

УДК 57.085.23+57.083.34

<https://doi.org/10.51523/2708-6011.2025-22-2-08>



Исследование потенциала толерогенных дендритных клеток к реверсии под влиянием фактора некроза опухоли

Я. С. Минич, А. Е. Гончаров, Н. Г. Антоневиц

Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси, г. Минск, Беларусь

Резюме

Цель исследования. Оценить реверсию толерогенных дендритных клеток (толДК), полученных из человеческих моноцитов крови, в иммуногенные дендритные клетки (ДК) под действием TNF- α *in vitro*.

Материалы и методы. Методом проточной цитофлуориметрии оценивали иммунофенотип ДК, полученных из моноцитов крови здоровых доноров ($n = 6$), при различных условиях культивирования: культура незрелых ДК, культура зрелых ДК, культура толДК, культура толДК после воздействия провоспалительного фактора TNF- α . Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием непараметрических методов.

Результаты. В популяции зрелых ДК количество клеток, экспрессирующих молекулу CD83 — 24,05 (19,30–28,20) % достоверно выше, по сравнению с незрелыми ДК, толДК и толДК после стимулирования TNF- α (незрДК — 4,10 (2,75–5,83), толДК — 4,45 (3,68–4,93), толДК/TNF- α — 9,70(8,83–10,58)). Интенсивность экспрессии HLA-DR на поверхности зрелых ДК достоверно выше по сравнению с незрелыми ДК, толДК и толДК после стимулирования TNF- α (незрДК — 23,03(18,24–25,40) усл. ед.; зрДК — 27,54 (25,04–32,41) усл. ед.; толДК — 10,56 (9,21–12,77) усл. ед.; толДК/TNF- α — 13,74 (10,66–18,53) усл. ед.).

Заключение. Добавление индуктора созревания TNF- α не приводит к реверсии иммунофенотипа толДК до уровня зрелых ДК. Полученные результаты свидетельствуют в пользу возможности безопасного применения толДК в качестве биомедицинского клеточного продукта для лечения заболеваний, связанных с избыточным иммунным ответом.

Ключевые слова: толерогенные дендритные клетки, проточная цитометрия, иммунофенотипирование

Вклад авторов. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочитали и одобрили финальную версию для публикации.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Источники финансирования. Исследование выполнено в рамках мероприятия 23-й Государственной программы «Наукоемкие технологии и техника» 2021–2025 гг. (№ 20213421).

Для цитирования: Минич ЯС, Гончаров АЕ, Антоневиц НГ. Исследование потенциала толерогенных дендритных клеток к реверсии под влиянием фактора некроза опухоли. Проблемы здоровья и экологии. 2025;22(2):69–75. DOI: <https://doi.org/10.51523/2708-6011.2025-22-2-08>

Study of the potential of tolerogenic dendritic cells to immunophenotypic reversion affected by tumor necrosis factor

Yana S. Minich, Andrei Y. Hancharou, Natalia G. Antonevich

Institute of Biophysics and Cell Engineering of National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

Abstract

Objective. To assess reversion of tolerogenic dendritic cells (tolDC), obtained from human blood monocytes into immunogenic mature dendritic cells (mDC) under the influence of TNF- α .

Materials and methods. The immunophenotype of dendritic cells (DCs) obtained from blood monocytes of healthy donors ($n=6$) was assessed by flow cytometry: immature DC culture (immDC), mature (mDC) culture, tolDC culture, tolDC culture after exposure to the proinflammatory factor TNF- α (tol DCs/TNF- α). Statistical analysis was performed using nonparametric methods.

Results. There was 24.05(19.30-28.20) % of CD83⁺ cells in the population of mDCs, that was significantly higher compared with immDCs, tolDCs and tolDCs after stimulation with TNF- α (imm DCs – 4.10 (2.75-5.83), tol DCs – 4.45 (3.68-4.93), tol DCs/TNF- α – 9.70 (8.83-10.58). The intensity of HLA-DR expression on the surface of mDCs was significantly higher compared with immDCs, tolDCs and tolDCs after stimulation with TNF- α (imm DCs – 23.03 (18.24-25.40) RFI; tolDCs – 27.54 (25.04-32.41) RFI; tolDC – 10.56 (9.21-12.77) RFI; tolDC/TNF- α – 13.74 (10.66-18.53) RFI (RFI – relative fluorescence intensity).

© Я. С. Минич, А. Е. Гончаров, Н. Г. Антоневиц, 2025

Conclusion. Adding of the TNF- α as maturation inducer did not result in immunophenotypic reversion of tolDCs to the mDCs level. The obtained data indicate in favor of possibility to use safely tolDCs as a biomedical cell product for the treatment of diseases associated with an excessive immune response.

Keywords: *tolerogenic dendritic cells, flow cytometry, immunophenotyping*

Author contributions. All authors made significant contributions to the search and analytical work and preparation of the article, read and approved the final version for publication.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. This research was carried out within activities of the 23rd State program “High Technologies and Technique” 2021-2025 (No. 20213421).

For citation: Minich YaS, Hancharou AY, Antonevich NG. Study of the potential of tolerogenic dendritic cells to immunophenotypic reversion affected by tumor necrosis factor. *Health and Ecology Issues*. 2025;22(2):69–75. DOI: <https://doi.org/10.51523/2708-6011.2025-22-2-08>

Введение

Толерогенные дендритные клетки – это дендритные клетки с иммуносупрессивными свойствами, они способны формировать иммунную толерантность в отношении определенных антигенов [1–4]. В настоящее время достигнуты успехи в получении *ex vivo* толДК, которые способны подавлять иммунный ответ против определенных аутоантигенов, что делает их перспективным персонализированным терапевтическим средством в лечении заболеваний с аутоиммунным компонентом в этиопатогенезе [5–7].

Толерогенные ДК необходимы для поддержания центральной и периферической толерантности путем делеции и анергии Т-клеток, а также генерации и активации регуляторных Т-клеток (Treg) [8, 9].

Как правило, на свойства всех типов ДК сильное влияние оказывает местное микроокружение, в том числе присутствие про- или противовоспалительных цитокинов [10, 11]. В связи с этим есть вероятность приобретения ДК провоспалительных свойств, что способно в свою очередь спровоцировать дополнительную стимуляцию аутоагрессивных Т-лимфоцитов и прогрессирование заболевания. Именно поэтому для практического использования толДК в лечебных целях необходимо исследовать стабильность иммунофенотипических показателей толДК и их потенциал к реверсии в иммуногенные ДК под действием провоспалительных факторов.

В доступной литературе отсутствуют сведения о способности индуцированных *in vitro* толДК человека приобретать свойства иммуногенных ДК под влиянием провоспалительных цитокинов, поэтому проведение исследований такого рода является актуальной задачей.

Для *in vitro* моделирования условий воспаления могут быть использованы такие цитокины, как TNF- α , ИЛ-1, ИЛ-6 и ИЛ-12 [12]. TNF- α является провоспалительным цитокином, который секретируется активированными макрофагами и

Т-клетками и оказывает плеiotропное влияние на клетки системы иммунитета через два рецептора — TNFR1 (p55) и TNFR2 (p75). Обработка незрелых ДК TNF- α *in vitro* приводит к повышению поверхностной экспрессии основных активационных маркеров — МНС (главного комплекса гистосовместимости) класса I, класса II, костимуляторных молекул CD80 и CD86, а также усилению активности Т-клеток [13, 14].

Цель исследования

Изучить влияние провоспалительного цитокина фактора некроза опухоли (TNF- α) на иммунофенотип индуцированных *in vitro* моноцитарных толДК и оценить их способность к реверсии в иммуногенные ДК.

Материалы и методы

Получение культуры незрелых ДК и толДК. Из периферической крови 6 здоровых доноров выделяли мононуклеары путем центрифугирования на градиенте плотности фиколл-пака ($\rho = 1077$ г/л), отбирали образовавшееся мононуклеарное кольцо в пробирку и дважды промывали фосфатным буфером. Полученные мононуклеары от каждого донора разделяли на 2 части и переносили во флаконы, инкубировали 40–60 мин, сливали клеточную суспензию, аккуратно промывали фосфатным буфером и получали культуру моноцитов, прикрепленную ко дну флакона.

Для получения незрелых ДК выделенные моноциты в первом флаконе культивировали в течение 4–5 суток в питательной среде AIM-V, содержащей 2 % АВ0-сыворотки и рекомбинантные человеческие цитокины (50 нг/мл ГМ-КСФ и 25 нг/мл ИЛ-4) [15].

Для получения толДК моноциты во втором флаконе культивировали в течение 4–5 суток в питательной среде AIM-V, содержащей 2 % АВ0-сыворотки, рекомбинантные человеческие цитокины (50 нг/мл ГМ-КСФ и 25 нг/мл ИЛ-4) и витамин Д3 (20 нг/мл). На 5–6-е сутки клет-

ки из второго флакона снимали и в количестве 500 тыс. кл/лунку высевали на лунки 12-луночного планшета, содержащего монослой мезенхимальных стволовых клеток (соотношение 2:1), предварительно удаляя ростовую среду. Сокультивирование проводили 3 суток в питательной среде AIM-V, содержащей 2 % АВ0-сыворотки и витамин Д3 (20 нг/мл), при 37 °С в увлажненной атмосфере с 5 % CO₂.

Постановка исследования. На 5–6-е сутки ДК из первого флакона снимали и в количестве 500 тыс. кл/лунку рассеивали на 12-луночный планшет в питательной среде AIM-V, содержащей 2 % АВ0-сыворотки. От каждого донора получали 4 лунки, содержащие ДК:

— № 1. Культура незрелых ДК (контроль).

— № 2. Культура незрелых ДК для дальнейшего созревания.

— № 3. Культура незрелых ДК и монослой мезенхимальных стволовых клеток (для получения толДК).

— № 4. Культура незрелых ДК и монослой мезенхимальных стволовых клеток (для оценки реверсии толДК).

Спустя 3 суток все варианты ДК снимали с лунок и в количестве 400 тыс. кл/лунку переносили в новые лунки (рисунок 1) в свежей среде AIM-V, содержащей 1,5 % АВ0-сыворотки. Проверляли отсутствие мезенхимальных стволовых клеток в культурах толДК путем оценки содержания CD90⁺-клеток на проточном цитофлуориметре (количество CD90⁺-клеток в образце менее 1 %). В лунку № 2 (незрелые ДК) и № 4 (толДК) добавляли TNF-α в концентрации 25 нг/мл (физиологическая концентрация).

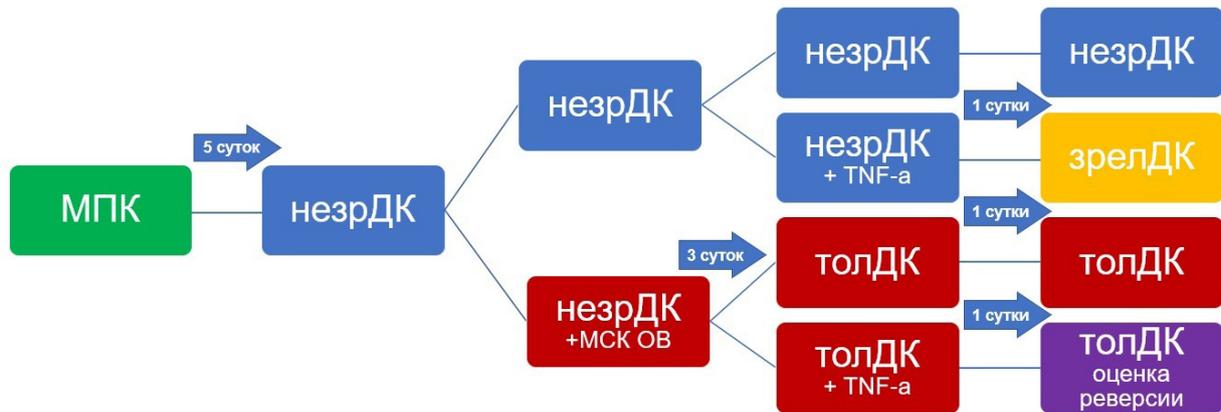


Рисунок 1. Постановка эксперимента по оценке реверсии толДК в иммуногенные ДК под действием TNF-α
Figure 1. Experimental setup to assess reversion of tolerogenic DCs to immunogenic DCs influenced by TNF-α

Культивировали все варианты ДК одни сутки в увлажненной атмосфере с 5 % CO₂ при 37 °С. Методом проточной цитометрии оценивали жизнеспособность и иммунофенотип полученных ДК для каждого донора: культура незрелых ДК, культура зрелых ДК, культура толДК, культура толДК после воздействия провоспалительного фактора. Использовали антитела: CD209 FITC (клон UW60.1, Invitrogen, США), CD83 PE (клон HB15e, Biolegend, США), HLA-DR APC (клон Immu-357, Invitrogen, США), зонд для оценки жизнеспособности 7-AAD (Cayman Chemical Co, США).

Учитывали количество (%) положительных клеток в популяции и относительный уровень экспрессии молекулы, который оценивали по относительной интенсивности флуоресценции (ОИФ) антител на клетку по формуле:

ОИФ = средняя интенсивность флуоресценции на клетку окрашенного образца / средняя интенсивность флуоресценции на клетку неокра-

шенного образца (неокрашенный контрольный образец), относительные единицы (отн. ед.)

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием U-критерия Манна – Уитни. Данные представлены в виде Me (25–75), где Me — медиана, а 25 и 75 — интерквартильный размах в виде 25-й и 75-й процентов.

Результаты и обсуждение

Основной маркер дифференцировки моноцитов в дендритные клетки — экспрессия молекулы CD209. Во всех полученных образцах популяция CD209⁺7AAD⁻-клеток составляла более 85 %. Анализировали изменения иммунофенотипа в популяциях ДК (жизнеспособные CD209⁺-клетки) по основным маркерам зрелости: CD83 и HLA-DR.

Одним из основных маркеров зрелых ДК является CD83, поскольку начинает высоко экс-

прессироваться на поверхности ДК после захвата антигена. Зрелые ДК способны активировать Т-клетки, а также инициировать дополнительную поверхностную экспрессию МНС класса II и ко-

стимулирующей молекулы CD86 [16].

На рисунке 2 представлено количество (%) ДК, экспрессирующих на своей поверхности молекулу CD83.

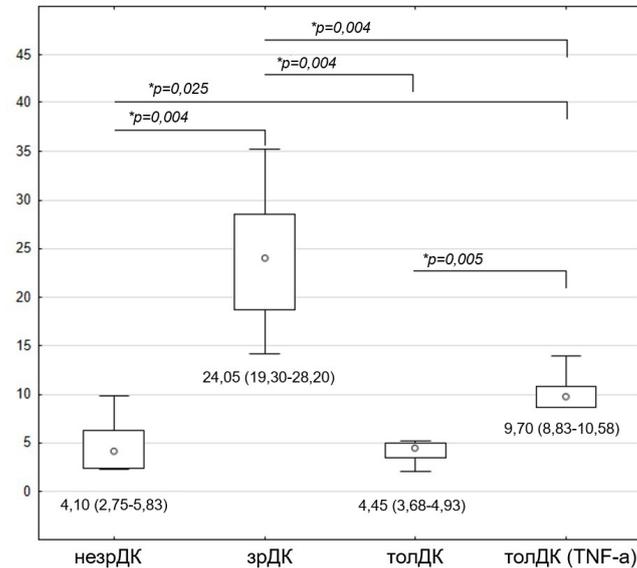


Рисунок 2. Содержание ДК, экспрессирующих молекулу CD83 (%), в различных клеточных культурах
Figure 2. Content of DCs expressing CD83 molecule (%) in various cell cultures

В популяции зрелых ДК количество клеток, экспрессирующих молекулу CD83, было достоверно выше ($p < 0,05$), по сравнению с незрелыми ДК, толДК и толДК после стимулирования TNF- α . В популяции толДК, которые стимулировали TNF- α , достоверно повышалось количество CD83⁺-клеток ($p < 0,05$) по сравнению с незрелыми ДК и нестимулированными толДК.

Вместе с тем количество CD83⁺-клеток в популяции толДК, стимулированных TNF- α , не до-

стигало уровня культур зрелых ДК. Это является одним из свидетельств того, что добавление индуктора созревания TNF- α не приводит к полноценной реверсии толДК в иммуногенные ДК.

Помимо оценки содержания CD83⁺-клеток во всей популяции оценивали относительный уровень экспрессии молекулы на клетку, рассчитанный по интенсивности флюоресценции антител, связавшихся с маркером CD83 на поверхности ДК (рисунок 3).

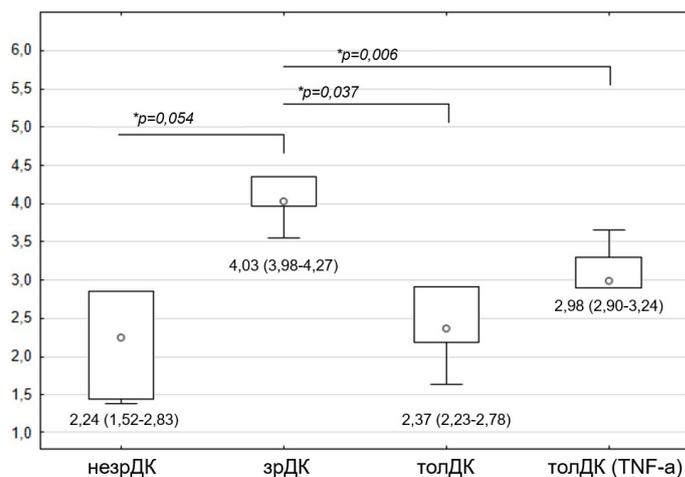


Рисунок 3. Относительная интенсивность флюоресценции CD83 на поверхности ДК (отн. ед.)
Figure 3. CD83 fluorescence relative intensity on the DC surface (relative fluorescence unit)

Установлено, что в популяции зрелых ДК интенсивность флюоресценции антител к CD83 (соответствует уровню экспрессии данной молекулы) достоверно выше ($p < 0,05$), по сравнению с незрелыми ДК, толДК и толДК после стимуляции TNF- α .

В результате можно сделать вывод о том, что добавление TNF- α к толДК не приводит к усиле-

нию экспрессии молекулы CD83 на поверхности клеток, тем самым не способствует изменению функциональных свойств толДК.

HLA-DR является антигенпрезентирующим комплексом II класса, который представляет антиген Т-клеткам. На рисунке 4 представлено количество ДК (%), экспрессирующих молекулу HLA-DR на своей поверхности.

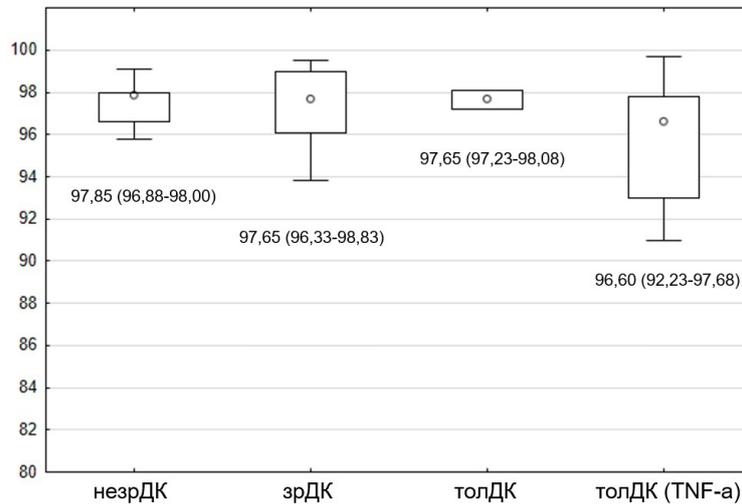


Рисунок 4. Содержание ДК, экспрессирующих молекулу HLA-DR (%)
Figure 4. Content of DCs expressing the HLA-DR molecule (%)

Молекула HLA-DR является одним из основных маркеров антигенпредставляющих клеток, в том числе ДК разной степени зрелости и направленности дифференцировки — уровень экспрессии данной молекулы превышал 90 % во всех исследуемых вариантах ДК. Достоверных различий между субпопуляциями ДК не выявлено.

При этом основополагающим критерием подлинности толДК является снижение уровня экспрессии молекулы HLA-DR на клетку по сравнению с незрелыми ДК [7]. В связи с этим необходимо определить стабильность ключевой иммунофенотипической характеристики толДК. На рисунке 5 представлена интенсивность флюоресценции антител к молекуле HLA-DR на поверхности ДК.

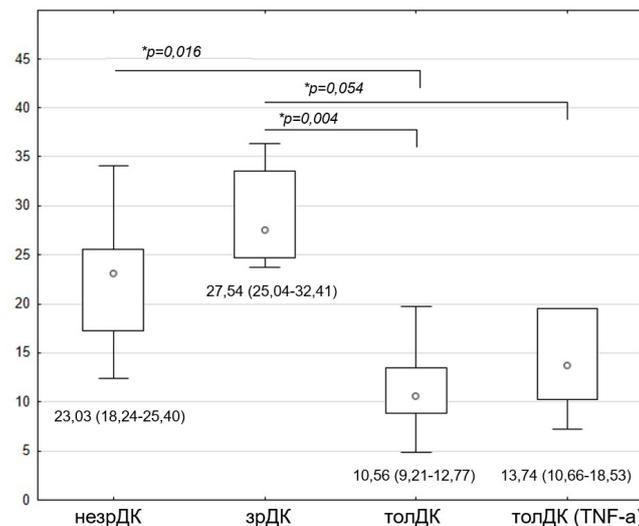


Рисунок 5. Относительная интенсивность флюоресценции HLA-DR на поверхности ДК (отн. ед.)
Figure 5. HLA-DR fluorescence relative intensity on the DC surface (relative fluorescence unit)

Установлено, что на поверхности незрелых ДК уровень экспрессии HLA-DR был достоверно выше ($p < 0,05$) по сравнению с толДК. Уровень экспрессии HLA-DR на поверхности зрелых ДК был достоверно выше ($p < 0,05$) по сравнению с толДК и толДК, стимулированными TNF- α .

Таким образом, после добавления TNF- α толДК, в отличие от незрелых ДК, сохраняют сниженный уровень экспрессии HLA-DR, который не достигает уровня зрелых ДК. Данный результат демонстрирует стабильность иммунофенотипа толДК и отсутствие реверсии в иммуногенные ДК.

Заключение

Толерогенные ДК являются перспективным персонализированным средством для лечения

заболеваний, связанных с избыточным иммунным ответом. В результате выполнения исследования нами получены убедительные результаты о стабильности иммунофенотипа толДК под влиянием TNF- α . Добавление индуктора созревания TNF- α не приводит к реверсии иммунофенотипа толДК. В популяции зрелых ДК уровень экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости II класса — HLA-DR и количество клеток, экспрессирующих активационный маркер CD83, было достоверно выше, по сравнению с незрелыми ДК, толДК и толДК после стимуляции TNF- α . Полученные результаты служат еще одним подтверждением безопасности применения толДК в качестве биомедицинского клеточного продукта для лечения заболеваний, связанных с избыточным иммунным ответом.

Список литературы / References

- Adorini L, Giarratana N, Penna G. Pharmacological induction of tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells. *Semin Immunol.* 2004;16:127-134. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.smim.2003.12.008>
- Piemonti L, Monti P, Sironi M, Fraticelli P, Leone BE, et al. Vitamin D3 affects differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol.* 2000;164:4443-4451. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.9.4443>
- Svajger U, Rozman P. Induction of Tolerogenic Dendritic Cells by Endogenous Biomolecules: An Update. *Frontiers in Immunology.* 2018;9. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02482>
- Svajger U, Rozman P. Tolerogenic dendritic cells: molecular and cellular mechanisms in transplantation. *J Leukoc Biol.* 2014;95:53-69. DOI: <https://doi.org/10.1189/jlb.0613336>
- Bell GM, Anderson AE, Diboll J, Reece R, Eltherington O, Harry RA, et al. Autologous tolerogenic dendritic cells for rheumatoid and inflammatory arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases.* 2017;76(1):227-234. DOI: <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2015-208456>
- Гончаров А.Е., Антоневиц Н.Г., Чекан В.Л. Влияние мезенхимальных стволовых клеток обонятельной выстилки на антигенный профиль дендритных клеток. *Новости медико-биол. наук.* 2015;12(4):159-162. Hancharou A, Antonevich N, Chekan V. The influence of olfactory mucosa-derived mesenchymal stem cells on the antigenic profile of the dendritic cells. *News of Biomedical Sciences.* 2015;12(4):159-162. (In Russ.).
- Гончаров А.Е., Минич Я.С., Антоневиц Н.Г. Иммуноморфологическая характеристика толерогенных дендритных клеток. *Новости медико-биол. наук.* 2024;24(3):182-194. Hancharou A, Minich Y, Antonevich N. Immunomorphological characteristics of tolerogenic dendritic cells. *News of Biomedical Sciences.* 2024;24(3):182-194. (In Russ.).
- Domogalla MP, Rostan PV, Raker VK, et al. Tolerance through education: how tolerogenic dendritic cells shape immunity. *Frontiers in Immunology.* 2017;8:1764. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01764>
- Hilkens CMU, Isaacs JD. Tolerogenic dendritic cell therapy for rheumatoid arthritis: where are we now? *Clinical & Experimental Immunology.* 2013;172(2):148-157. DOI: <https://doi.org/10.1111/cei.12038>
- Raker VK, Domogalla MP, Steinbrink K. Tolerogenic Dendritic Cells for Regulatory T Cell Induction in Man. *Frontiers in Immunology.* 2015;6:569. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00569>
- Wu L, Liu YJ. Development of dendritic-cell lineages. *Immunity.* 2007;26(6):741-750. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.06.006>
- Blanco P, Palucka AK, Pascual V, Banchereau J. Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2008;19(1):41-52. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2007.10.004>
- Trejejo JM, Marino MW, Philpott N, Josien R, et al. TNF- α -dependent maturation of local dendritic cells is critical for activating the adaptive immune response to virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98(21):12162-12167. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.211423598>
- Ritter U, Meissner A, Ott J, Körner H. Analysis of the maturation process of dendritic cells deficient for TNF and lymphotoxin- α reveals an essential role for TNF. *J Leukoc Biol.* 2003;74:216-222. DOI: <https://doi.org/10.1189/jlb.1202587>
- Тимохина О.В., Гончаров А.Е., Антоневиц Н.Г. Методы получения дендритных клеток для лечения онкологических заболеваний. *Новости медико-биологических наук.* 2020;20(2):127-136. Timohina O, Hancharou A, Antonevich N. Methods for obtaining dendritic cells for the treatment of cancer. *News Of Biomedical Sciences.* 2020;20(2):127-136. (In Russ.).
- Riaz B, Islam SMS, Ryu HM, Sohn S. Regulates the Immune Responses in Inflammatory Disorders. *Int J Mol Sci.* 2023;24(3):2831. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms24032831>

Информация об авторах / Information about the authors

Минич Яна Сергеевна, научный сотрудник лаборатории иммунологии и вирусологии, ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси», Минск, Беларусь
ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-2125-4990>
e-mail: yanaminich1094@gmail.com

Yana S. Minich, Researcher at the Laboratory of Immunology and Virology, Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-2125-4990>
e-mail: yanaminich1094@gmail.com

Гончаров Андрей Евгеньевич, к.м.н., доцент, директор
ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Бела-
руси», Минск, Беларусь
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4869-9864>
e-mail: andrei.hancharou@gmail.com

Антоневич Наталья Георгиевна, к.б.н., доцент, веду-
щий научный сотрудник лаборатории иммунологии и виру-
сологии, ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии
НАН Беларуси», Минск, Беларусь
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9535-7157>
e-mail: antonevich.n@gmail.com

Andrei Y. Hancharou, Candidate of Medical Sciences,
Associate Professor, Director of the Institute of Biophysics and
Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus,
Minsk, Belarus

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4869-9864>
e-mail: andrei.hancharou@gmail.com

Natalia G. Antonevich, Candidate of Biological Sciences,
Associate Professor, Leading Researcher at the Laboratory of
Immunology and Virology, Institute of Biophysics and Cell Engi-
neering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk,
Belarus

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9535-7157>
e-mail: antonevich.n@gmail.com

Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

Минич Яна Сергеевна
e-mail: yanaminich1094@gmail.com

Yana S. Minich
e-mail: yanaminich1094@gmail.com

Поступила в редакцию / Received 23.12.2024

Поступила после рецензирования / Accepted 13.03.2025

Принята к публикации / Revised 13.05.2025