

ВОРОНИНА
Елена Викторовна

**СОЗРЕВАНИЕ Т-ФОЛЛИКУЛЯРНЫХ ХЕЛПЕРОВ
В МОДЕЛЯХ IN VITRO И ПРИ HELICOBACTER
PYLORI-ИНФЕКЦИИ IN VIVO**

14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Нижний Новгород – 2019

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени академика И.Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Нижний Новгород.

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор

Талаев Владимир Юрьевич

Официальные оппоненты:

Пинегин Борис Владимирович – доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки России, заслуженный врач России, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, отдел иммунодиагностики и иммунокоррекции, заведующий отделом.

Захарова Людмила Алексеевна – доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН», лаборатория биохимии процессов онтогенеза, главный научный сотрудник.

Ведущая организация: «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук.

Защита состоится «__» _____ 2019 г. в __ часов на заседании диссертационного совета Д. 208.046.02 в Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10 и на сайте: <http://www.gabrich.ru>.

Автореферат разослан «__» _____ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат медицинских наук

Новикова Лидия Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы и степень её разработанности

Диссертационная работа направлена на изучение созревания фолликулярных Т-хелперов человека. Фолликулярные Т-хелперы (Тфх) – одна из субпопуляций CD4⁺ Т-лимфоцитов, основной функцией которой является стимуляция гуморального иммунного ответа. Под контролем Тфх происходит формирование герминативных центров внутри лимфоидного фолликула, созревают В-лимфоциты, способные к переключению изотипов иммуноглобулинов, долгоживущие плазмциты и В-клетки памяти [Fazilleau N. et al., 2009; Ma C.S. et al., 2012]. Фенотип зрелых Тфх, выделенных из лимфоидных органов человека, характеризуется присутствием на поверхности клеток следующих маркеров: CD4, CD45RO, CXCR5 и отсутствием CCR7. Хемокиновый рецептор CXCR5 необходим Тфх для миграции и удержания клеток в В-клеточной зоне вторичных лимфоидных органов [Топтыгина А.П., 2012; McHeyzer-Williams L. et al., 2009]. Также зрелые Тфх продуцируют IL-21 и IL-4 и отличаются высокой экспрессией молекул ICOS, PD-1, OX40 и CD40L [Nurieva R. I. et al., 2008; Crotty S., 2011]. Созреванием Тфх управляет ядерный репрессор транскрипции Bcl-6. Транскрипционный фактор Bcl-6 способствует экспрессии генов, придающих специфический фенотип Тфх [León V. et al., 2012; Hatzi K. et al., 2015].

Предполагается, что для дифференцировки в Тфх наивным CD4⁺ Т-лимфоцитам необходимо распознать клоноспецифический антиген на дендритных клетках в Т-клеточной зоне лимфатического узла, экспрессировать хемокиновый рецептор CXCR5 для миграции в В-клеточную зону, и там вступить в когнатные взаимодействия с В-лимфоцитами для завершения созревания [Fazilleau N. et al., 2009]. Мнение об участии дендритных клеток в такой двухстадийной схеме созревания основано на данных о частичном ослаблении созревания Тфх в мышах, лишенных CD11c⁺ дендритных клеток и способности дендритных клеток в отсутствие МНСII⁺ В-клеток стимулировать дифференцировку Тх с отдельными фенотипическими свойствами Тфх. В то же время, Тх, индуцированные избирательной стимуляцией с помощью дендритных клеток *in vivo*, лишены функциональных свойств Тфх [Goenka R. et al., 2011]. Роль В-лимфоцитов

подтверждается угнетением созревания Тфх при искусственном дефиците В-лимфоцитов или дефекте их взаимодействия с Т-клетками [Salek-Ardakani S. et al., 2011].

В определенных ситуациях В-лимфоциты, по-видимому, могут быть единственными антигенпрезентирующими клетками, индуцирующими дифференцировку Тфх. Такая возможность показана для дифференцировки Тфх из частично дифференцированных центральных Т-клеток памяти [Chevalier N. et al., 2011]. Однако возможность созревания Тфх из недифференцированных наивных Т-клеток под действием В-лимфоцитов без участия дендритных клеток не исследована.

Усиление созревания Тфх вносит вклад в патогенез аутоиммунных заболеваний с гиперпродукцией аутоантител, а ослабление их созревания может обуславливать слабость гуморального иммунного ответа. При некоторых заболеваниях патогенетическая роль Тфх может быть обусловлена атипичными функциями этой субпопуляции. Так, предполагается, что при инфекции, ассоциированной с *Helicobacter pylori*, Тфх могут не только стимулировать продукцию антител, но и усиливать созревание провоспалительных Т-хелперов 1 типа и Т-хелперов-17 [Ma C.S. et al., 2012; Leber A. et al., 2016].

В связи с этим, изучение ранних процессов дифференцировки Тфх из наивных Т-лимфоцитов является актуальной научной задачей. Понимание специфики созревания Т-фолликулярных хелперов необходимо для расширения представлений о клеточных взаимодействиях при индукции иммунного ответа на инфекцию, а также при развитии аутоиммунных патологий. Данная диссертационная работа посвящена изучению возможности созревания Тфх из наивных CD4⁺ Т-лимфоцитов при контакте с В-лимфоцитами. Для этого исследовалась потенциальная возможность наивных Т-лимфоцитов, а также дендритных клеток мигрировать в В-клеточные зоны лимфоидных органов для встречи с В-клетками, а затем изучалось созревание Тфх из наивных Тх в условиях *in vitro* при стимуляции В-лимфоцитами. Полученные данные сравнивались с результатом созревания Тфх под действием дендритных клеток.

Цель работы:

Изучить созревание Т-фолликулярных хелперов в моделях *in vitro* и при заболеваниях желудочно-кишечного тракта, ассоциированных с *H. pylori*-инфекцией.

Задачи исследования:

1. Разработать модели иммунных реакций *in vitro* для изучения процессов межклеточной кооперации при созревании Т-фолликулярных хелперов.
2. Оценить экспрессию хемокинового рецептора CXCR5, необходимого для миграции в В-клеточные зоны лимфоидных органов, а также молекул, ассоциированных с функцией Т-хелперов, на циркулирующих наивных CD4⁺ Т-лимфоцитах и на дендритных клетках.
3. Исследовать возможность и особенности созревания Т-фолликулярных хелперов при культивировании с В-лимфоцитами или дендритными клетками.
4. Оценить экспрессию транскрипционного фактора Bcl-6, управляющего созреванием Т-фолликулярных хелперов и В-лимфоцитов герминативных центров, в клетках смешанных культур.
5. Исследовать изменения содержания Т-фолликулярных хелперов при заболеваниях желудка и двенадцатиперстной кишки, ассоциированных с *H. pylori*-инфекцией.

Научная новизна

Впервые показано, что среди незрелых рециркулирующих CD45RO⁺ Т-хелперов обнаруживается группа клеток, несущая молекулы хоминга, ассоциированные с миграцией не только в Т-клеточную зону лимфоидных органов, но и в фолликулы и перифолликулярную зону. Охарактеризован активационный статус данной группы клеток.

Показано, что различные стимуляторы способны индуцировать экспрессию хемокинового рецептора CXCR5 на дендритных клетках, что может позволить данным клеткам мигрировать в область В-клеточных фолликулов.

Впервые показано, что наивные Т-хелперы, культивируемые в присутствии только дендритных клеток, не приобретают характерного фенотипа Т-фолликулярных хелперов. Стимулирующие сигналы от дендритных клеток способствуют созреванию Т-клеток с фенотипом эффекторов или эффекторных Т-

клеток памяти $CD4^+CD45RO^+CCR7^-CXCR5^-$, а также $CD4^+CD45RO^+CCR7^+CXCR5^+$ Т-хелперов с высоким уровнем экспрессии ICOS, PD-1, OX40. Одновременная экспрессия CCR7 и CXCR5 свидетельствует о возможности миграции $CCR7^+CXCR5^+$ клеток, как в Т-клеточную зону лимфоидных органов, так и в В-клеточные фолликулы.

Впервые установлено, что стимуляция наивных $CD4^+$ Т-лимфоцитов при помощи В-лимфоцитов приводит к созреванию Т-клеток с фенотипом Т-фолликулярных хелперов: они экспрессируют ядерный фактор транскрипции Bcl-6, несут молекулы CD45RO, CXCR5, ICOS, PD-1, OX40, CD40L и утрачивают экспрессию хемокинового рецептора CCR7. Впервые показано, что созревание Т-лимфобластов в смешанных культурах Т- и В-лимфоцитов замедляется в присутствии ингибитора Bcl-6.

Выявлено увеличение экспрессии ядерного фактора транскрипции Bcl-6 и снижение экспрессии мембранного IgM В-лимфоцитами смешанных культур с Т-хелперами, что служит свидетельством взаимной стимуляции созревающих Т-фолликулярных хелперов и В-клеток.

При язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, ассоциированных с *H. pylori*-инфекцией, впервые выявлено увеличение количества фолликулярных Т-хелперов и появление среди них минорной группы $CD4^+CD45RO^+CXCR5^+CCR6^+$ клеток, ассоциированных с миграцией в лимфоидные ткани желудочно-кишечного тракта.

Теоретическая и практическая значимость работы

Изучен процесс созревания Т-фолликулярных хелперов – важного этапа индуктивной фазы гуморального иммунного ответа. Установлено, что, по крайней мере, часть наивных Т-хелперов обладает возможностью прямой миграции в В-клеточные зоны лимфоидных органов, где эти клетки могут вступать в когнатные взаимодействия с В-лимфоцитами. В моделях *in vitro* показано, что процесс созревания Т-фолликулярных хелперов может быть индуцирован путем непосредственного взаимодействия Т-хелперов и В-лимфоцитов, без предварительного контакта с дендритными клетками. Эти данные существенно дополняют и расширяют представления о путях реализации гуморального иммунного ответа.

Были разработаны новые экспериментальные модели индуктивной фазы Т-зависимого гуморального иммунного ответа *in vitro*. Данные модели могут использоваться в современной клеточной иммунологии для изучения процессов межклеточной кооперации клеток иммунной системы в норме и при исследовании механизмов иммунного ответа при инфекционных и аутоиммунных заболеваниях. Использование разработанных моделей иммунных реакций позволит выявить ключевые молекулы, вовлеченные в индукцию гуморального иммунного ответа для создания принципиально новых способов терапии, направленной на стимуляцию недостаточного гуморального иммунного ответа на патогены или подавление аутоиммунных реакций, природа которых обусловлена усилением активности Т-фолликулярных хелперов и В-лимфоцитов.

Получены новые данные об изменении содержания патогенетически значимых субпопуляций Т-хелперов при язвенной болезни и гастродуодените, ассоциированном с *H. pylori*-инфекцией, что позволяет полнее представить роль иммунных процессов в патогенезе данной инфекции. Показано, что при язвенной болезни желудка в крови существенно увеличивается содержание активированных зрелых Т-хелперов, включая Т-фолликулярные хелперы и CCR6⁺ Т-хелперы, тогда как при гастродуодените происходит увеличение группы незрелых CXCR5⁺ Т-хелперов. Выявление двух разных типов изменений субпопуляционного состава Т-хелперов при язвенной болезни и гастродуодените дает возможность для совершенствования диагностики данных заболеваний желудочно-кишечного тракта, ассоциированных с *H. pylori*-инфекцией.

Результаты, полученные в ходе исследований, могут использоваться в рамках курсов иммунологии и микробиологии, читаемых для студентов биологических и медицинских специальностей.

Методология и методы исследования

Методология спланирована в соответствии со структурой диссертационного исследования и поставленными задачами.

Объектом исследования являлись клетки крови взрослых практически здоровых доноров, культивируемые в различных условиях стимуляции, а также клетки крови пациентов с заболеваниями желудочно-кишечного тракта, ассоциированными с *H. pylori*-инфекцией.

Выделение наивных Т-хелперов и В-лимфоцитов осуществлялось при помощи наборов для иммуномагнитной сепарации из мононуклеарных клеток периферической крови (МНПК) взрослых здоровых доноров. Для иммуномагнитной сепарации использовались наборы «EasySep® Human Naïve CD4⁺ T Cell Enrichment Kit» и «EasySep® Human B Cell Enrichment Kit» («Stemcell technologies», США). Чистота полученных популяций клеток оценивалась при помощи лазерной проточной цитометрии по экспрессии типичных молекул для данных популяций и отсутствию линейных маркеров других групп клеток.

Дендритные клетки (ДК) получали традиционным способом из моноцитов периферической крови. Для этого из МНПК выделяли моноциты с помощью адгезии и культивировали их 7 суток с интерлейкином-4 (IL-4) («R&D», США) и гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором (GM-CSF) в RPMI-1640 с 10 % эмбриональной телячьей сыворотки. Затем к клеткам добавляли исследуемые индукторы созревания (вакцины или микроорганизмы) и культивировали 2 суток. Контрольные зрелые ДК (ДК-ЦТК) получали двухсуточной стимуляцией смесью IL-1 β , IL-6, фактора некроза опухоли- α и простагландина E₂. В культуры контрольных незрелых ДК (нДК) стимуляторы не добавлялись. Затем с помощью лазерной проточной цитометрией оценивали экспрессию молекул HLA-DR, CD14, CD80, CD83, CD86 и хемокиновых рецепторов CCR7 и CXCR5. Использовано 150 вариантов культур ДК, полученных из моноцитов 32 образцов донорской крови. Была проведена лазерная проточная цитометрия 1186 образцов ДК.

Созревание Т-фолликулярных хелперов оценивали в условиях *in vitro*, для чего было поставлено 26 независимых экспериментов. 19 экспериментов с использованием смешанных культур нТх и В-лимфоцитов (57 вариантов культур, включая контрольные) и 7 экспериментов с использованием смешанных культур нТх и ДК (21 вариант культур). При иммунофлуоресцентном окрашивании было получено 410 образцов для 4-х-цветной лазерной проточной цитометрии (включая контрольные образцы и образцы контроля чистоты иммуномагнитной сепарации). Для постановки ОТ-ПЦР было использовано 4 варианта смешанных культур Т-лимфоцитов и ДК-ЦТК. В целом, было засеяно 228 вариантов культур клеток и проведено 1886 цитометрических исследований.

При создании смешанных культур использовали соотношение В-лимфоцитов и Т-лимфоцитов 5:1, воспроизводящее преобладание В-клеток в фолликулах и перифолликулярном пространстве, и соотношение ДК и Т-лимфоцитов 1:5, отражающее преобладание Т-клеток над антигенпрезентирующими клетками (АПК) в Т-клеточной зоне лимфоидных органов. Смешанные культуры выращивали в круглодонных 96-луночных планшетах в RPMI-1640 с 10 % эмбриональной телячьей сыворотки в течение 5 суток. Затем клетки собирали и оценивали процесс созревания Тх по изменению экспрессии молекул CD45RO, CCR7 и CXCR5 с помощью лазерной проточной цитометрии. Фенотип CD4⁺ Т-лимфобластов оценивали при помощи МКА к CD134 (OX40), CD279 (PD-1), CD278 (ICOS), CD154 (CD40L), CCR7 и CXCR5 («eBioscience», США). Фенотип В-лимфоцитов оценивали при помощи МКА к CD45, CXCR5 («eBioscience», США), CD19 («Beckman coulter», США), IgM («Сорбент», Россия).

Для оценки экспрессии ядерного фактора Bcl-6 после окрашивания поверхностных маркеров клетки фиксировали и их мембраны пермеабилizировали с помощью набора реагентов «Foxp3 Fixation/Permeabilization Kit» («eBioscience», США). После этого клетки окрашивали МКА к Bcl-6, конъюгированными с аллофикоцианином («eBioscience», США).

РНК экстрагировали из проб, нормализованных по количеству ядродержащих клеток, с помощью набора «NucleoSpinRNA XS» («Macherey-Nagel», Германия). Наборы «TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix Reagents kit» («Applied Biosystems», США) и «TaqMan gene expression assay reagents» («Applied Biosystems», США) использовались для оценки экспрессии генов *Bcl-6*, *TBX21*, *GATA3*, и *RORc*. Количество транскриптов оценивали в относительной количественной ОТ-ПЦР в реальном времени на приборе «Stratagene Mx3005P» («Agilent Technologies», США).

При обследовании взрослых больных с манифестными формами *H. pylori*-инфекции, больные с *H. pylori*-инфекцией разделялись на 2 группы в зависимости от клинических проявлений заболевания. Первую группу больных составляли пациенты с язвенной болезнью. Вторую группу представляли пациенты с диагнозом хронического гастрита и хронического дуоденита (гастродуоденит) без

признаков атрофии слизистой и без язвенной болезни. Группу сравнения составляли взрослые практически здоровые доноры. Для определения фенотипа Т-лимфоцитов клетки крови пациентов обеих групп и лиц группы сравнения окрашивались мечеными моноклональными антителами. Использовались МКА к молекулам CD4, CD45RO, CD45RA, CCR6 или CCR9, к CCR7, CXCR5, или ICOS. Анализ проводили на лазерном проточном цитофлуориметре «FacsCalibur» («BD Biosciences», США), последовательно гейтируя лимфоциты, CD4⁺ лимфоциты, CD45RO⁻ и CD45RO⁺ Т-клетки.

Результаты цитометрического анализа обрабатывали с помощью программного обеспечения CellQuest цитофлуориметра «FacsCalibur» («BD Biosciences», США), результаты ОТ-ПЦР – с помощью программного обеспечения прибора «Stratagene Mx3005P». Статистический анализ проводили с использованием t-теста Стьюдента для зависимых и независимых выборок. При исследовании фенотипа Т-хелперов у пациентов с язвенной болезнью статистический анализ проводили с использованием критерия Ньюмена-Кейлса (при множественном сравнении). Результаты считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Положения, выносимые на защиту

1. Наивные CD4⁺ Т-лимфоциты периферической крови человека содержат в своем составе малую группу клеток с хемокиновыми рецепторами, необходимыми для миграции как в Т-, так и в В-клеточные зоны вторичных лимфоидных органов, что создает условия для прямого контакта наивных Т-лимфоцитов и В-клеток.

2. В-лимфоциты при прямом контакте с наивными CD4⁺ Т-лимфоцитами способны индуцировать дифференцировку последних в клетки с фенотипом Т-фолликулярных хелперов и экспрессией ядерного фактора транскрипции Bcl-6. В то же время, при стимуляции CD4⁺ Т-лимфоцитов дендритными клетками происходит преимущественное созревание Т-клеток эффекторов и эффекторных Т-клеток памяти, с фенотипом, отличным от Тфх.

3. Полученные данные свидетельствуют о принципиальной возможности локализации всего процесса созревания наивных CD4⁺ Т-лимфоцитов в фолликулярные Т-хелперы в В-клеточной зоне периферических лимфоидных

органов, где роль основных антигенпрезентирующих клеток могут исполнять В-лимфоциты.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов определяет значительный объем исследований с применением высокотехнологичных современных иммунологических и молекулярно-биологических методов исследования. Апробация диссертационной работы была проведена на совместном заседании Ученого Совета ННИИЭМ имени академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора (протокол № 8.1 от 25 октября 2018 года). Результаты проведенных исследований были доложены на XXI Нижегородской сессии молодых ученых (Арзамасский р-н, Нижегородская обл., 2016); на Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 95-летию со дня рождения академика РАМН И.Н. Блохиной (Нижний Новгород, 2016), на заседаниях Ученого Совета ННИИЭМ имени академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора.

Личный вклад автора

Обзор литературы по теме исследования, выделение Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и дендритных клеток, создание смешанных культур Т-лимфоцитов и антигенпрезентирующих клеток, культивирование клеток, подготовка проб и проведение ПЦР, окрашивание поверхностных и внутриклеточных маркеров, статистическая обработка и анализ данных исследований, подготовка материалов для публикаций, а также написание и оформление работы были осуществлены автором лично.

Публикации по теме диссертации

Результаты диссертации опубликованы в 14 печатных работах, из них 6 статей в журналах, рекомендованных ВАК, 8 статей и тезисов в материалах всероссийских конференций.

Внедрение полученных результатов в практику

Результаты исследования внедрены в экспериментальную работу лаборатории иммунохимии ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 168 стр., содержит 31 рисунок и 6 таблиц. Диссертация состоит из следующих разделов: список сокращений, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение, выводы и список литературы, который включает в себя 4 отечественных и 346 зарубежных источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Поскольку основной целью работы было изучение созревания Тфх при непосредственном взаимодействии наивных Т-лимфоцитов с В-клетками, на первом этапе работы оценивалась возможность миграции наивных Т-хелперов в В-клеточные зоны лимфоидных органов, где может осуществляться прямой контакт между клетками данных групп. Исследование проводилось с помощью определения экспрессии на нТх хемокинового рецептора CXCR5, который обеспечивает локализацию клеток в фолликулах и межфолликулярном пространстве – зоне продукции его лиганда хемокина CXCL13. Было показано, что небольшая группа $CD3^+CD4^+CD45RA^+CD45RO^-CCR7^+$ Т-клеток обладает значительной экспрессией рецептора CXCR5 (рис. 1ж). Кроме того, все наивные $CD4^+$ Т-лимфоциты и, особенно, $CXCR5^+$ клетки, обладали выраженной экспрессией хемокинового рецептора CXCR4 (рис. 1д), лиганд которого CXCL12 продуцируется во многих органах и тканях, включая зону смешанного расположения Т- и В-лимфоцитов в лимфоидных органах. По нашему мнению, экспрессия CXCR4 на нТх может помогать этим клеткам не только при миграции в паракортес, но и в межфолликулярное пространство и мантийную зону фолликулов лимфатических узлов.

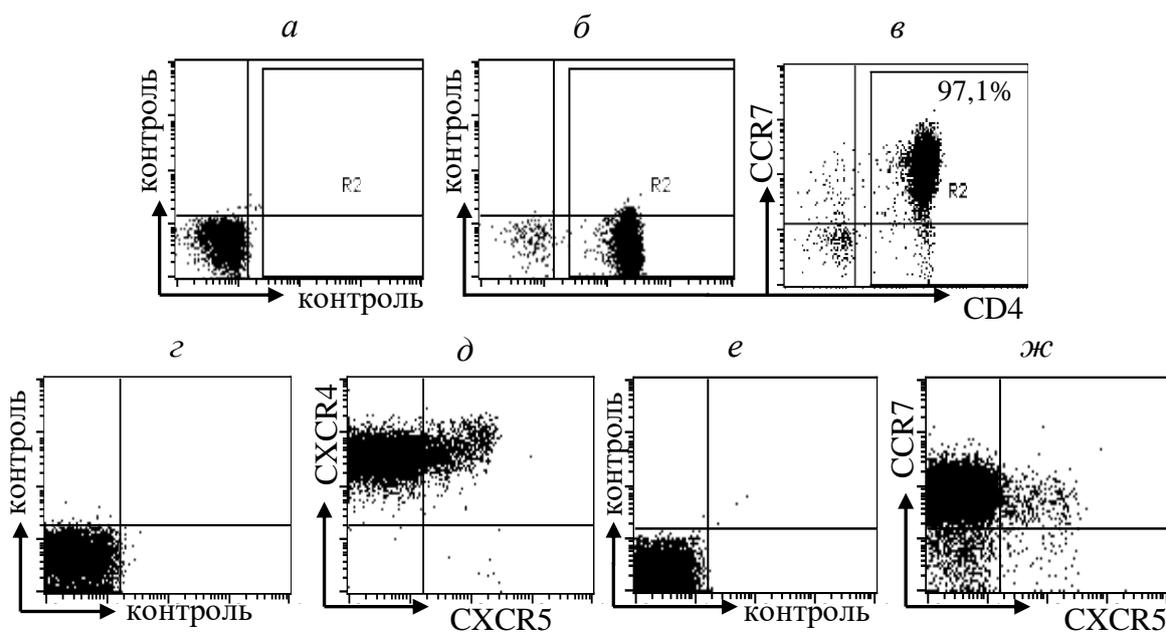


Рисунок 1. Экспрессия хемокиновых рецепторов на нТх. *а* – изотипический контроль; *б* – клетки, окрашенные МКА к CD4, выделены в гейт R2; *в* – экспрессия CCR7 на гейтированных CD4⁺ наивных Т-клетках. Распределение CXCR4 и CXCR5 (*д*), а также CCR7 и CXCR5 (*ж*) на гейтированных CD4⁺ наивных Т-клетках. *з* и *е* – изотипические контроли для *д* и *ж*, соответственно.

Т-лимфоциты, обладающие одновременной экспрессией CCR7 и CXCR5, характеризовались фенотипом, свойственным наивным Т-хелперам, за исключением относительно повышенной экспрессии молекулы PD-1, которая, впрочем, значительно уступала мощной экспрессии PD-1, свойственной зрелым Т-хелперам (табл. 1). В исследуемой группе клеток также не обнаруживалось экспрессии ядерного фактора транскрипции, свойственного Тфх – белка Bcl-6.

Таким образом, показано, что малая группа наивных Т-хелперов обладает выраженной экспрессией хемокинового рецептора CXCR5, которая может позволить этим клеткам мигрировать в В-клеточную зону и вступить в прямое взаимодействие с В-лимфоцитами.

Таблица 1. Среднее количество клеток, несущих соответствующие маркеры в группах Тх (%).

Исследуемые молекулы	Группы CD4 ⁺ Т-лимфоцитов			
	типичные наивные CD45RO ⁻ CCR7 ⁺ CXCR5 ⁻ Тх	наивные CD45RO ⁻ CCR7 ⁺ CXCR5 ⁺ Тх	CD45RO ⁻ CCR7 ⁻ CXCR5 ⁻ Тх	Зрелые CD45RO ⁺ Т-клетки
CD40L	2,23±1,14	3,82±1,4	5,8±1 *	18,03±6,59 *
ICOS	27,94±13,31	30,71±6,61	47,12±5,01 *	65,88±7,65 *
PD-1	9,11±4,8	17,34±2,67 *	30,81±5,64 *	65,39±6,28 *
OX40	0,89±0,42	1,25±0,33	3,91±1,06 *	14,08±5,09 *

* - достоверные отличия от типичных наивных CD45RO⁻CCR7⁺CXCR5⁻ Тх (p<0,05 в парном t-тесте).

Кроме того, оценивалась возможность миграции в В-клеточные зоны лимфоидных органов ДК, созревших под действием различных стимуляторов. В качестве стимуляторов использовали вакцину гепатита В (ВГВ), адъювант гидроксид алюминия (ГА) и следующие микроорганизмы: *Escherichia coli* штамм M17, *Bacillus cereus* штамм IP5832, *Saccharomyces boulardii* и *Candida albicans*. Было показано, что ВГВ, ГА и все использованные микроорганизмы стимулируют экспрессию CCR7 на ДК. При этом наибольшей активностью обладают грибы *C. albicans*, которые индуцировали полумаксимальную экспрессию CCR7 в меньшей концентрации по сравнению с другими микроорганизмами. ВГВ, ГА и *C. albicans* индуцируют экспрессию на ДК рецептора CXCR5, тогда как другие использованные микроорганизмы такой активностью не обладают (рис. 2). Таким образом, было показано, что ДК, наряду с нТх, могут мигрировать в фолликулы и перифолликулярное пространство лимфоидных органов, где может происходить контакт ДК, нТх и В-лимфоцитов.

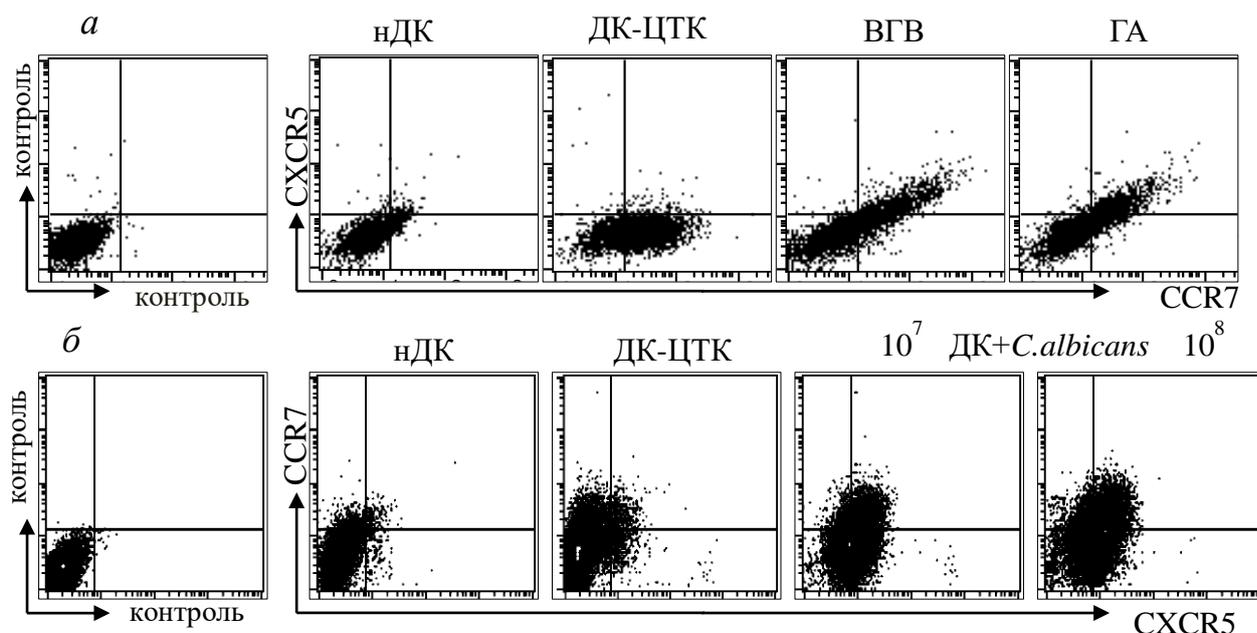


Рисунок 2. Экспрессия хемокиновых рецепторов CXCR5 и CCR7 на нДК, ДК-ЦТК, ДК, стимулированных ВГВ и ГА (а) и двумя концентрациями грибов *S. albicans* (10^7 и 10^8) (б).

Для исследования процесса дифференцировки Т-фолликулярных хелперов создавались смешанные культуры клеток иммунной системы человека в условиях *in vitro*. В смешанных культурах naive Т-хелперы получали активационный сигнал от аллогенных антигенпрезентирующих клеток (АПК), что к пятым суткам культивирования приводило к олигоклональной активации Т-лимфоцитов и превращению части клеток в лимфобласты. При стимуляции В-лимфоцитами $22,68 \pm 3,02\%$ naive $CD4^+$ Т-лимфоцитов трансформировалось в лимфобласты. Стимуляция нТх аллогенными нДК способствовала превращению $32,64 \pm 8,06\%$ $CD4^+$ Т-клеток в лимфобласты, а культивирование нТх совместно с ДК-ЦТК приводило к бласттрансформации $54,4 \pm 17,1\%$ $CD4^+$ Т-клеток (рис.3).

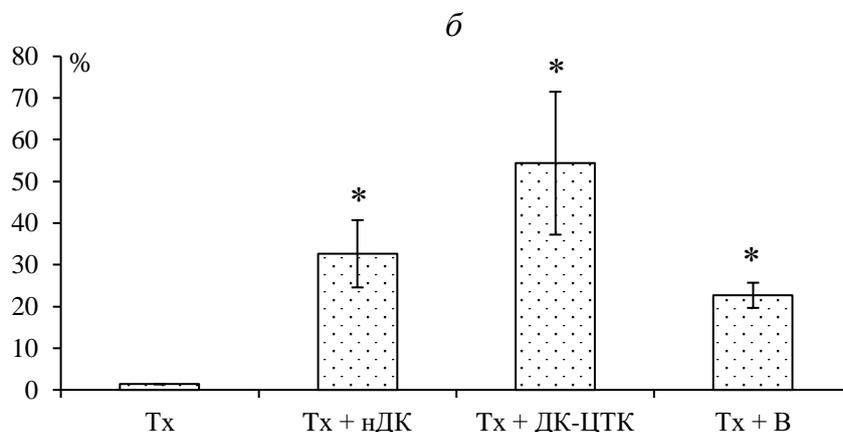
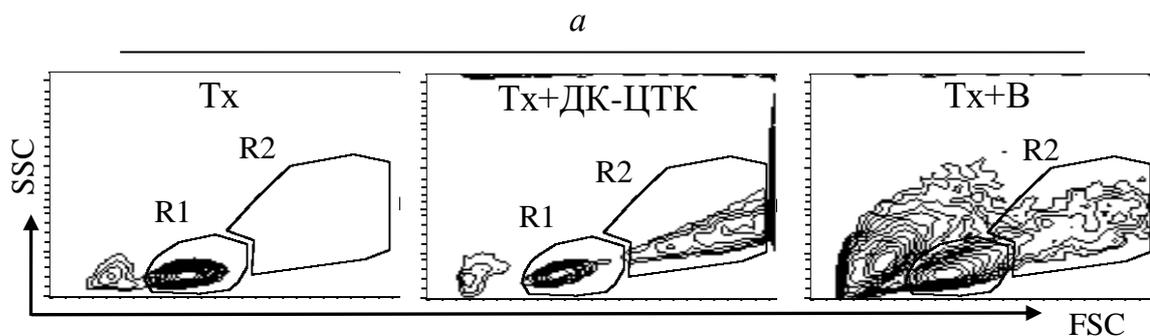


Рисунок 3. Стимуляция наивных $CD4^+$ Т-лимфоцитов аллогенными АПК приводит к появлению в культуре лимфобластов (гейт R2). Лимфоциты выделены в гейт R1 (*a*). На гистограмме (*б*) представлена доля лимфобластов среди $CD4^+$ клеток разных культур. Варианты культур подписаны под графиками: Tx – контрольные культуры наивных $CD4^+$ Т-лимфоцитов без АПК; Tx + В – смешанные культуры наивных $CD4^+$ Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов; Tx + нДК или ДК-ЦТК – смешанные культуры наивных $CD4^+$ Т-лимфоцитов с нДК или ДК-ЦТК, соответственно. * – достоверные отличия от контрольных наивных $CD4^+$ Т-клеток без АПК ($p < 0,05$).

Оценка экспрессии маркера зрелых Т-клеток молекулы CD45RO показала, что $CD4^+$ Т-клетки контрольных культур (без АПК) к 5 суткам культивирования оставались незрелыми. Т-хелперы смешанных культур с антигенпрезентирующими клетками, регистрируемые в гейте лимфоцитов, также слабо экспрессировали CD45RO (рис. 4), и практически все созревшие $CD45RO^+$ клетки были сосредоточены в гейте лимфобластов. В результате большая часть Т-лимфобластов, стимулированных незрелыми ДК ($63,51 \pm 8,11\%$), экспрессировала маркер зрелости CD45RO. Т-лимфобласты смешанных культур со зрелыми ДК обладали чрезвычайно высокой экспрессией CD45RO: $95,13 \pm 1,51\%$ клеток характеризовались экспрессией данной молекулы (рис. 4 *a*). Т-лимфобласты смешанных культур с В-лимфоцитами также достаточно высоко экспрессировали CD45RO – она присутствовала на $62,82 \pm 3,61\%$ Т-лимфобластов (рис 4 *б*). В дальнейшей работе фенотип клеток анализировался отдельно для лимфоцитов и

лимфобластов. При этом подразумевалось, что Т-лимфобласты представляют собой клетки, получившие эффективную стимуляцию к созреванию от аллогенных АПК, тогда как в группу лимфоцитов входят незрелые клетки, которые не смогли обнаружить свой клоноспецифический антиген на АПК.

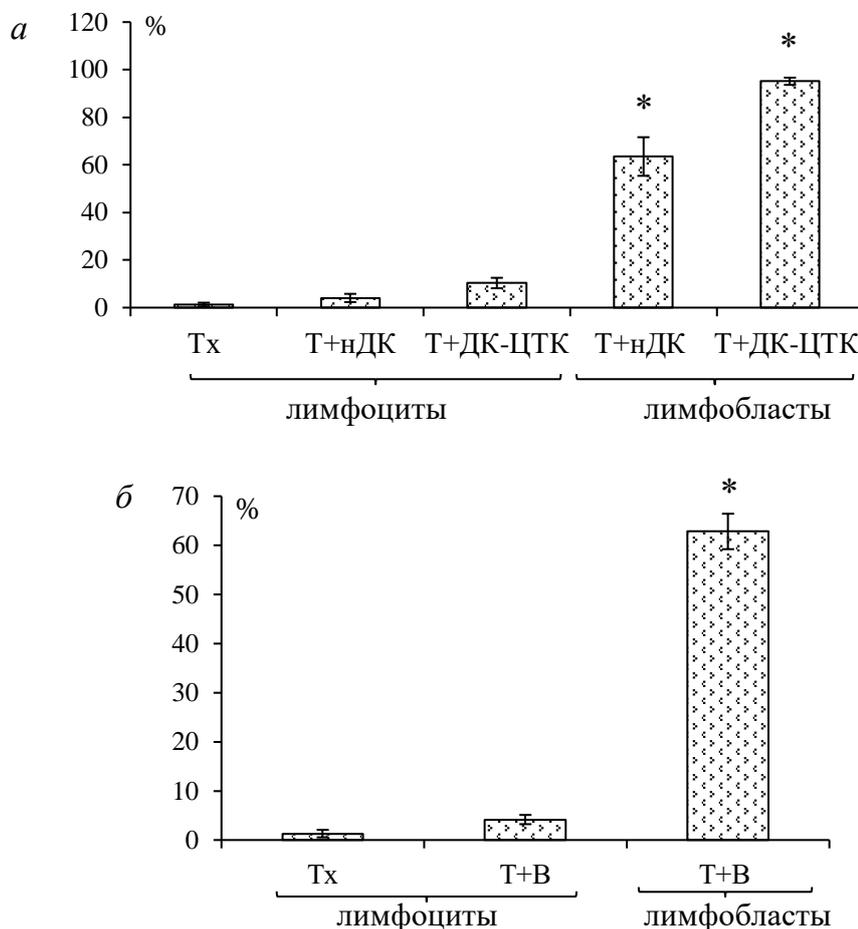


Рисунок 4. Созревающие CD45RO⁺ Т-клетки в культурах, стимулированных нДК и ДК-ЦТК (гистограмма *а*) или В-лимфоцитами (*б*) были локализованы в гейте лимфобластов (R2 – рис.10 *а*). Экспрессия CD45RO определялась на клетках, выделенных в гейты лимфоцитов или лимфобластов, а затем - в гейт CD4⁺ клеток. Достоверные отличия от контрольных наивных CD4⁺ Т-клеток без АПК ($p < 0,05$) обозначены как - *.

В ходе созревания Т-клеток в смешанных культурах происходили значительные изменения распределения экспрессии хемокиновых рецепторов CCR7 и CXCR5 на Т-лимфобластах смешанных культур, в то время как в гейте лимфоцитов данные изменения фактически не регистрировались. Было показано, что Т-лимфоциты контрольных культур характеризовались типичным для наивных Т-клеток набором хемокиновых рецепторов: CCR7⁺CXCR5⁻, и лишь малое количество клеток обладало фенотипом CCR7⁺CXCR5⁺ и CCR7⁻CXCR5⁻ (рис. 5*а*).

Большинство Т-лимфоцитов, не прошедших трансформацию в бласты в культурах с нДК, обладали фенотипом наивных Т-клеток $CCR7^+CXCR5^-$, тогда как большинство Т-лимфобластов приобретало фенотип $CCR7^-CXCR5^-$. По своему фенотипу эти клетки соответствуют Т-клеткам-эффекторам и эффекторным Т-клеткам памяти, которые утратили способность к миграции в лимфоидную ткань. Кроме того, среди Т-лимфобластов возрастало содержание клеток с фенотипом $CCR7^-CXCR5^+$, достигая $20,54 \pm 3,25\%$.

Наиболее значимой популяцией Т-лимфобластов, созревающих в культурах со зрелыми ДК (ДК-ЦТК), являлись клетки с фенотипом $CCR7^-CXCR5^-$: более чем на 60% клеток данной группы отсутствовали исследуемые хемокиновые рецепторы (рис. 5б). Вероятно, эти клетки являются аналогами Т-клеток-эффекторов и эффекторных Т-клеток памяти, способных в условиях *in vivo* выйти в рециркуляцию для поиска очага инфекции. Более 15% Т-лимфобластов экспрессировали хемокиновый рецептор CCR7, без экспрессии CXCR5. Данные клетки, вероятно, являлись аналогами центральных Т-клеток памяти, способных к рециркуляции с выходом в Т-клеточные зоны лимфатических узлов.

Самая большая группа Т-лимфобластов ($37,25 \pm 4,4\%$), созревших в культурах с В-лимфоцитами, характеризовалась фенотипом Т-фолликулярных хелперов: на них присутствовал хемокиновый рецептор CXCR5, способный направить созревающие клетки в В-клеточную зону лимфатического узла, и отсутствовал рецептор CCR7, свойственный наивным Т-хелперам (рис. 5в). На $26,28 \pm 3,92\%$ Т-лимфобластов смешанных культур с В-клетками отсутствовали исследуемые молекулы, более $23,90 \pm 4,76\%$ Т-лимфобластов экспрессировали только CCR7. Возможно, группы с различным набором хемокиновых рецепторов среди Т-лимфобластов смешанных культур с В-лимфоцитами отражают этапы созревания Т-фолликулярных хелперов в культуре.

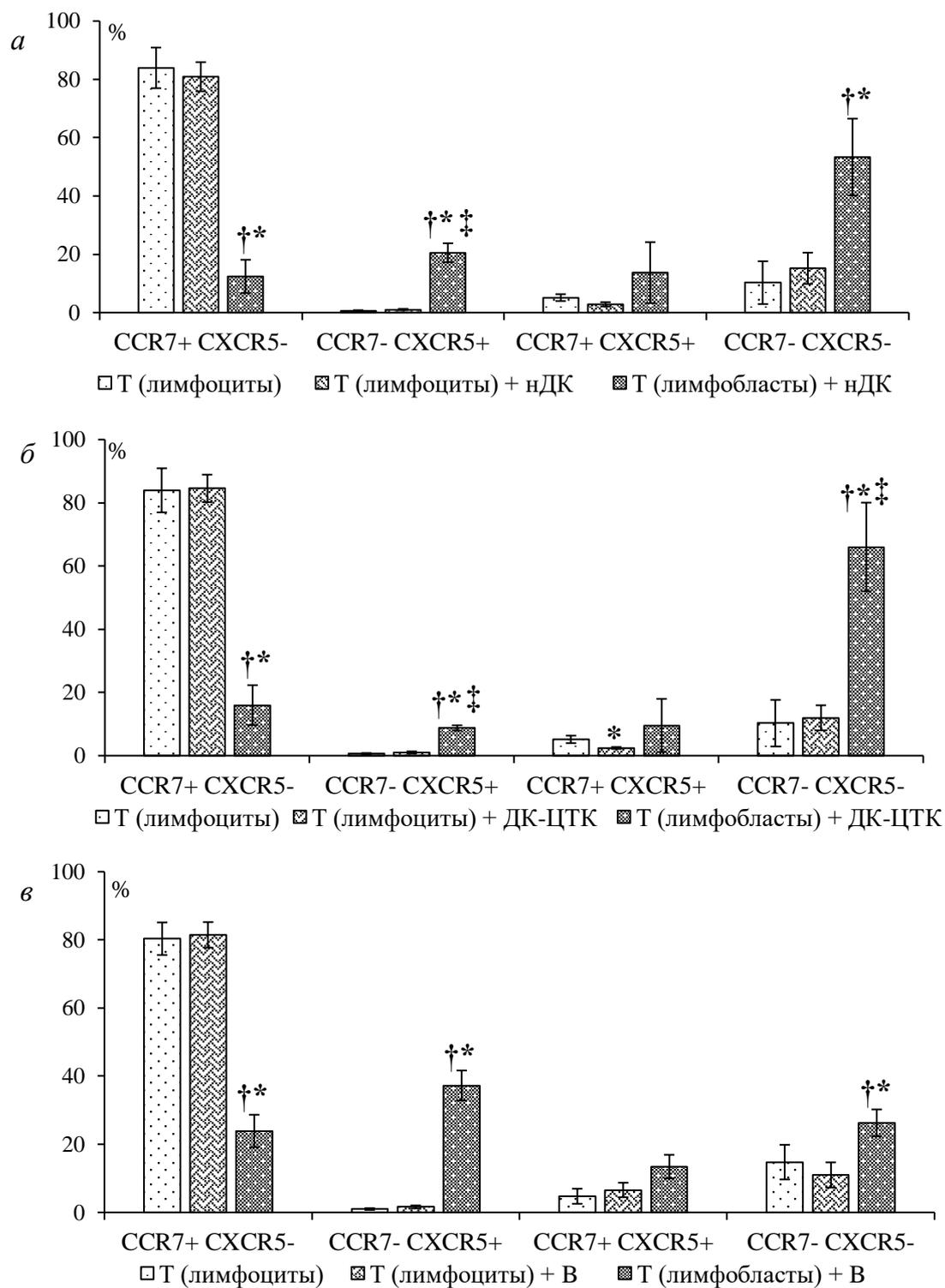


Рисунок 5. Содержание групп $CD4^+$ Т-клеток, различающихся по экспрессии хемокиновых рецепторов CCR7 и CXCR5 среди лимфоцитов и лимфобластов смешанных культур, стимулированных незрелыми ДК (а), зрелыми ДК (б), В-лимфоцитами (в). Фенотип групп клеток обозначен под гистограммами, принадлежность к лимфоцитам или лимфобластам – в легенде. Достоверные различия между контролем и опытом обозначены как - *, различия между лимфоцитами и лимфобластами обозначены - †, отличия от аналогичной группы в культуре с В-клетками - ‡ ($p < 0,05$).

Для дополнительной фенотипической характеристики оценивалась экспрессия функционально значимых молекул для зрелых Т-хелперов – ICOS, CD40L, PD-1 и OX40 на группах созревающих Т-лимфобластов смешанных культур с разным набором хемокиновых рецепторов. Как видно на рис. 6, в смешанных культурах с В-лимфоцитами происходило созревание CCR7⁻CXCR5⁺, CCR7⁺CXCR5⁻ и CCR7⁻CXCR5⁻ групп Т-лимфобластов. В смешанных культурах с ДК четко определялись группы созревающих клеток с фенотипом CCR7⁺CXCR5⁺, CCR7⁺CXCR5⁻ и CCR7⁻CXCR5⁻. При анализе мы использовали отдельное гейтирование этих групп клеток (рис. 6).

Было выявлено, что группа Т-лимфобластов смешанных культур с В-лимфоцитами, имеющая фенотип CCR7⁻CXCR5⁺, обладала наибольшими уровнями экспрессии молекул, характерных для зрелых активированных Т-хелперов. Таким образом, данные клетки по своему фенотипу (CD4⁺CD45RO⁺CCR7⁻CXCR5⁺ICOS^{hi}PD-1^{hi}CD40L⁺OX40⁺) полностью соответствовали зрелым Т-фолликулярным хелперам (рис.6 а, б).

В смешанных культурах CD4⁺ Т-хелперов с нДК и ДК-ЦТК практически не происходило созревания Т-лимфобластов с набором хемокиновых рецепторов, характерных для Тфх (CCR7⁻CXCR5⁺). Однако формировалась группа клеток с фенотипом CCR7⁺CXCR5⁺ и достаточно высокой интенсивностью экспрессии ICOS, PD-1 и OX40 (рис.6 в, г, д, е). По нашему мнению, экспрессия CXCR5 на данных Т-лимфобластах при определенных условиях может позволить им мигрировать в В-клеточную зону лимфатического узла, где они вступят в контакт с В-клетками и пройдут процесс дифференцировки в Тфх. По-видимому, эти клетки являются аналогами субпопуляций пре-Тфх или циркулирующих Тфх, описанных в литературе.

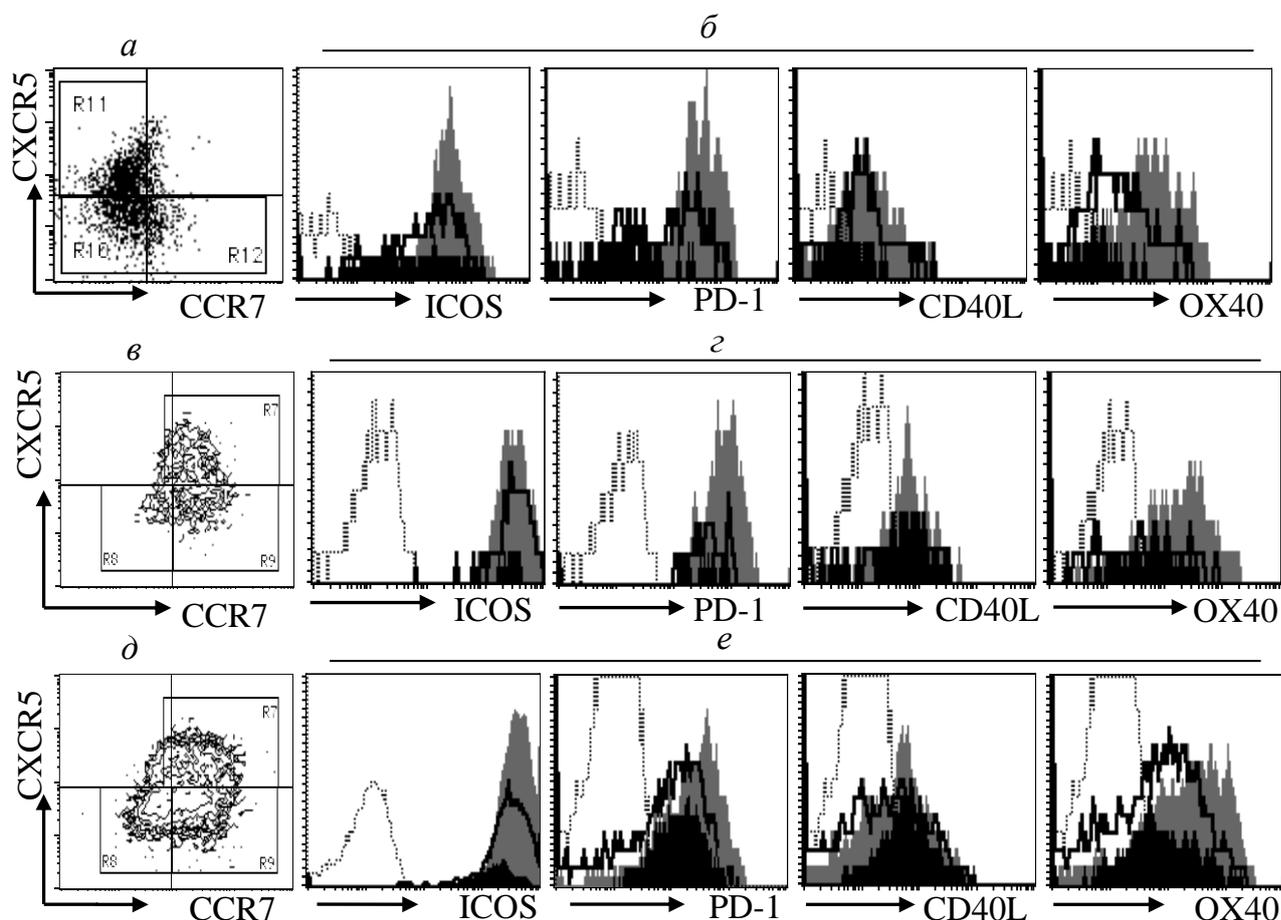


Рисунок 6. Характеристика $CD4^+$ лимфобластов из смешанных культур Т-клеток и В-лимфоцитов (*а*, *б*), и нДК (*в*, *з*), и ДК-ЦТК (*д*, *е*). *а* – пример гейтирования $CCR7^+CXCR5^-$ клеток (гейт R10), $CCR7^+CXCR5^+$ клеток (R11) и $CCR7^+CXCR5^-$ клеток (R12) смешанных культур с В-лимфоцитами. На рис. *б* представлена интенсивность экспрессии молекул ICOS, PD-1, CD40L и OX40 на $CCR7^+CXCR5^+$ Т-лимфобластах (гистограммы с серым полем), $CCR7^+CXCR5^-$ лимфобластах (толстая черная линия) и $CCR7^+CXCR5^-$ (гистограммы с черным полем) Т-лимфобластах смешанных культур с В-лимфоцитами. Пунктир – контроль окрашивания. Примеры гейтирования $CCR7^+CXCR5^+$ клеток (гейт R7), $CCR7^+CXCR5^-$ клеток (R8) и $CCR7^+CXCR5^-$ клеток (R9) смешанных культур с нДК и ДК-ЦТК представлены на рис. *в*, *д* соответственно. Интенсивность экспрессии молекул ICOS, PD-1, CD40L и OX40 на группах $CD4^+$ лимфобластов из культур Т-клеток с нДК (*з*) и с ДК-ЦТК (*е*) на $CCR7^+CXCR5^+$ клетках (гистограммы с серым полем), $CCR7^+CXCR5^-$ клетках (толстая черная линия) и $CCR7^+CXCR5^-$ клетках (гистограммы с черным полем). Пунктир – контроль окрашивания.

Также в $CD4^+CXCR5^+$ Т-клетках, созревающих в смешанных культурах с АПК, исследовалось наличие экспрессии ядерного фактора транскрипции Bcl-6, служащего мастер-регулятором созревания Т-фолликулярных хелперов. Так, анализ полученных данных показал, что наиболее активно созревание $CD4^+$ Т-клеток с фенотипом $CXCR5^+Bcl-6^+$ происходит в смешанных культурах Т- и В-

лимфоцитов и регистрируется в гейте лимфобластов ($8,97 \pm 1,85\%$). Значительно меньший процент $CD4^+CXCR5^+V\alpha 1-6^+$ Т-лимфобластов созревает в культурах с незрелыми дендритными клетками ($2,68 \pm 1,01\%$). В культурах со зрелыми ДК фактически отсутствовали Т-лимфобласты с фенотипом $CD4^+CXCR5^+V\alpha 1-6^+$, свойственным Тфх (рис. 7).

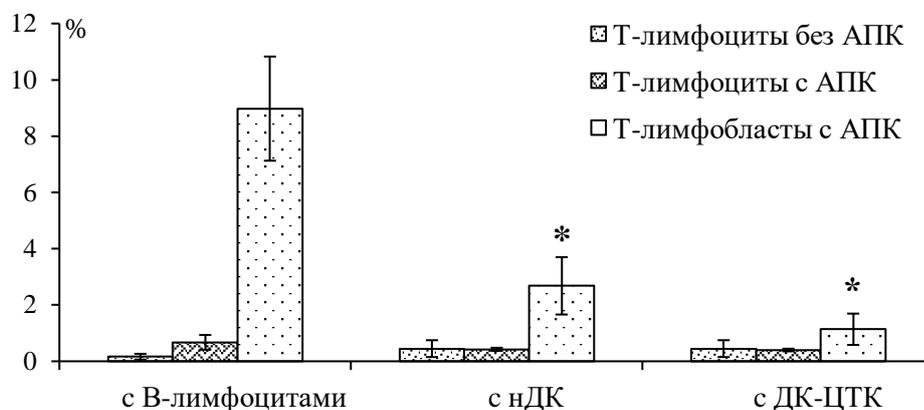


Рисунок 7. Сравнение содержания $V\alpha 1-6^+CXCR5^+$ Т-клеток в культурах с В-лимфоцитами, нДК и ДК-ЦТК. Типы Т-лимфоцитов обозначены в правом верхнем углу, под графиками – названия АПК. Достоверные отличия от соответствующего показателя смешанной культуры с В-клетками обозначены - * (при $p < 0,05$).

Для оценки роли ядерного фактора транскрипции $V\alpha 1-6$ в процессе созревания Т-хелперов в смешанных культурах нТх с В-лимфоцитами использовали внесение в культуры ингибитора $V\alpha 1-6$ – 79-6 («Merck Millipore», «Calbiochem», США). Показано, что ингибитор ослабляет процесс формирования пула Т-лимфобластов в смешанных культурах (рис. 8).

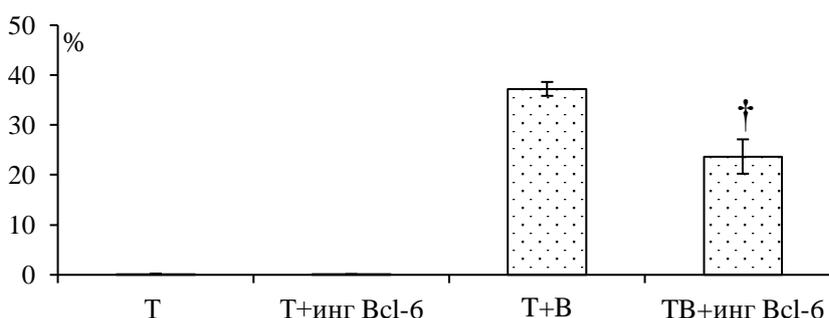


Рисунок 8. Влияние ингибитора $V\alpha 1-6$ (+инг $V\alpha 1-6$) на долю Т-лимфобластов (%) в контрольных культурах Т-клеток (Т) и смешанных культурах Т-клеток и В-лимфоцитов (Т+В). Результат репрезентативного эксперимента. Достоверные отличия соответствующих типов культур с добавлением и без добавления ингибитора обозначены как † ($p < 0,05$).

Таким образом, показано, что В-клетки при совместном культивировании с наивными Т-хелперами индуцируют созревание клеток с типичным фенотипом

зрелых Тфх. В связи с этим возникает вопрос, могут ли созревающие Тфх влиять на свойства В-лимфоцитов, выполняя свои хелперные функции. Исследование свойств В-лимфоцитов в смешанных культурах показало, что экспрессия Vcl-6 возрастает не только в Т-лимфобластах, но и в CXCR5⁺ В-лимфоцитах (рис. 9).

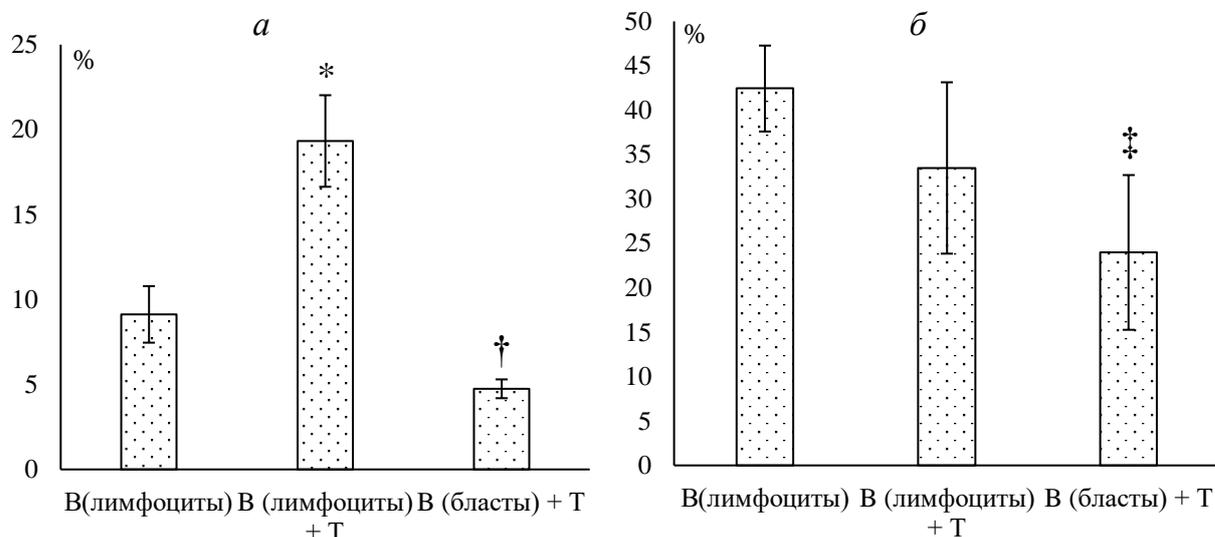


Рисунок 9. Изменение свойств В-лимфоцитов при взаимодействии с Т-хелперами. *а* – средние значения содержания Vcl-6⁺CXCR5⁺ клеток среди В-лимфоцитов в контрольных культурах нестимулированных В-клеток и в смешанных культурах Т- и В-клеток (N=6). Достоверные отличия контрольных В-лимфоцитов от В-лимфоцитов смешанных культур с Т-лимфоцитами обозначены – * (p=0,005), отличия В-лимфоцитов от В-лимфобластов смешанных культур с Т-лимфоцитами обозначены как – † (p=0,01); *б* - средние значения содержания IgM⁺CXCR5⁺ В-лимфоцитов и В-лимфобластов контрольных (В) и смешанных (В+Т) культур. ‡ — достоверные отличия от смешанных культур В-лимфоцитов и Т-клеток (p=0,04).

Кроме того, было показано, что в смешанных культурах Т- и В-лимфобластов происходило уменьшение доли В-клеток, имеющих фенотип IgM⁺CXCR5⁺, т.е. клеток с непереключенным изотипом мембранного иммуноглобулинового рецептора. Контрольные культуры одиночных В-лимфоцитов характеризовались высоким процентом клеток, экспрессирующих IgM и CXCR5 (42,43±4,83%). В смешанных культурах В-клеток с Т-лимфоцитами снижалось количество IgM⁺CXCR5⁺ В-лимфоцитов до уровня 33,49±9,64%. В смешанных культурах В-лимфобластов и Т-лимфоцитов снижение количества IgM⁺CXCR5⁺ В-лимфобластов было наибольшим, и доля IgM⁺CXCR5⁺ составляла 23,98±8,71% (рис.9, б). Таким образом, было показано, что В-лимфоциты, культивируемые с CD4⁺ Т-лимфоцитами, постепенно снижают экспрессию IgM,

что свидетельствует о запуске процесса переключения изотипов иммуноглобулинов. Данные наблюдения позволяют сделать вывод о том, что сокультивирование В-лимфоцитов с CD4⁺ Т-лимфоцитами способствует созреванию В-лимфоцитов и формированию фенотипа CXCR5⁺ фолликулярных В-клеток, способных к переключению изотипов иммуноглобулинов.

Для исследования процесса созревания Тфх *in vivo* оценивали фенотип Т-лимфоцитов при различных клинических формах *H. pylori*-инфекции. В качестве группы сравнения была обследована группа здоровых доноров. Анализ экспрессии хемокиновых рецепторов показал рост содержания зрелых Т-хелперов, несущих рецептор CCR6 при язвенной болезни, ассоциированной с *H. pylori* (рис. 10). Рост экспрессии CCR6 способствует миграции лимфоцитов в воспаленную слизистую и может отражать активизацию программы созревания Тх17.

Также у пациентов с язвенной болезнью наблюдается достоверное увеличение содержания CD4⁺CD45RO⁺CXCR5⁺ клеток (рис. 10 а). Увеличение экспрессии CXCR5 при язвенной болезни происходит за счёт наиболее зрелой группы клеток с фенотипом Тфх – CD4⁺CD45RO⁺CXCR5⁺CCR7⁻. Кроме того, при язвенной болезни в крови появляется малая группа клеток, одновременно экспрессирующих рецепторы CXCR5 и CCR6. Можно предположить, что эти Т-клетки способны мигрировать в В-клеточные зоны лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистой кишечника. Учитывая потенциальную возможность провоспалительного действия Тфх при язвенной болезни, миграция Тфх в пораженный желудочно-кишечный тракт может вносить свой вклад в развитие деструктивных воспалительных процессов при данной патологии.

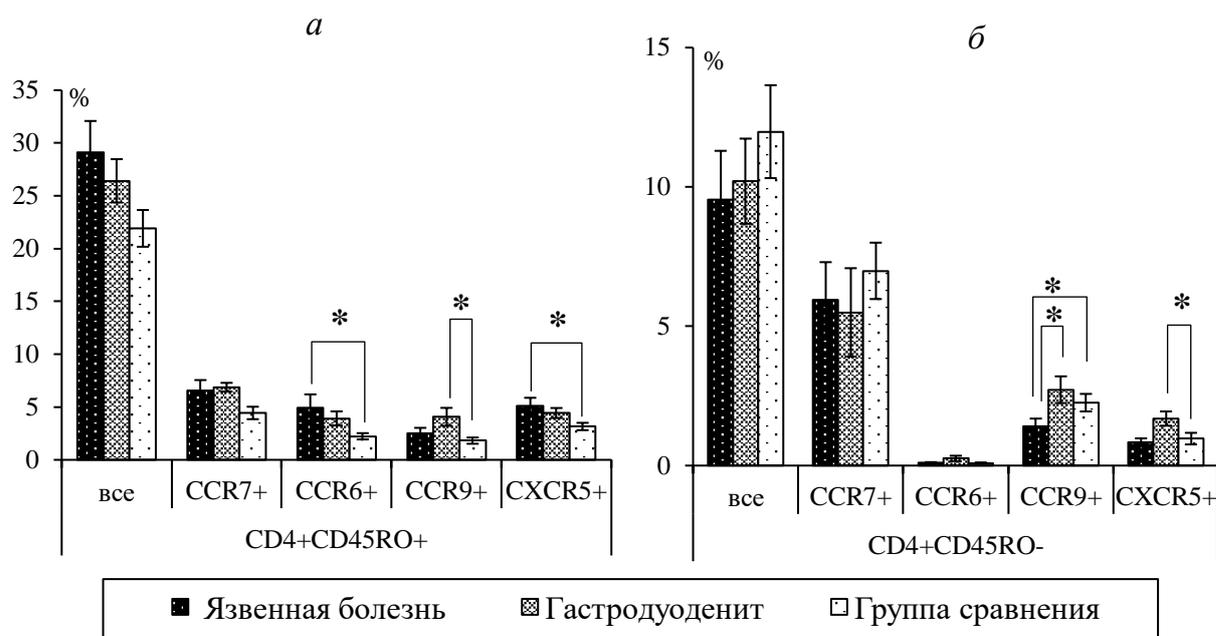


Рисунок 10. Содержание зрелых $CD4^+CD45RO^+$ Т-клеток (а) и незрелых $CD4^+CD45RO^-$ Т-клеток (б), экспрессирующих хемокиновые рецепторы CCR7, CCR6, CCR9 и CXCR5 в крови больных с язвенной болезнью, с хроническим гастродуоденитом и у лиц группы сравнения (% от всех лимфоцитов крови). * – достоверные отличия при $p < 0,05$ по критерию Ньюмена-Кейлса.

При гастродуодените достоверный рост содержания $CXCR5^+$ клеток наблюдается в незрелой субпопуляции $CD45RO^-$ Т-хелперов (рис. 10 б). Функциональный статус $CD4^+CD45RO^-CXCR5^+$ лимфоцитов при гастродуодените неизвестен, но в норме клетки с таким фенотипом, как это было описано выше, практически не отличаются от типичных наивных $CD4^+$ Т-лимфоцитов. По нашему предположению, эти клетки имеют возможность к миграции из кровотока в В-клеточные зоны и перифолликулярное пространство лимфоидных органов, где они могут дифференцироваться в Тфх в ходе прямых взаимодействий с В-лимфоцитами.

Таким образом, фенотипические изменения Т-лимфоцитов периферической крови при гастродуодените могут свидетельствовать лишь об увеличении потенциальной возможности созревания Тфх, тогда как при язвенной болезни мы наблюдаем результат реализации этой возможности – рост количества зрелых Тфх в кровеносном русле.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании результатов проведенных исследований была сформулирована гипотеза, согласно которой может происходить созревание Тфх в условиях *in vivo*. Было показано, что кровь человека содержит малую субпопуляцию наивных Т-лимфоцитов, одновременно экспрессирующих набор хемокиновых рецепторов, который может позволить мигрировать наивным Т-лимфоцитам как в Т-клеточные, так и в В-клеточные зоны лимфоидных органов. Таким образом, часть нТх может мигрировать в В-клеточную зону и вступить в контакт с В-лимфоцитами без взаимодействия с ДК. Для исследования созревания Т-фолликулярных хелперов в условиях *in vitro* создавались смешанные культуры Т-лимфоцитов и АПК. Было показано, что дифференцировка Т-фолликулярных хелперов может происходить под действием В-клеток без участия ДК. При этом В-лимфоциты, контактирующие с созревающими Тфх, приобретали фенотипические черты фолликулярных В-лимфоцитов, что является свидетельством взаимной стимуляции Т- и В-лимфоцитов и функциональной активности созревающих Тфх. Таким образом, весь процесс созревания Тфх, по крайней мере, для части клеток, может быть локализован в В-клеточной зоне вторичных лимфоидных органов, где основными антигенпрезентирующими клетками будут выступать В-лимфоциты.

Активация Т-лимфоцитов при участии ДК приводит к формированию групп клеток с фенотипом $CCR7^-CXCR5^-$, $CCR7^+CXCR5^-$ и $CCR7^+CXCR5^+$. Вероятно, $CCR7^+CXCR5^+$ клетки являются аналогами пре-Тфх или циркулирующих Тфх, которые для окончательного созревания в Тфх нуждаются в контакте с В-лимфоцитами. По нашему мнению, созревание данных клеток в смешанных культурах с ДК соответствует описанной в литературе двухэтапной модели созревания Тфх. Таким образом, предложенная гипотетическая модель созревания Т-фолликулярных хелперов при непосредственном прямом взаимодействии с В-лимфоцитами не отменяет собой, но дополняет основную гипотезу созревания Тфх, которая предполагает наличие предварительного контакта ДК и нТх. Возможно, что в условиях *in vivo* созревание Тфх осуществляется несколькими способами и обе схемы созревания отражают возможности дифференцировки Тфх в организме.

При исследовании пациентов с язвенной болезнью, вызванной *H. pylori*-инфекцией, мы обнаружили рост количества недавно активированных зрелых Т-

хелперов в крови, а также увеличение содержания группы клеток с фенотипом зрелых Т-фолликулярных хелперов. Часть CXCR5⁺ Тфх при язвенной болезни экспрессировала хемокиновый рецептор CCR6, отвечающий за миграцию в воспаленную слизистую кишечника и ассоциированные с ней лимфоидные органы. Мы предполагаем, что эти клетки способны направленно мигрировать в В-клеточные зоны лимфоидных тканей кишечника, что повышает эффективность их участия в развитии воспаления при язвенной болезни. Важно отметить, что при гастродуодените, который характеризуется меньшими деструктивно-воспалительными изменениями слизистой, мы не наблюдали достоверного увеличения содержания зрелых Т-фолликулярных хелперов. Таким образом, выраженные деструктивно-воспалительные изменения слизистой желудка и двенадцатиперстной кишки при *H. pylori*-инфекции ассоциированы с интенсификацией вовлечения Т-хелперов в иммунный ответ и усилением созревания Тфх.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны модели совместного культивирования антигенпрезентирующих клеток и Т-лимфоцитов в условиях *in vitro*.
2. Наивные CD4⁺ Т-лимфоциты периферической крови человека содержат малую группу клеток, экспрессирующих хемокиновые рецепторы CCR7, CXCR4 и CXCR5, обеспечивающие миграцию как в Т-, так и в В-клеточные зоны вторичных лимфоидных органов.
3. Наивные CD4⁺ Т-лимфоциты *in vitro* под действием В-лимфоцитов дифференцируются преимущественно в клетки с фенотипом Т-фолликулярных хелперов и повышенной экспрессией Vcl-6.
4. Под действием дендритных клеток наивные CD4⁺ Т-лимфоциты созревают преимущественно в Т-хелперы с фенотипом CD45RO⁺CCR7⁻CXCR5⁻.
5. В-лимфоциты, созревающие в смешанных культурах с Т-лимфоцитами, повышают экспрессию Vcl-6 и снижают экспрессию IgM, что свидетельствует о взаимной стимуляции Т- и В-лимфоцитов.
6. При язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, ассоциированных с *H. pylori*-инфекцией, выявлено увеличение содержания

активированных зрелых Т-хелперов, а также зрелых Т-фолликулярных хелперов и зрелых CCR6⁺ Т-хелперов.

7. При гастродуодените, ассоциированном с *H. pylori*-инфекцией, происходит увеличение группы незрелых CXCR5⁺ Т-хелперов.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Талаев, В. Ю. Характеристика малой субпопуляции наивных CD4⁺ Т-лимфоцитов, несущих хемокиновый рецептор CXCR5 / В. Ю. Талаев, М. В. Плеханова, О. Н. Бабайкина, Е. В. Воронина // Иммунология. – 2015. – Т.36. – № 1. – С. 9-13.
2. Талаев, В. Ю. Созревание Т-фолликулярных хелперов *in vitro* / В.Ю. Талаев, М.В. Плеханова, Е.В. Воронина, О.Н. Бабайкина // Иммунология. – 2015. – Т.36. – № 6. – С. 336-343.
3. Талаева, М.В. Два варианта экспрессии хемокиновых рецепторов на дендритных клетках под действием вакцин / М.В. Талаева, Е.В. Воронина // Материалы VII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии и гигиены» (8-10 декабря 2015 г., Санкт-Петербург). – СПб. – 2015. – С. 195-197.
4. Талаев, В.Ю. Миграция дендритных клеток человека *in vitro*, индуцированная вакцинами, стимулирующими гуморальный и клеточный иммунитет / В.Ю. Талаев, М.В. Талаева, Е.В. Воронина, О.Н. Бабайкина // Современные технологии в медицине. – 2016. – Т. 8. – № 3. – С. 91-99.
5. Воронина, Е.В. Экспрессия Vα1-6 в Т-хелперах, созревающих с В-лимфоцитами / Е.В. Воронина, М.В. Талаева, В.Ю. Талаев, О.Н. Бабайкина, И.Е. Заиченко // Современные технологии в эпидемиологическом надзоре за актуальными инфекциями. Материалы Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 95-летию со дня рождения академика РАМН И.Н. Блохиной (25 мая 2016г., г. Нижний Новгород). – Н.Новгород. – 2016. – С. 243-248.

6. Талаев, В. Ю. Регуляция апоптоза в процессе созревания дендритных клеток – приглашение на казнь / В.Ю. Талаев, И.Е. Заиченко, А.В. Матвейчев, М.В. Талаева, Е.В. Воронина // Иммунология. – 2016. – Т. 37. – № 5. – С. 281-291.
7. Воронина, Е.В. Репрессор транскрипции Vcl-6 в Т-хелперах, созревающих с В-лимфоцитами / Е.В. Воронина // Сборник докладов. XXI Нижегородская сессия молодых ученых. Естественные, математические науки: материалы докладов. – Княгинино: НГИЭУ. – 2016. – С. 61-64.
8. Воронина, Е. В. Экспрессия ядерного фактора Vcl-6 в смешанных культурах Т- и В-лимфоцитов / Е.В. Воронина, М.В. Талаева, В.Ю. Талаев, О.Н. Бабайкина, И.Е. Заиченко // Материалы VIII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии и гигиены» (1-3 ноября 2016 г., Москва). М.: ФБУН НИИ Дезинфектологии Роспотребнадзора, 2016. – С. 57-59.
9. Талаев, В. Ю. Два варианта экспрессии хемокиновых рецепторов на классических дендритных клетках крови человека, стимулированных вакцинами *in vitro* / В.Ю. Талаев, М.В. Талаева, О.Н. Бабайкина, Е.В. Воронина, И.Е. Заиченко // Иммунология. – 2017 – Т. 38. – № 3 – С. 155-159.
10. Талаев, В.Ю. Два варианта экспрессии хемокиновых рецепторов на классических дендритных клетках крови человека, стимулированных вакцинами *in vitro* / В.Ю. Талаев, М.В. Талаева, О.Н. Бабайкина, Е.В. Воронина, И.Е. Заиченко // Материалы XI Съезда Общероссийской общественной организации «Всероссийское научно-практическое общество эпидемиологов, микробиологов и паразитологов» (ВНПОЭМП) «Обеспечение эпидемиологического благополучия: вызовы и решения» (16-17 ноября 2017 г., г. Москва). – СПб. – 2017. – С. 144-145.
11. Воронина, Е.В. Экспрессия хемокиновых рецепторов на классических дендритных клетках крови человека, стимулированных вакцинами *in vitro* / Е.В. Воронина, М.В. Талаева, В.Ю. Талаев, О.Н. Бабайкина, И.Е. Заиченко // IX Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых и

специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (5-7 декабря 2017 г., г. Иркутск). – Иркутск. – 2017. – С. 35-38.

12. Воронина, Е.В. Созревание Т-фолликулярных хелперов в условиях *in vitro* / Е. В. Воронина, М.В. Талаева, В.Ю. Талаев, И.Е. Заиченко, О.Н. Бабайкина // X Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (24-26 октября 2018 г., г. Москва). – М. – 2018. – С. 140-144.
13. Талаева, М.В. Экспрессия хемокиновых рецепторов на Т-хелперах крови при заболеваниях, ассоциированных с *Helicobacter pylori* / М.В. Талаева, В.Ю. Талаев, Е.В. Воронина, И.Е. Заиченко, Н.В. Неумоина, К.М. Перфилова, О.Н. Бабайкина // X Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (24-26 октября 2018 г., г. Москва). – М. – 2018. – С. 275-279.
14. Воронина, Е.В. Созревание фолликулярных Т-хелперов / Е.В. Воронина, В.Ю. Талаев // *Иммунология*. – 2018. – Т. 39. – № 4. – С. 230-238.

Исследование созревания Т-фолликулярных хелперов в условиях *in vitro* было поддержано грантом РФФИ № 13-04-00264, исследование созревания Т-хелперов при заболеваниях, ассоциированных с *Helicobacter pylori*, было выполнено в рамках НИР «Исследование хоминга Т-лимфоцитов крови при инфекционных и аутоиммунных заболеваниях желудочно-кишечного тракта» № государственной регистрации АААА-А16-116111610216-9.

Список сокращений

АПК – антигенпрезентирующие клетки

ВГВ – вакцина гепатита В

ГА – гидроксид алюминия

ДК – дендритные клетки

ДК-ЦТК – зрелые дендритные клетки, стимулированные смесью провоспалительных цитокинов и простагландином E₂

МКА – моноклональные антитела

МНПК – мононуклеарные клетки периферической крови

нДК – незрелые дендритные клетки

нТх – наивные Т-хелперы

ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

Тфх – Т-фолликулярные хелперы

Тх – Т-хелперы
Bcl-6 – белок 6 В-клеточной лимфомы
CCR – рецептор хемокинов CC-семейства
CXCL – хемокины CXС-семейства
CXCR – рецептор хемокинов CXС-семейства
GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
IgM – иммуноглобулины класса М
IL – интерлейкин
MHC – главный комплекс гистосовместимости