различных стратегий лечения необходимо всестороннее исследование количественных и качественных показателей подтипов дендритных клеток (миелоидных и плазмоцитоидных) *ex vivo* у больных ревматоидным артритом и в условиях *in vitro* для оценки возможности индукции функционально полноценных ДК при РА.

Цель работы:

Изучить содержание и функциональные свойства субпопуляций дендритных клеток и эффективность их индукции из клеток-предшественников периферической крови у больных ревматоидным артритом

Задачи:

1. Оценить относительное количество миелоидных и плазмоцитоидных дендритных клеток в периферической крови больных ревматоидным артритом в период обострения заболевания.
2. Изучить содержание в периферической крови больных РА дендритных клеток с разным фенотипом.
3. Изучить относительное количество IL-12, IL-10, IL-4, IFN- α позитивных дендритных клеток у больных ревматоидным артритом.
4. Охарактеризовать фенотип и функциональные свойства дендритных клеток генерированных из клеток предшественников периферической крови

Научная новизна работы

Впервые было показано, что у больных ревматоидным артритом происходит изменение соотношения субпопуляций ДК за счет значительного снижения относительного количества циркулирующих в периферической крови плазмоцитоидных дендритных клеток. У больных ревматоидным артритом выявлено увеличение миграционного потенциала незрелых пДК по сравнению с условно здоровыми донорами. Установлено, что у больных ревматоидным артритом по сравнению с условно здоровыми донорами снижена продукция цитокинов IL-4, IL-10 миелоидными и плазмоцитоидными дендритными клетками и повышена продукция IL-12, IFN- α плазмоцитоидными дендритными клетками. Впервые было показано, что у больных ревматоидным артритом возможна целенаправленная индукция функционально полноценных дендритных клеток с миелоидным и плазмоцитоидным фенотипом из мононуклеарных клеток периферической крови.

Теоретическая и практическая значимость работы

Представленные результаты по изменению в относительном содержании миелоидных и плазмоцитоидных дендритных клеток периферической крови у больных ревматоидным артритом и их функциональных и фенотипических характеристик расширяют представления о вовлеченности дендритных клеток разных субпопуляций в аутоиммунный процесс.

Выявленное снижение относительного количества CD80-, CD83- позитивных дендритных клеток указывает на их незрелый фенотип у больных ревматоидным артритом по сравнению со здоровыми донорами. Наряду с этим повышение экспрессии хемокинового рецептора CCR7 на пДК свидетельствует об их более высоком миграционном потенциале, что вместе с выявленными изменениями профиля синтезируемых цитокинов подтверждает активную вовлеченность субпопуляции пДК в иммунопатологические реакции. Выявленные фенотипические и функциональные отличия ДК в периферической крови больных РА указывают на возможность использования генерированных полноценных ДК в разработке методов таргетной терапии заболеваний с воспалительным патогенезом.

Основные положения, выносимые на защиту

1. В периферической крови больных ревматоидным артритом наблюдается изменение фенотипических характеристик и функциональных свойств обеих субпопуляций дендритных клеток по сравнению со здоровыми донорами. Наибольшее изменения наблюдаются среди популяции плазмцитоподобных дендритных клеток за счет снижения их относительного количества, при этом они характеризуются незрелым фенотипом, но обладают высокой миграционной активностью, а так же увеличенной продукцией IL-12, IFN- α .
2. В условиях нарушенных свойств циркулирующих дендритных клеток у больных ревматоидным артритом из мононуклеарного пула периферической крови *in vitro* возможна индукция полноценных дендритных клеток с фенотипическими характеристиками миелоидных и плазмцитоподобных субпопуляций.

Апробация материалов диссертации

Материалы диссертации доложены и обсуждены на:

1) Семинарах экспериментального отдела ФГБУ НИИКИ СО РАМН (Новосибирск, 2011, 2012, 2013). 2) «VI конференции по дендритным клеткам и их роли при норме и патологии» в рамках Объединенного иммунологического форума - 2013 (Нижний Новгород, 30 июня-05 июля 2013 года). 3) «XV международном конгрессе по иммунологии» (Италия, Милан, 22-27 августа 2013 года). 4) Международной конференции «Достижения фундаментальных наук и персонализированной медицины в решении проблем системного и аутовоспаления» (Москва 5-7 июня 2014 г.). 5) Международной конференции «Cytokines» conference - конференция «Цитокины» (11-14 октября 2015 г., Германия, г. Бамберг).

Публикации.

По теме диссертации опубликовано 7 работ, в том числе 2 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК.

Личный вклад автора в проведение исследования.

Результаты, представленные в данной работе, получены лично автором на базе лаборатории молекулярной иммунологии. Работа была выполнена с использованием оборудования ЦКП НИИФКИ.

Структура и объем диссертации.

Диссертация изложена на 112 страницах машинописного текста, состоит из обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения, заключения и выводов. Библиографический указатель включает 144 источника, из них 137 зарубежных. Работа иллюстрирована 16 рисунками, 2 схемами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования

В исследовании использовалась гепаринизированная венозная кровь пациентов, больных ревматоидным артритом, выборка состояла из 35 (6 мужчин и 29 женщины) человек (в возрасте 54,7 (34-75) лет), на момент поступления в клинику ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН. Диагноз ревматоидного артрита верифицирован в

соответствии с критериями ACR 1987г. (Американская Коллегия Ревматологов). Клиническая оценка включала индекс активности болезни с 28-суставным счетом (disease activity score with 28 joint count, DAS 28), определялась с помощью подсчета количества болезненных и припухших суставов из 28, определения СОЭ, оценки пациентом общего состояния здоровья по ВАШ (визуальной аналоговой шкале от 0 до 100мм) и последующего вычисления индекса DAS28. Все пациенты на момент поступления в клинику ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН имели высокую активность заболевания (DAS28>5,9). Перед включением в исследование все пациенты подписали форму добровольного информированного согласия. Протоколы исследования были одобрены локальным этическим комитетом НИИКИ СО РАМН.

В работе использовалась периферическая кровь 22 условно здоровых доноров человека (4 мужчины и 18 женщин, в возрасте 46,7 (30-59) лет) полученная в пункте заготовки крови №1 ГБУЗ НСО «Новосибирского центра крови», доноры сопоставимы по полу и возрасту.

Оценка фенотипической и функциональной характеристики дендритных клеток в цельной периферической крови.

К части цельной крови добавляли моноклональные антитела: CD3- FITC, CD14-FITC, CD19-FITC («Сорбент», Москва), HLA-DR- PerCp, CD11c- PE-Cy7, CD123- APC, CD83- PE-Cy5, CD80- PE-Cy5 («BD Biosciences», США), CCR7- PerCp-Cy5.5 и сразу исследовали на проточном цитометре. К другой части цельной крови добавляли стимуляторы R848 (Resiquimod («BioVision», США)) и LPS (E.coli 0114:B4 («Sigma», США)) затем пробы инкубировали в течение 4 часов, а после добавляли такие же моноклональные антитела и исследовали на проточном цитометре. Подтипы дендритных клеток периферической крови характеризовали следующим фенотипом: миелоидные дендритные клетки (CD3-CD14-CD19-HLA-DR+CD11c+CD123-), плазмцитоидные дендритные клетки (CD3-CD14-CD19-HLA-DR+CD11c-CD123+).

Определение относительного процента клеток, экспрессирующих IL-4, IL-10 среди миелоидных и плазмцитоидных дендритных клеток в цельной периферической крови.

С целью изучения внутриклеточной продукции IL-10, IL-4 дендритными клетками к цельной крови добавляли следующие стимуляторы: Ionomycin (500нг/млн. лейкоцитов крови «Sigma», США), PMA (5нг/млн. лейкоцитов крови (phorbol 12-myristate 13-acetate) («Sigma», США)), после инкубации в пробу вносили Брефелдин А (4нг/мл. BFA («Sigma», США)) и проводили исследование методом проточной цитометрии. В качестве поверхностных маркеров использовали следующие моноклональные антитела: CD3- FITC, CD14-FITC, CD19-FITC («Сорбент», Москва), HLA-DR- PerCp, CD11c- PE-Cy7, CD123- APC, внутриклеточный маркер IL-10-PE, IL-4-PE. («BD Biosciences», США) Определения относительного процента клеток, продуцирующих IL-10 среди миелоидных и плазмцитоидных дендритных клеток в цельной периферической крови проводили с помощью проточного цитофлуориметра.

Определение относительного процента клеток экспрессирующих IL-12, IFN- α среди миелоидных и плазмоцитоидных дендритных клеток в цельной периферической крови

Для изучения внутриклеточной продукции IL-12, IFN- α дендритными клетками к цельной крови добавляли следующие стимуляторы: IFN-g (10 нг/мл (ООО «Иммунофарм», Россия)), LPS (100нг/мл E.coli 055:B5 («Sigma», США)), R848 (Resiquimod («BioVision», США)) и CpG (5 μ г/ мл. ООО «Биосан», Россия) после инкубации в пробу вносили Брефелдин А (4нг/мл. («Sigma», США)), далее к клеткам добавляли поверхностным маркерам CD3- FITC, CD14-FITC, CD19-FITC («Сорбент», Москва), HLA-DR- PerCp, CD11c- PEcy7, CD123- APC, и внутриклеточные IL-12p70-PE и IFN-a [2b] -PE («BD Biosciences», США). Затем клетки исследовали с помощью проточного цитофлуориметра.

Получение незрелых и зрелых дендритных клеток.

Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли стандартным методом путем центрифугирования цельной крови в градиенте плотности фиколл-урографина ($\rho=1,077$ г/л) согласно [Boyum, 1968]. Выделение моноцитов ПК проводилось методом адгезии на пластике [Wahl, 1995]. Для индукции миелоидных дендритных клеток к прилипшей фракции МНК добавлялись 50 нг/мл rhGM-CSF, 100 нг/мл rhIL-4 (Peprotech, США) на срок 48ч для получения незрелых ДК. Далее для созревания мДК в культуру добавляли rhTNF- α (25 нг/мл) (Peprotech, США) и инкубировали в течение 24 часов. Для индукции плазмоцитоидных дендритных клеток к прилипшей фракции МНК добавляли 20мкг/мл rhIL-3 (BioVision, США) и 20 нг/мл R848 и инкубировали в течение 24 часов. После к незрелым пДК добавляли 25нг/мл LPS (E.coli 0114:B4 («Sigma», США)) и инкубировали в течение 48 часов.

Фенотипическая оценка незрелых и зрелых индуцированных миелоидных и плазмоцитоидных дендритных клеток

К полученным незрелым и зрелым дендритным клеткам добавляли моноклональные антитела CD3- FITC, CD14-FITC, CD19-FITC («Сорбент», Москва), HLA-DR- PerCp, CD11c- PEcy7, CD123- APC, CD83-PE, CD80-V450, CCR7-PE («BD Biosciences», США) с последующим анализом при помощи проточной цитофлуориметрии.

Определение относительного процента клеток экспрессирующих IL-10 среди индуцированных миелоидных и плазмоцитоидных дендритных клеток

С целью изучения количества IL-10 в пробы (по 250тыс.клеток на пробу)добавляли следующие стимуляторы: Ionomycin (500нг/ млн. лейкоцитов крови «Sigma», США), PMA (5нг/ млн. лейкоцитов крови (phorbol 12-myristate 13-acetate) («Sigma», США)), после инкубации дабавляли Брефелдин А (4нг/мл. («Sigma», США)) и исследование методом проточной цитометрии. В качестве поверхностных маркеров использовали следующие моноклональные антитела:CD3-FITC,CD14-FITC, CD19-FITC («Сорбент», Москва), HLA-DR-PerCp, CD11c- PEcy7, CD123- APC, внутриклеточный маркер IL-10-PE («BD Biosciences», США).

Определение относительного процента клеток экспрессирующих IL-12, IFN- α среди индуцированных миелоидных и плазмоцитоидных дендритных клеток

Для изучения продукции IL-12, IFN- α в пробы (по 250 тыс. клеток на пробу) добавляли следующие стимуляторы: IFN-g (10 нг/мл (ООО «Имунофарм», Россия)), LPS (100 нг/мл E.coli 055:B5 («Sigma», США)), R848 (Resiquimod («BioVision», США)) и CpG (5 μ g/мл. ООО «Биосан», Россия) соответственно, после инкубации добавляли Брефелдин А (4 нг/мл. («Sigma», США)), затем к клеткам добавляли поверхностным маркерам CD3-FITC, CD14-FITC, CD19-FITC («Сорбент», Москва), HLA-DR-PerCp, CD11c-PECy7, CD123-APC, после добавляли моноклональные антитела к внутриклеточным IL-12p70-PE и IFN- α [2b]-PE («BD Biosciences», США). Пробы исследовали с помощью проточного цитофлуориметра.

Статистическая обработка данных

Статистическая обработка результатов производилась с помощью программы «Statistica 7.0». При ненормальном распределении выборки, для статистической проверки использовались непараметрические критерии Манна-Уитни и Уилкоксона, данные представлялись в виде медианы и квартильного диапазона значений (25% и 75%). В пояснениях к иллюстрациям количество лиц в группе обозначено n.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Фенотипическая и функциональная характеристика дендритных клеток в периферической крови больных ревматоидным артритом и условно здоровых доноров

Для изучения фенотипических характеристик дендритных клеток периферической крови, а так же их потенциала для созревания и миграционной активности, часть ДК (интактные ДК) исследовалась сразу же, а часть культивировалась как в присутствии, так и в отсутствии специфических стимуляторов созревания. Способность клеток по-разному реагировать на воздействие таких медиаторов экспрессией соответствующих маркёров позволила оценить их миграционный потенциал и степень зрелости клеток субпопуляций, циркулирующих в крови здоровых и больных доноров.

Определение общего относительного количества дендритных клеток периферической крови (миелоидные и плазмоцитоидные ДК) в группах условно-здоровых доноров и больных РА не выявило значимых различий (1,73% vs 1,12%). Наряду с этим, были выявлены существенные изменения в соотношении подтипов ДК у больных РА по сравнению с контролем. Так, соотношение миелоидных и плазмоцитоидных ДК достоверно превышало таковое в контрольной группе в 6,18 раз (в группе условно-здоровых доноров и больных РА соотношение составляло соответственно 1,65 и 10,2), что указывает на существенный количественный дисбаланс подтипов ДК в периферической крови больных РА. При анализе в разных группах относительного количества миелоидных и плазмоцитоидных ДК было установлено, что выявленное изменение соотношения подтипов ДК обусловлено преимущественно значительным снижением уровня плазмоцитоидных ДК в периферической крови больных РА (в 6,3 раза по сравнению с контролем).

Для оценки способности к созреванию ДК в периферической крови исследовались показатели не только интактных клеток, но и специфически стимулированных LPS и R848 в течение четырёх часов. Несмотря на отсутствие достоверных различий по относительному количеству миелоидных дендритных клеток между больными РА и условно-здоровыми донорами, миелоидные ДК из периферической крови больных РА характеризовались достоверно более низким уровнем экспрессии CD83 и CD80, что указывает на менее зрелое состояние циркулирующих миелоидных ДК у больных РА. Плазмоцитоидные ДК больных РА также имеет более низкую экспрессию CD83 и CD80 на клеточной мембране по сравнению с контрольной группой. Кроме того, процент плазмоцитоидных ДК, экспрессирующих рецептор CCR7, был достоверно выше по сравнению с условно-здоровыми донорами (рис.1), что свидетельствует об их повышенном миграционном потенциале.

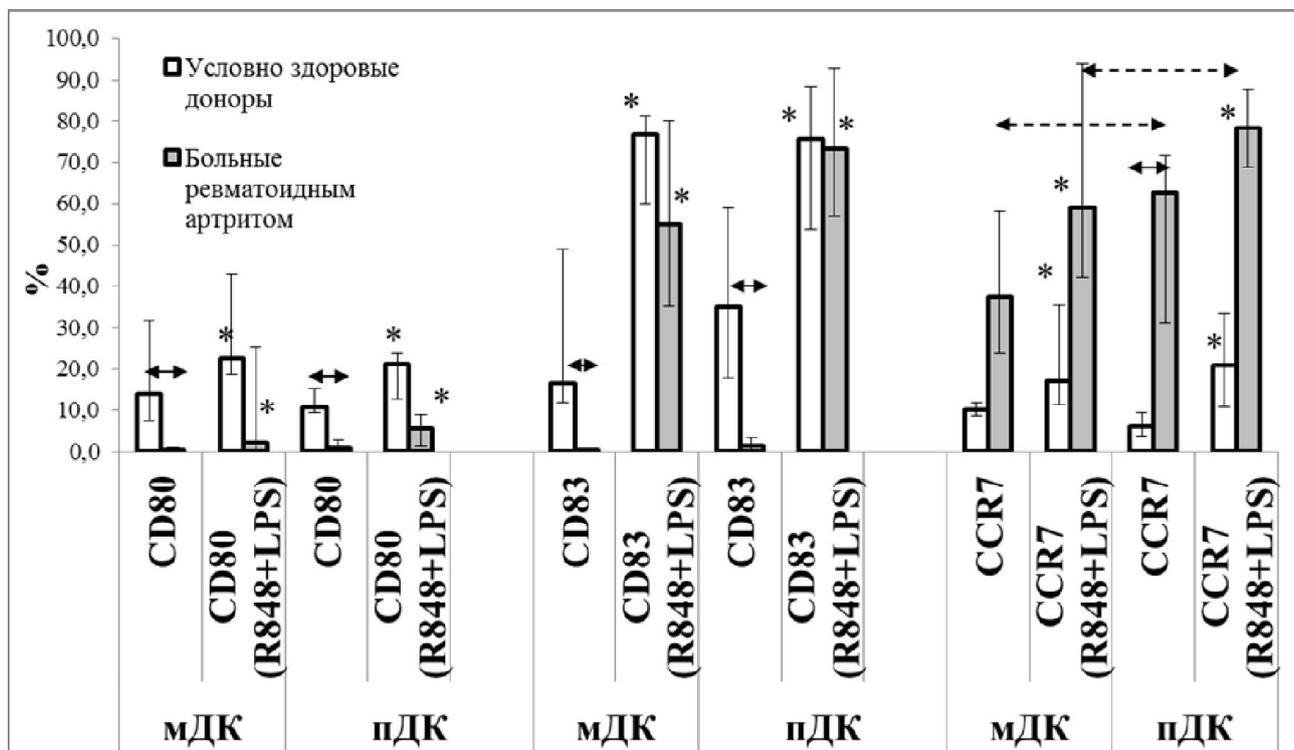


Рис.1 Относительное количество миелоидных и плазмоцитоидных дендритных клеток, экспрессирующих маркеры CD80, CD83, CCR7. Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала. Условно-здоровых доноров $n=15$ и больных ревматоидным артритом $n=12$. Стрелками указаны достоверные различия ($p<0,05$), * достоверное увеличение процента клеток в ответ на стимуляцию R848+LPS ($p<0,05$).

Таким образом, в периферической крови больных РА циркулируют менее зрелые как миелоидные, так и плазмоцитоидные дендритные клетки по сравнению с клетками здоровых доноров, но при этом их миграционный потенциал находится на высоком уровне. Можно предположить, что наличие дендритных клеток с подобными характеристиками и низкое их содержание в системном кровотоке объясняется происходящим на данном этапе воспаления процессом поступления из костного мозга в циркуляцию дендритных клеток с «незрелым» фенотипом, которые мигрируют в лимфоузлы и в регион активного воспалительного процесса.

Известно, что при развитии патологических процессов регуляторная активность дендритных клеток может изменяться как в сторону подавления, так и в сторону активации иммунных реакций. В связи с этим, чтобы оценить способность

миелоидных и плазмоцитоидных дендритных клеток реагировать на стимуляторы, которые индуцируют их созревание, использовались агонисты TLR. В проведенном эксперименте индуцировали созревание миелоидных и плазмоцитоидных ДК периферической крови через совместное культивирование с агонистами TLR 4 (LPS, преимущественно воздействующим на мДК) и TLR 7, TLR 8 (R848, преимущественно воздействующим на пДК). Было показано на образцах крови условно-здоровых доноров, что после инкубации со стимуляторами достоверно увеличивается процент миелоидных и плазмоцитоидных дендритных клеток, экспрессирующих CD83, CD80 и CCR7, по сравнению с пробами без стимуляции. Это демонстрирует адекватность выбранных стимуляторов и их дозировки для индукции созревания подтипов дендритных клеток в периферической крови. При проведении аналогичного теста в пробах крови больных РА, было обнаружено достоверное увеличение относительного количества миелоидных и плазмоцитоидных ДК, экспрессирующих CD83, CD80 и CCR7 по сравнению с образцами без стимуляции. Уровень экспрессии CD83 и CD80 на миелоидных и плазмоцитоидных ДК больных РА после стимуляции не имел достоверных различий по сравнению с аналогичной группой условно здоровых доноров. Было отмечено, что в ответ на стимуляцию количество плазмоцитоидных ДК в образцах крови больных РА, экспрессирующих хемокиновый рецептор (CCR7), было достоверно больше по сравнению с аналогичной группой условно-здоровых доноров.

Результаты оценки созревания дендритных клеток больных РА в ответ на агонисты TLR указывают на сохранную способность исходно менее зрелых миелоидных и плазмоцитоидных ДК реагировать на факторы созревания. Достоверное увеличение количества плазмоцитоидных ДК, экспрессирующих CCR7, в образцах крови больных РА под действием стимуляторов созревания, по сравнению со здоровыми донорами свидетельствует о более высокой миграционной способности как исходных плазмоцитоидных ДК, так и в ответ на факторы дифференцировки. Учитывая полученные данные и результаты исследований количества плазмоцитоидных ДК в синовиальной жидкости у больных РА [Cavanagh, 2005], можно предположить, что плазмоцитоидные ДК периферической крови с высокой экспрессией фактора миграции и сохранной способностью к созреванию, активно поступают в лимфоузлы и очаг воспаления (синовиальная оболочка и синовиальная жидкость) [Lebre, 2008].

Изучение продукции внутриклеточных цитокинов миелоидными и плазмоцитоидными дендритными клетками периферической крови у больных ревматоидным артритом и условно здоровых доноров.

Поскольку ДК являются мощными антиген-презентирующими клетками, они способны изменять направленность иммунного ответа путем активации дифференцировки Т-лимфоцитов по Th1 или Th2 пути. Эта способность ДК регулируется ими за счет экспрессии тех или иных цитокинов. С этой целью нам было важно оценить, какие медиаторы экспрессируются разными подтипами дендритных клеток в норме и при патологии. С помощью методов проточной цитометрии изучалась внутриклеточная продукция разными подтипами ДК как про-, так и противовоспалительных цитокинов: IL-4, IL-10 (Рис.2) и IL-12(Рис.3), IFN- α (Рис.4) соответственно.

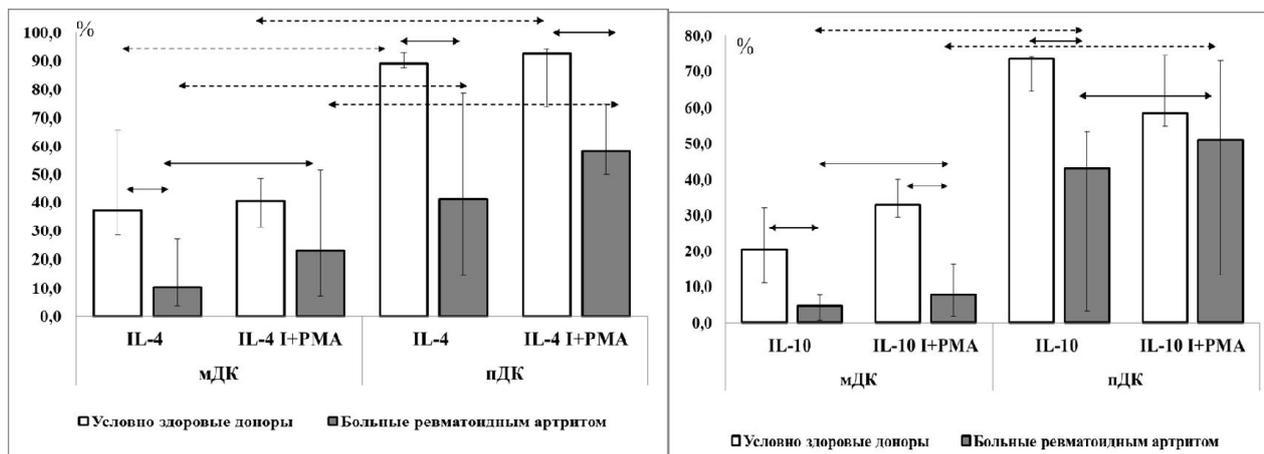


Рис 2 Относительное количество миелоидных и плазмоцитоидных дендритных клеток, продуцирующих IL-4, IL-10. Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала. Условно-здоровых доноров $n=15$ и больных ревматоидным артритом $n=14$. Стрелками указаны достоверные различия ($p<0,05$)

Для IL-4 и IL-10 оценивалась как спонтанная продукция, так и в ответ на воздействие стимуляторов, обеспечивающих ускоренную активацию клеток, с целью установления не только текущего функционального состояния клеток, но и их потенциальной активности. Во всех пробах была заблокирована секреция за счёт добавления брэфелдина А.

При определении показателей внутриклеточной продукции IL-4, было показано, что плазмоцитоидная субпопуляция как у здоровых доноров, так и у больных РА демонстрирует достоверно более высокий процент IL-4-продуцирующих клеток по сравнению с миелоидной субпопуляцией. При этом среди дендритных клеток больных РА показатели достоверно ниже по сравнению со здоровыми донорами. У больных РА мДК увеличивали продукцию IL-4 в ответ на добавление специфических стимуляторов.

При исследовании продукции IL-10 дендритными клетками, было обнаружено, что ДК как у больных РА так и у здоровых доноров продуцируют данный цитокин, однако более высокая продукция наблюдалась у пДК по сравнению с мДК в обеих исследуемых группах, причем как в пробах со стимуляцией, так и без нее. При изучении экспрессии IL-10 было показано, что как среди мДК, так и среди пДК при всех условиях культивирования дендритные клетки больных РА показывали более низкий уровень экспрессии IL-10 по сравнению со здоровыми донорами. Кроме того, достоверное увеличение IL-10- продуцирующих клеток в ответ на стимуляцию наблюдалось только в группе больных РА.

Таким образом, уровень продукции IL-4, IL-10 дендритными клетками позволяет предположить, что несмотря на снижение относительного количества пДК в периферической крови у больных РА по сравнению со здоровыми донорами способность продуцировать внутриклеточные цитокины у них находится на достоверно более высоком уровне как по сравнению с миелоидной субпопуляцией, что может указывать на большую вовлеченность пДК в воспалительный процесс. Установленная низкая экспрессия IL-4 у больных РА подтверждает гипотезу о сдвиге иммунного ответа в сторону Th1 пути в патогенезе данного заболевания, так как IL-4 является одним из ключевых цитокинов Th2 пути. IL-10 является цитокином, выступающим в качестве супрессорного медиатора в отношении воспалительных процессов и адаптивных иммунных реакций клеточного типа, которые существенно

нарушаются при развитии данного заболевания [Cox, 2005].

Для оценки потенциала ДК моделировать исход дифференцировки Т-хелперных клеток нами изучалась экспрессия IL-12 различными субпопуляциями ДК.

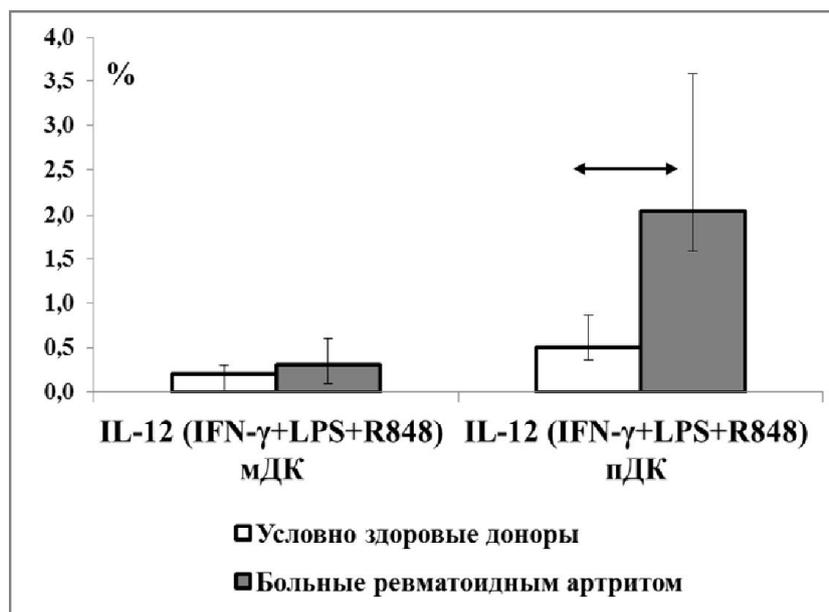


Рис.3 Относительное количество миелоидных и плазмоцитоидных дендритных клеток, продуцирующих IL-12. Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала. Условно-здоровых доноров $n=15$ и больных ревматоидным артритом $n=9$. Стрелками указаны достоверные различия ($p<0,05$)

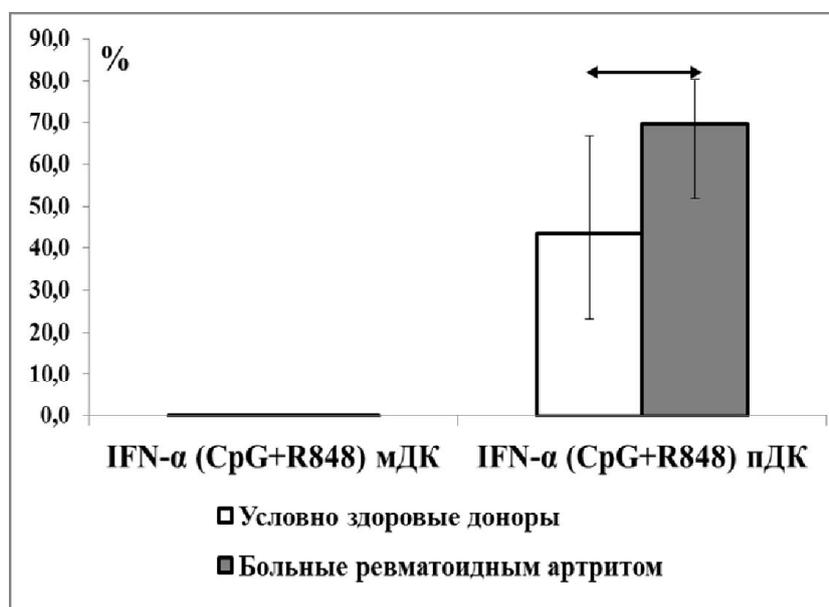


Рис.4 Относительное количество миелоидных и плазмоцитоидных дендритных клеток, продуцирующих IFN- α . Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала. Условно-здоровых доноров $n=15$ и больных ревматоидным артритом $n=9$. Стрелками указаны достоверные различия ($p<0,05$)

Анализ относительного количества мДК и пДК, продуцирующих внутриклеточный IL-12 показал, что у здоровых доноров в периферической крови не обнаружено ДК, продуцирующих данный цитокин. При этом у больных РА наблюдалось достоверное увеличение содержания IL-12 продуцирующих пДК. IL-12 играет большую роль при дифференцировке наивных Т клеток в Th1 и может

вызвать чрезмерную активацию клеточно-опосредованного иммунного ответа с развитием аутоиммунной патологии. В обеих исследуемых группах внутриклеточная продукция IL-12 определялась только у плазмоцитоидных дендритных клеток больных ревматоидным артритом, что свидетельствует об их активной вовлеченности и участии в патологическом процессе.

Принято считать, что дисбаланс некоторых провоспалительных цитокинов (например, TNF- α и IFN- α) оказывается наиболее критичным для развития аутоиммунного заболевания, и основным продуцентом IFN- α являются плазмоцитоидные предшественники дендритных клеток. При изучении экспрессии на разных субпопуляциях дендритных клеток внутриклеточного цитокина IFN- α нами было установлено, что мДК данный цитокин не продуцируется, в то время как плазмоцитоидные ДК показывают высокий уровень продукции данного цитокина. При этом среди пДК больных РА отмечено достоверно большее содержание IFN- α -продуцирующих дендритных клеток, нежели у условно здоровых доноров, что вместе с высокой экспрессией CCR7 свидетельствует о возможной задействованности сигнальных путей TLR7/8, через которые активируют процессы созревания и миграции.

Характеристика индуцированных миелоидных и плазмоцитоидных дендритных клеток

Изучение функциональной активности и фенотипических свойств разных субпопуляций дендритных клеток в периферической крови имеет важное значение для понимания формирования воспалительного процесса у больных РА, однако важно не только знать, в каком именно состоянии находятся ДК в данный момент, но и есть ли возможность получить ДК по функциям и фенотипу не отличающиеся от клеток здоровых доноров, поскольку это важно для применения ДК в терапевтических подходах лечения РА.

Поскольку ДК как и отдельные их субпопуляции представляют значительный интерес для дальнейшего практического применения, но их процент среди клеток периферической крови (как наиболее доступного биоматериала) крайне низок, то для дальнейшего использования необходимо их генерировать в значительном объеме. Однако, методы получения полноценных ДК с разным фенотипом неоптимизированы и значительно различаются для разных подтипов (по времени индукции, способам сепарации и др.), поэтому актуальной задачей является получение разных субпопуляций дендритных клеток в схожих условиях и за идентичный промежуток времени.

Мы использовали прилипающую фракцию мононуклеарных клеток периферической крови больных ревматоидным артритом и условно здоровых доноров в присутствии разных иммунорегуляторных и ростовых факторов: rhGM-CSF (50нг/мл), rhIL-4 (100нг/мл) и rhTNF- α (25нг/мл) для получения дендритных клеток с фенотипом (Lin⁻HLA-DR⁺CD123⁻CD11c⁺), rhIL-3 (20мкг/мл), R848 (20нг/мл) и LPS(25 нг/мл) для получения дендритных клеток с фенотипом (Lin⁻HLA-DR⁺CD123⁺CD11c⁻). На разных этапах дифференцировки мы оценивали фенотип клеток и цитокиновую продукцию у полученных нами ДК как у больных так и у здоровых доноров.

Индукция дендритных клеток с фенотипом Lin-HLA-DR+CD123-CD11c+

Для оценки возможностей использования ДК в качестве клеток-кандидатов для клеточной терапии необходимо более подробное изучение как отдельных

субпопуляций ДК циркулирующих в периферической крови, так и возможность их генерации из клеток предшественников.

Для генерации незрелых ДК, сходных по фенотипическим характеристикам с миелоидными ДК, клетки инкубировались с цитокинами IL-4 + GM-CSF в течении 48 ч., после чего еще на 24 часа добавлялся TNF в качестве созревающего стимула. После созревания оценивалась экспрессия поверхностных маркеров. Было установлено, что ДК условно здоровых доноров и больных РА, индуцированные по данному протоколу, экспрессируют CD80, CD83 (Рис.4) и CCR7 (Рис.5) практически на одном уровне для каждого из этапов оценки созревания. Достоверное увеличение экспрессии поверхностных маркеров CD80, CD83 на позитивных мДК в ответ на стимуляцию TNF происходит как у здоровых доноров, так и у больных РА, что указывает на способность к созреванию полученных дендритных клеток с миелоидным фенотипом в обеих исследуемых группах.

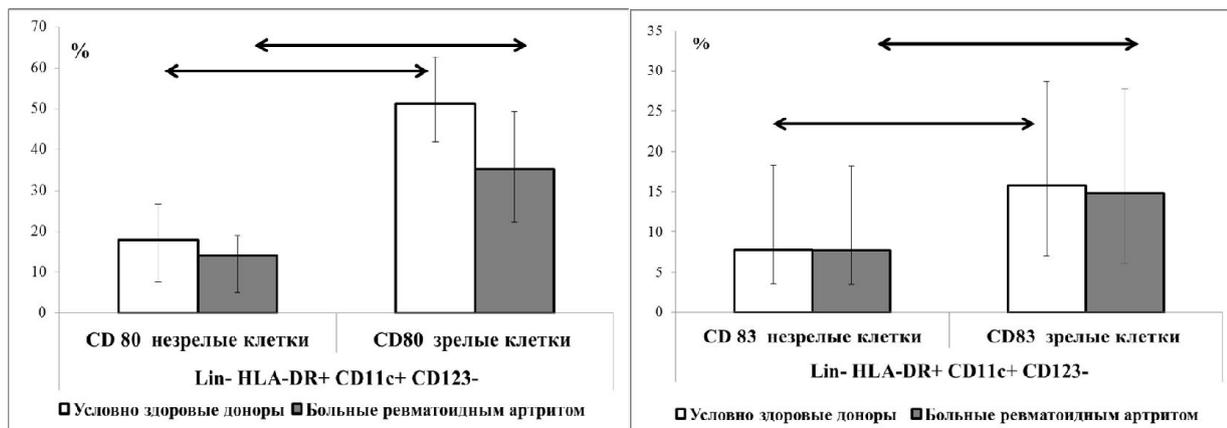


Рис.4 Относительное количество миелоидных дендритных клеток культивированных *in vitro* из мононуклеарных клеток условно-здоровых доноров (n=10) и больных ревматоидным артритом (n=15), экспрессирующих маркер CD80, CD83. Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала. Стрелками указаны достоверные различия (p<0,05).

Уровень экспрессии CCR7 (Рис.5) и у больных, и у здоровых на незрелых мДК крайне низкий, при этом после добавлении TNF он повышается в обоих исследуемых группах.

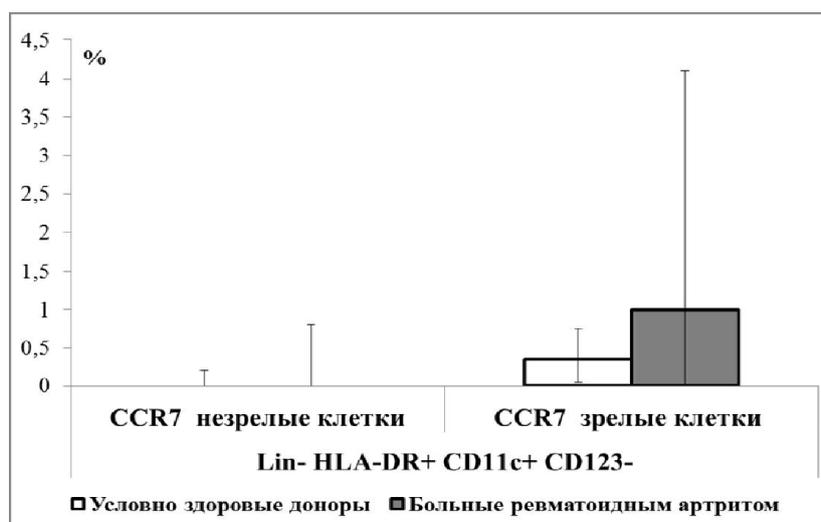


Рис.5 Относительное количество миелоидных дендритных клеток культивированных *in vitro* из мононуклеарных клеток условно-здоровых доноров (n=10) и больных ревматоидным артритом (n=15), экспрессирующих маркер CCR7. Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала. Стрелками указаны достоверные различия (p<0,05).

Изучение цитокин-продуцирующей (Рис.6) активности, (IL-10, IL-12, IFN- α), полученными дендритными клетками больных и здоровых продемонстрировало, что зрелые индуцированные ДК при добавлении специфических стимуляторов способны продуцировать цитокины, но при этом клетки больных РА не показали достоверных отличий по сравнению со здоровыми донорами.

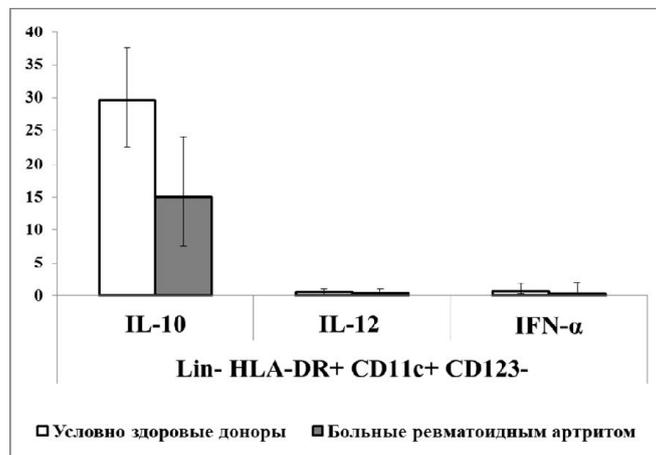


Рис.6 Относительное количество миелоидных дендритных клеток культивированных *in vitro* из мононуклеарных клеток условно-здоровых доноров (n=10) и больных ревматоидным артритом (n=15), продуцирующих IL-10, IL-12, IFN- α . Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала.

Индукция дендритных клеток с фенотипом $Lin^-HLA-DR^+CD123^+CD11c^-$

Для генерации незрелых дендритных клеток с плазмоцитоидными фенотипическими характеристиками, мононуклеарные клетки инкубировались с IL-3+R848 в течении 24 ч., после чего еще на 48 часа добавлялся LPS (*E.coli* 0114:B4) в качестве созревающего стимула.

Показано, что при данных условиях культивирования и при использовании IL-3, R848, LPS в качестве стимулирующих факторов, происходило достоверное увеличение уровня экспрессии маркеров CD80, CD83 (Рис.7) после созревания в обеих исследуемых группах.

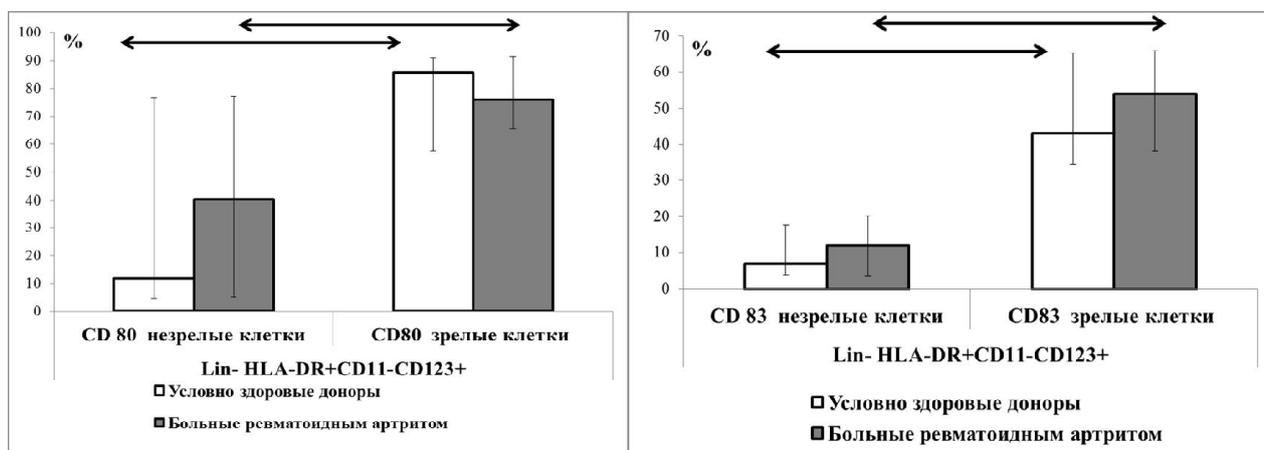


Рис. 7 Относительное количество плазмоцитоидных дендритных клеток культивированных *in vitro* из мононуклеарных клеток условно-здоровых доноров (n=10) и больных ревматоидным артритом (n=15), экспрессирующих маркер CD83. Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала. Стрелками указаны достоверные различия ($p < 0,05$).

При этом процесс созревания ДК сопровождался одновременным усилением экспрессии CCR7(Рис.11): на пДК в ответ на стимуляцию LPS достоверно

увеличивается экспрессия CCR7 как у больных РА, так и у здоровых доноров. Было показано, что на всех этапах созревания пДК уровень экспрессии CD80, CD83, CCR7 между РА и здоровыми донорами достоверно не отличался.



Рис. 8 Относительное количество плазмоцитоподобных дендритных клеток культивированных *in vitro* из мононуклеарных клеток условно-здоровых доноров (n=10) и больных ревматоидным артритом (n=15), экспрессирующих маркер CCR7. Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала. Стрелками указаны достоверные различия (p<0,05).

Различий по продукции IL-10 и IL-12 (Рис.9) зрелыми плазмоцитоподобными ДК между исследуемыми группами не наблюдалось, однако, по продукции IFN- α пДК (Рис.9) больных ревматоидным артритом демонстрируют достоверно более высокую продукцию данного цитокина по сравнению с клетками условно здоровых доноров.

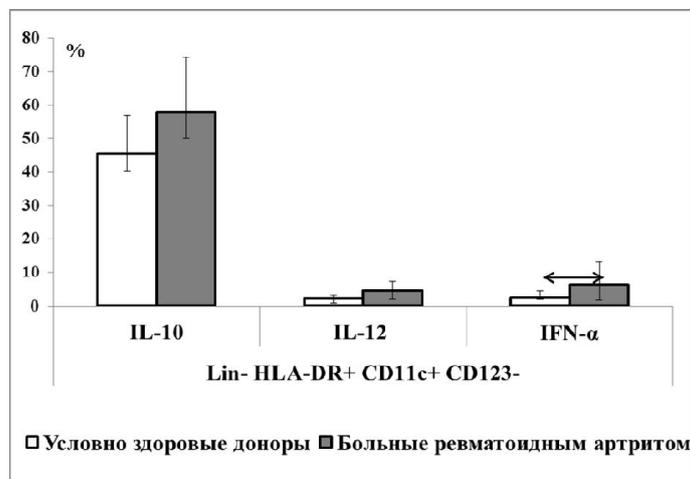


Рис.9 Относительное количество плазмоцитоподобных дендритных клеток культивированных *in vitro* из мононуклеарных клеток условно-здоровых доноров (n=10) и больных ревматоидным артритом (n=15), продуцирующих IL-10, IL-12, IFN- α . Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала. Стрелками указаны достоверные различия (p<0,05).

В результате проведенных исследований было показано, что в периферической крови больных РА мДК и пДК обладают незрелым фенотипом, при этом обнаружено значительное снижение относительного количества пДК периферической крови у больных РА, что свидетельствует о формировании при данной патологии дисбаланса между субпопуляциями ДК. Одновременно с этим, пДК больных РА характеризуются более высокой экспрессией CCR7.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обобщая полученные данные, можно заключить, что, как для здоровых доноров, так и для больных ревматоидным артритом, установлено определенное соотношение подтипов дендритных клеток периферической крови, достоверное изменяющееся при патологии за счет уменьшения количества циркулирующих плазмоцитоидных ДК. Кроме того, показаны различия по функциональным и фенотипическим характеристикам ДК между исследуемыми группами, что говорит об участии разных субпопуляций дендритных клеток в воспалительном процессе.

У больных ревматоидным артритом как миелоидные, так и плазмоцитоидные ДК характеризовались достоверно менее зрелым фенотипом по сравнению с клетками условно здоровых доноров, однако обладали сохранной способностью к созреванию под действием специфических стимуляторов, а именно при добавлении R848 и LPS наблюдалось увеличение экспрессии CD80 и CD83 на дендритных клетках больных ревматоидным артритом.

Для больных ревматоидным артритом показано меньшее относительное количество плазмоцитоидных ДК, но при этом дендритные клетки обеих субпопуляций при патологии демонстрируют достоверно более высокий миграционный потенциал, выраженный в увеличении экспрессии поверхностного маркера CCR7, по сравнению с показателями здоровых доноров.

Показано снижение внутриклеточной продукции противовоспалительных цитокинов (IL-4, IL-10) клетками обеих субпопуляций ДК больных ревматоидным артритом по сравнению со здоровыми донорами одновременно с увеличением плазмоцитоидными ДК внутриклеточной продукции провоспалительных цитокинов (IL-12, IFN- α), что свидетельствует об их активном участии в дисрегуляции цитокинового баланса.

Полученные данные о генерации дендритных клеток от больных ревматоидным артритом с миелоидным и плазмоцитоидным фенотипом имеют аналогичные по уровню экспрессии поверхностных маркеров и внутриклеточных цитокинов характеристики по сравнению с дендритными клетками условно здоровых доноров. Это свидетельствует о функциональной полноценности и потенциальной возможности применения их в качестве терапевтического агента.

Таким образом, выявленные характеристики субпопуляций циркулирующих ДК периферической крови больных ревматоидным артритом достоверно отличаются по сравнению с показателями условно здоровых доноров, при этом была показана возможность индукции функционально полноценных миелоидных и плазмоцитоидных дендритных клеток у больных ревматоидным артритом.

ВЫВОДЫ

1. У больных ревматоидным артритом по сравнению со здоровыми донорами в периферической крови не меняется содержание миелоидных и достоверно снижается количество плазмоцитоидных дендритных клеток, что свидетельствует о формировании дисбаланса между субпопуляциями дендритных клеток.
2. Дендритные клетки больных ревматоидным артритом характеризуются низким уровнем экспрессии CD80 CD83 как на миелоидных, так и на плазмоцитоидных ДК, что указывает на менее зрелое состояние циркулирующих дендритных клеток.

3. У больных ревматоидным артритом наблюдается более высокий процент ССR7- позитивных плазмоцитоидных дендритных клеток по сравнению со здоровыми донорами, что свидетельствует о более высоком миграционном потенциале плазмоцитоидных ДК периферической крови при данной патологии.
4. В периферической крови больных ревматоидным артритом по сравнению с показателями у здоровых доноров наблюдается снижением процента как миелоидных, так и плазмоцитоидных дендритных клеток, продуцирующих ИЛ-4 и ИЛ-10, при этом в популяции плазмоцитоидных дендритных клеток наблюдается повышение процента клеток продуцирующих ИЛ-12, ИFN- α , что свидетельствует о смещении баланса цитокинов в пользу медиаторов, стимулирующих клеточные реакции.
5. Индуцированные миелоидные и плазмоцитоидные дендритные клетки из клеток крови больных ревматоидным артритом не отличаются по своим фенотипическим характеристикам (CD80, CD83, ССR7) и способности к продукции цитокинов (ИЛ-10, ИЛ-12) от аналогичных клеток, индуцированных из клеток крови здоровых доноров, что свидетельствует о возможности индукции функционально полноценных дендритных клеток.
6. Полученные результаты по достоверному изменению как количества дендритных клеток в периферической крови, так и их фенотипических и функциональных характеристик (маркеры дифференцировки, маркеры миграции и экспрессия ИЛ-4, ИЛ-10, ИЛ-12) свидетельствуют о вовлеченности дендритных клеток в формирование иммунопатологического процесса при ревматоидном артрите.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Фалалеева С.А.**, Курилин В.В., Шкаруба Н. С., Чумасова О. А., Сизиков А. Э., Сенников С.В. Характеристика подтипов дендритных клеток периферической крови у больных ревматоидным артритом. // Медицинская иммунология.- 2013.- Т.15.- №4.- С. 343-350.
2. **Фалалеева С.А.**, Шкаруба Н.С. Чумасова О.А. Сизиков А.Э. Сравнительная характеристика дендритных клеток периферической крови больных ревматоидным артритом и здоровых доноров. //Российский иммунологический журнал, Тезисы объединенного иммунологического форума. Нижний-Новгород, 30 июня-5 июля. – 2013.- Т.7(16).- №2-3. - С. 347.
3. **Falaleeva S.A.**, Kurilin V.V., Shkaruba N.S., Chumasova O.A., Sizikov A.E. Sennikov S.V. Identification of myeloid dendritic cells and plasmacytoid dendritic cells in the peripheral blood of rheumatoid arthritis. //Сборник тезисов «15th International Congress of Immunology». – 2013. – Published Online doi: 10.3389
4. **Falaleeva S.A.**, Kurilin V.V., Shkaruba N.S., Chumasova O.A., Sizikov A.E. Sennikov S.V. Myeloid dendritic cells and plasmacytoid dendritic cells as possible target for the immunotherapy in patients with rheumatoid arthritis. // Ann Rheum Dis. Сборник материалов EULAR.- 2014. – Vol.73. – P.957.
5. **Фалалеева С.А.**, Курилин В.В., Шкаруба Н.С., Альшевская А.А., Сенников С.В. Роль субпопуляций дендритных клеток в патогенезе ревматоидного артрита. // Иммунология.- 2014.-№5. – С.291-297.

6. **Falaleeva S.A.**, Kurilin V.V., Shkaruba N.S., Chumasova O.A., Sizikov A.E. Sennikov S.V. Plasmacytoid and myeloid dendritic cells in whole peripheral blood producing intracellular cytokines in patients with rheumatoid arthritis. Сборник материалов Cytokine.- 2015. – Vol.76 (1). – P. 71.
7. **Falaleeva S.A.**, Kurilin V.V., Shkaruba N.S., Chumasova O.A., Sizikov A.E. Sennikov S.V. Dendritic cells as a potential object in cellular immunotherapy in rheumatoid arthritis. Сборник материалов Ann Rheum Dis.- 2015.- Vol.74. – P.490-491.

Список сокращений:

ДК–дендритные клетки

мДК–миелоидные дендритные клетки

пДК– плазмоцитоидные дендритные клетки

МНК–моноклеарные клетки

РА- ревматоидный артрит