

МИГРАЦИЯ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА *in vitro*, ИНДУЦИРОВАННАЯ ВАКЦИНАМИ, СТИМУЛИРУЮЩИМИ ГУМОРАЛЬНЫЙ И КЛЕТОЧНЫЙ ИММУНИТЕТ

DOI: 10.17691/stm2016.8.3.10

УДК 577.27:615.37–084–001.57

Поступила 9.02.2016 г.



В.Ю. Талаев, д.м.н., профессор, зав. лабораторией клеточной иммунологии¹;
профессор кафедры микробиологии и иммунологии²;

М.В. Талаева, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии¹;

Е.В. Воронина, младший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии¹;

О.Н. Бабайкина, к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии¹

¹Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной, Н. Новгород, 603950, ул. М. Ямская, 71;

²Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород, 603950, пл. Минина и Пожарского, 10/1

Дендритные клетки (ДК) — специализированные антигенпрезентирующие клетки, одной из функций которых является доставка антигенов из периферических тканей в лимфоидные органы посредством миграции, управляемой хемокинами.

Цель исследования — изучить действие вакцин, стимулирующих клеточный или гуморальный иммунный ответ, на экспрессию хемокиновых рецепторов CCR7, CXCR4 и CXCR5 на ДК, оценить подвижность этих клеток и миграционный ответ на хемокины.

Материалы и методы. Незрелые ДК, полученные из моноцитов *in vitro*, инкубировали с вакцинами или медиаторами воспаления, а затем оценивали их созревание и анализировали экспрессию гена CCR7, наличие рецепторов CCR7, CXCR4 и CXCR5 на наружной мембране, спонтанную подвижность клеток и хемотаксис, индуцированный хемокинами CCL21 и CXCL13.

Результаты. Туберкулезная вакцина БЦЖ, стимулирующая клеточный иммунный ответ, эффективно индуцирует созревание ДК, не влияет на экспрессию рецепторов CXCR4 и CXCR5 и вызывает небольшое, но достоверное усиление экспрессии гена и рецептора CCR7, а также хемотаксиса, индуцированного хемокином CCL21. Рекомбинантная дрожжевая вакцина гепатита В, индуцирующая гуморальный иммунный ответ, вызывает частичное созревание ДК, значительно увеличивает экспрессию рецепторов CCR7, CXCR4 и CXCR5, но при этом не повышает спонтанную подвижность клеток и слабо усиливает хемотаксис в ответ на CCL21 и CXCL13.

Заключение. Туберкулезная вакцина и вакцина гепатита В индуцируют различные наборы хемокиновых рецепторов на ДК, но при этом относительно слабо стимулируют хемотаксис ДК. Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности поиска новых адъювантов, способных усиливать миграцию несущих антигены ДК в лимфоидные органы.

Ключевые слова: дендритные клетки; хемокиновые рецепторы; миграция дендритных клеток; вакцины.

Как цитировать: Talayev V.Y., Talaeva M.V., Voronina E.V., Babaykina O.N. Migration of human dendritic cells *in vitro* induced by vaccines stimulating humoral and cell immunity. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2016; 8(3): 91–99, <http://dx.doi.org/10.17691/stm2016.8.3.10>

English

Migration of Human Dendritic Cells *in vitro* Induced by Vaccines Stimulating Humoral and Cell Immunity

V.Y. Talayev, MD, DSc, Professor, Head of Cellular Immunology Laboratory¹; Professor, Department of Microbiology and Immunology²;

M.V. Talaeva, PhD, Senior Researcher, Cellular Immunology Laboratory¹;

E.V. Voronina, Junior Researcher, Cellular Immunology Laboratory¹;

O.N. Babaykina, MD, PhD, Senior Researcher, Cellular Immunology Laboratory¹

Для контактов: Талаев Владимир Юрьевич, e-mail: talaev@inbox.ru

¹Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after academician I.N. Blokhina, 71 M. Yamskaya St., Nizhny Novgorod, 603950, Russian Federation;

²Nizhny Novgorod State Medical Academy, 10/1 Minin and Pozharsky Square, Nizhny Novgorod, 603005, Russian Federation

Dendritic cells (DC) are specialized antigen-presenting cells. One of their function is to deliver antigens from peripheral tissues to lymphoid organs by migration controlled by chemokines.

The aim of the investigation was to study the effect of vaccines stimulating cellular or humoral response on the expression of chemokine receptors CCR7, CXCR4 and CXCR5 on DC, and assess the motility of the cells and migration response on chemokines.

Materials and Methods. Immature DC derived from monocytes *in vitro* were incubated with vaccines or inflammatory mediators, and then assessed their maturation and studied CCR7 gene expression, the presence of CCR7, CXCR4 and CXCR5 receptors on the outer membrane, spontaneous cell motility and chemotaxis induced by chemokines CCL21 and CXCL13.

Results. BCG tuberculosis vaccine stimulating cellular immune response effectively induces DC maturation, and has no effect on the expression of receptors CXCR4 and CXCR5 causing slight but reliable enhanced expression of gene and receptor CCR7 as well as chemotaxis induced by chemokine CCL21. Recombinant yeast hepatitis B vaccine inducing humoral immune response causes partial DC maturation increasing significantly the expression of receptors CCR7, CXCR4 and CXCR5, but does not increase spontaneous cell motility and enhances weakly chemotaxis in response to CCL21 and CXCL13.

Conclusion. Tuberculosis vaccine and hepatitis B vaccine induce different sets of chemokine receptors on DC, however, they stimulate DC chemotaxis relatively weakly. The findings suggest feasibility of searching new adjuvants, which enable to enhance the migration of DC carrying antigens to lymphoid organs.

Key words: dendritic cells; chemokine receptors; migration of dendritic cells; vaccines.

Модели иммунных реакций *in vitro* используются как в фундаментальных, так и в прикладных научных исследованиях для изучения молекулярных механизмов действия лекарственных препаратов и разработки новых средств направленного воздействия на функции клеток иммунной системы и способов клеточной терапии. В данной работе методы исследований *in vitro* применены для оценки действия двух широко используемых вакцин (туберкулеза и гепатита В) на миграционные свойства дендритных клеток (ДК) человека.

ДК являются самыми активными антигенпрезентирующими клетками, способными запускать первичный иммунный ответ, вовлекая в реакцию наивные (т.е. впервые контактирующие с антигеном) Т-лимфоциты [1]. На стадии так называемых незрелых ДК (нДК) эти клетки эффективно собирают антигены и после поглощения патогенных микроорганизмов изменяют свои свойства, превращаясь в зрелые ДК. Зрелые ДК ослабляют эндоцитоз, но усиливают свою способность к представлению собранных ранее антигенов за счет увеличения экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости, мембранных белков и цитокинов, необходимых для стимуляции размножения и созревания Т-лимфоцитов. Кроме того, ДК обладают уникальными миграционными характеристиками, которые позволяют нДК максимально эффективно собирать антигены внутри различных тканей организма, а при созревании покидать очаг инфекции и транспортировать антигены в периферические лимфоидные органы — место встречи с наивными Т-лимфоцитами. Сигналом, индуцирующим миграцию и созревание ДК, является распознавание наиболее типичных для больших групп микроорганизмов молекул — так называемых молекулярных паттернов патогенов, а также

эндогенных медиаторов воспаления — провоспалительных цитокинов, алларминов и простагландина E₂ (ПГЕ₂) [2, 3]. При подготовке к миграции на мембране ДК снижается количество рецепторов для хемокинов периферических тканей и вместо них экспрессируются рецепторы хемокинов, направляющих клетки в регионарные лимфатические узлы (ЛУ). Среди этих вновь экспрессируемых рецепторов ключевую роль отводят CCR7, лиганды которого продуцируются на всем пути миграции ДК от периферической ткани до Т-клеточной зоны ЛУ [4, 5]. Так, в отправной точке маршрута значимая продукция одного из этих лигандов — хемокина CCL21 — происходит в эндотелии начальных участков лимфатических капилляров, привлекая мигрирующие ДК в лимфатические сосуды [5, 6]. Попав с током лимфы в дренирующий ЛУ, ДК продолжают движение под действием градиента CCL19 и CCL21, мощная продукция которых происходит в паракортексе — конечной точке маршрута [2, 5–7]. В коже роль дополнительного хемоаттрактанта ДК в лимфатическое русло играет хемокин CXCL12, распознаваемый рецептором CXCR4 [8].

Однако этот основной путь миграции ДК в ЛУ не является единственным. Показано, что часть ДК дермы кожи и маргинальной зоны селезенки экспрессирует хемокиновый рецептор CXCR5 [9]. Этот рецептор и его лиганд CXCL13 играют ключевую роль в миграции В-лимфоцитов и Т-фолликулярных хелперов (Тфх) в перифолликулярные регионы и фолликулы ЛУ — зону индукции гуморального иммунного ответа [10], где сосредоточены продуценты CXCL13 [11, 12]. CXCR5⁺ ДК кожи отвечают на CXCL13 и мигрируют в В-клеточную зону ЛУ при адаптивном переносе [9]. Функциональная роль такой миграции ДК доказана

в системе с избирательным подавлением экспрессии гена *CXCR5* в ДК, Т-лимфоцитах и В-клетках у мышей, инвазированных кишечной нематодой *Heligmosomoides polygyrus* [13]. Недавно мы обнаружили, что вакцины, стимулирующие гуморальный ответ, также способны индуцировать экспрессию *CXCR5* на ДК, полученных из моноцитов *in vitro* [14].

Цель исследования — изучить действие туберкулезной вакцины БЦЖ, стимулирующей преимущественно клеточный иммунный ответ, вакцины гепатита В, стимулирующей антителопродукцию, а также адъюванта гидроксида алюминия на экспрессию и распределение хемокиновых рецепторов *CCR7*, *CXCR4* и *CXCR5* на дендритных клетках; оценить подвижность обработанных вакцинами клеток и миграционный ответ их на соответствующие хемокины.

Материалы и методы. В работе использовали туберкулезную вакцину БЦЖ («Микроген», Россия) и дрожжевую рекомбинантную вакцину гепатита В («Комбиотех», Россия), а также суспензию геля гидроксида алюминия (ГА) («Комбиотех», Россия). Одна доза вакцины БЦЖ содержит 50 мкг лиофилизированных бактерий *Calmette–Guérin* ((2–4)·10⁷ живых бактерий). Одна доза вакцины гепатита В содержит 10 мкг рекомбинантного HBs-антигена, сорбированного на геле ГА (250 мкг Al³⁺). Перед использованием вакцину гепатита В и гель ГА трижды отмывали от мертиолята средой RPMI-1640 (Gibco, Великобритания) центрифугированием. ДК получали из моноцитов венозной крови взрослых здоровых доноров. Для этого мононуклеарные клетки крови выделяли центрифугированием над слоем среды *Hystopaque-1077* (Sigma-Aldrich, США), засеивали в 24-луночные планшеты (Costar, США) по 5·10⁶ клеток на лунку и инкубировали при 37°C и 5% CO₂. Через 2 ч неприлипшие клетки удаляли, а прилипшие моноциты культивировали в среде RPMI-1640 с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (PAA Laboratories, Австрия), 20 нг/мл интерлейкина-4 (ИЛ-4) (R&D, США) и 100 нг/мл гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) (R&D, США). ИЛ-4 и ГМ-КСФ повторно добавляли в культуры до той же концентрации на 3-й день культивирования. На 7-й день полученные из моноцитов нДК стимулировали вакцинами в концентрации 0,2 и 0,02 дозы/мл. Суспензию геля ГА использовали в эквивалентных концентрациях (50 и 5 мкг/мл Al³⁺).

Развитие контрольных зрелых ДК индуцировали смесью медиаторов воспаления, состоящей из 25 нг/мл ИЛ-1β, 25 нг/мл ИЛ-6, 50 нг/мл фактора некроза опухоли α (R&D, США) и 1 мкг/мл ПГЕ₂ (Sigma-Aldrich, США). Через 48 ч после стимуляции клетки собирали, отделяли от вакцины гепатита В или от геля ГА центрифугированием над слоем 85% перколлы (Sigma-Aldrich, США) и использовали при анализе фенотипа, миграционных свойств и экстракции РНК для реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР).

Фенотип клеток определяли с помощью лазерной

проточной цитометрии ДК, меченных флюоресцентными конъюгатами антител к молекулам HLA-DR, CD14 («Сорбент», Россия), CD80, CD83, CD86, *CCR7*, *CXCR4* и *CXCR5* (BD Biosciences, США). Пробы анализировали на проточном цитофлюориметре *FacsCalibur* (BD Biosciences, США), гейтируя ДК в соответствии с профилем прямого и бокового светорассеивания.

Миграцию ДК измеряли по хемотаксису через поликарбонатный фильтр с порами диаметром 8 мкм в 24-луночных камерах *ThinCerts* (Greiner bio-one, Швейцария). Для этого 10⁵ клеток, отмывых от ЭТС и ресуспендированных в среде RPMI-1640, помещали во вставку (верхнюю камеру). Для индуцирования хемотаксиса хемокины *CCL21* или *CXCL13* (R&D, США), разведенные в среде RPMI-1640 без ЭТС, помещали в лунку (нижнюю камеру) в концентрациях 500 нг/мл и 1 мкг/мл соответственно. В контрольных вариантах использовались нижние камеры со средой без хемокинов. Через 2 ч инкубации при 37°C и 5% CO₂ мигрировавшие ДК собирали из нижних камер и подсчитывали. В отдельных экспериментах спонтанную подвижность ДК определяли через 19 ч инкубации. В этих экспериментах верхние и нижние камеры системы *ThinCerts* содержали RPMI-1640 с 10% ЭТС без хемокинов.

Для оценки экспрессии гена *CCR7* экстрагировали РНК из 10⁵ клеток с помощью набора *NucleoSpinRNA XS* (Macherey-Nagel, Германия) и оценивали количество транскриптов в одностадийной относительной количественной ОТ-ПЦР в режиме реального времени на приборе *Stratagene Mx3005P* (Agilent Technologies, США) с использованием набора *TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix Reagents kit*, праймеров и меченых проб *TaqMan gene expression assay reagents* для определения экспрессии гена *CCR7* (Hs01013469_m1) и β2-микроглобулина (*Applied Biosystems*, США). Измерения выполняли в трипликатах. Выравнивание графиков осуществляли по нормировочному красителю. Значение Ct (пороговый цикл амплификации) определяли как максимум второй производной функции накопления ДНК. Нормализацию осуществляли по уровню экспрессии гена β2-микроглобулина. Пробы нДК использовались как калибратор.

Результаты цитометрического анализа обрабатывали программой *CellQuest*, оценивая процент клеток, несущих маркер, и плотность экспрессии маркера по геометрической средней интенсивности флюоресценции окрашенных клеток. Результаты ПЦР обрабатывали с помощью программного обеспечения прибора *Stratagene Mx3005P*. Статистический анализ проводили с использованием t-теста Стьюдента.

Результаты. Для экспериментов использовали ДК, полученные из моноцитов взрослых здоровых доноров с помощью культивирования с ИЛ-4 и ГМ-КСФ. В ходе культивирования с этими цитокинами клетки утрачивали моноцитарный маркер CD14, увеличивали плотность экспрессии молекулы главного комплекса

гистосовместимости HLA-DR и приобретали экспрессию костимулирующих молекул CD80 и CD86. В результате полученные клетки имели типичный фенотип нДК: CD14-HLA-DR⁺CD80⁺CD83^{low}-CD86⁺ (рис. 1). Стимуляция нДК смесью провоспалительных цитокинов и ПГЕ₂ индуцировала созревание клеток, которое проявлялось в экспрессии маркера зрелых ДК CD83 и дополнительном повышении уровня экспрессии HLA-DR, CD80 и CD86. Такие стимулированные цитокинами клетки (ДК-ЦТК) с фенотипом типичных зрелых ДК использовали в качестве положительного контроля созревания, а нестимулированные нДК — в качестве отрицательного контроля.

Добавление в культуры нДК вакцины БЦЖ в конечной концентрации 0,2 дозы/мл вызывало созревание клеток с фенотипом, практически идентичным ДК-ЦТК (см. рис. 1). Вакцина гепатита В в концентрации

0,2 дозы/мл и ее адъювантный компонент гель ГА в эквивалентной концентрации также увеличивали экспрессию молекул HLA-DR, CD83 и CD86, однако плотность этой экспрессии была невысока и фенотип клеток соответствовал так называемым полузрелым ДК.

Созревание нДК в зрелые ДК сопровождалось экспрессией хемокиновых рецепторов, способных направлять миграцию клеток в регионарные лимфоидные органы. Так, зрелые ДК-ЦТК демонстрировали мощную экспрессию мРНК гена *CCR7*, кодирующего ключевой рецептор для миграции ДК из периферических тканей в Т-клеточные зоны дренирующих ЛУ (рис. 2). Стимуляция ДК вакциной БЦЖ и вакциной гепатита В в концентрации 0,2 дозы/мл или гелем ГА в эквивалентной концентрации также индуцировала экспрессию этого гена, однако представленность его транскриптов в клетках существенно уступала уровню

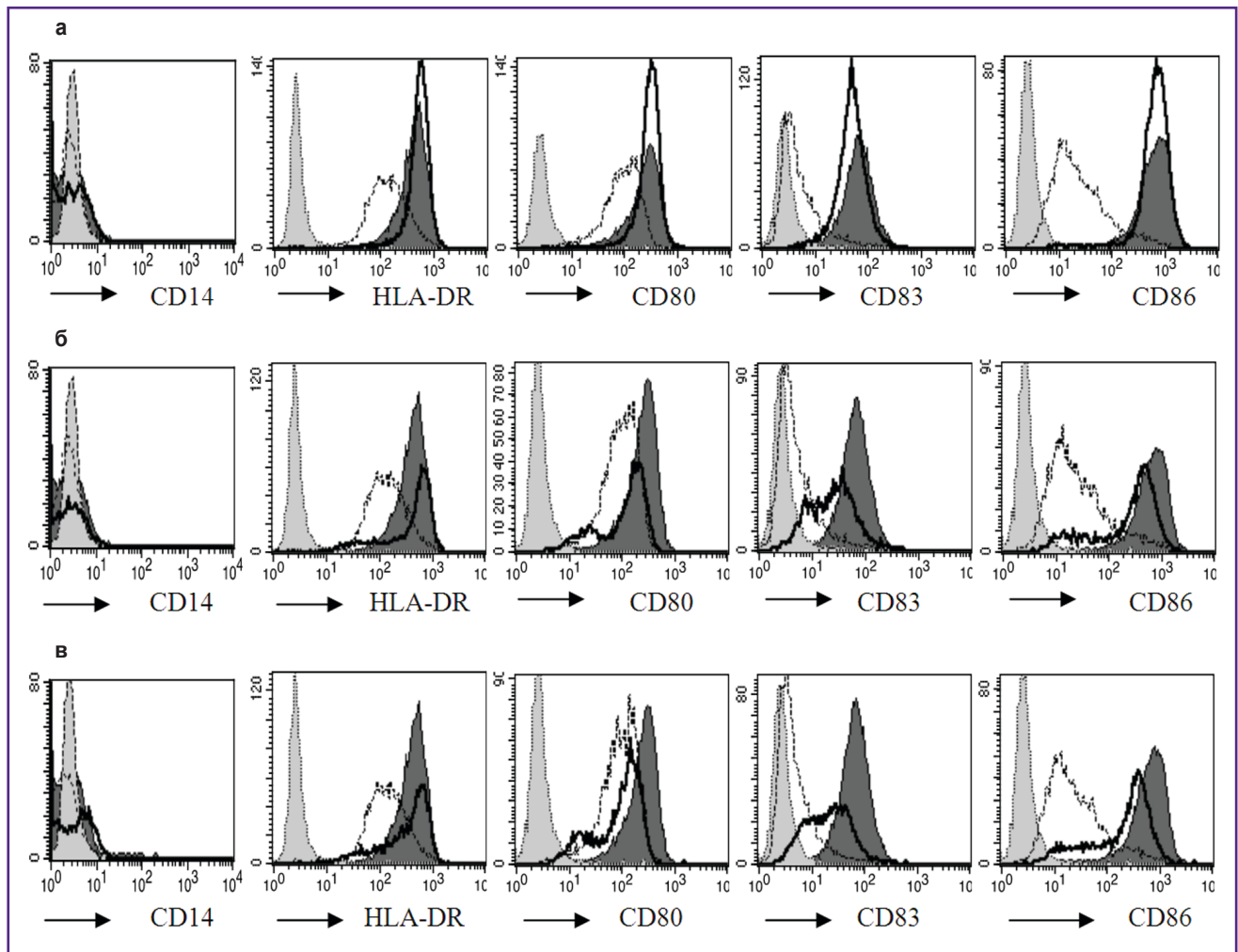


Рис. 1. Экспрессия CD14, HLA-DR, CD80, CD83 и CD86 на дендритных клетках после стимуляции вакциной БЦЖ (а), вакциной гепатита В (б) и суспензией геля гидроксида алюминия (в) представлена толстой черной линией. Экспрессия тех же молекул на нДК показана тонкой пунктирной линией, а на ДК-ЦТК — гистограммой с темно-серым полем. Светло-серая гистограмма с точечной линией — изотипический контроль. Концентрация вакцин — 0,2 дозы/мл, гидроксида алюминия — 50 мкг/мл Al³⁺. Результат репрезентативного эксперимента (n=15). На оси Y показано количество событий

ДК-ЦТК. Использование вакцин в конечной концентрации 0,02 дозы/мл не приводило к достоверному росту экспрессии гена *CCR7*.

Незрелые ДК имели крайне низкий уровень экспрессии белка *CCR7*. Рост экспрессии гена *CCR7* при созревании ДК приводил к значительному усилению экспрессии рецептора *CCR7* на наружной мембране клеток. Наибольшим уровнем экспрессии рецептора *CCR7* обладали ДК-ЦТК и ДК, обработанные вакциной гепатита В (рис. 3). ДК, инкубированные с частицами геля ГА, имели значительно меньшую экспрессию белка *CCR7*, чем ДК-ЦТК ($p=0,01$) и ДК, стимулированные вакциной гепатита В ($p=0,002$). ДК, обработанные БЦЖ, также демонстрировали меньший прирост экспрессии *CCR7* на мембране по сравнению с ДК-ЦТК ($p=0,01$) и ДК, стимулированными вакциной гепатита В ($p=0,04$).

Исследование других хемокиновых рецепторов, способных влиять на маршрут миграции зрелых ДК в лимфоидные органы, показало, что инкубация клеток с вакциной гепатита В или с гелем ГА индуцирует выраженную экспрессию рецептора *CXCR5* на ДК (см. рис. 3). Созревание ДК-ЦТК также ведет к появлению *CXCR5*⁺ клеток, но эти клетки имеют малое количество рецепторов *CXCR5* на мембране, что проявляется в слабом приросте флуоресценции. Контрольные нДК, также как и ДК, обработанные БЦЖ, практически не имеют *CXCR5* на своей поверхности. Анализ распределения хемокиновых рецепторов на клетках обнаружил коэкспрессию *CXCR5* и *CCR7* на ДК, обработанных вакциной гепатита В или ГА (см. рис. 3).

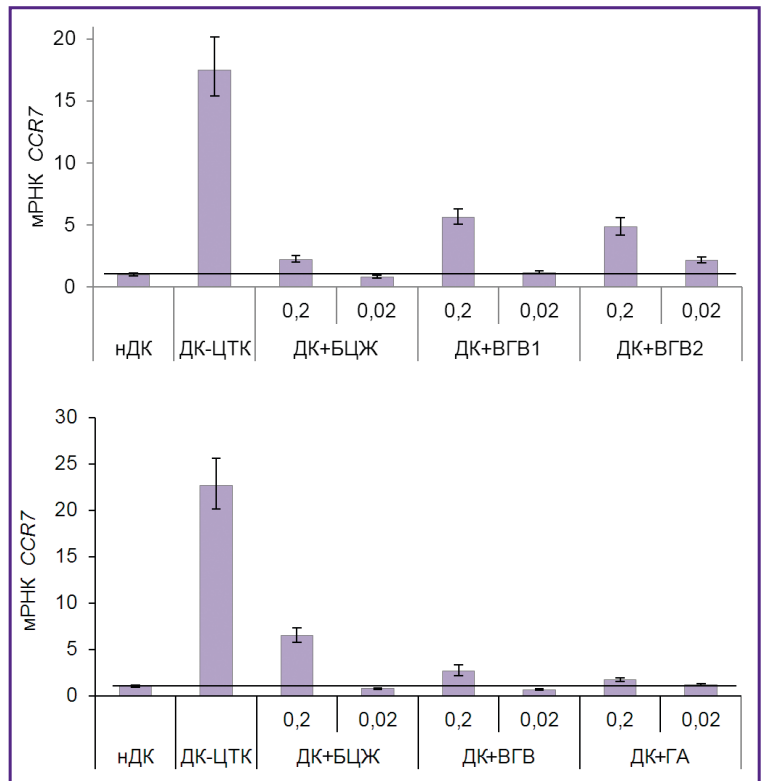
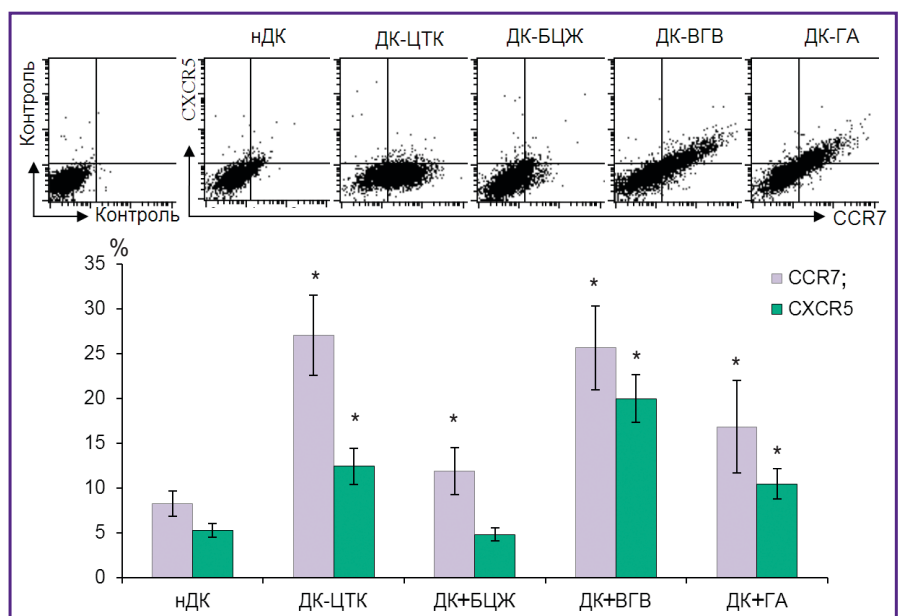


Рис. 2. Экспрессия гена *CCR7* в дендритных клетках. Клетки, инкубированные с вакциной БЦЖ, обозначены ДК+БЦЖ, с вакциной гепатита В — ДК+ВГВ, с гидроксидом алюминия — ДК+ГА. Результаты двух репрезентативных ОТ-ПЦР из пяти. Цифры над типами дендритных клеток — концентрации вакцин (дозы/мл)

В отличие от *CCR7* и *CXCR5* хемокиновый рецептор *CXCR4* присутствует на значительной части нДК (рис. 4). Стимуляция медиаторами воспаления, вакциной гепатита В или ГА индуцирует дополнительное

Рис. 3. Экспрессия *CCR7* и *CXCR5* на наружной мембране дендритных клеток после инкубации с вакцинами. *Сверху* — результат цитометрического анализа распределения хемокиновых рецепторов на клетках. *Снизу* — среднее процентное содержание *CCR7*⁺ и *CXCR5*⁺ ДК ($n=19$). * — статистически значимые различия с нДК в парном t-тесте ($p<0,05$). Обозначения типов клеток аналогичны рис. 2



увеличение количества CXCR4⁺ клеток (рис. 4, б) и ведет к росту интенсивности флюоресценции (рис. 4, в). Максимальная яркость флюоресценции наблюдается на CXCR4⁺ ДК после инкубации с вакциной гепатита В или ГА. CCR7 и CXCR5 в этих условиях преимущественно экспрессируются на ДК с высоким уровнем экспрессии CXCR4 (рис. 4, г). Вакцина БЦЖ не оказывает значимого эффекта на экспрессию CXCR4.

Функцию рецепторов CCR7 и CXCR5 оценивали по хемотаксису, индуцированному соответствующими хемокинами. Исследование проводили в двухчасовом тесте миграции клеток из камеры, содержащей среду, в камеру с раствором хемокина через поры поликарбонатного фильтра, диаметр которых был меньше размера ДК. Несмотря на то, что данный тест в качестве контроля подразумевает определение спонтанной подвижности клеток (миграцию без хемокина), для точной оценки мобильности клеток мы дополнительно

определяли спонтанную подвижность ДК в 19-часовом тесте. Показано, что ДК-ЦТК обладают как высокой спонтанной подвижностью, так и выраженной способностью к направленному CCR7-зависимому хемотаксису. В отсутствие хемокина эти клетки активно перемещались по поверхности фильтра, в результате чего почти треть их за 19 ч успевала проникнуть через поры фильтра в нижнюю камеру (рис. 5, в). Хемокин CCL21 (лиганд CCR7) значительно усиливал миграцию этих клеток, и за 2 ч инкубации в камеру с хемокином успевало мигрировать 12,8% внесенных в систему клеток (рис. 5, а), т.е. более половины всех ДК-ЦТК, экспрессировавших CCR7 (см. рис. 3).

Стимуляция вакциной БЦЖ не оказывала заметного действия на спонтанную подвижность ДК, но повышала CCR7-зависимый хемотаксис, и за 2 ч в камеру с хемокином мигрировало 4,5% клеток. Прирост хемотаксиса был статистически значимым ($p=0,015$ при

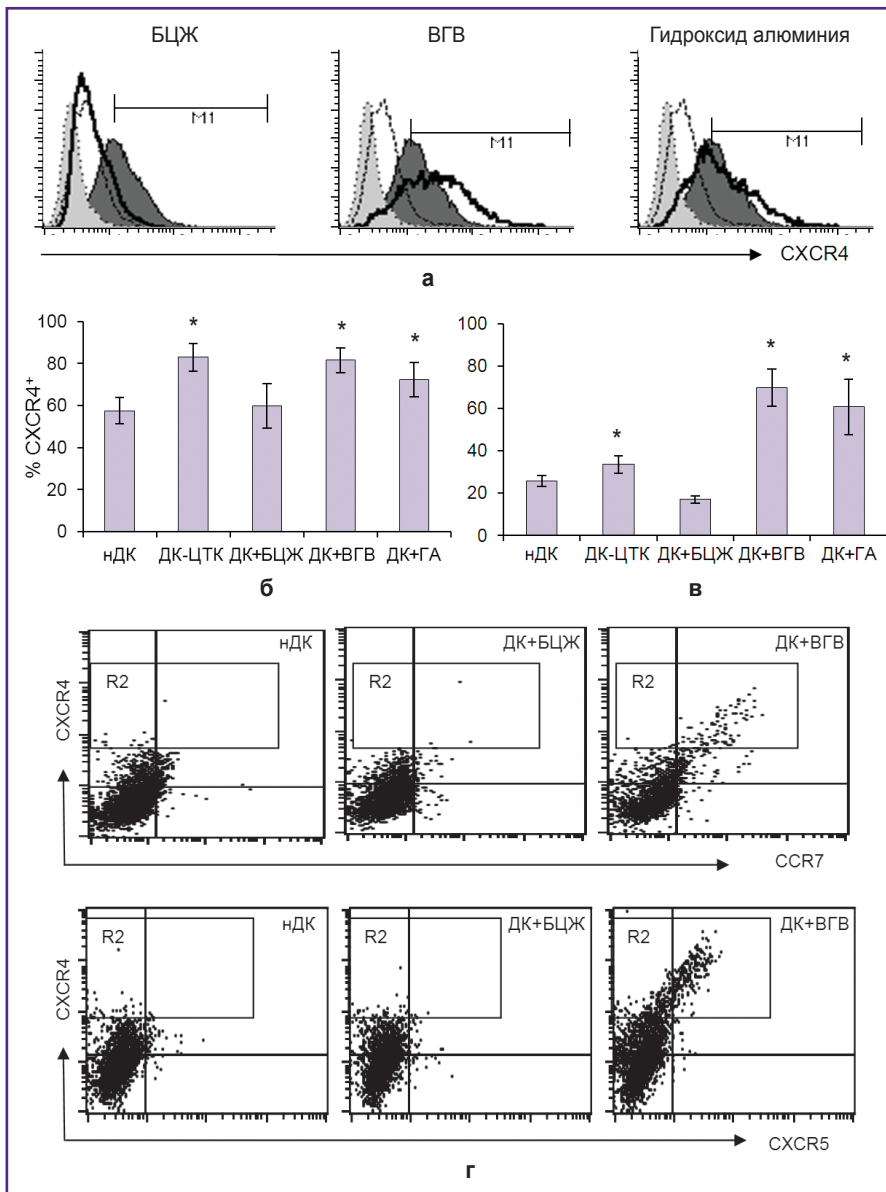


Рис. 4. Экспрессия CXCR4 на дендритных клетках: а — репрезентативный цитометрический анализ CXCR4 на ДК после стимуляции БЦЖ, вакциной гепатита В и гелем (толстая линия). Экспрессия CXCR4 также показана на контрольных нДК (тонкая пунктирная линия) и ДК-ЦТК (гистограмма с темно-серым полем). Светло-серая гистограмма с точечной линией — изотипический контроль. Диаграммы (б) и (в) показывают среднее процентное содержание CXCR4⁺ дендритных клеток взрослых и геометрическую среднюю интенсивности их флюоресценции соответственно ($n=17$); * — статистически значимые различия с нДК в парном t-тесте ($p<0,05$); г — распределение хемокиновых рецепторов на дендритных клетках. Гейт R2 выделяет клетки с высоким уровнем экспрессии CXCR4. Обозначения типов клеток аналогичны рис. 2

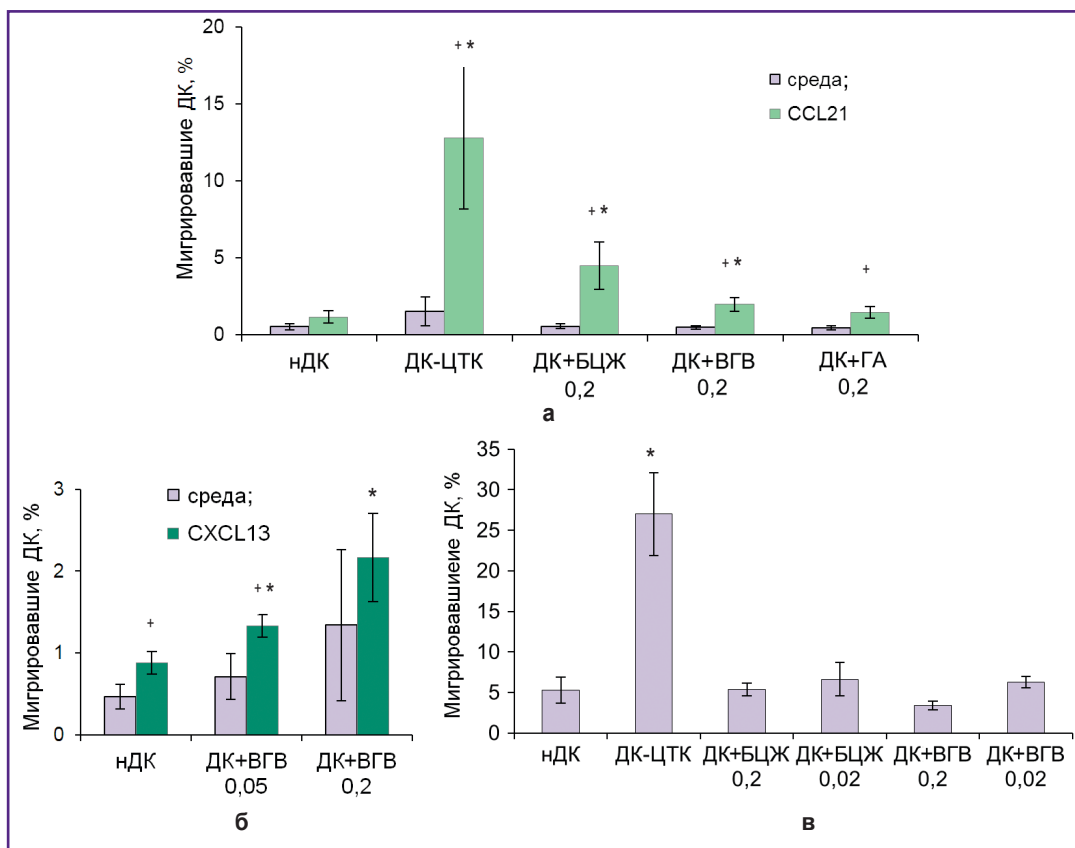


Рис. 5. Индуцированная хемокинами и спонтанная миграция дендритных клеток: а — миграционный ответ клеток на CCL21 (n=10); б — миграционный ответ на CXCL13 (n=5); в — спонтанная миграция клеток в течение 19 ч (n=7); * — статистически значимые различия значений с нДК в парном t-тесте (p<0,05); + — статистически значимые различия значений индуцированного хемокинами хемотаксиса со спонтанной миграцией соответствующего типа клеток в парном t-тесте (p<0,05). Обозначения типов клеток аналогичны рис. 2, рядом с обозначением типов клеток указана концентрация вакцины (дозы/мл)

сравнении с нДК), но существенно уступал соответствующему показателю ДК-ЦТК (p=0,025). Несмотря на низкое содержание CCR7⁺ ДК в этих культурах, инкубированных с БЦЖ, количество клеток, мигрировавших в ответ на CCL21, соответствовало 38% от CCR7⁺ ДК, т.е. от всех клеток, принципиально способных к данному типу хемотаксиса.

Обработка ДК вакциной гепатита В в концентрации 0,2 дозы/мл индуцирует достоверный, но малый прирост CCR7-зависимой миграции (рис. 5, а), несмотря на выраженную экспрессию CCR7 на обработанных клетках (рис. 3, б). За 2 ч в ответ на хемокин мигрирует менее 2% внесенных ДК или всего лишь 7,7% CCR7⁺ клеток, потенциально способных к такому хемотаксису. Этот неожиданный результат может быть обусловлен низкой подвижностью клеток, поглотивших большое количество частиц вакцины на основе геля ГА. Действительно, ДК, обработанные вакциной гепатита В, проявляют меньшую подвижность в 19-часовом тесте по сравнению со всеми типами ДК, включая нДК (см. рис. 5, в). Десятикратное снижение концентрации вакцины восстанавливает подвижность клеток

до уровня нДК, но отменяет действие на экспрессию CCR7 (см. рис. 2). По-видимому, та же причина, т.е. низкая мобильность, не позволяет ДК, нагруженным вакциной гепатита В, эффективно мигрировать в ответ на CXCL13 — хемокин, распознаваемый рецептором CXCR5. Как было указано выше, данная вакцина индуцирует значительную экспрессию CXCR5 на мембране клеток (см. рис. 3), но в миграционном тесте наблюдается лишь слабый прирост CXCR5-зависимого хемотаксиса, и в ответ на CXCL13 за 2 ч успевает мигрировать лишь 2,1% от внесенных ДК, инкубированных с 0,2 дозы/мл вакцины (рис. 5, б). Несмотря на малый масштаб, прирост CXCR5-зависимого хемотаксиса под действием вакцины гепатита В носит статистически значимый характер (для концентрации 0,05 дозы/мл p=0,013, для концентрации 0,2 дозы/мл p=0,045).

Обсуждение. Исследование действия вакцин на созревание и миграцию ДК в моделях *in vitro* показало, что вакцина БЦЖ эффективно индуцирует фенотипическое созревание ДК и вызывает умеренное усиление экспрессии гена и рецептора CCR7. Этот

хемокиновый рецептор характерен для зрелых ДК и необходим для миграции ДК из периферических тканей (например, из места введения вакцины) в сеть лимфатических сосудов и далее — в паракортекс, т.е. в Т-клеточную зону ЛУ. Как было показано ранее [15], БЦЖ эффективно увеличивает способность ДК стимулировать Т-хелперы первого типа (Тх1), необходимые для защиты от туберкулеза. В связи с этим CCR7-опосредованный путь доставки антигенов этой вакцины в Т-клеточную зону ЛУ представляется наиболее выгодным для встречи с наивными CD4⁺ Т-лимфоцитами и инструктирования их к созреванию в Тх1, поскольку индуктивная фаза такой реакции локализована в Т-клеточной зоне лимфоидных органов. Однако анализ экспрессии CCR7 и его функции (хемотаксиса) демонстрирует относительно слабое мобилизующее действие БЦЖ на CCR7-зависимую миграцию ДК по сравнению с уровнем контрольных зрелых ДК. Обнаруженная слабость стимуляции хемотаксиса ДК вакциной БЦЖ расценивается нами как фактор, ограничивающий эффективность вакцины. Кроме того, вакцина БЦЖ в отличие от смеси медиаторов воспаления не увеличивает спонтанной подвижности ДК, которая может способствовать выходу клеток из периферических тканей и активному поиску контактов с Т-лимфоцитами в паренхиме ЛУ в первые сутки после миграции [16].

Вакцина гепатита В и ее адъювантный компонент ГА индуцируют частичное фенотипическое созревание ДК, которое сопровождается ростом уровня экспрессии хемокинового рецептора CXCR4 и индукцией экспрессии CCR7 и CXCR5 на значительной части клеток. По нашему мнению, этот тип экспрессии хемокиновых рецепторов должен содействовать задержке как минимум части мигрирующих ДК в наружном слое коры ЛУ, где в фолликулах продуцируется хемокин CXCL13 [11, 12]. Кроме того, у человека в мантийной области фолликулов и межфолликулярном регионе [17], а у мышей — в темной зоне фолликулов [18] продуцируется хемокин CXCL12, который также может способствовать задержке ДК с высоким уровнем экспрессии CXCR4. Кроме того, экспрессия CXCR5 на ДК, В-клетках и созревающих Т-фолликулярных хелперах может приводить к колокализации всех этих потенциальных участников гуморального иммунного ответа на вакцину вблизи или внутри В-клеточных фолликулов, что способствует развитию гуморального иммунного ответа. В связи с этим такой маршрут доставки антигенов представляется благоприятным для вакцины, стимулирующей продукцию антител, однако недостатком вакцины гепатита В является слабое мобилизующее действие на миграцию ДК, что, по-видимому, связано со слабой подвижностью клеток после поглощения большого количества вакцины, сорбированной на частицах геля ГА.

Заключение. Туберкулезная вакцина и вакцина гепатита В индуцируют различные наборы хемокиновых рецепторов на дендритных клетках, но при этом

относительно слабо мобилизуют клетки к миграции в лимфоидные органы. Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности поиска новых адъювантных компонентов вакцин, способных усиливать направленную миграцию дендритных клеток в Т- и В-клеточные зоны лимфоидных органов, тем самым повышая эффективность доставки антигенов в зоны индукции иммунного ответа.

Финансирование исследования. Работа выполнена в рамках отраслевой научно-исследовательской программы на 2011–2015 гг. «Научные исследования и разработки с целью обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия и снижения инфекционной заболеваемости в Российской Федерации».

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Литература/References

1. Steinman R.M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 1991; 9: 271–296, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.9.1.271>.
2. Alvarez D., Vollmann E.H., von Andrian U.H. Mechanisms and consequences of dendritic cell migration. *Immunity* 2008; 29(3): 325–342, <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2008.08.006>.
3. Талаев В.Ю. Механизмы управления миграцией миелоидных дендритных клеток и клеток Лангерганса. *Иммунология* 2012; 33(2): 104–112. Talaev V.Yu. The mechanisms controlling migration of myeloid dendritic cells and langerhans cells. *Immunologiya* 2012; 33(2): 104–112.
4. Ohl L., Mohaupt M., Czeloth N., Hintzen G., Kiafard Z., Zwirner J., Blankenstein T., Henning G., Förster R. CCR7 govern skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity* 2004; 21(2): 279–288, <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2004.06.014>.
5. Johnson L.A., Jackson D.G. Cell traffic and the lymphatic endothelium. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1131: 119–133, <http://dx.doi.org/10.1196/annals.1413.011>.
6. Randolph G.J., Angeli V., Swartz M.A. Dendritic-cell trafficking to lymph node through lymphatic vessels. *Nat Rev Immunol* 2005; 5(8): 617–628, <http://dx.doi.org/10.1038/nri1670>.
7. Martín-Fontecha A., Sebastiani S., Höpken U.E., Ugucioni M., Lipp M., Lanzavecchia A., Sallusto F. Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node. Impact on T lymphocyte traffic and priming. *J Exp Med* 2003; 198(4): 615–621, <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20030448>.
8. Kabashima K., Shiraiishi N., Sugita K., Mori T., Onoue A., Kobayashi M., Sakabe J., Yoshiki R., Tamamura H., Fujii N., Inaba K., Tokura Y. CXCL12-CXCR4 engagement is required for migration of cutaneous dendritic cells. *Am J Pathol* 2007; 171(4): 1249–1257, <http://dx.doi.org/10.2353/ajpath.2007.070225>.
9. Saeki H., Wu M.T., Olsasz E., Hwang S.T. A migratory population of skin-derived dendritic cells expresses CXCR5, responds to B lymphocyte chemoattractant in vitro, and localizes to B cell zones in lymph nodes in vivo. *Eur J Immunol* 2000; 30(10): 2808–2814, [http://dx.doi.org/10.1002/1521-4141\(200010\)30:10<2808::aid-immu2808>3.0.co;2-k](http://dx.doi.org/10.1002/1521-4141(200010)30:10<2808::aid-immu2808>3.0.co;2-k).
10. Топтыгина А.П. Лимфоидный фолликул — террито-

рия иммунного ответа. *Иммунология* 2012; 33(3): 162–168. Toptygina A.P. The lymphoid follicle — the immune response zone. *Immunologiya* 2012; 33(3): 162–168.

11. Cyster J.G., Ansel K.M., Reif K., Ekland E.H., Hyman P.L., Tang H.L., Luther S.A., Ngo V.N. Follicular stromal cells and lymphocyte homing to follicles. *Immunol Rev* 2000; 176(1): 181–193, <http://dx.doi.org/10.1034/j.1600-065x.2000.00618.x>.

12. Katakai T., Suto H., Sugai M., Gonda H., Togawa A., Suematsu S., Ebisuno Y., Katagiri K., Kinashi T., Shimizu A. Organizer-like reticular stromal cell layer common to adult secondary lymphoid organs. *J Immunol* 2008; 181(9): 6189–6200, <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.181.9.6189>.

13. León B., Ballesteros-Tato A., Browning J.L., Dunn R., Randall T.D., Lund F.E. Regulation of T_H2 development by CXCR5⁺ dendritic cells and lymphotoxin-expressing B cells. *Nat Immunol* 2012; 13(7): 681–690, <http://dx.doi.org/10.1038/ni.2309>.

14. Талаев В.Ю., Плеханова М.В., Заиченко И.Е., Бабайкина О.Н. Действие вакцин на экспрессию хемокиновых рецепторов дендритными клетками новорожденных и взрослых *in vitro*. *Иммунология* 2013; 34(6): 318–323. Talayev V.Yu., Plehanova M.V., Zaichenko I.Ye., Babaykina O.N. Effect of vaccines on the expression of

chemokine receptors on dendritic cells of newborns and adults *in vitro*. *Immunologiya* 2013; 34(6): 318–323.

15. Плеханова М.В., Талаев В.Ю., Бабайкина О.Н., Заиченко И.Е., Ефимов Е.И. Действие вакцин против туберкулеза и гепатита В на фенотипические и функциональные свойства дендритных клеток новорожденных *in vitro*. *Иммунология* 2012; 33(6): 311–318. Plehanova M.V., Talayev V.Yu., Babaykina O.N., Zaichenko I.Ye., Ephimov E.I. The action of BCG and hepatitis B vaccines on phenotypic and functional properties of the newborn's dendritic cells *in vitro*. *Immunologiya* 2012; 33(6): 311–318.

16. Lindquist R.L., Shakhar G., Dudziak D., Wardemann H., Eisenreich T., Dustin M.L., Nussenzweig M.C. Visualizing dendritic cell networks *in vivo*. *Nat Immunol* 2004; 5(12): 1243–1250, <http://dx.doi.org/10.1038/ni1139>.

17. Wang C., Hillsamer P., Kim C.H. Phenotype, effector function, and tissue localization of PD-1-expressing human follicular helper T cell subsets. *BMC Immunology* 2011; 12: 53, <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2172-12-53>.

18. Allen C.D., Ansel K.M., Low C., Lesley R., Tamamura H., Fujii N., Cyster J.G. Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nat Immunol* 2004; 5(9): 943–952, <http://dx.doi.org/10.1038/ni1100>.