

# LPS indukuje apoptozę komórek dendrytycznych krwi obwodowej

## LPS induces apoptosis of peripheral blood dendritic cells

AGATA KUBICKA-SIERSZEŃ<sup>1,3</sup>, ANNA MICHALAK<sup>1</sup>, MAREK L. KOWALSKI<sup>2</sup>, MAGDALENA GISZTEROWICZ<sup>1,3</sup>, JANINA Ł. GRZEGORCZYK<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Zakład Mikrobiologii i Laboratoryjnej Immunologii Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

<sup>2</sup> Klinika Immunologii, Reumatologii i Alergologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

<sup>3</sup> Studium Doktoranckie Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Praca finansowana ze środków przyznanych na prowadzenie badań naukowych służących rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Zadania nr 502-03/1-137-02/502-14-217; 502-03/1-137-02/502-14-218; 502-03/1-137-02/502-14-219 i 503/1-137-02/503-11-002.

### Streszczenie

**Wprowadzenie.** Komórki dendrytyczne (DC) są komórkami prezentującymi antygen, które stanowią istotny element zarówno odpowiedzi wrodzonej jak i nabytej. Główną funkcją DC jest przetwarzanie i prezentacja antygenów limfocytom T.

**Cel pracy.** Ocena wpływu pochodnych czynników infekcyjnych na apoptozę CD123+ komórek dendrytycznych wyizolowanych z krwi obwodowej osób zdrowych.

**Materiał i metody.** Komórki dendrytyczne CD123+ pozyskano z monocytów izolowanych z krwi obwodowej 7 zdrowych pacjentów. Komórki były hodowane 24, 48 i 72 godziny w samym medium (sp, próba kontrolna) oraz w obecności LPS (1 µg/mL), toksyny tężcowej (TT; 25 ng/mL) i rekombinowanego białka fuzyjnego ludzkiego wirusa paragrypy (fpHPIV3; 10 ng/mL). Apoptozę oceniano metodą cytometrii przepływowej z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych anty-CD123-PE oraz zestawu Annexin V – FITC Apoptosis Detection Kit.

**Wyniki.** Odsetek komórek DC CD123+ w późnej apoptozie istotnie wzrósł ( $p < 0,05$ ) tylko pod wpływem LPS w 24h eksperymentu [67,69±4,00% (47,03%-80,94%)] w porównaniu do sp [57,36±6,57% (37,53%-77,27%)]. W pozostałych wariantach doświadczenia nie obserwowano istotnych statystycznie zmian.

**Wnioski.** Apoptoza komórek dendrytycznych CD123+, izolowanych od osób zdrowych, jest zróżnicowana w zależności od czasu hodowli oraz zastosowanych pochodnych czynników infekcyjnych.

**Słowa kluczowe:** komórki dendrytyczne, apoptoza, toksyna tężcowa, lipopolisacharyd, wirus paragrypy człowieka typ 3

### Summary

**Introduction.** Dendritic cells (DCs) have important function in both innate and adaptive immunity. The main function of DCs is to process and present antigen to the T lymphocytes.

**Aim.** The aim of the study was to evaluate the effect of infectious agents derivatives on apoptosis of CD123+ dendritic cells isolated from peripheral blood of healthy donors.

**Material and method.** DCs CD123+ were generated from peripheral blood monocytes of 7 healthy donors. The cells were cultured for 24, 48 and 72 hours in medium alone (sp, control sample) or with LPS (1 µg/mL), tetanus toxin (TT; 25 ng/mL) and recombinant fusion protein of human parainfluenza virus (fpHPIV3; 10 ng/mL). The apoptosis of CD123+ DCs was detected by flow cytometry method using PE-conjugated anti-CD123 monoclonal antibodies and Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit.

**Results.** Stimulation with LPS for 24 hours significantly increased the percentage of CD123+ DCs in late apoptosis [67.69±4.00% (47.03-80.94%)] compared to spontaneous culture [57.36±6.57% (37.53-77.27%)] ( $p < 0.05$ ). The other stimuli did not affect DC apoptosis.

**Conclusion.** The apoptosis of CD123+ DCs, isolated from healthy donors, varies depending on the time of culture and the infectious factors derivatives used in the experiment.

**Keywords:** dendritic cells, apoptosis, tetanus toxin, lipopolysaccharide, human parainfluenza virus type 3

© *Alergia Astma Immunologia* 2016, 21 (2): 121-126

www.alergia-astma-immunologia.pl

Przyjęto do druku: 25.04.2016

**Adres do korespondencji / Address for correspondence**

Prof. dr hab. n. med. Janina Łucja Grzegorzczak

Zakład Mikrobiologii i Laboratoryjnej Immunologii Medycznej UM w Łodzi

Ul. Pomorska 251, 92213 Łódź

Tel. 42 272 57 95; e-mail: janina.grzegorzczak@umed.lodz.pl

### Wykaz skrótów:

APC – komórki prezentujące antygen

DC – komórki dendrytyczne

fpHPIV3 – białko fuzyjne ludzkiego wirusa paragrypy typu 3

GM-CSF – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów

IL-4 – interleukina 4

sp – próba spontaniczna

TT – toksyna tężcowa

## WSTĘP

Komórki dendrytyczne (*dendritic cells*, DC) są jedynymi profesjonalnymi komórkami prezentującymi antygen (*antigen presenting cells*, APC), będącymi zarówno składnikiem odpowiedzi odpornościowej wrodzonej, jak i niezbędnym elementem zaindukowania odpowiedzi nabytej [1]. Szczególnie ważną funkcję pełnią w przetwarzaniu i prezentowaniu antygenów limfocytom T – jako jedyne komórki APC prezentują antygeny naiwnym limfocytom T [1-4]. Pod względem immunofenotypu i funkcji stanowią zróżnicowaną populację. Konwencjonalne DC posiadają rozległe wypustki, specjalizują się w pochłanianiu, przetwarzaniu i prezentowaniu antygenów. Plazmacytoidalne DC nie posiadają rozbudowanych wypustek (dlatego ich zdolność do prezentacji antygenów jest ograniczona), natomiast są głównymi producentami interferonu typu I w organizmie, co związane jest z odpowiedzią przeciwwirusową. Jeszcze inną subpopulacją DC są komórki Langerhansa, które występują w skórze i błonach śluzowych [1-4]. Wszystkie subpopulacje DC wywodzą się z CD34<sup>+</sup> multipotencjalnych komórek szpiku kostnego i w zależności od oddziaływujących na nie czynników mogą się różnicować w odrębne subpopulacje [1].

W warunkach fizjologicznych, DC powstają z prekursorów szpikowych, natomiast w stanach zapalnych mogą różnicować się także z monocytów tworząc subpopulacje zapalnych DC [5]. W warunkach *in vitro* można uzyskać DC z monocytów krwi obwodowej w obecności interleukiny-4 (IL-4) oraz czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF) [1]. Ekspresja markerów powierzchniowych DC w dużym stopniu zależy od czynników stanowiących mikrośrodowisko komórki. Wykazano, że w obecności IL-4 i GM-CSF, 60% komórek DC charakteryzuje się występowaniem markera CD 123<sup>+</sup> [6,7].

W odniesieniu do odpowiedzi DC na czynniki infekcyjne ważnym jest proces dojrzewania oraz eliminacji tych komórek poprzez apoptozę. Niedojrzałe DC mają silne właściwości fagocytarne. Cechuje je obecność licznych receptorów rozpoznających PAMP (*pathogen-associated molecular patterns*). W konsekwencji kontaktu z obcym antygenem, komórka dojrzewa, tracąc właściwości fagocytarne, nabiera cech komórki APC poprzez zwiększenie ekspresji powierzchniowych cząsteczek MHC klasy I i II, cząsteczek kostymulujących i adhezyjnych, a na jej powierzchni pojawiają się liczne wypustki cytoplazmatyczne, które ułatwiają kontakt z innymi komórkami [8]. W trakcie tego procesu komórka migruje do narządów limfatycznych, gdzie prezentuje pochłonięte antygeny, a następnie ulegnie procesowi apoptozy [9].

Proces programowanej śmierci DC jest bardzo ważną częścią cyklu życiowego komórki, ponieważ reguluje wielkość odpowiedzi immunologicznej na wnikające do organizmu patogeny. Apoptoza nie tylko zapobiega nadmiernej aktywacji układu odpornościowego, ale także uczestniczy w utrzymaniu tolerancji immunologicznej na własne antygeny, poprzez wpływ na generowanie populacji limfocytów T regulatorowych [8,9]. Wszelkie zaburzenia tego procesu mogą prowadzić do poważnych konsekwencji. Zahamowanie apoptozy DC może przyczynić się do przewlekłej aktywacji limfocytów T, a tym samym prowadzić do rozwoju chorób autoimmunizacyjnych [12,13], natomiast zbyt nasilona apoptoza DC może powodować powstanie stanu immunosupresji, czyniąc organizm podatnym na infekcje [12,14].

Komórki dendrytyczne stanowią wciąż nie do końca poznany element układu odpornościowego, dlatego też zbadanie ich cyklu życiowego oraz funkcji wydaje się niezwykle istotne. Ponieważ jest niewiele danych na temat czynników i mechanizmów, które wpływają na proces ich programowanej śmierci – apoptozy, celem podjętych badań była ocena wpływu nieswoistych pochodnych czynników infekcyjnych na apoptozę CD123<sup>+</sup> komórek dendrytycznych wyizolowanych z krwi obwodowej osób zdrowych.

## MATERIAŁ I METODY

### Pacjenci

Do badań zakwalifikowano 7 osób zdrowych, które uprzednio wyraziły zgodę na udział w badaniu [(3 kobiety - średnia wieku 24 lata  $\pm$  4 lata (21-30 lat) oraz 4 mężczyzn - średnia wieku 25 lat  $\pm$  4 lata (23-32 lata)]. Pacjenci byli rekrutowani przez lekarza z Kliniki Immunologii, Reumatologii i Alergii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Podstawą kwalifikacji pacjentów był wywiad wykluczający schorzenia o podłożu alergicznym i innym zapalnym. Badania uzyskały zgodę Komisji Bioetyki nr RNN/379/12/KB.

### Pobieranie krwi i izolacja monocytów

Krew do badań pobrano z żyły w zgięciu łokciowym na heparynę przy użyciu systemu próżniowego S-Monovette firmy Sarstedt. Przed izolacją komórek oznaczono leukocytozę, wykonano rozmaz krwi i oceniono skład komórkowy przy pomocy barwienia metodą May-Grünwalda-Giemsa. Krew rozcieńczano 2-krotnie buforowanym roztworem soli fizjologicznej (PBS) bez jonów Ca<sup>2+</sup> i Mg<sup>2+</sup>. Komórki jednojądrowe (PBMC) izolowano metodą Boyuma [15] poprzez wirowanie 800 x g w gradiencie gęstości Histopaque 1077 g/cm<sup>3</sup> (Sigma-Aldrich). Żywotność wyizolowanych komórek sprawdzono za pomocą błękitu trypanu (Sigma-Aldrich). Uzyskane PBMC przepłukiwano 2-krotnie w roztworze PBS bez jonów Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, a następnie doprowadzono do gęstości 1,5x10<sup>6</sup>/mL w medium RPMI-1610 ogrzanym do temperatury 37°C wzbogaconym o antybiotyki streptomycynę (10mg/mL) i penicylinę (10<sup>3</sup> U/mL), L-glutaminę (200mM) oraz 10% FBS (*fetal bovine serum*) (Sigma-Aldrich). Monocyty izolowano metodą adherencyjną [16]; zawieszinę PBMC wylewano na plastikowe płytki Petriego i inkubowano 2 godziny w temperaturze 37°C. Następnie oddzielano komórki nieprzylegające poprzez 3-krotne płukanie płytek medium RPMI-1610 ogrzanym do temperatury 37°C. Komórki przylegające – monocyty uzyskiwano poprzez 3-krotne płukanie płytek oziębionym do temperatury 4°C PBS bez jonów Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> oraz zeskrobywanie komórek za pomocą gumowej łopatki. Czystość uzyskanej frakcji monocytów sprawdzano przy zastosowaniu przeciwciał monoklonalnych anti-CD14-FITC i anti-DC45-RPE (Dako). Analizy dokonano w cytometrze przepływowym DAKO Galaxy przy zastosowaniu programu komputerowego FloMax.

### Różnicowanie komórek dendrytycznych

Komórki dendrytyczne uzyskiwano z frakcji monocytarnej, zawieszanej w medium RPMI-1610 ogrzanym do temperatury 37°C wzbogaconym o antybiotyki streptomycynę (100µg/mL) i penicylinę (100 U/mL), L-glutaminę (2mM), 10% FBS (Sigma-Aldrich), IL-4 (100ng/mL) i GM-CSF (50ng/mL) (Peprotech), doprowadzając do gęstości 1x10<sup>6</sup>/mL. Następnie zawieszinę komórek w objętości 1 mL umieszczano w probówkach hodowlanych (Sarstedt) i inkubowano przez 7 dni w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO<sub>2</sub> i wilgotności 95%, co 3. dzień odświeżając medium poprzez dodanie połowy objętości medium wyjściowego. Po 7 dniach hodowli probówkę odwirowano; komórki CD123+

identyfikowano przy użyciu cytometru przepływowego oraz przeciwciał monoklonalnych anti-CD123-PE (eBioscience). Do pozostałych komórek dodano odpowiednio: toksynę tężcową *Clostridium tetani* (TT; 25ng/mL), LPS *Escherichia coli* (1µg/mL), rekombinowane białko fuzyjne (fragment 454-488) ludzkiego wirusa paragrypy typu 3 (fpHPV3; 10ng/mL) (Sigma Aldrich); próbę kontrolną (sp) stanowiły komórki zawieszane w medium. Próby inkubowano 24h, 48h i 72h, wirowano, nadszyc zabezpieczano w temp. -70 °C do dalszych oznaczeń, a komórki przepłukiwano 3-krotnie i oznaczano apoptozę.

### Ocena apoptozy DC CD123<sup>+</sup>

Apoptozę DC CD123<sup>+</sup> oznaczano metodą cytometrii przepływowej za pomocą zestawu *Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit* (eBiosource) oraz przeciwciał monoklonalnych anti-CD123-PE (eBiosource). Poszczególne stadia apoptozy oceniano na podstawie wiązania aneksyny V sprzężonej z fluoresceiną (FITC) do fosfatydyloseryny umiejscowionej na błonie komórek apoptotycznych. Zastosowanie jodku propidyny (PI) umożliwiało określenie komórek późno-apoptotycznych i nekrotycznych. Komórki we wczesnej apoptozie różnicowano jako [AxV+ PI-], w późnej apoptozie [AxV+ PI+], w całkowitej apoptozie [(AxV+/PI-)+(AxV+/PI+)], komórki nekrotyczne [AxV- PI+] oraz komórki żywe [AxV- PI-] (ryc. 1).

### Opracowanie wyników i analiza statystyczna

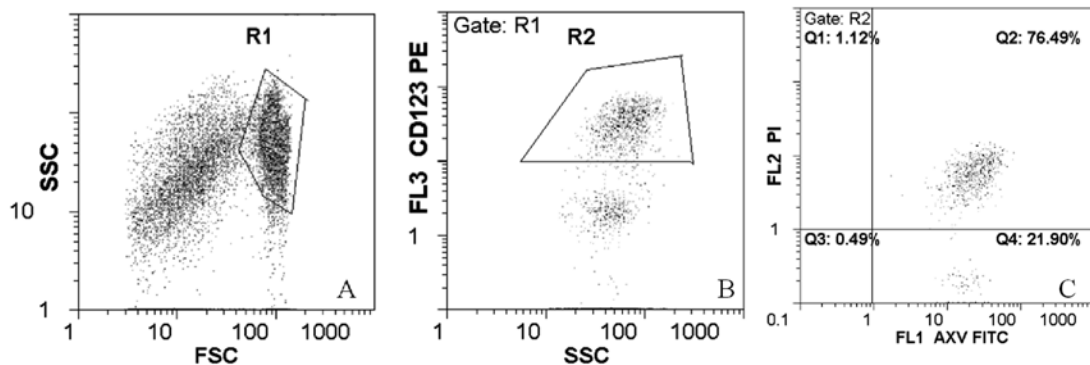
Wyniki przedstawiono jako średnią ± SE [%]. Do oceny normalności rozkładu prób badanych użyto testu Shapiro-Wilka (Statistica 10.0). Następnie za pomocą programu Statistica dla wyników z rozkładem normalnym przeprowadzono analizę statystyczną, wykorzystując do analizy test t-Studenta, natomiast przy wynikach wykazujących rozkład skośny, wykorzystując test Wilcozona. Za poziom ufności przyjęto p<0,05.

### WYNIKI

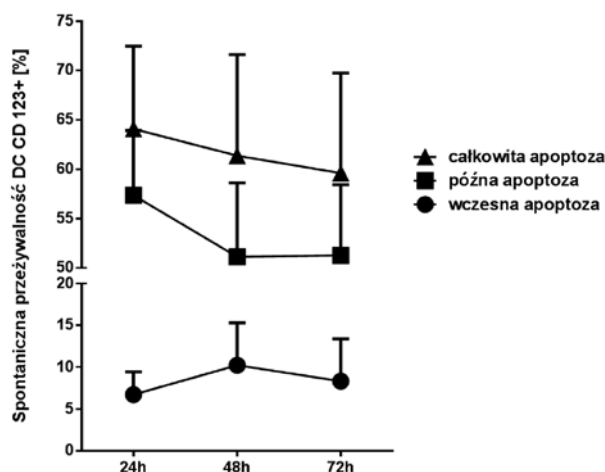
Czystość frakcji monocytów [CD45+ CD14+] po izolacji metodą aderenecyjną wynosiła 60,87±3,00% (55,00-64,89%). Pozostałą pulę stanowiły komórki [CD45+ CD14-]. Po 7 dniach hodowli komórek [CD45+ CD14+] odsetek komórek dendrytycznych DC [CD123+] wyniósł 32,34±3,15% (22,66-42,74%).

### Ocena apoptozy DC [CD123+] w hodowli niestymulowanej (sp) w zależności od czasu

Wykazano, że odsetek komórek DC [CD123+] w sp we wczesnym i późnym stadium apoptozy był podobny niezależnie od czasu trwania hodowli (ryc. 2).



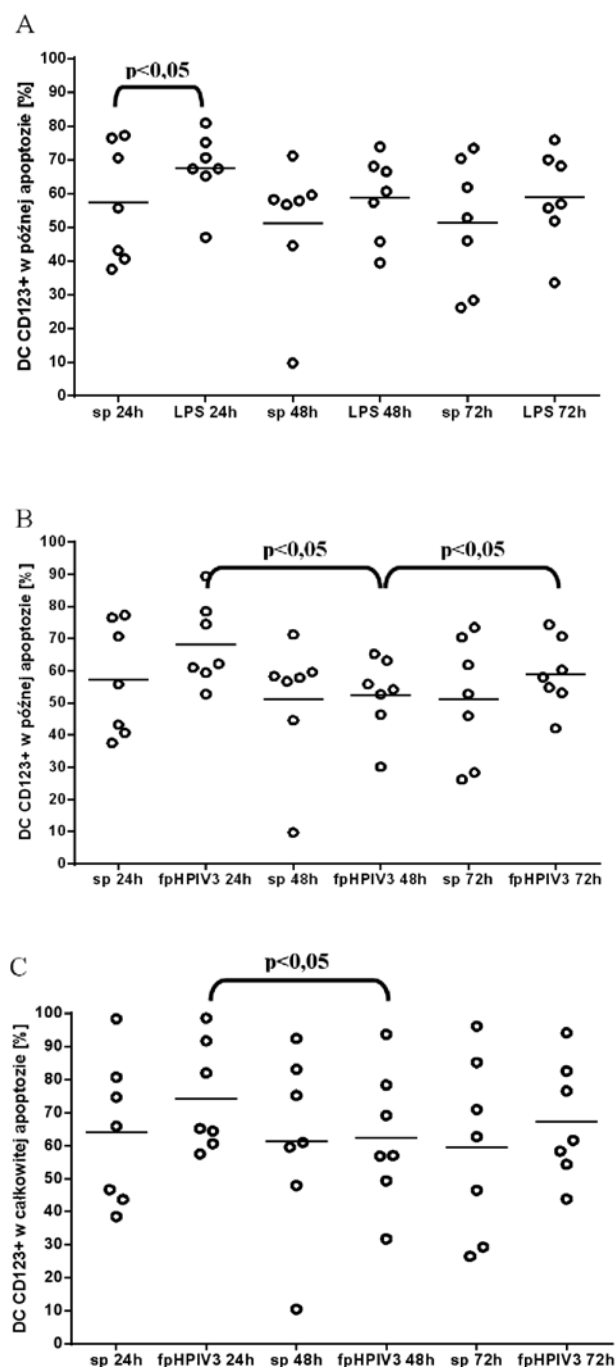
Ryc. 1. Analiza apoptozy DC metodą cytometrii przepływowej. Regionem R1 oznaczono populację analizowanych komórek DC (A), regionem R2 oznaczono populację DC [CD123+] (B). Ocenę apoptozy przeprowadzono z zastosowaniem aneksyny V (AxV) oraz jodku propidyny (PI) (C). Za komórki we wczesnej fazie apoptozy uznano [AxV+ PI-] (Q4), w późnej [AxV+PI+] (Q2) oraz w całkowitej apoptozie [(AxV+ PI-)+(AxV+ PI+)] (Q2 + Q4) (opracowanie oceny apoptozy DC [CD123] - Janina Ł. Grzegorzcyk)



Ryc. 2. Spontaniczna apoptoza (wczesna, późna i całkowita) DC [CD123+] w kolejnych godzinach doświadczenia (przedstawione wyniki stanowią średnią + SE, n=7)

## Ocena apoptozy DC [CD123+] w hodowli pod wpływem pochodnych czynników infekcyjnych

Procent komórek DC późno-apoptotycznych [CD123+ AxV+ PI+] istotnie wzrósł po 24h hodowli pod wpływem LPS [67,69±4,00% (47,03-80,94%)] w stosunku do sp [57,36±6,57% (37,53-77,27%)] ( $p<0,05$ ) (ryc. 3). Natomiast w hodowlach z TT i fpHPiV3 nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w porównaniu do sp. Nie zaobserwowano również istotnych statystycznie różnic we wczesnej apoptozie oraz w nekrozie.



Ryc. 3. Indywidualne wyniki pacjentów przedstawiające wpływ LPS na późną apoptozę DC [CD123] (A) Indywidualne wyniki pacjentów przedstawiające zależności między wpływem fpHPiV3 na późną (B) i całkowitą apoptozę (C) DC [CD123+] w kolejnych godzinach doświadczenia; (-) oznacza wartość średnią; n=7

Odsetek komórek DC późno-apoptotycznych [CD123+ AxV+ PI+] istotnie statystycznie spadł w 48h pod wpływem fpHPiV3 [52,51±4,44% (30,15-65,22%)] w stosunku do 24h [68,21±4,86% (52,74-89,31%)] i 72h [59,03±4,12% (42,06-74,33%)] (ryc. 4).

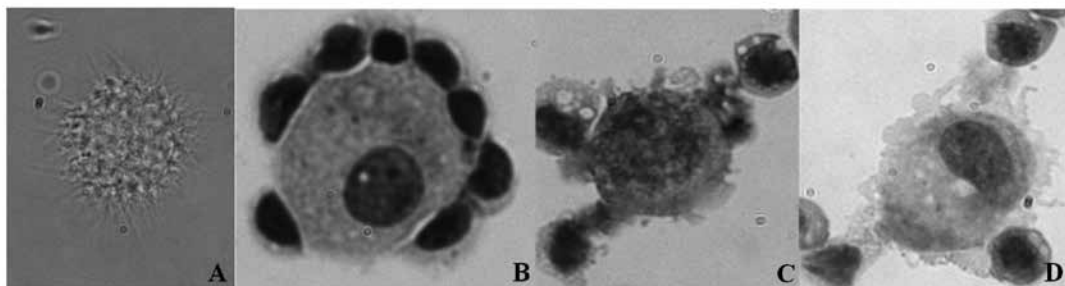
W odsetku komórek DC w całkowitej apoptozie [CD123+ (AxV+PI-)+(Axv+PI+)] w 48h [62,31±7,63% (31,77-93,68%)] odnotowano istotny statystycznie spadek pod wpływem fpHPiV3 w stosunku do 24h [74,28±6,17% (57,49-98,60%)] (ryc. 4).

## DYSKUSJA

Komórki dendrytyczne są głównymi komórkami rozpoznającymi i prezentującymi antygeny limfocytom T. Odpowiedź immunologiczna jest regulowana poprzez prezentację antygenów, jak również długość życia DC. Dlatego też w badaniu oceniano wpływ wybranych pochodnych czynników bakteryjnych i wirusowych na apoptozę DC [CD123+]. Populacja komórek dendrytycznych jest plastyczna i wykazuje ekspresję różnych markerów powierzchniowych w zależności od oddziaływujących na nie czynników. Wcześniejsze badania innych autorów wykazały, że 45-60% DC wyprowadzonych z monocytów pod wpływem IL-4 i GM-CSF w ciągu 7-dniowej hodowli cechuje obecność markera [CD123+] [6,7]. W naszych badaniach odsetek komórek [CD123+] wynosił 32,34%, co prawdopodobnie mogło mieć związek ze sposobem izolacji monocytów. W badaniach Shi i wsp. [6] oraz Wang i wsp. [7] monocyty izolowano za pomocą pozytywnej separacji magnetycznej wykorzystującej przeciwciała monoklonalne anti-CD14+. Natomiast w przeprowadzonych przez nas badaniach zastosowano metodę adherencyjną, w wyniku której do hodowli oprócz monocytów przedostała się pula limfocytów, która oddziałując z monocytami poprzez bezpośredni kontakt lub wydzielane cytokiny mogła wpłynąć na immunofenotyp powstających DC (ryc. 5).

W niniejszej pracy istotny wzrost odsetka DC późno-apoptotycznych [CD123+ AxV+ PI+] stwierdzono jedynie pod wpływem LPS. W badaniach Elkord i wsp. [17] porównano wpływ metod izolacji monocytów na powstawanie DC. Według badaczy monocyty izolowane metodą adherencji pod wpływem LPS wydzielają znaczne ilości cytokin m.in. TNF $\alpha$  (którego wydzielanie było 8 razy większe w porównaniu do komórek izolowanych za pomocą separacji magnetycznej), który pełni funkcję tzw. „liganda śmierci” i indukuje apoptozę poprzez szlak zewnętrzny. Prawdopodobnie apoptoza DC [CD123+] pod wpływem LPS mogła przebiegać właśnie tym szlakiem. Dodatkowo, LPS wiążąc się z cząsteczką CD14 dojrzałych DC aktywuje czynnik NAFT odpowiedzialny za zahamowanie ekspresji genów antyapoptotycznych Bcl-2, a także wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia Ca<sup>2+</sup>, co wiąże się z wejściem DC na szlak apoptozy [18].

Prawdopodobnie także kontakt limfocytów z monocytami znacznie wpłynął na przeżywalność DC. W 24h eksperymentu, niezależnie od działającego czynnika (LPS, TT, fpHPiV3) większość DC [CD123+] uległo apoptozie (w porównaniu do żywotności całej populacji komórek użytych w doświadczeniu). Można wobec tego przypuszczać, że na długość życia DC [CD123+] wpływa nie tylko kontakt z pochodnymi czynnikami infekcyjnych, ale również prezentacja antygenów limfocytom. W badaniach Matsue i wsp. [19] dotyczących wpływu limfocytów CD4+ na DC izolowane od myszy, zaobserwowano zwiększoną apoptozę (90%)



Ryc. 4. Dojrzała komórka dendrytyczna z widocznymi wypustkami po 48h hodowli z fpHPIV3 (A) – preparat przyżyciowy, pow. x 400. Komórki dendrytyczne kontaktujące się z limfocytami po 24h stymulacji LPS (B), TT (C) i fpHPIV3 (D) – preparat cytospinowy barwiony metodą May-Grunwalda-Giemsy, pow. x 1000 (zdjęcia własne)

tych komórek po 20h inkubacji z limfocytami T i swoistymi wobec nich antygenami. Samobójcza śmierć DC wywołana była głównie poprzez interakcję FasL-Fas, a także kontakt CD40-CD40L. Podczas pobudzenia cząsteczki CD40 dochodzi do zwiększonej syntezy tlenku azotu w komórce, który bezpośrednio aktywuje apoptozę [19]. Śmierć DC spowodowana prezentacją antygeny i kontaktem z limfocytami może mieć kluczowe znaczenie w regulacji odpowiedzi immunologicznej, poprzez ograniczenie nadmiernej aktywacji i ekspansji aktywowanych limfocytów T CD4+. Dodatkowo wykazano, że większa ekspresja cząsteczek MHC kl. II na powierzchni DC bezpośrednio koreluje z wejściem tych komórek na szlak apoptozy [20]. Można przypuszczać, że tym szlakiem następuje eliminacja dojrzałych DC w węzłach chłonnych, jednakże bezpośrednie mechanizmy tego procesu nie zostały dokładnie wyjaśnione.

Kolejnym badanym czynnikiem była TT. Analizując indywidualne wyniki zaobserwowano zwiększenie apoptozy DC [CD123+], chociaż wyniki nie były istotne statystycznie. Według Kichler-Lakomy i wsp. [21] przyczyną tego zjawiska jest fakt, że DC po kontakcie z TT szybko ulegają dojrzewaniu i prezentują antygeny limfocytom T, po czym są eliminowane przez proces apoptozy.

Ostatnim zastosowanym w badaniach czynnikiem było białko fpHPIV3, które odpowiada na połączenie cząsteczki wirusa z błoną komórkową gospodarza. W 48h eksperymentu zaobserwowano istotne statystycznie wyhamowanie późnej apoptozy komórek DC [CD123+ AxV+ PI+] w stosunku do 24h i 72h. Badania Plotnicky-Gilquin i wsp. [22] wykazały, że niedojrzałe komórki dendrytyczne są

wrażliwe na infekcje tym wirusem o czym świadczyła maszynowa replikacja wirusa wewnątrz komórek oraz indukcja apoptozy DC już po 16h od zakażenia wirusem. Natomiast w badaniach prowadzonych przez Le Nouën [23] zaobserwowano wyhamowanie apoptozy pod wpływem HPIV3, który tłumaczono wzrostem ekspresji białek anti-apoptycznych z rodziny Bcl-2.

Uzyskane przez nas wyniki wskazują, że apoptoza DC nie zależy jedynie od działającego czynnika, ale również od kontaktu z innymi komórkami. Można przypuszczać, że strategią działania wielu mikroorganizmów jest wywołanie szybkiej apoptozy DC, aby osłabić rozwój odpowiedzi immunologicznej i skolonizować organizm gospodarza. Równocześnie apoptoza aktywowana przez mikroorganizmy stanowi sposób obrony. Dzięki temu może dojść do wyhamowania replikacji/namnażania patogenów w DC i zatrzymania komórek zakażonych w obszarze infekcji, przeciwdziałając ich przedostaniu się do węzłów chłonnych oraz innych organów. Dodatkowo, unieruchomienie patogenów wewnątrz ciałek apoptotycznych zapobiega ich rozprzestrzenianiu się, a ich fagocytoza przez komórki żerne sprzyja efektywnej prezentacji antygenów, co umożliwia pobudzenie cytotoksycznych limfocytów T i eliminację intruza [26,27].

Należy rozważyć, czy sposób izolacji monocytów, z których pozyskiwane są DC, jak również stymulacja komórek wirionami i innymi toksynami bakteryjnymi może mieć wpływ na apoptozę DC i tym samym zachowanie homeostazy układu odpornościowego człowieka.

## Piśmiennictwo

- Breckpot K, Bonehill A, Aerts JL i wsp. Dendritic Cells: Subtypes, life cycle, activation, biological function and their exploitation in cancer immunotherapy. Nova Science Publisher 2010; 1-42.
- Żeromski J, Samara H, Mozer-Lisewska I. Komórki dendrytyczne: czy wszystko o nich wiemy? Postępy Biol Kom 2007; 34: 541-56.
- Kopeć-Szlęzak J. Biologia komórek dendrytycznych. Onkol Pol 2008; 11: 106-110.
- Collin M, McGovern N, Haniffa M. Human dendritic cell subsets. Immunology 2013; 140: 22-30.
- Hespele C, Moser M. Role of inflammatory dendritic cells in innate and adaptive immunity. Eur J Immunol 2012; 42: 2535-43.
- Shi J, Ikeda K, Maeda Y i wsp. Identification of CD123+ myeloid dendritic cells as an early-stage immature subset with strong tumorigenic potential. Cancer Lett 2008; 270: 19-29.
- Wang M, Shi J, Wan Y i wsp. A subset of myeloid dendritic cells derived from peripheral blood monocytes represented a predominant subset characterized by their potential tumor-inhibiting activity. Cell Dev Biol 2009; 45: 398-404.
- Hus I. Komórki dendrytyczne – rozwój i funkcja. Acta Haematol Pol 2000; 31: 361-9.
- Granucci F, Zanoni I. The dendritic cell life cycle. Cell Cycle 2009; 8: 3816-21.
- Kushwah R, Oliver JR, Zhang J i wsp. Apoptotic dendritic cells induce tolerance in mice through suppression of dendritic cell maturation and induction of antigen-specific regulatory T cells. J Immunol 2009; 183: 7104-18.
- Kushwah R, Wu J, Oliver JR i wsp. Uptake of apoptotic DC converts immature DC into tolerogenic DC that induce differentiation of Foxp3+ Treg. Eur J Immunol 2010; 40: 1022-35.

12. Kushwah R, Hu J. Dendritic cell apoptosis – regulation of tolerance versus immunity. *J Immunol* 2010; 185: 795-802.
13. Chen M, Huang L, Wang J. Deficiency of Bim in dendritic cells contributes to overactivation of lymphocytes and autoimmunity. *Blood* 2007; 109: 4360-7.
14. Servet-Delprat C, Vidalain PO, Azocar O i wsp. Consequences of Fas-mediated human dendritic cell apoptosis induced by measles virus. *J Virol* 2000; 74: 4387-93.
15. Boyüm A. Separation of lymphocytes, granulocytes and monocytes from human blood using iodinated density gradient media. *Met Enzymol* 1984; 108: 88-97.
16. Treves AJ, Yagoda D, Haimowitz A i wsp. The isolation and purification of human peripheral blood lymphocytes in cell suspension. *J Immunol Methods* 1980; 39: 71-81.
17. Elkord E, Williams PE, Kynaston H i wsp. Human monocyte isolation methods influence cytokine production from in vitro generated dendritic cells. *Immunology* 2005;114: 204-12.
18. Zanoni I, Ostuni R, Capuano G i wsp. CD14 regulates the dendritic cell life cycle after LPS exposure through NFAT activation. *Nature* 2009; 460: 264-8.
19. Matsue H, Edelbaum D, Hartmann AC i wsp. Dendritic cells undergo rapid apoptosis in vitro during antigen-specific interaction with CD4+ T cells. *J Immunol* 1999; 162: 5287-98.
20. Plotnicky-Gilquin H, Cyblat D, Aubry J i wsp. Differential effects of parainfluenza virus type 3 on human monocytes and dendritic cells. *Virology* 2001; 285: 82-90.
21. Le Nouën C, Munir S, Losq S i wsp. Infection and maturation of monocyte-derived human dendritic cells by human respiratory syncytial virus, human metapneumovirus, and human parainfluenza virus type 3. *Virology* 2009; 385: 169-82.
22. Kichler-Lakomy C, Budinsky AC, Wolfram R, Hellan M i wsp. Deficiencies in phenotype expression and function of dendritic cells from patients with early breast cancer. *Eur J Med Res* 2006 31; 11: 7-12.
23. Leverkus M, McLellan AD, Heldmann M i wsp. MHC class II-mediated apoptosis in dendritic cells: a role for membrane-associated and mitochondrial signaling pathways. *Int Immunol* 2003; 15: 993-1006.
24. Hasebe H, Sato K, Yanagie H i wsp. Bcl-2, Bcl-xL and c-FLIP(L) potentially regulate the susceptibility of human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells to cell death at different developmental stages. *Biomed Pharmacother* 2002; 56: 144-51.
25. Ludewig, B, Graf D, Gelderblom HR i wsp. Spontaneous apoptosis of dendritic cells is efficiently inhibited by TRAP (CD40-ligand) and TNF- $\alpha$ , but strongly enhanced by interleukin-10. *Eur J Immunol* 1995; 5: 1943-50.
26. Nogueira VC, Lindsten T, Jamieson AM i wsp. Rapid pathogen-induced apoptosis: a mechanism used by dendritic cells to limit intracellular replication of *Legionella pneumophila*. *PLoS Pathog* 2009; 5: 1-15.
27. Bosnjak L, Miranda-Saksena M, Koelle DM i wsp. Herpes simplex virus infection of human dendritic cells induces apoptosis and allows cross-presentation via uninfected dendritic cells. *J Immunol* 2005; 174: 2220-2.