

© Талаев В.Ю., Светлова М.В., Заиченко И.Е., Бабайкина О.Н., Воронина Е.В., 2021
УДК 615.371, 57.021

Методы исследования дендритных клеток человека, применимые для оценки действия вакцин

В.Ю. Талаев, М.В. Светлова, И.Е. Заиченко, О.Н. Бабайкина, Е.В. Воронина

ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н.Блохиной» Роспотребнадзора,
ул. Малая Ямская, д. 71, г. Нижний Новгород, 603950, Российская Федерация

Резюме: Введение. Вакцины являются одним из наиболее действенных средств профилактики инфекционных заболеваний. Их эффективность и безопасность гарантируется исследованиями свойств вакцин как на этапе их разработки, так и в ходе обязательных доклинических и клинических испытаний каждой новой вакцины. Дополнительную информацию о механизмах действия вакцин на клетки иммунной системы человека можно получить с использованием моделей иммунных реакций *in vitro*. Цель исследования – определить применимость отдельных методов исследования дендритных клеток человека *in vitro* для оценки действия вакцин. Дендритные клетки человека являются наиболее активными антигенпрезентирующими клетками, играющими ключевую роль в запуске первичного иммунного ответа на инфекцию или вакцину. Материалы и методы. Изучали влияние вакцин на созревание дендритных клеток, их фагоцитарную активность и способность стимулировать Т-лимфоциты *in vitro*. Результаты. Апробация методов проводилась с использованием широко применяемых вакцин с известным характером действия на иммунную систему. Показано, что все использованные вакцины индуцировали экспрессию маркеров созревания дендритных клеток. При этом различные вакцины индуцировали разный набор маркеров и степень экспрессии этих молекул. Описаны количественные методы оценки фагоцитоза и стимулирующей активности дендритных клеток. Выводы. Методы оценки фагоцитоза, фенотипического созревания и функциональных свойств дендритных клеток применимы для оценки действия вакцин. По нашему мнению, эти методы могут быть использованы для исследования механизмов действия прототипов вакцин на этапе их разработки и доклинических испытаний в качестве дополнения к традиционным способам оценки иммунного ответа.

Ключевые слова: вакцины, иммунный ответ, дендритные клетки, Т-лимфоциты, цитокины, модели иммунных реакций *in vitro*.

Для цитирования: Талаев В.Ю., Светлова М.В., Заиченко И.Е., Бабайкина О.Н., Воронина Е.В. Методы исследования дендритных клеток человека, применимые для оценки действия вакцин // Здоровье населения и среда обитания. 2021. № 4 (337). С. 87–94. doi: <https://doi.org/10.35627/2219-5238/2021-337-4-87-94>

Информация об авторах:

✉ Талаев Владимир Юрьевич – д.м.н., проф. заведующий лабораторией клеточной иммунологии; e-mail: talaev@inbox.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1993-0622>.

Светлова Мария Владимировна – к.б.н., ст. науч. сотр.; e-mail: talaev@inbox.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4097-6780>.

Заиченко Ирина Евгеньевна – к.б.н., вед. науч. сотр.; e-mail: talaev@inbox.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5063-3111>.

Бабайкина Ольга Николаевна – к.м.н., ст. науч. сотр.; e-mail: talaev@inbox.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4527-6134>.

Воронина Елена Викторовна – к.б.н., науч. сотр.; e-mail: talaev@inbox.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1801-9693>.

Methods of Studying Human Dendritic Cells Applicable to Assessing Vaccine Efficacy

V.Yu. Talayev, M.V. Svetlova, I.Y. Zaichenko, O.N. Babaykina, E.V. Voronina

Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology,
71 Malaya Yamskaya Street, Nizhny Novgorod, 603950, Russian Federation

Summary. Introduction: Vaccines are one of the most effective means of preventing infectious diseases. Their effectiveness and safety are guaranteed by studies of vaccine properties, during their development and during the mandatory preclinical and clinical trials of each new vaccine. Additional information on the mechanisms of vaccine action on human immune system cells can be obtained using *in vitro* immune response models. The objective of the study was to determine applicability of certain methods of studying human dendritic cells *in vitro* to assessing the effect of vaccines. Dendritic cells are the most active antigen presenting cells, which play a key role in triggering a primary immune response to an infection or vaccine. Materials and methods: We studied the effect of vaccines on the maturation of dendritic cells, their phagocytic activity and the ability to stimulate T-lymphocytes *in vitro*. Results: To test the methods, we used vaccines with a known pattern of action on the immune system. All the vaccines induced the expression of dendritic cell maturation markers. At the same time, different vaccines induced a different set of markers and the degree of expression of these molecules. Quantitative methods for assessing phagocytosis and stimulating activity of dendritic cells are described. Conclusion: Methods for evaluation of phagocytosis, phenotypic maturation and functional properties of dendritic cells have been shown to be useful for evaluation of vaccine action. In our opinion, these methods, as a complement to traditional methods for evaluating the immune response, can be used to investigate the action of prototype vaccines at the stage of their development and preclinical trials.

Keywords: vaccines, immune response, dendritic cells, T-lymphocytes, cytokines, models of immune responses *in vitro*.

For citation: Talayev VYu, Svetlova MV, Zaichenko IY, Babaykina ON, Voronina EV. Methods of studying human dendritic cells applicable to assessing vaccine efficacy. *Zdorov'e Naseleniya i Sreda Obitaniya*. 2021; (4(337)):87–94. (In Russian). doi: <https://doi.org/10.35627/2219-5238/2021-337-4-87-94>

Author information:

✉ Vladimir Yu. Talayev, D.M.Sc., Professor, Head of the Laboratory of Cellular Immunology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology; e-mail: talaev@inbox.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1993-0622>.

Maria V. Svetlova, Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, Laboratory of Cellular Immunology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology; e-mail: talaev@inbox.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4097-6780>.

Irina Y. Zaichenko, Candidate of Medical Sciences, Leading Researcher, Laboratory of Cellular Immunology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology; e-mail: talaev@inbox.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5063-3111>.

Olga N. Babaykina, Candidate of Medical Sciences, Senior Researcher, Laboratory of Cellular Immunology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology; e-mail: talaev@inbox.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4527-6134>.

Elena V. Voronina, Candidate of Biological Sciences, Researcher, Laboratory of Cellular Immunology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology; e-mail: talaev@inbox.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1801-9693>.

Введение. Одним из наиболее эффективных и безопасных средств профилактики инфекционных заболеваний человека является вакцинация. Внедрение массовой вакцинации в мировую медицинскую практику привело к искоренению оспы и превращению многих широко распространенных и опасных инфекций в редко встречающиеся заболевания. Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии за время своего существования внес существенный вклад в дело вакцинопрофилактики в нашей стране. В 30-е годы и во время Великой Отечественной войны институт на своей базе создал производственные мощности и внедрил в производство вакцины и сыворотки для профилактики бешенства, дифтерии, брюшного тифа и дизентерии. Знаменательно, что в 1952 году институт получил название «Горьковский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток». Под руководством Ирины Николаевны Блохиной, вступившей в должность директора в 1955 году, институт продолжал совершенствование производства иммунопрофилактических препаратов. В это время были освоены новые технологии культивирования вакцинных штаммов, под руководством Ирины Николаевны были созданы и внедрены в производство и медицинскую практику новые препараты для пассивной иммунопрофилактики стафилококковой инфекции, а также иммуноглобулин для внутривенного введения, который эффективно используется как для лечения иммунодефицитов, так и для профилактики тяжелых гнойно-септических заболеваний [1].

Вакцинопрофилактика, как, впрочем, любое направление медицины, требует постоянного развития. До сих пор существуют широко распространенные и социально значимые инфекции, против которых еще не созданы вакцины. Эволюция микромира ведет к появлению новых штаммов микроорганизмов, несущих существенную угрозу человечеству, таких как коронавирус SARS-CoV2 [2]. Кроме того, генетическая изменчивость инфекционных агентов может создавать пеструю картину географического распространения множества различных штаммов микроорганизмов, характерную, например, для энтеровирусов и ротавирусов [3, 4]. Эти особенности распределения штаммов по территориям планеты затрудняют создание вакцин для глобальной профилактики и требуют разработки вариантов вакцин с наибольшей ожидаемой локальной эффективностью. С другой стороны, успехи современной науки, в первую очередь молекулярной биологии, позволяют существенно усовершенствовать технологию производства вакцин и значительно ускорить разработку принципиально новых иммунобиологических препаратов. Однако вне зависимости от использования традиционных или недавно разработанных технологий производства любая новая вакцина перед внедрением в практику должна пройти длительный, трудоемкий и дорогостоящий цикл доклинических и клинических испытаний для доказательства эффективности и безопасности вакцины. Доклинические испытания включают эксперименты на животных, а также в моделях *in vitro*, причем актуальность оценки иммунных

реакций клеток человека на вакцину *in vitro* существенно возрастает при испытании вакцин против антропонозных инфекций, не имеющих адекватных моделей заболеваний у лабораторных животных. Кроме того, экспериментальные модели иммунных реакций *in vitro* могут быть полезны на стадии разработки для выявления возможных недостатков действия прототипов вакцин на отдельные клетки иммунной системы и поиска наиболее эффективного варианта дизайна разрабатываемой вакцины. В данной статье приведен обзор методов, применимых для оценки действия вакцин и адъювантов на дендритные клетки (ДК) человека *in vitro*. По нашему мнению, эти методы могут быть использованы как на этапе разработки вакцин, так и на этапе доклинических испытаний, поскольку являются полезным дополнением других иммунологических методов.

Миелоидные, или классические, ДК — высокоспециализированные антигенпрезентирующие клетки, специфическая функция которых заключается в сборе разнообразного органического материала, потенциально содержащего антигены инфекционных агентов, его частичное ферментативное разрушение и представление этого материала Т-лимфоцитам, а также стимуляция распознавших антиген Т-лимфоцитов для обеспечения их выживания и функционального созревания [5–8]. Способность к стимуляции Т-лимфоцитов у ДК проявляется существенно сильнее, чем у других антигенпрезентирующих клеток, что дает им уникальную способность эффективно вовлекать в иммунный ответ наивные Т-лимфоциты, т. е. клетки, не контактировавшие ранее с антигеном [9]. Соответственно, ДК критически необходимы для индукции первичного иммунного ответа, в частности для запуска иммунного ответа на вакцину. Жизненный цикл ДК разделен на отдельные фазы. В первой фазе т.н. незрелые ДК (нДК) активно собирают антигенный материал [9–12]. При распознавании характерных микробных молекул (молекулярных паттернов патогенов), а также провоспалительных цитокинов и молекул, сигнализирующих о повреждении клеток, ДК проходят этап функционального созревания. В ходе созревания они экспрессируют собранный антигенный материал на молекулах главного комплекса гистосовместимости, увеличивают экспрессию молекул для стимуляции Т-лимфоцитов [9, 13–19] и мигрируют в лимфоидные органы для контакта с Т-лимфоцитами [20–22]. Наконец, на заключительной фазе жизненного цикла зрелые ДК (зДК) представляют антигены Т-лимфоцитам и стимулируют их созревание в различные типы Т-клеток эффекторов и Т-клеток иммунологической памяти [23–25]. Описанные ниже методы позволяют оценить действие вакцин на различные этапы функционирования ДК человека.

Цель исследования — определить применимость отдельных методов исследования ДК человека *in vitro* для оценки действия вакцин.

Материалы и методы. В работе использовались туберкулезная вакцина (БЦЖ) «Микроген» (НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи), рекомбинантная дрожжевая вакцина против гепатита В (ЗАО НПК «Комбиотех»), полисахаридная менингококковая

А+С вакцина (Sanofi Pasteur), вакцина «Гриппол Квадринагент» (НПО «Петровакс»), а также модельный микроорганизм *Bacillus cereus* штамм IP5832.

Получение незрелых ДК. Незрелые ДК получали из моноцитов венозной крови взрослых практически здоровых доноров с помощью культивирования моноцитов с интерлейкином-4 (ИЛ-4) и гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором (ГМ-КСФ), как это описано ранее [26]. Для этого отбирали пробы венозной крови объемом 18 мл в вакуутайнеры с гепарином натрия и стерильно выделяли моноклеарные клетки периферической крови (МНПК) с помощью центрифугирования над слоем Diacoll 1077 (ООО «ДИА-М»). МНПК дважды отмывали средой DME, подсчитывали и готовили суспензию с концентрацией 4×10^6 клеток/мл в полной питательной среде (ППС) следующего состава: среда RPMI-1640 (Gibco) с 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (РАА) и 292 мг/л L-глутамин (ПанЭко). Суспензию вносили в лунки 24-луночного планшета (Costar) по 1 мл на лунку или в лунки 48-луночного планшета — по 0,5 мл на 1 лунку. Планшеты инкубировали при $+37^\circ\text{C}$ в атмосфере 5 % CO_2 и через 2 часа собирали неприлипшие клетки (лимфоциты), которые использовали для засева смешанных культур (см. ниже), тогда как прилипшие клетки (моноциты) культивировали в ППС с 20 нг/мл ИЛ-4 и 100 нг/мл ГМ-КСФ (SCI-store.ru) для получения ДК. ИЛ-4 и ГМ-КСФ повторно добавляли в культуры в той же концентрации на 3-й день культивирования. На 7-й день полученные из моноцитов незрелые ДК использовали для оценки их взаимодействия с вакцинами или модельными микроорганизмами.

Оценка фагоцитоза. Для отработки способа количественной оценки фагоцитоза использовали модельный микроорганизм *B. cereus*. Для флуоресцентного мечения *B. cereus* собирали из трех идентичных односточных культур, выращенных на скошенном МПА, и готовили суспензию микроорганизмов на забуференном фосфатами физиологическом растворе (PBS). Бактериальные клетки дважды отмывали PBS при 4500 об./мин в течение 5 мин. Затем концентрацию микроорганизмов определяли по стандарту мутности МакФарланда, доводили до 10^8 клеток/мл, смешивали с равным объемом 10 мкМ раствора CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester, eBioscience) в PBS и инкубировали в течение 30 мин при $+37^\circ\text{C}$. Затем меченые бациллы трижды отмывали от излишка метки и инактивировали с помощью автоклавирования при 1,2 атм в течение 7 мин. Микроорганизмы осаждали и готовили суспензии бактерий с концентрациями от 10^3 до 10^9 микроорганизмов/мл в забуференном фосфатами физиологическом растворе (PBS).

Незрелые ДК собирали и пересевали в концентрации 10^5 клеток/мл в лунки 96-луночного планшета в свежей ППС. Флуоресцентно меченые микроорганизмы вносили в лунки в конечной концентрации от 10^2 до 10^8 микроорганизмов/мл и инкубировали при $+37^\circ\text{C}$ в атмосфере 5 % CO_2 . Контролем служили лунки с дендритными клетками без микроорганизмов. Через 2 ч клетки собирали, осаждали и каждую пробу

ресуспендировали в 200 мкл PBS с 0,09 % азида натрия. Пробы анализировали на лазерном проточном цитофлуориметре FACSCalibur (BD Biosciences). С помощью программы CellQuest (BD Biosciences) оценивали два параметра: количество флуоресцирующих ДК и геометрическую среднюю интенсивность флуоресценции (GMFI) дендритных клеток, поглотивших бактерии.

Стимуляция дендритных клеток вакцинами. Незрелые ДК инкубировали в ППС при $+37^\circ\text{C}$ в атмосфере 5 % CO_2 в течение 48 ч с вакцинами в концентрациях от 0,025 до 0,2 дозы в мл. Негативным контролем являлись нДК, инкубированные 48 ч в ППС без стимуляторов. Положительным контролем являлись зДК, созревание которых было индуцировано 48-часовой инкубацией в ППС со смесью следующих провоспалительных медиаторов: ИЛ-1 β (конечная концентрация 25 нг/мл), ИЛ-6 (25 нг/мл), фактор некроза опухоли- α (50 нг/мл) и простагландин E2 (1 мкг/мл). После инкубации ДК собирали из культур, подсчитывали и однократно отмывали центрифугированием при 1200 об./мин в течение 10 мин. Для оценки фенотипа ДК ресуспендировали в PBS с 0,09 % азида натрия из расчета 2×10^5 клеток в объеме 50 мкл на одну пробу для проточной цитометрии. Для оценки функциональных свойств ДК ресуспендировали в ППС.

Анализ фенотипа дендритных клеток. Для окрашивания ДК использовали моноклональные антитела к HLA-DR, CD14 («Сорбент»), CD80, CD83, CD86, ICOSL, CCR5, CCR7, CXCR5 (eBioscience). Антитела добавляли в количестве, рекомендованном производителями, к пробам клеток объемом 50 мкл и инкубировали 20 мин при $+4^\circ\text{C}$. Затем клетки проб отмывали и ресуспендировали в PBS с 1 % параформальдегида. Цитометрический анализ выполняли на лазерном проточном цитофлуориметре FACSCalibur, гейтируя ДК в соответствии с профилями прямого и бокового светорассеяния.

Смешанная культура лимфоцитов и дендритных клеток. В качестве клеток, отвечающих на стимуляцию, использовали лимфоциты, которые выделяли как не прилипающие к пластику МНПК (см. выше). Из лимфоцитов готовили суспензию на ППС с концентрацией 10^6 клеток/мл и засевали в лунки 96-луночного планшета по 200 мкл (2×10^5 клеток) на лунку. В качестве клеток, стимулирующих смешанные культуры, использовали аллогенные ДК, инкубированные с вакцинами, а также нДК и зДК. Из собранных проб ДК готовили суспензии с концентрацией 4×10^5 клеток/мл на ППС. Каждую из полученных суспензий ДК вносили в лунки по 10 или 20 мкл. Таким образом, ДК вносились в лунки в количестве 2 или 4 % от числа лимфоцитов. Лунки без ДК использовались в качестве контрольных. Каждый вариант смешанной культуры засеивался в трех повторах. Объем во всех лунках доводился ППС до 220 мкл. Культуры инкубировали трое суток при $+37^\circ\text{C}$ в атмосфере 5 % CO_2 . Затем клетки в лунках осаждали центрифугированием планшетов и отбирали пробы надосадков для определения содержания цитокинов с помощью ИФА. Анализ концентрации интерферона- γ (ИНФ- γ), ИЛ-17A и ИЛ-5 в надосадках из

смешанных культур проводили с помощью набора «ИНФ-гамма-ИФА-Бест» («Вектор-Бест»), набора реактивов «ИФА-ИЛ-17А» («Цитокин») и набора для определения ИЛ-5 («R&D») соответственно. Анализ проводили в соответствии с инструкциями производителей. Результаты выражали в пг/мл.

Все данные представлены как $M \pm m$. Статистический анализ выполнен с помощью парного *t*-теста с поправкой Бонферрони.

Результаты и обсуждение. В нашем организме классические ДК представлены как минимум двумя субпопуляциями и несколькими подгруппами ДК, специфичными для отдельных тканей. У человека основными субпопуляциями ДК являются CD1c⁺ ДК, обладающие относительно универсальными свойствами, и «перекрестно презентующие» CD141⁺ ДК, обладающие повышенной способностью вовлекать цитотоксические CD8⁺ Т-лимфоциты в иммунный ответ на вирусные инфекции [27, 28]. В соответствии с этим для оценки действия вакцин на ДК человека было бы идеально использовать клетки этих субпопуляций, созревшие в естественных условиях организма и выделенные в чистые культуры с помощью магнитной сепарации и клеточного сортирования. Однако большинство ДК рассеяно в тканях различных лимфоидных и нелимфоидных органов, и основной путь их миграции протекает через систему лимфатических сосудов. Получение этих тканей человека для целей исследования травматично и небезопасно для доноров. В то же время в периферической крови — наиболее доступном материале для выделения клеток иммунной системы человека — ДК содержатся в чрезвычайно малом количестве, причем выделение этой минорной группы клеток сопровождается значительными потерями численности. По нашему опыту, из венозной крови взрослого здорового человека с помощью магнитной сепарации удается выделить в среднем $1,50 \pm 0,52$ тыс. классических ДК из 1 мл, из которых $88,75 \pm 1,12$ % являются CD1c⁺ ДК, а $9,47 \pm 1,27$ % составляют группу CD141⁺ ДК. Очевидно, что это количество клеток недостаточно для выполнения экспериментов *in vitro*, направленных на сравнение действия контрольных и нескольких исследуемых объектов (например, прототипов вакцин) на разнообразные фенотипические и функциональные характеристики ДК. В связи с этим для оценки действия вакцин на ДК человека представляется целесообразным использовать традиционный метод генерации ДК из моноцитов периферической крови в условиях *in vitro*, который позволяет получить относительно большое количество ДК из малого количества крови. При необходимости отдельные ключевые результаты, полученные на моноцитарных ДК, можно верифицировать с использованием ДК, созревших в естественных условиях организма.

В данной работе использованы нДК, полученные из моноцитов с помощью культивирования с ИЛ-4 и ГМ-КСФ в течение 7 суток. Используя этот метод, мы получали в среднем $92,3 \pm 11,4$ тысячи нДК из 1 мл периферической крови взрослых здоровых доноров. Полученные нДК обладали характерным фенотипом HLA-DR⁺CD14⁺CD80⁺CD83^{low}. Морфология клеток была также типична для моноцитарных нДК:

крупные округлые клетки с небольшим количеством коротких отростков, умеренной адгезивностью к культуральной поверхности и склонностью к объединению в кластеры.

Важнейшей функцией любых антигенпрезентирующих клеток, включая ДК, является сбор антигенного материала. Реализацию этой функции по отношению к вакцинам можно оценить с помощью введения в частицы вакцины флуоресцентной метки, инкубации меченого вакцинного материала с нДК и последующей количественной оценки накопления метки в ДК. Для мечения штаммов бактерий, которые планируется использовать для получения живых или инактивированных вакцин, можно использовать реагент CFSE. Этот исходно нефлуоресцирующий реагент хорошо проникает внутрь живых бактериальных клеток, приобретает сильные флуоресцентные свойства под действием внутриклеточных эстераз и прочно связывается с цитоплазматическими белками. После мечения бактериальные клетки следует инактивировать для того, чтобы прекратить размножение бактерий, которое с каждым делением будет уменьшать флуоресценцию бактерий. Затем следует подготовить суспензии с различной концентрацией меченых бактериальных клеток и добавить их в культуры нДК. После инкубации дендритные клетки собирают и анализируют на лазерном проточном цитофлуориметре, определяя долю флуоресцирующих клеток (т. е. клеток, поглотивших бактериальный материал) и среднюю геометрическую интенсивности их флуоресценции. Последний параметр зависит от количества флуоресцентного материала, накопленного каждой дендритной клеткой при фагоцитозе. Репрезентативный результат анализа фагоцитоза флуоресцентно меченого модельного микроорганизма (непатогенного комменсала *V. cereus*) дендритными клетками человека представлен на рис. 1. Наложение графиков флуоресценции наглядно демонстрирует рост количества поглотивших бактерии ДК и интенсивности их флуоресценции по мере увеличения концентрации бактерий в культуре, что проявляется в увеличении правого плеча кривой и сдвиге этого плеча вправо. Дозозависимый рост как количества ДК, успешно фагоцитировавших бактерии, так и количества флуоресцентного материала, поглощенного каждой клеткой, наблюдается в интервале концентраций от 10^5 до 10^7 бактерий/мл.

После поглощения антигенов нДК должна запустить процесс созревания, чтобы перейти к следующей фазе своего функционирования — фазе презентации собранных антигенов и стимуляции Т-лимфоцитов. Информативным и чувствительным способом оценки действия вакцин и их компонентов на созревание ДК является исследование набора мембранных молекул, ассоциированных с функцией зрелых ДК. Для отработки этого метода мы инкубировали нДК с различными вакцинами в течение 2 суток, а затем с помощью лазерной проточной цитофлуориметрии оценивали экспрессию следующих молекул: молекулы главного комплекса гистосовместимости HLA-DR, участвующей в презентации антигенов; молекул CD80 и CD86, отвечающих за дополнительную стимуляцию (ко-стимуляцию) Т-лимфоцитов; молекулы

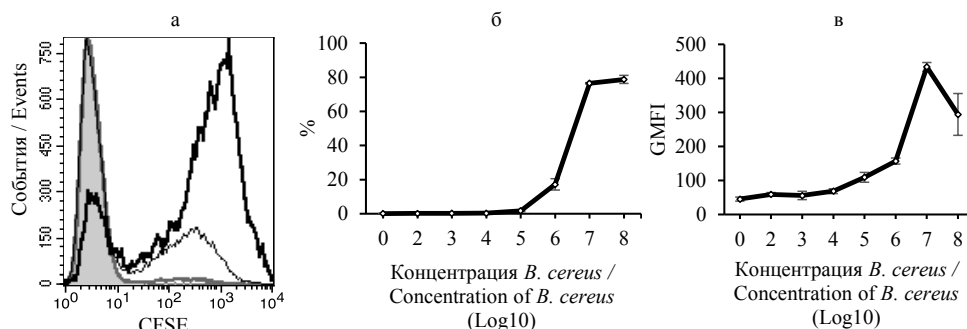


Рис. 1. Оценка фагоцитоза *B. cereus*, меченого CFSE, незрелыми ДК. Репрезентативный результат проточной цитофлуориметрии (а): гистограмма с серым полем — контрольные нДК без микроорганизмов; толстая серая линия, тонкая черная линия и толстая черная линия — нДК, инкубированные с 10⁵, 10⁶ и 10⁷ бактерий/мл соответственно. Дозовая зависимость количества ДК (%), поглотивших микроорганизм (б), и интенсивности флуоресценции этих ДК (в) от концентрации микроорганизмов

Fig. 1. Phagocytosis by immature DCs of CFSE-labeled *B. cereus*. A representative result of flow cytometry (a): histogram with a gray field — control nDCs without microorganisms, thick gray line, thin black line and thick black line — nDCs incubated with 10⁵, 10⁶, and 10⁷ bacteria/ml, respectively. Dose dependence of the amount of DCs (%) that have captured the microorganism (b) and the fluorescence intensity of these DCs (c) on the concentration of the microorganism

CD83, которая также обладает стимулирующими свойствами и является маркером ЗДК; ко-стимулирующей молекулы ICOSL, преимущественно участвующей в индукции гуморального иммунного ответа; хемокиновых рецепторов CXCR5 и CCR7, отвечающих за миграцию клеток в В- и Т-клеточные зоны регионарных лимфатических узлов соответственно, а также хемокинового рецептора CCR5, участвующего в миграции ДК в зону воспаления. Для контроля чистоты ДК оценивали экспрессию моноцитарного маркера CD14, который утрачивается при созревании моноцитов в нДК и не появляется при их дальнейшем созревании в ЗДК.

На первом этапе экспериментов мы определили концентрации вакцин, вызывающие фенотипическое созревание нДК. Оказалось, что различные вакцины индуцируют достоверный прирост экспрессии CD83 и CD86 на ДК при одинаковой концентрации вакцин в культуре — 0,2 дозы/мл, тогда как концентрация 0,05 дозы/мл вызывает незначительные и недостоверные изменения экспрессии этих молекул (рис. 2). В дальнейшем для оценки созревания ДК мы использовали концентрацию вакцин 0,2 дозы/мл.

Затем мы оценили действие на созревание ДК вакцин различных типов: живой вакцины БЦЖ, полисахаридной менингококковой вакцины, вакцины против гепатита В, содержащей адъювант алюминия гидроксид (АлГО), и

вакцины против гриппа «Гриполл квадριвалент», содержащей адъювант полиоксидоний (азоксимера бромид). При оценке экспрессии каждого маркера ДК оценивали 2 параметра: долю клеток, несущих маркер, и среднюю геометрическую интенсивности флуоресценции, которая зависит от среднего количества молекулы-маркера на одной клетке. В качестве негативного контроля были использованы нДК, культивированные без вакцин и стимуляторов созревания. Позитивным контролем созревания служили зрелые ДК, созревание которых было индуцировано смесью провоспалительных цитокинов и простагландина Е2. Пример действия различных типов вакцин на долю ДК, несущих маркеры, приведен на рис. 3, а действия вакцин на средние показатели интенсивности флуоресценции — на рис. 4. Необходимо отметить, что эти примеры приведены не для сравнения использованных вакцин, направленных на профилактику различных инфекций и индуцирующих разные типы иммунного ответа, а лишь для демонстрации различных результатов, которые можно получить с помощью анализа фенотипического созревания ДК.

Все вакцины вызвали определенные признаки созревания ДК, однако набор этих признаков и степень их выраженности существенно различались. Так, вакцина БЦЖ, защитные свойства которой преимущественно обеспечиваются клеточным иммунным ответом

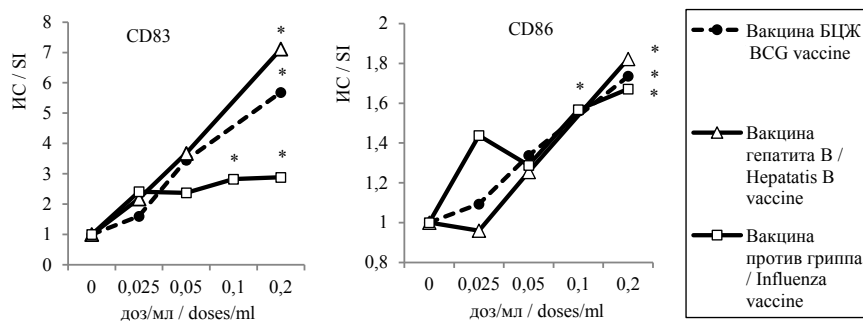


Рис. 2. Дозовая зависимость экспрессии CD83 и CD86 от концентрации вакцин в культурах ДК (доз/мл). Индекс стимуляции (ИС) — отношение доли несущих маркер ДК в культуре с вакциной к соответствующему параметру контрольной культуры нДК без вакцины. Вакцины указаны в легенде.

Fig. 2. Dose dependence of CD83 and CD86 expression on vaccine concentration in cultures of DCs (doses/ml). The stimulation index (SI) is the ratio of the proportion of DCs carrying the marker in the culture with vaccine to the corresponding parameter of the control culture of iDCs without vaccine. Vaccines are listed in the legend. * — significant difference from control iDCs (p < 0.05).

[29], продемонстрировала сильное стимулирующее действие на созревание ДК. В культуре ДК эта вакцина увеличивала долю $CD83^+$ и $CD86^+$ клеток (рис. 3а), а также интенсивность флуоресценции окрашенных молекул HLA-DR, CD80 CD83 и CD86 (рис. 4а) до уровней зрелых ДК положительного контроля. Кроме того, БЦЖ индуцировала рост экспрессии хемокинового рецептора CCR7 для миграции ДК в Т-клеточные зоны лимфатических узлов. В то же время БЦЖ подавляла экспрессию ICOSL (рис. 3а), что, по нашему мнению, не является недостатком вакцины, стимулирующей клеточный иммунный ответ. Полисахаридная менингококковая вакцина оказывала слабое действие на созревание ДК. Она увеличивала лишь плотность экспрессии HLA-DR (рис. 4б) и долю клеток, несущих CD83 (рис. 3б). Слабое действие этой вакцины на ДК мы связываем с особенностью полисахаридных антигенов менингококка, стимулирующих гуморальный (преимущественно Т-независимый) ответ. Вакцина против гепатита В, как и другие вакцины, содержащие адъювант гидроксид алюминия, эффективно стимулирует Т-зависимый гуморальный иммунный ответ [30]. В культуре ДК эта вакцина индуцировала выраженные признаки созревания клеток, увеличивая экспрессию молекул HLA-DR, CD83 и CD86, а

также хемокиновых рецепторов CCR7 и CXCR5 (рис. 3в и 4в). Стимулирующее действие этой вакцины на ДК практически полностью обеспечивается входящим в его состав гидроксидом алюминия, поскольку этот адъювант в концентрации, эквивалентной его содержанию в вакцине, индуцирует идентичные изменения фенотипа ДК, за исключением индукции CCR7. Следует отметить, что прирост интенсивности флуоресценции HLA-DR, CD83 и CD86, вызванный вакциной против гепатита В или ее адъювантом, был относительно небольшим, в результате уровень флуоресценции не достигал показателей зрелых ДК положительного контроля. В целом сходные изменения фенотипа ДК индуцировала вакцина против гриппа, также стимулирующая Т-зависимый гуморальный иммунный ответ [31]. Внесение этой вакцины в культуры нДК вызывало умеренное увеличение экспрессии молекул HLA-DR, CD80, CD83, CD86 и ICOSL (рис. 3г и 4г).

Следующим этапом функционирования ДК является презентация собранных антигенов Т-лимфоцитам и стимуляция их функционального созревания. В результате созревания наивные $CD8^+$ Т-лимфоциты, распознавшие антиген на ДК, приобретают цитотоксические свойства, а наивные $CD4^+$ Т-лимфоциты дифференцируются в один из типов зрелых Т-хелперов,

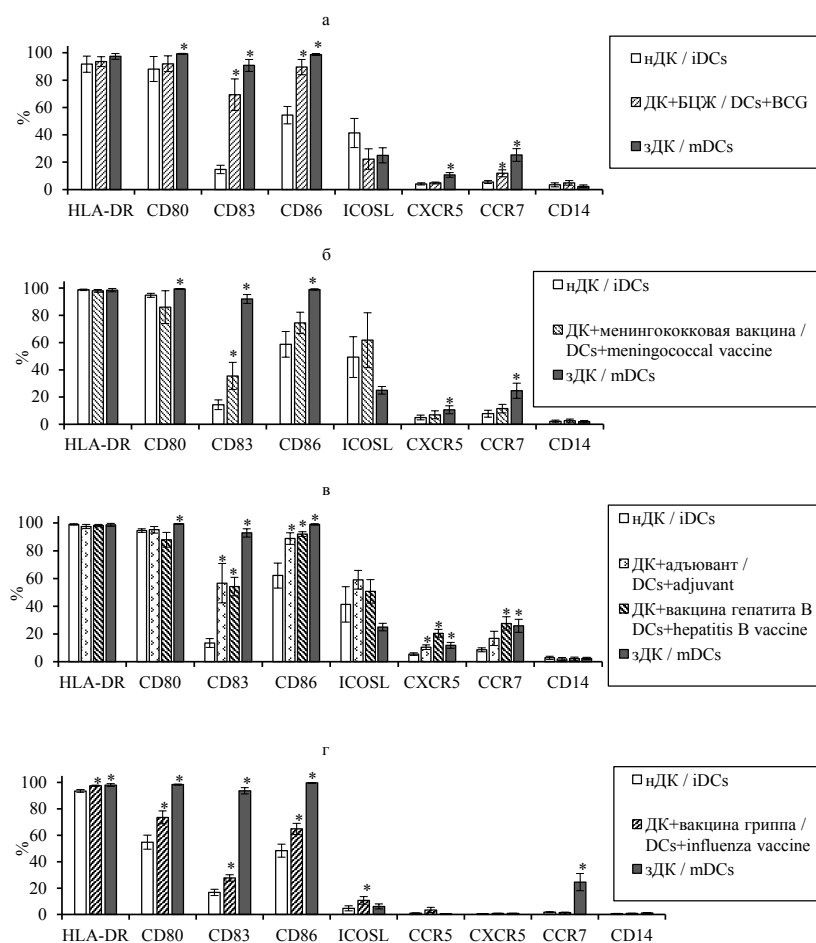


Рис. 3. Действие вакцин на экспрессию мембранных молекул ДК. Концентрация вакцин — 0,2 дозы/мл.

По оси X — названия молекул, оси Y — доля клеток, экспрессирующих молекулу.

Тип культур ДК обозначен в легендах. * — достоверное отличие от нДК (p < 0,05)

Fig. 3. The effect of vaccines on the expression of DC membrane molecules. The concentration of vaccines is 0.2 doses/ml. The X-axis shows the names of the molecules, the Y-axis shows the proportion of cells expressing the molecule. The type of DC cultures is specified in the legends. * — significant difference from iDCs (p < 0.05)

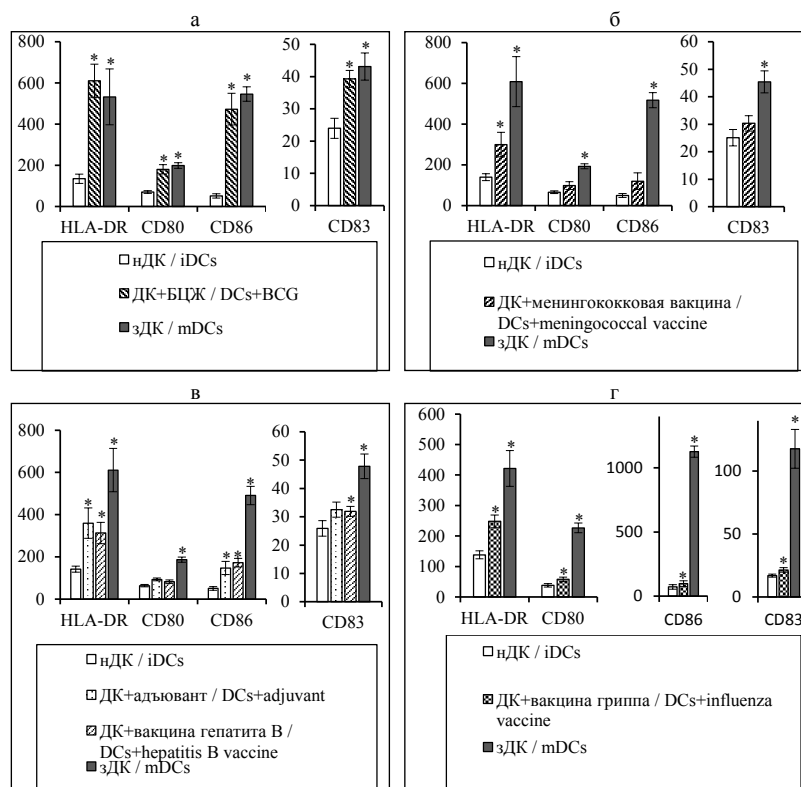


Рис. 4. Действие вакцин на интенсивность флуоресценции окрашенных мембранных молекул ДК. Концентрация вакцин — 0,2 дозы/мл. По оси X — названия молекул, оси Y — интенсивность флуоресценции (GMFI). Тип ДК обозначен в легендах. * — достоверное отличие от нДК ($p < 0,05$)

Fig. 4. The effect of vaccines on the fluorescence intensity of stained membrane molecules of dendritic cells (DCs). The concentration of vaccines is 0.2 doses/ml. The X-axis shows the names of the molecules, the Y-axis shows the fluorescence intensity (GMFI). The DC type is specified in the legends. * — significant difference from iDCs ($p < 0.05$)

отличающихся по набору продуцируемых цитокинов. Для оценки этого процесса мы использовали смешанную культуру, в которой лимфоциты стимулировались с помощью ДК, предварительно инкубированных с вакциной. Результат реакции оценивался по накоплению в культуральной среде цитокинов ИНФ- γ , ИЛ-17А и ИЛ-5. ИНФ- γ является ключевым цитокином Т-хелперов первого типа (Th1) — основных стимуляторов клеточных форм иммунных реакций. ИЛ-5 продуцируется Th2 и принимает участие в индукции гуморального иммунного ответа. ИЛ-17А является ключевым цитокином Th17, участвующих в индукции гнойного воспаления, а также отвечающих за защиту барьерных тканей, в первую очередь

слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта. На рис. 5 представлен результат оценки действия вакцины с помощью смешанной культуры на примере БЦЖ. Показано, что предварительная инкубация ДК с вакциной БЦЖ в концентрации 0,2 дозы/мл усиливает их способность индуцировать продукцию ИНФ- γ в смешанной культуре по сравнению с контрольными нДК, не контактировавшими с вакциной. Причем это усиление ИНФ-индуцирующей способности ДК достоверно проявляется даже при малом количестве ДК в смешанной культуре (2 % от числа лимфоцитов). Также вакцина БЦЖ усиливает способность ДК индуцировать продукцию ИЛ-5 лимфоцитами. Однако усиление ИЛ-5-индуцирующей способ-

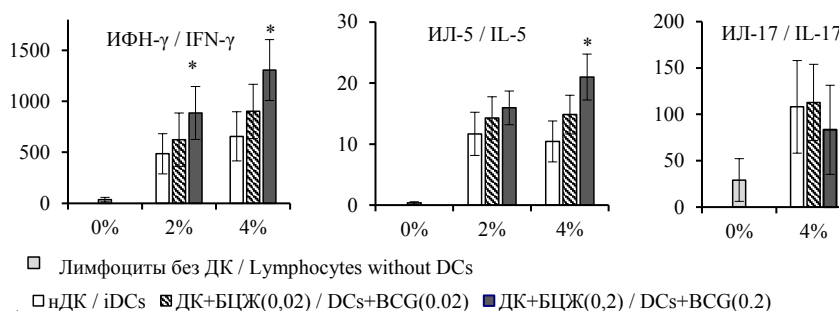


Рис. 5. Продукция цитокинов в смешанных культурах лимфоцитов с нДК или с ДК, предварительно инкубированными с вакциной БЦЖ в концентрации 0,02 дозы/мл (ДК+БЦЖ(0,02)) и 0,2 дозы/мл (ДК+БЦЖ(0,2)). По оси Y — концентрация цитокина в надосадках культур (пг/мл), по оси X — доля ДК в смешанных культурах. Тип ДК обозначен в легенде. * — достоверное отличие от смешанной культуры с нДК ($p < 0,05$)

Fig. 5. Production of cytokines in mixed cultures of lymphocytes with iDCs or DCs, pre-incubated with the BCG vaccine at a concentration of 0.02 doses/ml (DC+BCG(0.02)) and 0.2 doses/ml (DC+BCG(0.2)). Y-axis — cytokine concentration in culture supernatants (pg/ml), X-axis — the proportion of DCs in mixed cultures. The DC type is specified in the legend. * — significant difference from the mixed culture with iDCs ($p < 0.05$)

ности ДК наблюдается лишь при добавлении 4 % ДК в смешанную культуру. Инкубация с вакциной БЦЖ не усиливала способность ДК индуцировать продукцию ИЛ-17 лимфоцитами. Таким образом, БЦЖ усиливает способность ДК стимулировать клетки с Тх1-подобным профилем цитокинопродукции и в меньшей степени влияет на способность ДК стимулировать Тх2, что вполне соответствует ожидаемому эффекту этой вакцины, стимулирующей клеточный иммунитет.

Заключение. Показано, что методы оценки фагоцитоза, фенотипического созревания и функциональных свойств дендритных клеток человека *in vitro* применимы для оценки действия вакцин. Эти методы в качестве дополнения к традиционным способам оценки иммунного ответа могут быть использованы для исследования механизмов действия прототипов вакцин на этапе их разработки и доклинических испытаний.

Информация о вкладе авторов: В.Ю. Талаев — разработка дизайна исследования, написание текста рукописи; М.В. Светлова, И.Е. Заиченко, О.Н. Бабайкина, Е.В. Воронина — выполнение экспериментов, анализ полученных данных.

Финансирование: исследование проведено без спонсорской поддержки за исключением оценки действия вакцины «Гриппол квадριвалент», проведенной при поддержке НПО «Петровакс».

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Исследования были одобрены решением Локального этического комитета ФБУН ННИИЭМ № 3 от 24.03.2020. Все доноры крови давали письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы (пп. 2–31 см. References)

- Ефимов Е.И., Григорьева Г.И., Королева В.В., Снегирева М.С. 100 лет большого пути. Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной // Здоровье населения и среда обитания. 2019. Т. 317. № 8. С. 4–10.
- Ефимов Е.И., Григорьева Г.И., Королева В.В., Снегирева М.С. 100 years of long way. Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology. *Zdorov'e Naseleniya i Sreda Obitaniya*. 2019;(8(317)):4–10. (In Russian). doi: 10.35627/2219-5238/2019-317-8-4-10
- Lancet COVID-19 Commissioners, Task Force Chairs, and Commission Secretariat. Lancet COVID-19 Commission Statement on the occasion of the 75th session of the UN General Assembly. *Lancet*. 2020;396(10257):1102–1124. doi: 10.1016/S0140-6736(20)31927-9
- Santos N, Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol*. 2005;15(1):29–56. doi: 10.1002/rmv.448
- GBD Diarrhoeal Diseases Collaborators. Estimates of global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoeal diseases: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Infect Dis*. 2017;17(9):909–948. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30276-1
- Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol*. 1991;9:271–96. doi: 10.1146/annurev.iy.09.040191.001415
- Mellman I, Steinman RM. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*. 2001;106(3):255–258. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00449-4
- Steinman RM. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:1–22. doi: 10.1146/annurev-immunol-100311-102839
- Roche PA, Cresswell P. Antigen processing and presentation mechanisms in myeloid cells. *Microbiol Spectr*. 2016;4(3):209–223. doi: 10.1128/microbiolspec.MCHD-0008-2015
- Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Théry C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:621–67. doi: 10.1146/annurev.immunol.20.100301.064828
- Norbury CC. Drinking a lot is good for dendritic cells. *Immunology*. 2006;117(4):443–51. doi: 10.1111/j.1365-2567.2006.02335.x
- Jutras I, Desjardins M. Phagocytosis: at the crossroads of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2005;21:511–27. doi: 10.1146/annurev.cellbio.20.010403.102755
- Liu Z, Roche PA. Macropinocytosis in phagocytes: regulation of MHC class-II-restricted antigen presentation in dendritic cells. *Front Physiol*. 2015;6:1. doi: 10.3389/fphys.2015.00001
- de Jong JM, Schuurhuis DH, Ioan-Facsinay A, et al. Dendritic cells, but not macrophages or B cells, activate major histocompatibility complex class II-restricted CD4+ T cells upon immune-complex uptake *in vivo*. *Immunology*. 2006;119(4):499–506. doi: 10.1111/j.1365-2567.2006.02464.x
- Benvenuti F. The dendritic cell synapse: a life dedicated to T cell activation. *Front Immunol*. 2016;7:70. doi: 10.3389/fimmu.2016.00070
- Inaba K, Inaba M. Antigen recognition and presentation by dendritic cells. *Int J Hematol*. 2005;81(3):181–7. doi: 10.1532/IJH97.04200
- Fiebiger E, Meraner P, Weber E, Fang IF, Stingl G, Ploegh H, et al. Cytokines regulate proteolysis in major histocompatibility complex class II-dependent antigen presentation by dendritic cells. *J Exp Med*. 2001;193(8):881–92. doi: 10.1084/jem.193.8.881
- Watts C. The exogenous pathway for antigen presentation on major histocompatibility complex class II and CD1 molecules. *Nat Immunol*. 2004;5(7):685–92. doi: 10.1038/ni1088
- Foti M, Granucci F, Pelizzola M, Beretta O, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cells in pathogen recognition and induction of immune responses: a functional genomics approach. *J Leukoc Biol*. 2006;79(5):913–6. doi: 10.1189/jlb.1005547
- Dalod M, Chelbi R, Malissen B, Lawrence T. Dendritic cell maturation: functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming. *EMBO J*. 2014;33(10):1104–16. doi: 10.1002/emboj.201488027
- Platt AM, Randolph GJ. Dendritic cell migration through the lymphatic vasculature to lymph nodes. *Adv Immunol*. 2013;120:51–68. doi: 10.1016/B978-0-12-417028-5.00002-8
- Angeli V, Randolph GJ. Inflammation, lymphatic function, and dendritic cell migration. *Lymphat Res Biol*. 2006;4(4):217–28. doi: 10.1089/lrb.2006.4406
- de Winde CM, Munday C, Acton SE. Molecular mechanisms of dendritic cell migration in immunity and cancer. *Med Microbiol Immunol*. 2020;209(4):515–529. doi: 10.1007/s00430-020-00680-4
- Sallusto F, Lanzavecchia A. The instructive role of dendritic cells on T-cell responses. *Arthritis Res*. 2002;4(Suppl 3):S127–32. doi: 10.1186/ar567
- Bourque J, Hawiger D. Immunomodulatory bonds of the partnership between dendritic cells and T cells. *Crit Rev Immunol*. 2018;38(5):379–401. doi: 10.1615/CritRevImmunol.2018026790
- Hilligan KL, Ronchese F. Antigen presentation by dendritic cells and their instruction of CD4+ T helper cell responses. *Cell Mol Immunol*. 2020;17(6):587–599. doi: 10.1038/s41423-020-0465-0
- Talaye VY, Talaeva MV, Voronina EV, Babaykina ON. Migration of human dendritic cells *in vitro* induced by vaccines stimulating humoral and cellular immunity. *Sovremennye Tekhnologii v Meditsine*. 2016;8(3):91–99. doi: 10.17691/stm2016.8.3.10
- Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:563–604. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-074950
- Collin M, Bigley V. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology*. 2018;154(1):3–20. doi: 10.1111/imm.12888
- Goter-Robinson C, Derrick SC, Yang AL, Jeon BY, Morris SL. Protection against an aerogenic *Mycobacterium tuberculosis* infection in BCG-immunized and DNA-vaccinated mice is associated with early type I cytokine responses. *Vaccine*. 2006;24(17):3522–9. doi: 10.1016/j.vaccine.2006.02.005
- Sokolovska A, Hem SL, HogenEsch H. Activation of dendritic cells and induction of CD4(+) T cell differentiation by aluminum-containing adjuvants. *Vaccine*. 2007;25(23):4575–85. doi: 10.1016/j.vaccine.2007.03.045
- Talaye V, Zaichenko I, Svetlova M, Matveichev A, Babaykina O, Voronina E, et al. Low-dose influenza vaccine Grippol Quadrivalent with adjuvant Polyoxidentonium induces a T helper-2 mediated humoral immune response and increases NK cell activity. *Vaccine*. 2020;38(42):6645–6655. doi: 10.1016/j.vaccine.2020.07.053