

ПЛЕХАНОВА

Мария Владимировна

**Исследование действия вакцин на созревание дендритных
клеток новорожденных и взрослых**

14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва - 2013

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.

Научный руководитель:

Доктор медицинских наук, профессор
ЕФИМОВ Евгений Игоревич

Официальные оппоненты:

ПИНЕГИН Борис Владимирович, заслуженный деятель науки России, заслуженный врач России, доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом иммунодиагностики и иммунокоррекции Государственный научный центр "Институт иммунологии" Федерального медико-биологического агентства России;

КУРАЛЕСОВА Альбина Ивановна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории стромальной регуляции иммунитета Государственное учреждение Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Российской академии медицинских наук.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» Российской академии медицинских наук (Москва)

Защита состоится «__» _____ 2013 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 208.046.02 при 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 научной библиотеке ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Габричевского Роспотребнадзора по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10.

Автореферат разослан «__» _____ 2013 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
Кандидат медицинских наук

Л.И. Новикова

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы

Работа направлена на изучение неизвестных аспектов действия вакцин на клетки иммунной системы. Основным объектом исследования являлись дендритные клетки (ДК) – наиболее активные антигенпрезентирующие клетки нашего организма [Пашенков М. В., Пинегин Б. В., 2006]. Именно эти клетки обеспечивают запуск иммунного ответа на первый контакт организма с инфекцией или вакциной [Steinman R. M., 1991]. Поглощение микроорганизмов приводит к созреванию ДК и миграции в лимфатические узлы для последующей, более точной, идентификации антигенов микроорганизмов Т-лимфоцитами. Активация лимфоцитов, в свою очередь, ведет к запуску иммунного ответа и формированию иммунологической памяти, что и является целью вакцинации. Следует отметить, что ДК и лимфоциты используют два принципиально различных способа распознавания микроорганизмов: ДК способны обнаружить лишь ограниченное количество типовых молекул патогенов, тогда как лимфоциты могут распознать практически любую молекулу, несущую признаки генетической чужеродности [Ярилин А. А., 2010; Steinman R. M., Hemmi H., 2006]. Таким образом, для изучения механизмов действия вакцин на иммунную систему необходимо отдельно оценивать эффекты распознавания вакцин дендритными клетками и Т-лимфоцитами. В рамках данной работы исследовалось действие туберкулезной вакцины БЦЖ и вакцин гепатита В на созревание, функциональные и миграционные свойства ДК новорожденных и взрослых.

Туберкулез является хроническим инфекционным заболеванием, которое продолжает убивать около 3 миллионов человек в год в мире. Каждый год возникает 8 миллионов новых случаев заболевания, и их количество продолжает увеличиваться. Приблизительно одна треть населения мира инфицирована *M. tuberculosis*. Появление СПИДа реактивировало туберкулез у миллионов индивидуумов, вызвав резкое увеличение числа случаев заболевания [Trunz В. В., 2006; Maartens. G., 2007].

Гепатит В является вирусной инфекцией, вызывающей как острое, так и хроническое поражение печени. Этим вирусом инфицировано около 2 миллиардов человек в мире, 350 миллионов человек имеют хроническую инфекцию и 600 000

людей ежегодно умирают от острой или хронической формы гепатита В [Lok A. S., 2001].

Как известно, вакцины являются одними из наиболее важных средств борьбы с этими тяжелыми и социально значимыми заболеваниями. Новые методы исследования действия вакцин на клетки иммунной системы и полученные с их помощью новые научные знания необходимы для дальнейшего совершенствования средств профилактики инфекционных заболеваний. Это обуславливает актуальность и социально-экономическую значимость данной работы.

Цель работы

Исследовать действие вакцин на дендритные клетки новорожденных и взрослых, их созревание, иммуностимулирующие и миграционные свойства.

Задачи исследования

1. Разработать экспериментальную модель исследования действия вакцин на функциональное состояние дендритных клеток взрослых и новорожденных *in vitro*.
2. Оценить способность живой вакцины БЦЖ и рекомбинантных вакцин гепатита В вызывать созревание дендритных клеток по экспрессии мембранных молекул – маркеров созревания.
3. Изучить влияния вакцины БЦЖ и вакцин гепатита В на продукцию цитокинов дендритными клетками новорожденных и взрослых.
4. Изучить действие вакцин на способность дендритных клеток стимулировать Т-лимфоциты.
5. Изучить действие вакцин на миграционные свойства дендритных клеток.

Научная новизна

Показано, что живая вакцина БЦЖ и рекомбинантные вакцины гепатита В одинаково эффективно стимулируют фенотипическое созревание моноцитарных дендритных клеток новорожденных и взрослых в условиях *in vitro*, но обладают различным действием на способность дендритных клеток продуцировать цитокины и стимулировать лимфоциты к цитокинопродукции.

Установлено, что вакцина БЦЖ *in vitro* индуцирует продукцию дендритными клетками про- и противовоспалительных цитокинов и значительно усиливает способность дендритных клеток новорожденных и взрослых стимулировать продукцию интерферона- γ лимфоцитами. Впервые показано, что БЦЖ значительно увеличивает способность дендритных клеток взрослых стимулировать продукцию фактора некроза опухолей- α лимфоцитами и слабо влияет на данный параметр у дендритных клеток новорожденных. Впервые выявлено, что БЦЖ слабо, но достоверно, усиливает экспрессию хемокинового рецептора CCR7, обеспечивающего миграцию дендритных клеток в Т-клеточные зоны лимфатических узлов.

Впервые показано, что вакцины гепатита В *in vitro* незначительно увеличивают продукцию провоспалительных цитокинов дендритными клетками детей, вызывают слабое усиление их способности стимулировать продукцию интерферона- γ и не влияют на способность дендритных клеток стимулировать продукцию фактора некроза опухолей- α , ИЛ-5 и ИЛ-17 лимфоцитами. Впервые обнаружено, что вакцины гепатита В слабо усиливают экспрессию CCR7, но индуцируют сильную экспрессию CXCR5 на дендритных клетках, что способствует их миграции в фолликулы лимфатических узлов – место индукции гуморального иммунного ответа.

Практическая значимость

Разработаны новые методы оценки действия вакцин на клетки иммунной системы и изучены механизмы запускаемых ими иммунных реакций, что необходимо для совершенствования средств иммунопрофилактики инфекционных заболеваний. В ходе исследования разработаны экспериментальные модели оценки действия вакцин на дендритные клетки человека в условиях *in vitro*. В дальнейшем эти модели могут быть использованы для поиска компонентов вакцин, способных эффективно стимулировать дендритные клетки, а также для испытания вакцин в процессе их разработки.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработан комплекс методов оценки действия вакцин на дендритные клетки *in vitro*. С использованием этих методов показано, что ключевыми

свойствами дендритных клеток, определяющими тип иммунного ответа на вакцину, могут быть не только способность к поляризации Т-лимфоцитов, но и особенности хоминга дендритных клеток.

2. Вакцина БЦЖ эффективно индуцирует созревание дендритных клеток, запускает продукцию ими про- и противовоспалительных цитокинов. Под действием БЦЖ дендритные клетки *in vitro* экспрессируют хемокиновый рецептор CCR7 и приобретают способность мощно стимулировать продукцию интерферона γ – ключевого цитокина Т-хелперов 1 типа, что и определяет превалирование клеточного иммунного ответа.

3. Вакцина против гепатита В *in vitro* индуцирует созревание дендритных клеток, но при этом дендритные клетки слабо продуцируют цитокины (особенно у новорожденных) и вызывают лишь слабую стимуляцию Т-хелперов 1 типа и не стимулируют Т-хелперы 2 типа и Т-хелперы-17. В то же время обработанные вакцинами гепатита В дендритные клетки экспрессируют хемокиновый рецептор CXCR5, направляющий их в фолликулы лимфатических узлов, что способствует развитию гуморального иммунного ответа.

Внедрение результатов исследования

Результаты исследования внедрены в работу ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора и ФГБУ «Нижегородский научно-исследовательский институт детской гастроэнтерологии» Минздрава России.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 20 научных работ, из них 12 статей в отечественных рецензируемых научных журналах и одна статья в иностранном рецензируемом журнале, 4 статьи в сборниках, 3 тезисов докладов.

Апробация работы

Диссертация обсуждена и одобрена на Совместном заседании Ученого совета № 2 и межлабораторного семинара № 1 ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора 21 февраля 2013г.

Основные материалы работы были доложены на: юбилейной Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 90-летию Нижегородского

НИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора «Научное обеспечение противоэпидемической защиты населения» (Н.Новгород, 2009); XI международном медицинском форуме «Современные медицинские технологии на службе охраны здоровья россиян» (Н.Новгород, 2010); 2-ом международном конгрессе-партнеринге по биотехнологии и биоэнергетике «EurasiaBio» (Москва, 2010); научно-практической конференции молодых ученых Роспотребнадзора «Инновационные технологии в противоэпидемической защите населения», посвященной 90-летию со дня рождения академика РАМН И.Н. Блохиной, (Н.Новгород, 2011); конференции Роспотребнадзора «Научное обеспечение противоэпидемической защиты населения» (Н. Новгород, 2012); VI Региональной научно-практической конференции «Перспективы использования в медицинской практике новых иммунобиологических препаратов, полученных на основе клеточных культур» (Екатеринбург, 2012); V Российской конференции по иммунологии репродукции (Иваново, 2012).

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 176 страницах, состоит из введения, обзора литературы, раздела «Материалы и методы», раздела «Результаты исследований», раздела «Обсуждение», выводов и списка цитируемой литературы, который содержит 7 отечественных и 214 зарубежных источника. Диссертация иллюстрирована 33 рисунками и 4 таблицами.

Материалы и методы исследований

В работе было проведено исследование дендритных клеток, полученных из моноцитов периферической крови здоровых взрослых доноров и пуповинной крови здоровых доношенных новорожденных. В работе использовано 656 вариантов культур ДК, полученных из моноцитов от 30 взрослых здоровых доноров и 41 здорового новорожденного, а также 1930 вариантов культур смешанной лейкоцитарной реакции (СЛР). Проведено 1850 иммуноферментных анализов (ИФА) надосадков ДК и 3860 ИФА надосадков из СЛР. В работе использовали туберкулезную вакцину БЦЖ («Микроген», Россия), рекомбинантную дрожжевую вакцину гепатита В Шанвак-В («Шанта Биотекникс Лимитед», Индия) и рекомбинантную дрожжевую вакцину гепатита В производства ЗАО НПК «Комбитех» (Россия).

ДК получали традиционным способом из моноцитов периферической крови. Для этого выделяли мононуклеарные клетки крови (МНПК) центрифугированием над слоем Гистопак-1077 (Sigma, США), отмывали и ресуспендировали в полной питательной среде (ППС) DME (Sigma, США) с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Биолот, Санкт-Петербург), L-глутамином и гентамицином. МНПК засеивали в 24-луночные полистироловые планшеты (Costar, USA) по 5×10^6 на лунку и инкубировали 2 часа при $+37^\circ \text{C}$. Неадгезировавшие лимфоциты осторожно смывали средой DME и использовались для постановки СЛР. В лунки с адгезировавшимися на пластике моноцитами вносили ППС с рекомбинантным человеческим ГМ-КСФ (100 нг/мл) и ИЛ-4 (20 нг/мл) для запуска дифференцировки моноцитов в незрелые ДК. Клетки инкубировали 6 или 7 суток при $+37^\circ \text{C}$ и 5 % CO_2 , повторно добавляя ГМ-КСФ и ИЛ-4 на третьи сутки культивирования. Затем незрелые ДК из 6-ти суточных культур пересеивали в свежую ППС и добавляли активаторы созревания или исследуемые вакцины. Для получения стандартных зрелых ДК в лунки вносили липополисахарид (ЛПС) *Salmonella typhi* в концентрации 1 мкг/мл, (ГИСК им. Л.А.Тарасевича, Москва) и рекомбинантный фактор некроза опухолей- α (ФНО- α) в концентрации 10 нг/мл (Sigma, США). В экспериментах по определению действия вакцин на продукцию ФНО- α в качестве положительного контроля использовались ДК, стимулированные 1 мкг/мл ЛПС. В другие лунки вносили исследуемые вакцины в концентрациях 0,2; 0,02 и 0,002 детской дозы в мл. В качестве отрицательного контроля использовали незрелые ДК, росшие без ЛПС, ФНО- α и вакцин. Через сутки из культур отбирали среду для определения содержания цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-10, ИЛ-6, ФНО- α и хемокина MCP-1 с помощью ИФА. ДК собирали и использовали для оценки их функциональных свойств.

Функциональные свойства ДК определяли по их способности стимулировать продукцию аллогенными лимфоцитами интерферона- γ (ИНФ- γ), ФНО- α , ИЛ-5, ИЛ-17 в СЛР. Суспензию лимфоцитов засеивали в лунки 96-луночных планшетов по $2 \cdot 10^5$ клеток на лунку. Из собранных проб дендритных клеток готовили суспензии с концентрацией 4×10^5 клеток/мл на ППС. Каждую из полученных суспензий ДК вносили в лунки по 5, 10 и 20 мкл. Таким образом, ДК вносились в лунки в количестве 1, 2 и 4 % от числа лимфоцитов. Лунки без ДК

использовались в качестве контрольных. Каждый вариант СЛР засеивался в трех повторах. Планшеты инкубировали 72 ч. при +37° С и 5% CO₂ и затем отбирали пробы надосадков для ИФА. ИФА проводили с помощью наборов пр-ва «Цитокин» (С.-Петербург), «Вектор-Бест» (Новосибирск) и R&D (Франция) согласно инструкции к применению с использованием автоматической системы промывания планшет PW40 (BioRad, Франция) и планшетного ридера Sunrise (Tecan, Австрия).

Для определения фенотипа и миграционных свойств дендритных клеток сроки культивирования увеличивались. Незрелые ДК получали инкубированием моноцитов с ГМ-КСФ и ИЛ-4 в течение 7 суток. Затем среду в лунках заменяли на свежую и к клеткам вносили вакцины в концентрациях 0,2 и 0,02 детской дозы в мл или стандартные индукторы созревания (1 мкг/мл ЛПС и 10 нг/мл ФНО-α) или смесь следующего состава: 25 нг/мл ИЛ-1β, 25 нг/мл ИЛ-6, 50 нг/мл ФНО-α, 1 мкг/мл простагландина E₂. ДК культивировали еще двое суток и собирали не менее 2×10⁵ клеток для исследования фенотипа или оценки подвижности. Для исследования фенотипа клетки окрашивали моноклональными антителами, мечеными флюорохромами, и анализировали на лазерных проточных цитофлюориметрах FACSCalibur или FACSCantoII (BD Biosciences Immunocytometry Systems, США) в режиме двух- или трехцветной цитометрии.

Для оценки подвижности готовили суспензии ДК с концентрацией 5×10⁵ клеток/мл. В лунки 24-луночных планшетов вносили ППС и вкладывали вставки ThinCerts с диаметром пор 8 мкм (Greiner bio-one, Германия). Во вставки вносили суспензию ДК и в лунки добавляли среду для выравнивания уровня жидкости в лунках и во вставках. Планшеты инкубировали 19 ч. при +37° С и 5% CO₂. Затем вставки убирали, клетки из лунок собирали, осаждали центрифугированием, ресуспендировали в 100 мкл среды, тщательно выверяя конечный объем суспензии, и концентрацию клеток подсчитывали в камере Горяева.

Статистический анализ проводили с использованием t-теста Стьюдента для зависимых и независимых выборок. Данные на рисунках представлены в виде M±m. Результаты проточной цитометрии обрабатывали с помощью программного обеспечения CellQuest, FACS Diva и WinMDI 2.8. При этом оценивался процент клеток, несущих маркер и плотность экспрессии данного маркера по геометрической средней яркости свечения окрашенных клеток.

Результаты исследований и их обсуждение

Использованные в работе дендритные клетки взрослых доноров демонстрировали типичную морфологию и фенотип моноцитарных дендритных клеток. Это были крупные округлые клетки с низкой адгезивностью, с овальным, полулунным или разделенным на лопасти ядром и множеством шипообразных отростков на мембране. В ходе созревания они утрачивали моноцитарный маркер CD14 и существенно увеличивали экспрессию костимулирующих молекул CD80, CD83 и CD86 (табл. 1). ДК новорожденных обладали сходной морфологией, но отличались определенными фенотипическими признаками незрелости. Часть из них сохраняла моноцитарный маркер CD14, а также имела низкий уровень экспрессии молекул CD80 и CD83.

Таблица 1. Экспрессия мембранных молекул на ДК детей и взрослых (%).

молекула	Незрелые дендритные клетки		Дендритные клетки с ЛПС и ФНО- α	
	новорожденных	взрослых	новорожденных	взрослых
HLA-DR	97.38 \pm 0.77	92.08 \pm 6.04	94.78 \pm 2.83	93.77 \pm 1.64
CD14	29.97 \pm 7.62 *	11.84 \pm 5.35	29.99 \pm 7.1 *	9.39 \pm 4.06
CD80	13.39 \pm 4.77	39.69 \pm 3.24	22.42 \pm 2.73 *	50.90 \pm 7.28
CD83	10.38 \pm 1.64 *	14.9 \pm 1.99	16.48 \pm 2.28 *	33.32 \pm 5.38
CD86	45.03 \pm 6.74	46.25 \pm 6.22	59.91 \pm 6.77	70.77 \pm 8.07

* - различия между детьми и взрослыми достоверны при $p < 0.05$.

Живая вакцина БЦЖ и рекомбинантные вакцины гепатита В одинаково эффективно стимулировали фенотипическое созревание моноцитарных дендритных клеток новорожденных и взрослых, усиливая экспрессию молекул HLA-DR, CD83 и CD86, необходимых для презентации антигена и костимуляции Т-лимфоцитов (рис. 1, 2). Рост экспрессии молекул HLA-DR проявлялся в увеличении яркости окрашивания клеток, которая свидетельствовала о росте количества этой молекулы на мембране каждой клетки. Увеличение экспрессии CD83 и CD86 проявлялось в усилении яркости окрашивания и росте доли клеток, несущих эти маркеры. Выраженные изменения экспрессии HLA-DR, CD83 и CD86 наблюдались при использовании вакцин в концентрации 0,2 детской дозы в мл.

Использование меньшей концентрации (0,02 дозы в мл) вызывало менее выраженные и статистически недостоверные изменения экспрессии этих молекул.

Анализ действия вакцин на продукцию цитокинов ДК позволил выявить определенные закономерности. Вакцина БЦЖ вызывает сильную продукцию провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-6, МСР-1, ФНО- α , а также противовоспалительного ИЛ-10 дендритными клетками взрослых. При действии на ДК детей вакцина БЦЖ стимулирует продукцию про- и противовоспалительных цитокинов, хотя уровень секреции ИЛ-1 β и ФНО- α значительно слабее, чем у взрослых. Вакцина гепатита В Шанвак В индуцирует продукцию провоспалительных цитокинов клетками взрослых, однако её действие на продукцию ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО- α слабее эффекта БЦЖ. При действии на ДК новорожденных вакцина гепатита В не влияет на продукцию большинства цитокинов и стимулирует лишь слабую продукцию ФНО- α .

Показано, что вакцина БЦЖ мощно усиливает способность ДК взрослых стимулировать продукцию ИНФ- γ отвечающими лимфоцитами. При использовании ДК детей также наблюдается существенное усиление интерферон-индуцирующей способности ДК, однако концентрации ИНФ- γ в смешанных культурах клеток детей значительно ниже (рис. 3А), чем в смешанных культурах клеток взрослых (рис. 3Б).

Для выяснения, с какими именно клетками смешанной культуры связана слабость продукции ИНФ- γ у детей, мы использовали вариант СЛР, в которой лимфоциты взрослых активировались дендритными клетками новорожденных (рис. 3В). Продукция ИНФ- γ в таких культурах оказалась столь же активной, как и в обычных смешанных культурах клеток взрослых. Таким образом, слабость продукции ИНФ- γ в смешанных культурах клеток детей обусловлена функциональными особенностями детских лимфоцитов, но не ДК.

Следует отметить, что несмотря на низкие абсолютные значения концентраций ИНФ- γ , кратность усиления продукции этого цитокина под действием БЦЖ в смешанной культуре лимфоцитов детей и ДК детей превышала

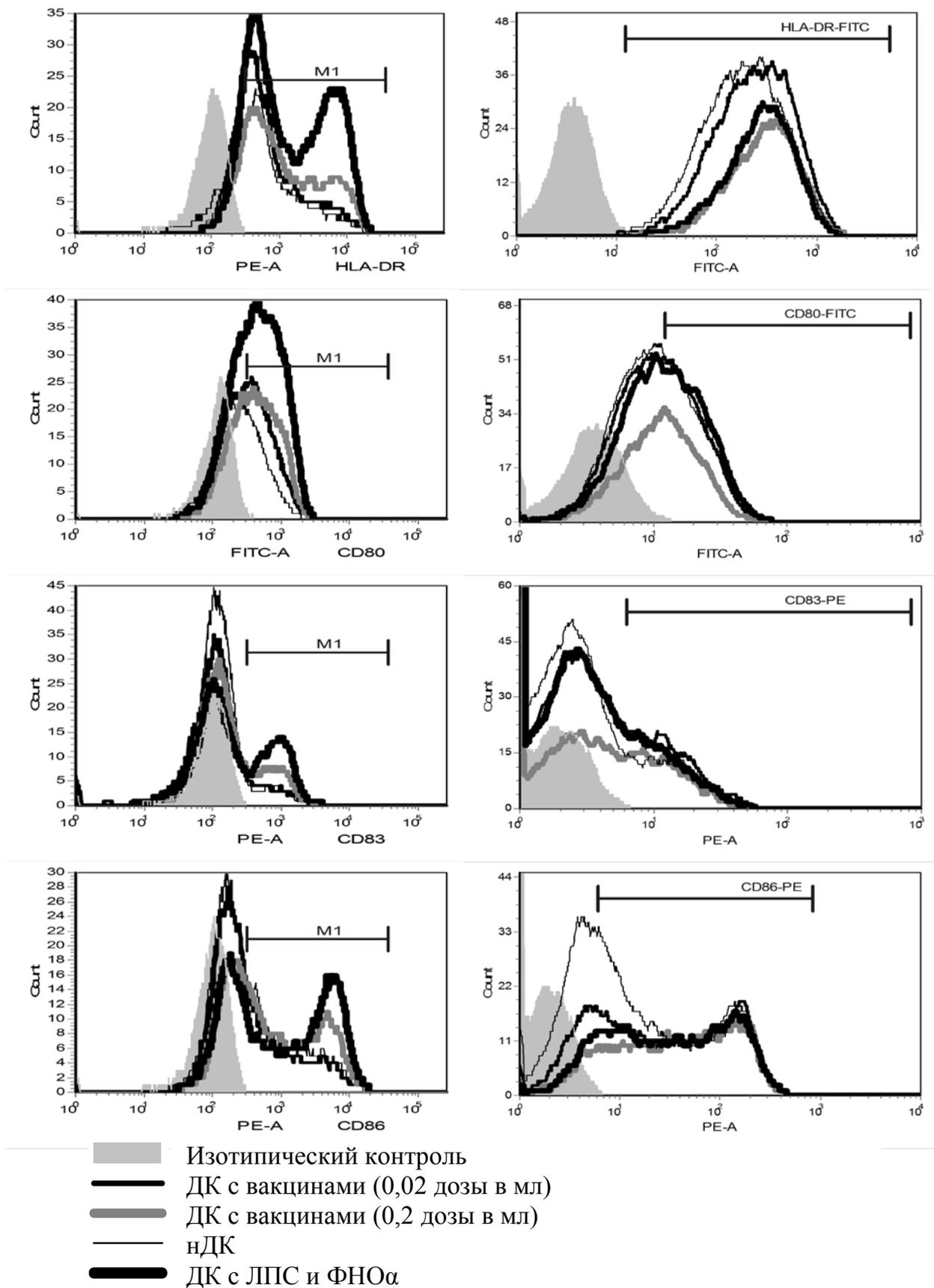


Рис. 1. Действие вакцин БЦЖ (слева) и Шанвак В (справа) на экспрессию молекул дендритных клеток взрослых. Названия молекул обозначены на гистограммах.

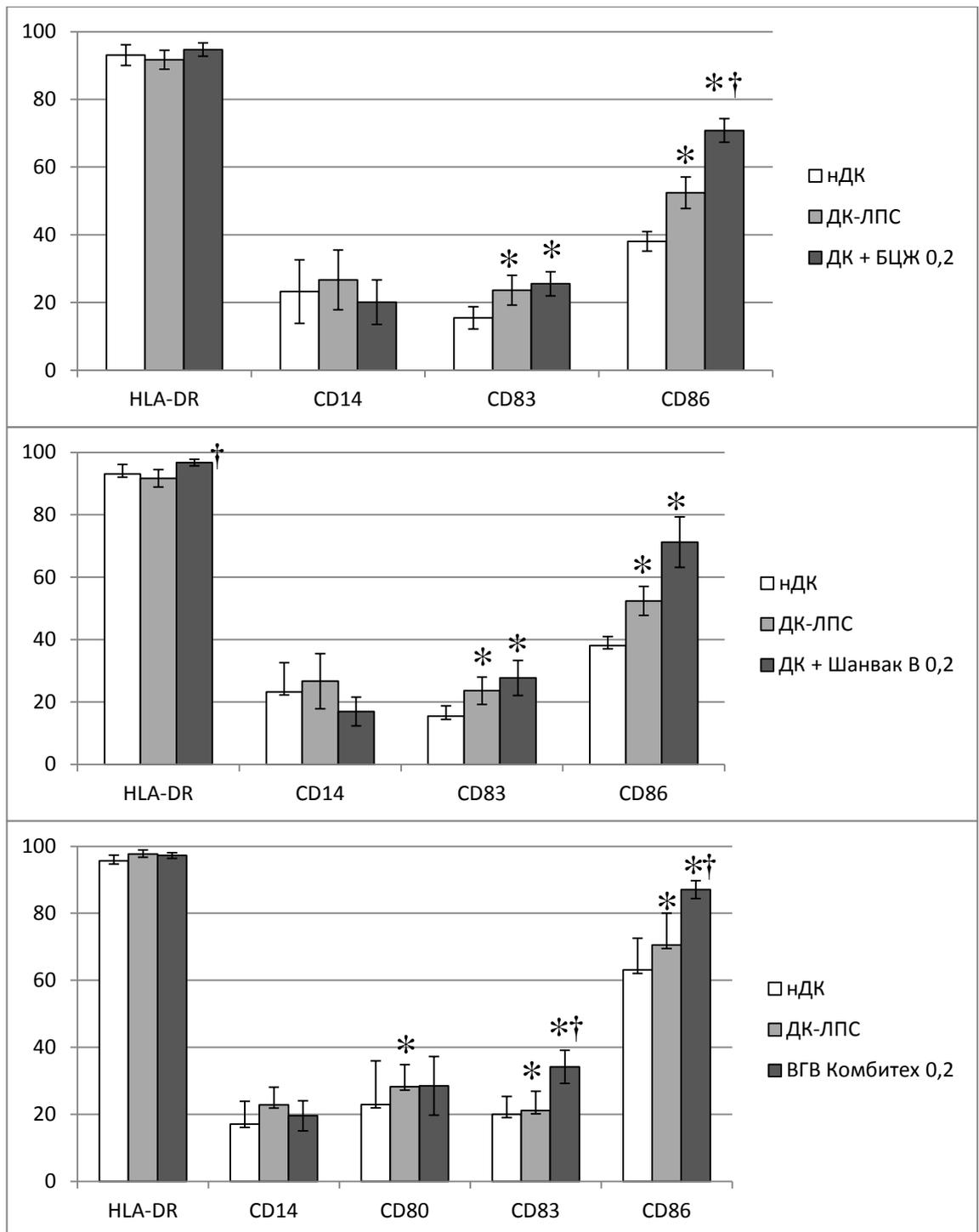


Рис. 2. Экспрессия молекул HLA-DR, CD14, CD83 и CD86 на дендритных клетках новорожденных, стимулированных вакцинами. Тип клеток обозначен справа от гистограмм; нДК – незрелые дендритные клетки; ДК-ЛПС – дендритные клетки стимулированные смесью ЛПС и ФНО- α ; ВГВ Комбитех 0,2 – дендритные клетки стимулированные вакциной гепатита В производства Комбитех в концентрации 0,2 детские дозы в мл. Названия молекул обозначены под гистограммами. Знаком * обозначены достоверные отличия от нДК, † – отличия от ДК-ЛПС ($p < 0,05$ в парном t-тесте).

таковую в смешанных культурах, где отвечающими клетками были лимфоциты взрослых. Известно, что слабость продукции ИНФ- γ лимфоцитами новорожденных связана с гиперметилованием промоторного участка гена этого цитокина в $CD4^+$ Т-клетках новорожденных и, по-видимому, может быть преодолена при достаточно мощной стимуляции лимфоцитов. Полученные результаты свидетельствуют, о том, что ограничение продукции ИНФ- γ у лимфоцитов новорожденных частично снимается при стимуляции дендритными клетками, обработанными БЦЖ. Полученные результаты согласуются с литературными данными о том, что вакцина БЦЖ в организме детей индуцирует ответ Тх1, сравнимый с таковым у взрослых. Иной характер носит действие БЦЖ на ФНО-индуцирующую способность дендритных клеток. ДК взрослых, обработанные вакциной БЦЖ, значительно усиливают свою способность стимулировать продукцию ФНО- α (рис. 3Д). В то же время, инкубация ДК новорожденных с вакциной БЦЖ приводит лишь к небольшому усилению их ФНО-индуцирующей способности, причем это усиление проявляется только при воздействии на лимфоциты взрослых (рис. 3Е), но не новорожденных (рис. 3Г). Таким образом слабость продукции ФНО- α в культурах клеток новорожденных связана с недостатком активности как ДК, так и лимфоцитов-продуцентов. Поскольку субпопуляции лимфоцитов, продуцирующих ФНО- α и ИНФ- γ , в основном совпадают (это $CD4^+$ Тх1, $CD8^+$ цитотоксические Т-клетки, НКТ- и НК-клетки), то различия продукции этих цитокинов могут обуславливаться особенностями набора костимулирующих молекул у ДК новорожденных, который достаточен для запуска продукции ИНФ- γ , но не позволяет активировать в лимфоцитах внутриклеточный сигналинг, ведущий к продукции ФНО- α .

Инкубирование ДК детей и взрослых с БЦЖ вызывает небольшое усиление ИЛ-5-индуцирующей способности этих клеток и не влияет на способность индуцировать продукцию ИЛ-17 (рис. 4).

Как известно, вакцина БЦЖ является сильным индуктором клеточных форм иммунного ответа, и полученные результаты, включая выявленные возрастные особенности продукции ИНФ- γ , соответствуют ожидаемым.

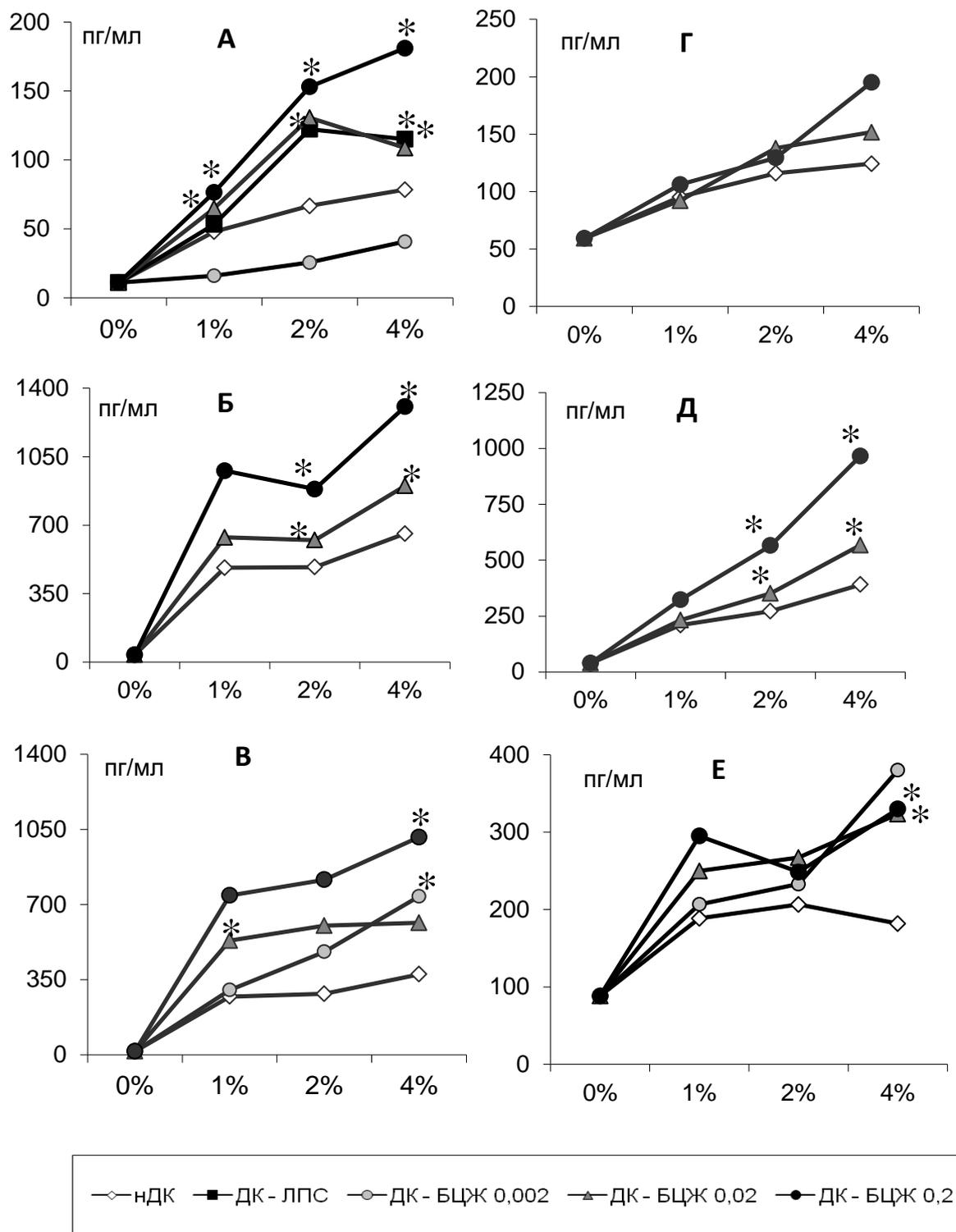


Рис. 3. Действие БЦЖ на продукцию ИНФ- γ (А, Б и В) и ФНО- α (Г, Д и Е) в смешанных культурах лимфоцитов и дендритных клеток новорожденных (А и Г), лимфоцитов и дендритных клеток взрослых (Б и Д), а также лимфоцитов взрослых и дендритных клеток новорожденных (В и Е). По оси абсцисс – доля дендритных клеток в культуре (%), по оси ординат – концентрация цитокина (пг/мл). Типы дендритных клеток и концентрации вакцины (доз/мл) обозначены в картуше под гистограммами. Знаком * обозначены достоверные отличия от незрелых дендритных клеток ($p < 0,05$ в парном t-тесте).

Вакцина гепатита В вызывает лишь слабое усиление ИНФ-индуцирующей способности ДК детей и взрослых (рис. 5) и практически не влияет на способность ДК стимулировать продукцию ФНО- α (рис. 5), ИЛ-5 и ИЛ-17 (рис. 4).

Отсутствие влияния вакцины гепатита В на ИЛ-5-индуцирующую способность ДК может показаться неожиданным, поскольку продуцирующие этот цитокин Тх2 до недавнего времени рассматривались как основные, если не единственные, стимуляторы гуморальных иммунных реакций, а сорбированные на гидроокиси алюминия вакцины являются индукторами гуморального иммунного ответа. Однако в настоящее время основную роль в индукции гуморального иммунного ответа отводят недавно открытой специализированной субпопуляции CD4⁺ Т-клеток – фолликулярным Т-хелперам (фТх). Эти клетки дифференцируются из наивных Т-лимфоцитов, имеющих высокоаффинный Т-клеточный рецептор к антигену. Ключевым моментом, определяющим судьбу фТх, является экспрессия хемокинового рецептора CXCR5, направляющего эти лимфоциты в перифолликулярное пространство и фолликулы лимфоидных органов, где они встречаются с В-лимфоцитами, несущими тот же хемокиновый рецептор. При взаимодействии с В-лимфоцитами фТх снабжают эти клетки необходимыми костимулирующими сигналами и цитокинами. Активность фТх критически необходима для эффективного и длительного функционирования зародышевых центров лимфоидных органов, созревания аффинитета антител и формирования В-клеток иммунологической памяти.

Остальные субпопуляции Т-хелперов при определенных условиях также могут оказывать помощь В-лимфоцитам, но для её эффективной реализации эти клетки после распознавания антигена должны передислоцироваться из Т-клеточной в В-клеточную зону лимфоидного органа, т.е. утратить хемокиновый рецептор CCR7 и экспрессировать CXCR5. Подобная схема миграции лимфоцитов подразумевает «канонический» маршрут трафика антигенов ДК в Т-клеточные зоны лимфатического узла. Однако изложенные в диссертации данные свидетельствуют о том, что существует иной путь доставки антигенов ДК в лимфатические узлы. Показано, что вакцины гепатита В не только усиливают экспрессию CCR7, но индуцируют на ДК сильную экспрессию CXCR5 (рис. 6),

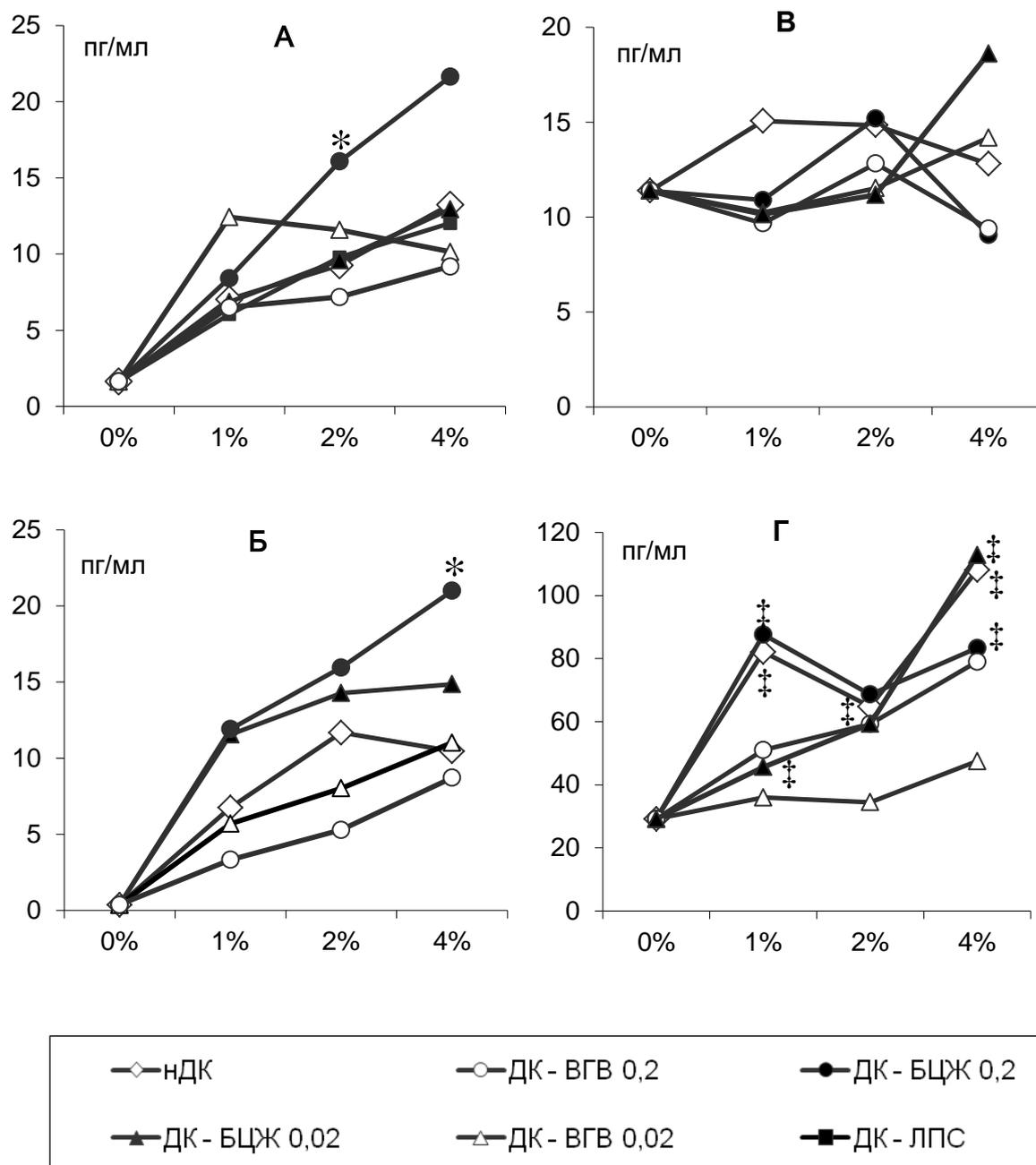


Рис. 4. Действие БЦЖ и вакцины Шанвак-В на продукцию ИЛ-5 (А, Б) и ИЛ-17 (В, Г) в смешанных культурах лимфоцитов и дендритных клеток новорожденных (А и В) и лимфоцитов и дендритных клеток взрослых (Б и Г). По оси абсцисс – доля дендритных клеток в культуре (%), по оси ординат – концентрация цитокина (пг/мл). Типы дендритных клеток и концентрации вакцин (доз/мл) обозначены в карте под гистограммами. Дендритные клетки, стимулированные вакциной гепатита В, обозначены ДК-ВГВ. Знаком * обозначены достоверные отличия от незрелых дендритных клеток ($p < 0,05$ в парном t-тесте). На рис. В и Г знаком ‡ обозначены достоверные отличия от продукции ИЛ-17 лимфоцитами без дендритных клеток (0% ДК).

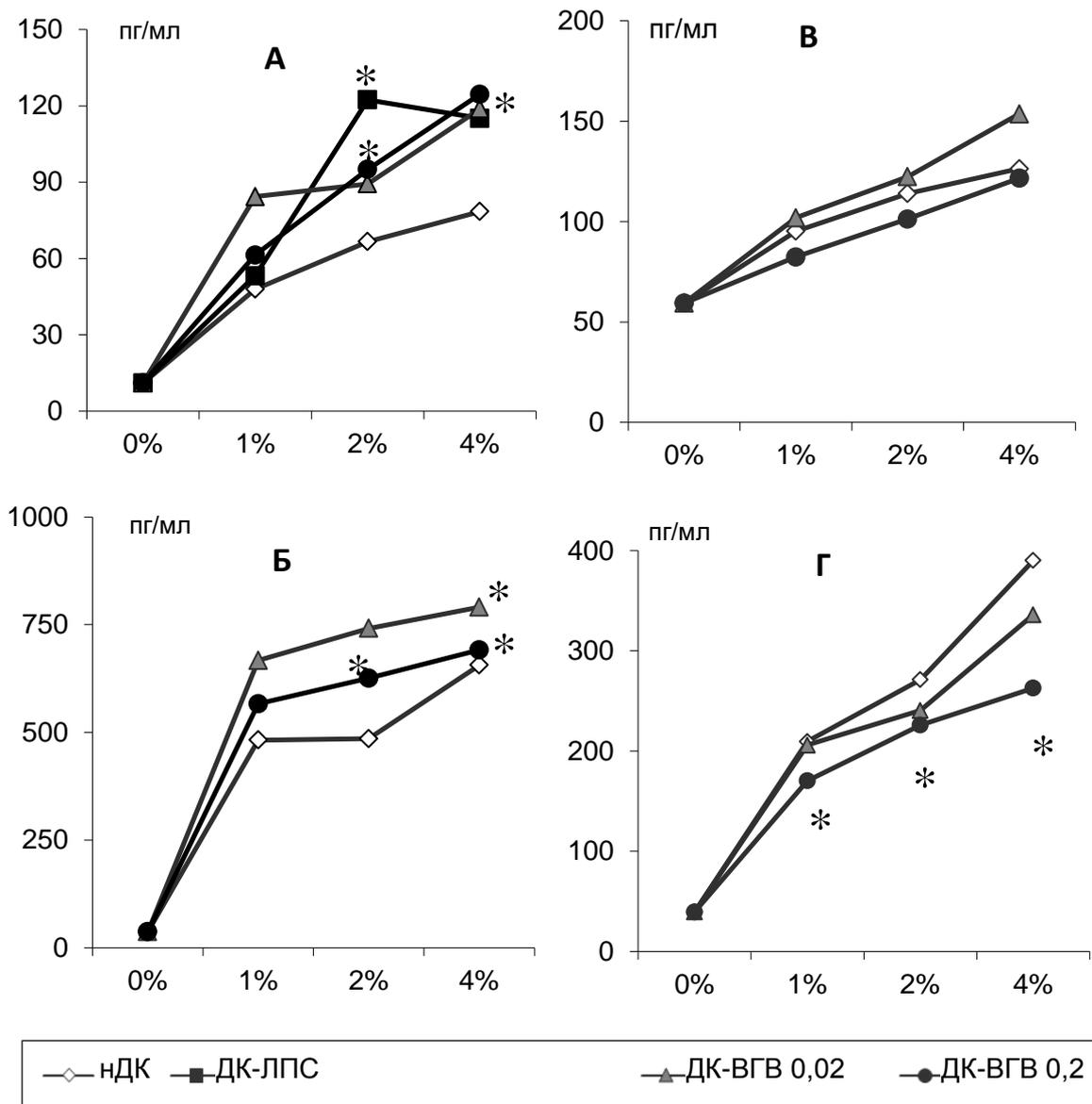


Рис. 5. Действие вакцины Шанвак-В на продукцию ИНФ- γ (А, Б) и ФНО- α (В, Г) в смешанных культурах лимфоцитов и дендритных клеток новорожденных (А и В) и лимфоцитов и дендритных клеток взрослых (Б и Г). По оси абсцисс – доля дендритных клеток в культуре (%), по оси ординат – концентрация цитокина (пг/мл). Типы дендритных клеток и концентрации вакцины (доз/мл) обозначены в карте под гистограммами. Дендритные клетки, стимулированные вакциной гепатита В, обозначены ДК-ВГВ. Знаком * обозначены достоверные отличия от незрелых дендритных клеток ($p < 0,05$ в парном t-тесте).

который направляет их непосредственно в фолликулы. Полученные результаты наводят на мысль о том, что именно это специфическое воздействие на хоминг ДК определяет способность вакцин гепатита В индуцировать гуморальный иммунный ответ.

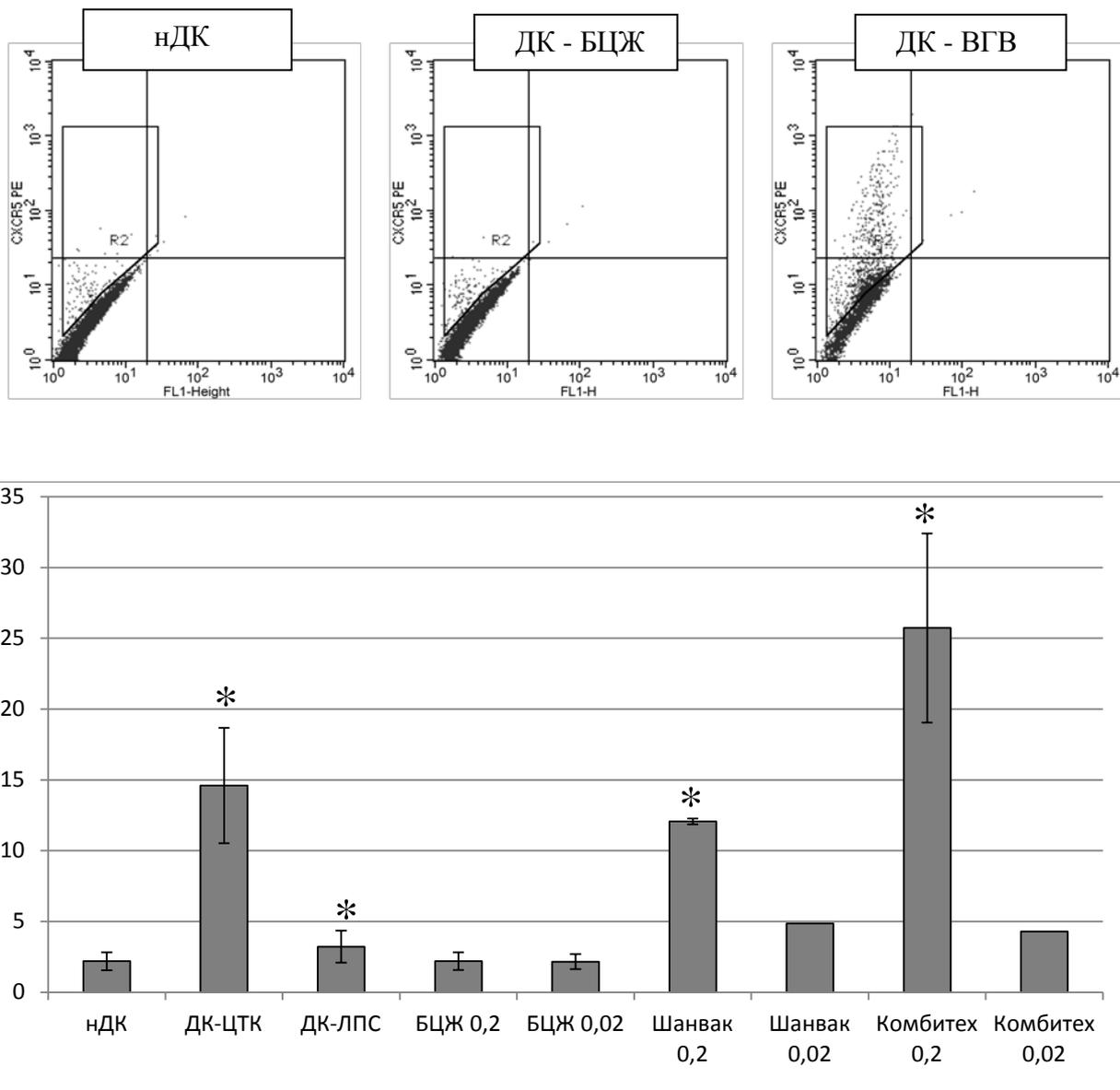


Рис. 6. Экспрессия CXCR5 на дендритных клетках детей. Сверху – результат репрезентативного эксперимента, снизу – средние значения количества CXCR5⁺ на дендритных клетках (%). Названия вакцин и их концентрации (доз в мл) обозначены под гистограммами. Другие обозначения: ДК-ЛПС – дендритные клетки, стимулированные ЛПС *E. coli*. ДК-ЦТК – дендритные клетки, стимулированные смесью провоспалительных цитокинов и простагландина E2. * - отличия от незрелых дендритных клеток достоверны при p<0,05.

В то же время, вакцина БЦЖ при прямом воздействии на ДК *in vitro* не влияет на экспрессию CXCR5, но достоверно усиливает экспрессию CCR7, тем

самым стимулируя «канонический» путь доставки антигенов вакцины в лимфатические узлы. Кроме того, показано, что наиболее мощными индукторами экспрессии CCR7 и стимуляторами подвижности ДК являются эндогенные медиаторы воспаления. Учитывая способность БЦЖ стимулировать продукцию провоспалительных цитокинов можно предположить дополнительный механизм стимуляции миграции ДК за счет продукции медиаторов воспаления в месте введения этой вакцины.

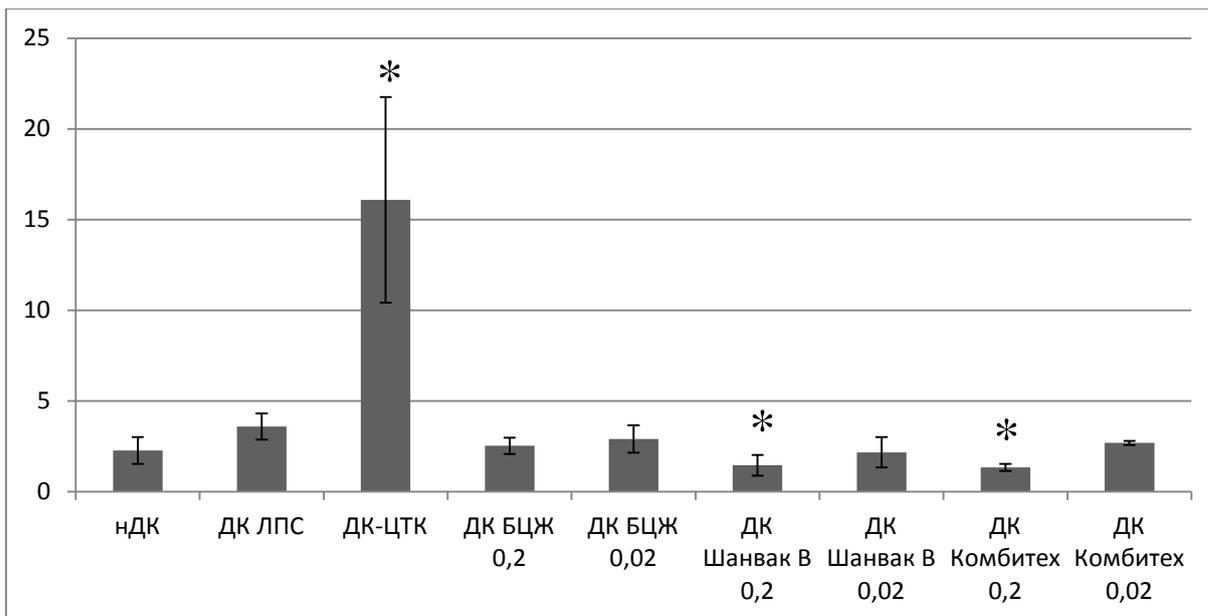


Рис. 7. Миграция дендритных клеток новорожденных через пористые мембраны. нДК – незрелые дендритных клеток, ДК ЛПС – клетки, стимулированные смесью ЛПС и ФНО- α . ДК-ЦТК – клетки, стимулированные смесью провоспалительных цитокинов с ПГЕ2. По оси ординат – количество клеток, проникших в нижнюю камеру за 19 ч. (тыс. клеток). * – отличие от незрелых дендритных клеток достоверно при $p < 0,05$.

Исследование спонтанной подвижности ДК в системе типа Transwell показало, что все использованные вакцины не усиливают подвижность дендритных клеток (рис. 7). Более того, вакцины гепатита В в высокой концентрации достоверно подавляют подвижность этих клеток.

Не вызывает сомнений, что усиление подвижности способствует выходу зрелых ДК из зоны первичной локализации и их миграции в лимфатические узлы. В связи с этим представляется вероятным, что отсутствие действия на миграцию и, тем более, негативное воздействие на неё, снижает эффективность доставки антигенов вакцин к месту индукции иммунного ответа.

По нашему мнению, исследование действия вакцин на миграцию ДК, и целенаправленный поиск новых потенциальных компонентов вакцин, способных стимулировать этот процесс, позволит разработать новые эффективные средства специфической иммунопрофилактики инфекционных заболеваний.

Выводы

1. Разработан комплекс методов, позволяющий моделировать действие вакцин на функциональное состояние дендритных клеток взрослых и новорожденных в условиях *in vitro*.

2. Вакцина БЦЖ и вакцина против гепатита В одинаково эффективно стимулируют фенотипическое созревание моноцитарных дендритных клеток, усиливая экспрессию молекул HLA-DR, CD83 и CD86.

3. Вакцина БЦЖ вызывает сильную продукцию про- и противовоспалительных цитокинов дендритными клетками взрослых. Вакцина БЦЖ также стимулирует продукцию про- и противовоспалительных цитокинов дендритными клетками новорожденных, хотя уровень секреции ИЛ-1 β и ФНО- α значительно слабее, чем у взрослых.

4. Вакцина против гепатита В индуцирует продукцию провоспалительных цитокинов дендритными клетками взрослых, однако действие этой вакцины на продукцию ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО- α слабее эффекта БЦЖ. При действии на дендритные клетки новорожденных вакцина гепатита В стимулирует лишь слабую продукцию ФНО- α .

5. Вакцина БЦЖ усиливает способность дендритных клеток детей и взрослых индуцировать сильную продукцию ИНФ- γ и слабую продукцию ИЛ-5 лимфоцитами, а так же усиливает способность дендритных клеток взрослых индуцировать продукцию ФНО- α . Вакцина против гепатита В слабо стимулирует способность дендритных клеток детей и взрослых индуцировать продукцию ИНФ- γ лимфоцитами и не влияет на продукцию ФНО- α , ИЛ-5 и ИЛ-17.

6. Вакцина БЦЖ и вакцина против гепатита В индуцируют экспрессию на дендритных клетках хемокинового рецептора CCR7, необходимого для миграции в Т-клеточные зоны лимфатических узлов.

7. Вакцина против гепатита В индуцирует на дендритных клетках сильную экспрессию хемокинового рецептора CXCR5, который обеспечивает миграцию клеток в фолликулы лимфатических узлов.

8. Все исследованные вакцины не усиливают подвижность дендритных клеток. Вакцина против гепатита В в высокой концентрации подавляет подвижность этих клеток.

Список опубликованных работ по теме диссертации

1. Талаев В.Ю., Цатуров М.Э., Матвейчев А.В., Талаева М.В., Бабайкина О.Н., Ломунова М.А., Заиченко И.Е. Миелоидные дендритные клетки как объект исследований в инфекционной иммунологии. Медицинский альманах, 2009, № 2(7), С. 47-50.
2. Talayev V.Yu., Matveichev A.V., Lomunova M.A., Talayeva M.V., Tsaturov M.E., Zaichenko I.Ye., Babaykina O.N., The effect of human placenta cytotrophoblast cells on the maturation and T-cell stimulating ability of dendritic cells in vitro. Clinical and Experimental Immunology, 2010, V. 162(1), P. 91-99.
3. Талаев В.Ю., Ефимов Е.И., Талаева М.В., Матвейчев А.В., Цатуров М.Э., Бабайкина О.Н., Заиченко И.Е. Разработка способа оценки действия вакцин на дендритные клетки in vitro. Медицинский альманах, 2010, № 3 (11), С. 255-258.
4. Матвейчев А.В., Талаев В.Ю., Ломунова М.А., Талаева М.В., Бабайкина О.Н., Цатуров М.Э., Заиченко И.Е. Роль дендритных клеток в предотвращении иммунологического конфликта матери и плода. Медицинский альманах, 2010, № 3 (11), С. 273-276.
5. Цатуров М.Э., Талаев В.Ю., А.В. Матвейчев, Талаева М.В., Бабайкина О.Н., Заиченко И.Е., Ломунова М.А. Толерогенные дендритные клетки – созревание и функции в экспериментах in vitro. Медицинский альманах, 2010, №3(11), С.263-265.
6. Талаев В.Ю., Ефимов Е.И., Талаева М.В., Матвейчев А.В., Цатуров М.Э., Бабайкина О.Н., Заиченко И.Е. Оценка действия вакцин на дендритные клетки in vitro. Сборник тезисов 2-ого Международного Конгресса-партнеринга и Выставки по биотехнологии и биоэнергетике EurasiaBio, 2010, М., С. 183 (рус.), С. 380 (англ.).
7. Талаев В.Ю., Плеханова М.В., Ефимов Е.И. Перспективы использования моделей иммунных процессов in vitro для совершенствования средств иммунопрофилактики. Медицинский альманах, 2011, № 4(17), С. 75 – 78.
8. Плеханова М.В., Цатуров М.Э., Матвейчев А.В., Бабайкина О.Н., Заиченко И.Е., Ефимов Е.И., Талаев В.Ю. Действие вакцин против туберкулеза и гепатита В на созревание дендритных клеток новорожденных и взрослых in vitro. Медицинский альманах, 2011, № 4(17), С. 56 – 59.
9. Цатуров М.Э., Матвейчев А.В., Плеханова М.В., Заиченко И.Е., Бабайкина О.Н., Ломунова М.А., Талаев В.Ю. Исследования толерогенных дендритных

клеток новорожденных и взрослых в моделях иммунного ответа *in vitro*. Медицинский альманах, 2011, № 4(17), С. 78 – 81.

10. Цатуров М.Э., Матвейчев А.В., **Плеханова М.В.**, Заиченко И.Е., Бабайкина О.Н. Ломунова М.А. Талаев В.Ю. Свойства дендритных клеток новорожденных детей. Статья в сборнике материалов III научно-практической школы-конференции молодых ученых и специалистов «Современные технологии обеспечения биологической безопасности», 2011, Оболенск, С. 339 – 342.

11. Цатуров М.Э., Матвейчев А.В., **Плеханова М.В.**, Заиченко И.Е., Бабайкина О.Н. Ломунова М.А. Талаев В.Ю. Исследования толерогенных дендритных клеток новорожденных и взрослых в моделях иммунного ответа *in vitro*. Сборник материалов научно-практической конференции молодых ученых Роспотребнадзора «Инновационные технологии в противоэпидемической защите населения», посвященной 90-летию со дня рождения академика РАМН И.Н. Блохиной, 2011, Н. Новгород, С. 72 – 74.

12. **Плеханова М.В.**, Цатуров М.Э., Матвейчев А.В., Бабайкина О.Н., Заиченко И.Е., Ефимов Е.И., Талаев В.Ю. Действие вакцин против туберкулеза и гепатита В на созревание дендритных клеток новорожденных и взрослых. Там же (смотри пункт 11). С. 78 – 80.

13. Цатуров М.Э., Талаев В.Ю., Матвейчев А.В., **Плеханова М.В.**, Заиченко И.Е., Бабайкина О.Н., Ломунова М.А. Эффекты последовательного и конкурентного взаимодействия обычных моноцитарных дендритных клеток и дендритных клеток, обработанных индукторами толерогенности, с аллогенными лимфоцитами. Иммунология, 2012, Т. 33, № 1, С. 29 – 35.

14. Талаев В.Ю., Ломунова М.А., **Плеханова М.В.**, Матвейчев А.В., Цатуров М.Э., Бабайкина О.Н., Заиченко И.Е., Еланкова Н.Н., Талаева Е.Б. Продукция цитокинов и хемокинов при взаимодействии дендритных клеток и клеток трофобласта плаценты человека *in vitro*. Иммунология, 2012, Т.33, №1, С.24-29.

15. Талаев В.Ю., **Плеханова М.В.**, Ломунова М.А., Матвейчев А.В., Бабайкина О.Н., Заиченко И.Е. Действие клеток трофобласта плаценты человека на миграционные свойства дендритных клеток *in vitro*. Вестник нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского, 2012, № 2 (3), С. 289-294.

16. **Плеханова М.В.**, Талаев В.Ю., Ефимов Е.И., Бабайкина О.Н., Заиченко И.Е. Действие вакцины БЦЖ на дендритные клетки новорожденных *in vitro*. Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского, 2012, № 2 (3), С. 280-284.

17. **Плеханова М.В.**, Бабайкина О.Н., Заиченко И.Е., Ефимов Е.И., Талаев В.Ю. Особенности действия вакцины БЦЖ на дендритные клетки и лимфоциты новорожденных *in vitro*. Сборник материалов научно-практической конференции Роспотребнадзора «Научное обеспечение противоэпидемической защиты населения», 2012, Н. Новгород, С 99-103.

18. **Плеханова М.В.**, Талаев В.Ю., Бабайкина О.Н., Заиченко И.Е., Ефимов Е.И. Действие вакцин против туберкулеза и гепатита В на дендритные клетки новорожденных *in vitro*. Иммунология, 2012, Т. 33, № 6, С. 311 – 318.

19. Талаев В.Ю., Плеханова М.В., Ломунова М.А., Матвейчев А.В., Бабайкина О.Н., Заиченко И.Е. Действие клеток трофобласта плаценты человека на фенотипические, функциональные и миграционные свойства дендритных клеток *in vitro*. Российский иммунологический журнал 2012, Т. 6 (14), № 2 (1), С. 166-168.

20. Талаев В.Ю., Плеханова М.В., Бабайкина О.Н., Заиченко И.Е., Ефимов Е.И. Исследование действия вакцин на моноцитарные дендритные клетки новорожденных. Российский иммунологический журнал, 2012, Т.6 (14), № 2 (1), С.168-169.

Список сокращений

БЦЖ – бацилла Calmette-Guérin –
вакцинный штамм *Mycobacterium*
bovis

ГМ-КСФ – гранулоцитарно-
макрофагальный
колониестимулирующий фактор

ДК – дендритные клетки

ДК-БЦЖ – дендритные клетки,
стимулированные вакциной БЦЖ

ДК-ВГВ – дендритные клетки,
стимулированные вакциной гепатита

В

ДК-ЛПС – дендритные клетки,
стимулированные смесью ЛПС *E. coli*
и ФНО- α

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

ИЛ – интерлейкин

ИНФ- γ – интерферон- γ

ИФА – иммуноферментный анализ

ЛПС – липополисахарид

МНПК – мононуклеарные клетки
периферической крови

нДК – незрелые дендритные клетки

ППС – полная питательная среда

СЛР – смешанная лимфоцитарная
реакция

Тх1 – Т-хелперы первого типа

Тх17 – Т-хелперы-17

Тх2 – Т-хелперы второго типа

ФНО- α – фактор некроз опухолей- α

фТх – фолликулярные Т-хелперы

ССР – рецепторы хемокинов СС-
семейства

СХСР – рецепторы хемокинов СХС-
семейства

НК – естественные киллеры