

ВЛИЯНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ БЕЛОКСОДЕРЖАЩИХ ПНЕВМОКОККОВЫХ ПРЕПАРАТОВ НА СОЗРЕВАНИЕ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК У МЫШЕЙ

Н.К. Ахматова¹, И.М. Грубер¹, О.М. Кукина¹, Э.А. Ахматова¹, И.Д. Макаренкова², В.Н. Столпникова¹, Е.О. Калининченко¹, И.А. Бишева¹, С.А. Сходова¹

¹ ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

² ФГБНУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, г. Владивосток, Россия

Резюме. Ключевую роль в инициации иммунных реакций играют дендритные клетки — наиболее активные и высокоспециализированные антигенпрезентирующие клетки. В настоящее время актуальна разработка препаратов, активирующих дендритные клетки для создания противоинфекционных и противоопухолевых вакцин. Перспективными для усиления активности дендритных клеток являются препараты микробного происхождения, поскольку они несут лиганды для Toll-подобных рецепторов системы врожденного иммунитета. К таким препаратам относятся экспериментальные белоксодержащие пневмококковые препараты. В данном исследовании их получали из инактивированной ацетоном микробной массы депонированного вакцинного штамма *S. pneumoniae* 6В № 296 с последующей водной экстракцией и выделением фракции 30–100 kDa. Дендритные клетки получали из клеток костного мозга мышей линии СВА (n = 15). Клетки культивировали в полной ростовой среде RPMI-1640 в присутствии рекомбинантных GM-CSF и IL-4 (Biosource, США). На шестые сутки в культуру незрелых дендритных клеток вносили экспериментальные белоксодержащие пневмококковые препараты (50 мкл/мл). В качестве классического индуктора созревания использовали коммерческий TNF α (20 нг/мл, Biosource, США). Иммунофенотип дендритных клеток определяли методом проточной цитометрии с использованием FITC- и PE-меченых моноклональных антител к клеточным рецепторам: CD34, CD38, CD83, CD86, CD80, CD11c, MHC II, CD14, CD282 (TLR2), CD-284 (TLR4) (eBioscience, США). При изучении влияния экспериментальных белоксодержащих пневмококковых препаратов на созревание дендритных клеток установлено, что морфологические характеристики дендритных клеток при использовании в качестве индуктора созревания экспериментальных белоксодержащих препаратов не имеют существенных различий между собой и с классическим индуктором созревания TNF α . Клетки характеризовались крупными размерами, имели овальную или неправильную форму с вуалевидной цитоплазмой, эксцентрично расположенным ядром и многочисленными длинными тонкими отростками. Данные препараты в культуре дендритных клеток вызвали снижение численности CD34⁺ незрелых клеток и TLR2/TLR4⁺ DC, повышали количество клеток с маркером адгезии CD38⁺, активационными MHC II⁺, костимулирующими CD80/CD86⁺ молекулами и маркером терминальной дифференцировки CD83⁺, что может свидетельствовать о процессах дифференцировки дендритных клеток при их созревании. Фракция 30–100 kDa в большей степени увеличивала численность клеток с молекулами адгезии по сравнению с водным экстрактом, который

Адрес для переписки:

Ахматова Нэлли Кимовна
105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., 5а,
ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова.
Тел.: 8 919 776-55-70. E-mail: anelly@mail.ru

Contacts:

Nelli K. Akhmatova
105064, Russian Federation, Moscow, Malyy Kazennyi lane, 5a,
Mechnikov Scientific Research Institute for Vaccines and Sera.
Phone: +7 919 776-55-70. E-mail: anelly@mail.ru

Для цитирования:

Ахматова Н.К., Грубер И.М., Кукина О.М., Ахматова Э.А., Макаренкова И.Д., Столпникова В.Н., Калининченко Е.О., Бишева И.А., Сходова С.А. Влияние экспериментальных белоксодержащих пневмококковых препаратов на созревание дендритных клеток у мышей // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 1. С. 85–92. doi: 10.15789/2220-7619-TEO-1218

Citation:

Akhmatova N.K., Gruber I.M., Kukina O.M., Akhmatova E.A., Makarenkova I.D., Stolpnikova V.N., Kalinichenko E.O., Bisheva I.A., Skhodova S.A. Effects of experimental protein-containing pneumococcal preparations on maturation of murine dendritic cells // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 1, pp. 85–92. doi: 10.15789/2220-7619-TEO-1218

значительнее стимулировал нарастание количества дендритных клеток с экспрессией костимулирующих молекул по сравнению с фракцией 30–100 kDa ($p < 0,05$). Активность исследуемых препаратов в отношении влияния на CD83⁺ клетки была сопоставимой. Показано, что экспериментальные белоксодержащие антигены вакцинного штамма пневмококка индуцируют созревание дендритных клеток из костномозговых предшественников и снижение численности TLR2- и TLR4-экспрессирующих клеток, что свидетельствует об активизирующем влиянии на эффекторы врожденного иммунитета.

Ключевые слова: экспериментальные белоксодержащие препараты, дендритные клетки, пневмококк, индукция созревания, иммунофенотип, морфологические характеристики.

EFFECTS OF EXPERIMENTAL PROTEIN-CONTAINING PNEUMOCOCCAL PREPARATIONS ON MATURATION OF MURINE DENDRITIC CELLS

Akhmatova N.K.^a, Gruber I.M.^a, Kukina O.M.^a, Akhmatova E.A.^a, Makarenkova I.D.^b, Stolpnikova V.N.^a, Kalinichenko E.O.^a, Bisheva I.A.^a, Skhodova S.A.^a

^a Mechnikov Scientific Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

^b Somov Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russian Federation

Abstract. Dendritic cells as the most active and highly specialized antigen presenting cells, play a key role in initiating immune responses. Currently, generation of medications activating dendritic cells for development of anti-infective and anticancer vaccines is of highly relevance. Preparations of microbial origin are promising to augment activity of dendritic cells, because they carry innate immune ligands for Toll-like receptors. Such preparations include experimental protein-containing pneumococcal preparations, obtained from acetone-inactivated microbial mass of the deposited *S. pneumoniae* 6B vaccine strain No. 296, followed by aqueous extraction and separation of 30–100 kDa fraction. Dendritic cells were obtained from bone marrow cells of CBA mice ($n = 15$), and cultured in complete growth medium RPMI-1640 added with recombinant GM-CSF and IL-4 (Biosource, USA). On day 6, experimental protein-containing pneumococcal preparations (50 μ l/ml) were administered to the cultured immature dendritic cells. Commercial TNF α (20 ng/ml, Biosource, USA) was used as a standard maturation inducer (positive control). Immunophenotyping of dendritic cells was conducted by using flow cytometry with FITC- and PE-labeled monoclonal antibodies against cell surface receptors: CD34, CD38, CD83, CD86, CD80, CD11c, MHC II, CD14, CD282 (TLR2), CD284 (TLR4), (eBioscience, USA). Studying an effect of preparations on maturation of dendritic cells revealed that morphological characteristics of dendritic cells generated by using experimental protein-containing preparations did not differ significantly between each other as well as those induced by TNF α . The cells were characterized by large sizes, oval or irregular shape, veiled cytoplasm, eccentrically located nucleus and numerous long thin protrusions. Experimental protein-containing preparations induced in cultured dendritic cells decrease in count of CD34⁺ immature and TLR2/TLR4⁺ cells, increased count of cells expressing markers of adhesion (CD38⁺), activation (MHC II⁺), costimulation (CD80/CD86⁺) and terminal differentiation (CD83⁺), which may evidence about events of differentiation upon dendritic cell maturation. The 30–100 kDa fraction increased count of cells expressing adhesion molecules to a greater extent than aqueous extract that more pronouncedly stimulated rise in count of dendritic cells bearing costimulatory molecules ($p < 0.05$). The activity of the examined proteins regarding their effect on CD83⁺ cells was comparable. Experimental protein-containing antigens derived from pneumococcal vaccine strain were shown to induce maturation of dendritic cells from bone marrow precursors, induce a decrease in the count of TLR2 and TLR4-expressing cells accounting for activating effect on innate immune effectors.

Key words: experimental protein-containing pneumococcal preparations, dendritic cells, pneumococcus, maturation induction, immunophenotype, morphological characteristics.

Введение

Дендритные клетки (DC) являются высокоспециализированными антигенпрезентирующими клетками, играющими ключевую роль в инициации иммунных реакций; они обладают способностью регулировать иммунные процессы в организме и поддерживать гомеостаз иммунокомпетентных клеток [1, 3, 16].

Способность DC эффективно представлять антиген Т-лимфоцитам активно используется для генерации специфических иммунных кле-

ток-эффекторов и для создания противоинфекционных и противоопухолевых вакцин [2, 6, 11].

Будучи ключевыми эффекторами врожденного иммунитета, DC выполняют функцию связующего звена между врожденным и адаптивным иммунитетом, обеспечивая процессинг и представление антигена Т-лимфоцитам. В результате распознавания дендритными клетками патоген-ассоциированных молекулярных структур (PAMPs) происходит передача сигналов, активирующих ядерный транскрип-

ционный фактор NF-κB с каскадом иммунных реакций, обеспечивающих не только первую линию защиты от патогена, но и формирование адаптивного иммунного ответа с поляризацией Т-хелперов по Th-1/Th-2 типу [5]. В настоящее время остается актуальным поиск препаратов, активирующих DC. Наиболее перспективным считается применение препаратов микробного происхождения, поскольку они несут лиганды для Toll-подобных рецепторов (TLRs) системы врожденного иммунитета. К таким препаратам относятся экспериментальные белоксодержащие пневмококковые препараты (ЭБСП), имеющие в своем составе PAMPs, которые с большой вероятностью могут быть обнаружены TLRs антигенпрезентирующих клеток.

Материалы и методы

Мыши. Мышей линии СВА массой 18–20 г получали из питомника «Андреевка» Московской области. Для выделения DC использовали клетки костного мозга 20 мышей. Животных выводили из эксперимента под эфирным наркозом в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Препараты. ЭБСП выделяли из инактивированной ацетоном микробной массы депонированного вакцинного штамма *S. pneumoniae* 6B № 296, с последующей водной экстракцией (ВЭ) и выделением фракции 30–100 kDa (ФР) с использованием фильтров Amicon® Ultra (Millipore, Ирландия) с порогом отсека 100 и 30 kDa.

Культивирование DC. DC получали из клеток костного мозга мышей линии СВА. Костный мозг мышей гомогенизировали в среде RPMI-1640 (Sigma, США), трижды осаждали центрифугированием (250 г x 5 мин) и переводили в обогащенную среду культивирования (10^6 клеток в 1 мл среды RPMI-1640) с добавлением 10 мкг/мл гентамицина сульфата (AppliChem, Германия) и 10%-ной термоинактивированной эмбриональной телячьей сыворотки — ЭТС (Thermo Fisher Scientific, США), содержащую по 20 нг/мл рекомбинантных GM-CSF и IL-4 (Biosource, США). На шестые сутки производили смену среды и в культуру незрелых DC мышей вносили ЭБСП (ВЭ или ФР) по 50 мкл/мл культуральной жидкости. В качестве классического индуктора созревания (позитивный контроль) использовали коммерческий TNFα (20 нг/мл, Biosource, США).

Оценку иммунофенотипа DC осуществляли методом проточной цитометрии на приборе Cytomix FC-500 (Beckman Coulter, США) с применением моноклональных антител (МКА) (eBiosciences, США), меченных флуорохромом, к определяемому маркеру: CD34-FITC

(clone RAM 34, кат. № 11-0341-82), CD38-FITS (clone 90, кат. № 11-0381-82), CD83-PE (clone Michel-17, кат. № 12-0831-80), CD86-PE (GL-1, кат. № 120862-81), CD80-FITS (clone 16-10A1, кат. № 11-0801-82), CD11c-FITS (clone 418, кат. № 11-0114-81), MHC II-FITS (clone NIMR-4, кат. № 11-5322-82), CD14-PE (clone Sa2-8, кат. № 12-0141-82), CD282 (TLR2)-FITS (clone 6C2, кат. № 11-9021-82), CD-284 (TLR4)-PE (clone UT41, кат. № 12-9041-80) (eBioscience, США).

Фиксация и окраска клеток. Клетки культивировали в культуральных плоскодонных планшетах (Corning Costar, США) с покровным стеклом 24, 48 или 72 ч. Отбирали среду из лунок со стеклами и фиксировали клетки 3,7%-ным раствором параформальдегида (Panreas, Испания) на PBS 15 мин при комнатной температуре. Окраску актинового цитоскелета производили с использованием фаллоидина с флуоресцентным красителем (Alexa Fluor 594 phalloidin, Invitrogen) в разведении 1:150. Молекулу ДНК клеток окрашивали водным раствором красителя Hoechst 33342 (Sigma), разведенным до концентрации 1 мкг/мл.

Получение снимков DC, окрашенных антителами. Фотографии клеток на стеклах делали при помощи микроскопа Nikon Eclipse Ti-U, оснащенного камерой Infinity 3 и флуоресцентными фильтрами UV-1A (для препаратов, окрашенных красителем Hoechst 33342 [Sigma]), В-2А (для наблюдения флуоресценции в зеленом диапазоне) и G-2А (для наблюдения флуоресценции в красном диапазоне).

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 10. Достоверность различий между сравниваемыми величинами определяли в рамках непараметрической базовой статистики с использованием теста Kruskal–Wallis. Различия рассматривались как значимые при $p \leq 0,05$.

Результаты

Клетки, дифференцированные из клеток-предшественников костного мозга мышей, представляли собой особый клеточный тип, характеризующийся звездчатыми формами с ветвящимися цитоплазматическими отростками, что позволяет отнести их к дендритным клеткам, описанным ранее рядом исследователей [1, 4, 6, 11, 12]. При культивировании в плоскодонных планшетах на покровных стеклах определялись клетки крупных размеров овальной или неправильной формы с вуалевидной цитоплазмой, эксцентрично расположенным ядром и многочисленными длинными тонкими отростками (рис.).

Дифференцировку клеток-предшественников в зрелые DC под воздействием эксперимен-

тальных белоксодержащих пневмококковых препаратов (ЭБСП) у мышей оценивали по изменению иммунофенотипа клеток.

При культивировании клеток костного мозга в присутствии GM-CSF и IL-4 на шестые сутки они приобретали фенотипические признаки незрелых DC, характеризующихся низким уровнем экспрессии костимулирующих молекул и молекул антигенного представления (МНС) (табл. 1).

Степень дифференцировки и зрелости DC, генерированных из клеток костного мозга мышей, определяли по изменению уровня экспрессии дифференцировочных молекул CD34, CD38, CD80, CD86, CD83, CD14, МНС I/II через 3 суток после добавления к незрелым DC ЭБСП (ВЭ и ФР) (табл. 1).

ЭБСП, наряду с классическим индуктором $TNF\alpha$, вызывали снижение численности незрелых (CD34) DC. Это свидетельствует о том, что исследуемые препараты снижают численность недифференцированных клеток.

По мере созревания в культуре DC с ЭБСП снижалось содержание CD14-экспрессирующих клеток ($p < 0,05$). Наличие CD14-экспрессирующих клеток предполагает присутствие в культуре также определенного пула клеток миеломоноцитарной линии дифференцировки.

Исследуемые препараты приводили к увеличению численности клеток с маркером CD38. Причем ФР в большей степени по сравнению с ВЭ увеличивала численность клеток с молекулой адгезии CD38 (табл. 2, 3).

После стимуляции ЭБСП незрелых DC они приобретали фенотип, характерный для активированных зрелых DC с высокой экспрессией активационного маркера МНС II, необходимого для осуществления презентации антигенов. Под воздействием ЭБСП также повышалась численность DC с костимулирующими молекулами CD80 и CD86.

Исследуемые препараты индуцировали дифференцировку DC, так как обладали способностью стимулировать их созревание. На DC

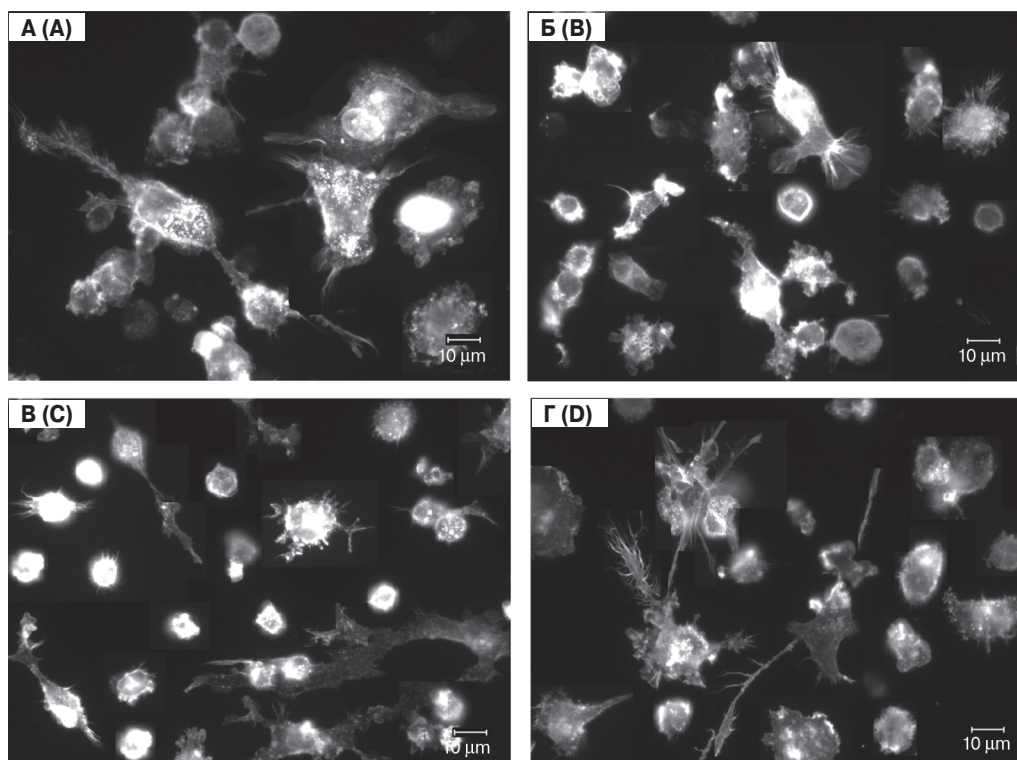


Рисунок. Дендритные клетки, генерированные из клеток-предшественников костного мозга мышей СВА, в культуре на 9 сутки (3 сутки после обработки ЭБСП)

Figure. Dendritic cells generated from CBA mouse bone marrow progenitor cells, in day 9-cell culture (3 days after treatment with experimental protein-containing preparations)

Примечания. А — незрелые DC; Б — созревшие под воздействием $TNF\alpha$ (20 нг/мл); В — ЭБСП ВЭ (50 мкл/мл); Г — ЭБСП ФР (50 мкл/мл). Микрофотография дендритных клеток при флуоресцентной микроскопии стеклов с адгезированными DC, ок. $\times 10$, об. $\times 40$ (поскольку фотографии представлены в черно-белом варианте, на рисунке не приведены используемые фильтры; см. «Материалы и методы»).

Notes. A — immature DC; B — maturation triggered by $TNF\alpha$ (20 ng/ml); C — aqueous extraction (50 μ l/ml); D — fraction (50 μ l/ml). Microimaging of adhered dendritic cells by fluorescence microscopy, $\times 10$ ocular, $\times 40$ objective.

возрастала экспрессия маркера терминальной дифференцировки CD83 (табл. 2). При этом существенной разницы в активации CD83⁺ клеток под воздействием данных препаратов и TNF α не наблюдалось (табл. 3). Введение исследуемых пневмококковых препаратов в культуру незре-

лых DC приводило к увеличению численности популяции CD11⁺ миелоидных DC (табл. 2).

Незрелые DC в большей степени экспрессировали на своей поверхности TLR2 (54,86%). По мере созревания под воздействием исследуемых препаратов снижалась численность клеток

Таблица 1. Влияние экспериментальных белоксодержащих препаратов *S. pneumoniae* на созревание дендритных клеток *in vitro*

Table 1. The effect of experimental protein-containing preparations *S. pneumoniae* on the maturation of dendritic cells *in vitro*

Маркеры Markers	Количество клеток, %; M \pm SD; Me (Q1–Q3) The number of cells, %; M \pm SD; Me (Q1–Q3)			
	ВЭ Aqueous extraction	ФП (30–100 kDa) Fraction (30–100 kDa)	TNF α	Незрелые DC Immature DC
CD34 ⁺	23,9 \pm 1,4 24,2 (22,4–25,3) *	25,5 \pm 0,7 25,8 (24,7–26) *	17,36 \pm 1,35 18,8 (16,1–18,8) *	42,9 \pm 1,96 45 (41,1–45)
CD14 ⁺	43,47 \pm 0,8 43,9 (42,5–44) *	44,56 \pm 1,26 44,8 (43,2–45,7) *	37,6 \pm 3,19 38,7 (34–40,1) *	58,23 \pm 3,32 57 (55,7–62)
CD38 ⁺	35,76 \pm 2,16 36 (33,5–37,8) *	44,86 \pm 1,48 44,5 (43,6–46,5) *	45 \pm 3 45,1 (42–48) *	12,4 \pm 0,87 12,8 (11,4–13)
CD38 ⁺ /MHC II ⁺	19,5 \pm 1,11 19,7 (18,3–20,5) *	21,36 \pm 1,05 21,2 (20,4–22,5) *	24,5 \pm 1 24,4 (23,5–25,6) *	12,43 \pm 2,01 13 (10,2–14,1)
MHC II ⁺	24,43 \pm 0,51 24,3 (24–25) *	24,5 \pm 0,65 24,4 (23,9–25,2) *	38,8 \pm 1,05 38,7 (37,8–39,9) *	11,5 \pm 1,6 11 (10,2–13,3)
CD11c ⁻ /CD123 ⁺	23,3 \pm 1,21 23,5 (22–24,4) *	19,33 \pm 1,26 19,5 (18–20,5) *	36,9 \pm 1,6 17,2 (16,1–18,8) *	12,5 \pm 2,13 42,7 (41,1–45)
CD80 ⁺	43,36 \pm 0,81 43 (42,8–44,3) *	38,33 \pm 1,26 38,2 (36,7–40,1) *	66,43 \pm 2,4 66,3 (64,1–68,9) *	29,53 \pm 2,11 29,8 (27,3–31,5)
CD11c ⁺	55,5 \pm 1,6 55,7 (53,8–57) *	52 \pm 1,7 52,7 (50,5–53) *	56,96 \pm 1,45 57,6 (55,3–58) *	20,56 \pm 1,29 20,2 (19,5–22)
CD86 ⁺ /CD11c ⁺	29,16 \pm 0,76 29 (28,5–30) *	25,2 \pm 1,05 25,6 (24–26) *	34,9 \pm 0,65 35 (34,3–35,6) *	14,4 \pm 0,9 14,4 (13,5–15,3)
CD86 ⁺	40,56 \pm 1,15 40,4 (39,5–41,8) *	45,8 \pm 0,9 45,8 (44,9–46,7) *	63,86 \pm 3,85 63,7 (60,1–67,8) *	13,7 \pm 2,16 13,4 (11,7–16)
CD83 ⁺ /CD80 ⁺	33,76 \pm 1,15 33,6 (32,7–35) *	37,36 \pm 1,72 37,7 (35,5–38,9) *	42,7 \pm 2,2 42,7 (40,5–44,9) *	8,2 \pm 1,21 8 (7,1–9,5)
MHC I ⁺	70,16 \pm 3,1 70,3 (67–73,2) *	73,43 \pm 3,45 73,2 (70,1–77) *	69,76 \pm 2,41 70,1 (67,2–72) *	45,2 \pm 2,82 45,6 (42,2–47,8)
CD83 ⁺	54,23 \pm 1,4 54,3 (52,8–55,6) *	53,56 \pm 1,4 53,3 (52,4–55) *	57,2 \pm 1,23 57,5 (55,8–58,2) *	15,73 \pm 2,05 15,2 (14–18)

Примечание. В культуру незрелых DC внесли экспериментальные белоксодержащие препараты: ВЭ и ФП (50 мкл/мл), TNF α (20 нг/мл).

*p < 0,05 — достоверность различий по сравнению с незрелыми DC (Kruskal–Wallis test).

Note. Experimental protein-containing preparations were introduced into the culture of immature DC: aqueous extraction and fraction (50 μ l/ml), TNF α (20 ng/ml). *p < 0.05 — significance of differences compared with immature DC (Kruskal–Wallis test).

с данным маркером до 23,37% — ВЭ, 36,7% — ФР, 35,7% — TNF α , причем под воздействием ВЭ отмечалось более существенное снижение численности TLR2-экспрессирующих клеток по сравнению с ФР и TNF α соответственно, $p < 0,05$.

В отношении TLR4 также отмечалась тенденция к снижению числа клеток с его экспрессией с 45,7 до 23,5% — ВЭ; до 29,8% — ФР; до 24,7% — TNF α , $p < 0,05$.

Обсуждение

Зрелость DC определяется совокупностью морфологических, иммунофенотипических и функциональных параметров [3, 6]. Судя по морфологии и иммунофенотипу клеток, генерированных из костномозговых предшественников мышей под воздействием GM-CSF и IL-4, их можно отнести к популяции незрелых DC.

Введение в культуру незрелых DC белоксодержащих пневмококковых препаратов и классического индуктора созревания — TNF α —

индуцировало дифференцировку клеток с многочисленными разветвленными цитоплазматическими отростками, которые необходимы для контактирования DC с окружающими клетками. Данная особенность DC позволяет им более эффективно презентировать антигены T-лимфоцитам, способствуя формированию адаптивного иммунитета [14].

Исследования выявили, что под воздействием изучаемых препаратов происходит дифференцировка DC, так как в культуре происходило снижение численности незрелых DC более чем в 1,6 раза. Клетки начинали экспонировать маркер адгезии CD38, необходимый для контактных взаимодействий с эндотелиальными и иммунокомпетентными клетками, активационные молекулы MHC II — важные для презентации антигенов T-лимфоцитам [10, 12, 14], а также костимуляционные молекулы CD80/CD86 — усиливающие контактные взаимодействия между клетками в процессе представления этих антигенов. Под воздействием экспериментальных белоксодержащих пневмококковых препаратов, в частности ВЭ, возрастала чис-

Таблица 2. Индекс стимуляции созревания DC под воздействием экспериментальных белоксодержащих препаратов *S. pneumoniae* относительно незрелых DC (отрицательный контроль)

Table 2. DC maturation stimulation index under the influence of experimental protein-containing preparations of *S. pneumoniae* relative to immature DC (negative control)

Маркеры Markers	Индекс стимуляции относительно незрелых DC The stimulation index relatively immature DC		
	ВЭ Aqueous extraction	ФР (30–100 kDa) Fraction (30–100 kDa)	TNF α
CD34 ⁺	1,79**	1,68**	2,47**
CD14 ⁺	1,3**	1,3**	1,55**
CD38 ⁺	2,88*	3,6*	3,6*
CD38 ⁺ /MHC II ⁺	1,57*	1,72*	1,97*
MHC II ⁺	2,12*	2,13*	3,37*
CD11c ⁻ /CD123 ⁺	1,86*	1,54*	2,95*
CD80 ⁺	1,47*	1,29*	2,25*
CD11c ⁺	2,7*	2,53*	2,77*
CD86 ⁺ /CD11c ⁺	2*	1,75*	2,42*
CD86 ⁺	2,9*	3,34*	4,66*
CD83 ⁺ /CD80 ⁺	4,1*	4,55*	5,2*
MHC I ⁺	1,55*	1,62*	1,54*
CD83 ⁺	3,44*	3,4*	3,36*

Примечание. * — повышение/** — снижение индекса стимуляции клеток по сравнению с незрелыми DC ($p < 0,05$).

Note. * — increase/** — decrease in cell stimulation index compared with immature DC ($p < 0,05$).

Таблица 3. Индекс стимуляции DC под воздействием экспериментальных белоксодержащих препаратов *S. pneumoniae* по сравнению с классическим индуктором созревания TNF α (положительный контроль)

Table 3. DC stimulation index under the influence of experimental protein-containing preparations *S. pneumoniae* compared with the classical inducer of maturation of TNF α (positive control)

Маркеры Markers	Индекс стимуляции относительно TNF α The stimulation index relatively TNF α		
	ВЭ Aqueous extraction	ФР (30–100 kDa) Fraction (30–100 kDa)	Незрелые DC Immature DC
CD34 ⁺	1,37*	1,47*	2,47**
CD14 ⁺	1,15*	1,18*	1,55**
CD38 ⁺	1,25**	1	3,6*
CD38 ⁺ /MHC II ⁺	1,25**	1,14**	1,97**
MHC II ⁺	1,58**	1,58**	3,37**
CD11c ⁻ /CD123 ⁺	1,58**	1,9**	2,95**
CD80 ⁺	1,53**	1,73**	2,25**
CD11c ⁺	1	1	2,77**
CD86 ⁺ /CD11c ⁺	1,2**	1,38**	2,42**
CD86 ⁺	1,57**	1,39**	4,66**
CD83 ⁺ /CD80 ⁺	1,26**	1,14**	5,2**
MHC I ⁺	1	1,05	1,54**
CD83 ⁺	1,05	1,06	3,36**

Примечание. * — повышение/** — снижение индекса стимуляции клеток по сравнению с действием TNF α ($p < 0,05$).

Note. * — increase/** — decrease in cell stimulation index compared with the action of TNF α ($p < 0,05$).

ленность CD80-экспрессирующих лимфоцитов в 1,47 раз и CD86 — почти в 3 раза, а ФР увеличивала популяцию CD80 в 1,3 раза и CD86 — в 3,34 раза, что также может свидетельствовать о процессе дифференцировки дендритных клеток в сторону зрелых. Кроме перечисленных маркеров, показателем зрелости DC является молекула терминальной дифференцировки CD83, экспрессирующаяся только на высокодифференцированных клетках. Культура DC без добавления индуктора созревания содержала клеточные типы с экспрессией данного маркера в 15,73% случаев, и это позволяет сделать предположение, что происходила несущественная спонтанная активация клеток, в результате чего они частично созревали. Внесение в культуру незрелых DC экспериментальных белоксодержащих пневмококковых препаратов увеличивало число созревших клеток до 53% и более. При этом активность исследуемых препаратов по влиянию на созревание клеток была сопоставимой. Для ФР было характерно повышение численности клеток с молекулами адгезии (в 1,25 раза, $p < 0,05$) по сравнению с ВЭ, а ВЭ стимулировал нарастание количества DC с экспрессией костимулирующих молекул более чем в 1,12 раза в сравнении с ФР, $p < 0,05$. Возможно, что эти компенсаторные механизмы и сравняли их способность индуцировать созревание DC.

Важным этапом иммунного распознавания является наличие тех или иных паттерн-распознающих рецепторов (PRRs), которые передают сигналы, активирующие ядерные транскрипционные факторы с высвобождением спектра про-

воспалительных цитокинов, которые запускают каскад иммунных реакций с формированием адаптивного иммунитета [9, 13, 15]. В распознавании микробных антигенов ключевую роль играют Toll-подобные рецепторы (TLRs), выявляющие патоген-ассоциированные молекулярные структуры (PAMPs) как живых микробных клеток, так и их компонентов (антигены, вакцины) [8, 9].

Больше половины незрелых DC экспрессировали на своей поверхности TLR2 и около 46% — TLR4. Введение в культуру незрелых DC ЭБСП индуцировало снижение численности клеток с данными распознающими рецепторами почти в 1,5–2 раза. Возможно, этот феномен обусловлен тем, что по мере созревания у дендритных клеток снижается необходимость распознавания лигандов, но повышается способность к антигенной презентации поглощенного и процессированного ими антигена.

Таким образом, наши исследования показали возможность получения из костномозговых предшественников мышей как зрелых DC, так и клеток миеломоноцитарного ряда при использовании в качестве индуктора созревания DC экспериментальных белоксодержащих препаратов пневмококка.

Получение вакцин на основе DC для адоптивной иммунотерапии может быть перспективным направлением в профилактике и терапии инфекционных заболеваний, а также может служить критерием оценки эффективности разрабатываемой вакцины против пневмококковой инфекции.

Список литературы/References

1. Ахматова Н.К., Киселевский М.В. Врожденный иммунитет: противоопухолевый и противои инфекционный. М.: Практическая медицина, 2008. 256 с. [Akhmatova N.K., Kiselevsky M.V. Innate immunity: antitumor and anti-infective. Moscow: Practical medicine, 2008. 256 p. (In Russ.)]
2. Aandahl E.M., Michaelsson J., Moretto W.J., Hecht F.M., Nixon D.F. Human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control T-cell responses to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus antigens. *J. Virol.*, 2004, vol. 78, pp. 2454–2459. doi: 10.1128/JVI.78.5.2454-2459.2004
3. Boor P.P.C., Bosma B.M., Tran K.T.C., van der Laan L.J.W., Hagens H., IJzermans J.N.M., Metselaar H.J., Kwekkeboom J. Characterization of antigen-presenting cell subsets in human liver-draining lymph nodes. *Front. Immunol.*, 2019, vol. 14, no. 10: 441. doi: 10.3389/fimmu.2019.00441
4. Castell-Rodríguez A., Piñón-Zárate G., Herrera-Enríquez M., Jarquín-Yáñez K., Medina-Solares I. Dendritic cells: location, function, and clinical implications. In: *Biology of Myelomonocytic Cells*, ed. A. Ghosh. 2017. doi: 10.5772/63122
5. Chow K., Lew M., Sutherland R., Zhan Y. Monocyte-derived dendritic cells promote Th polarization, whereas conventional dendritic cells promote Th proliferation. *J. Immunol.*, 2016, vol. 196, no. 2, pp. 624–636. doi: 10.4049/jimmunol.1501202
6. Dalod M., Chelbi R., Malissen B., Lawrence T. Dendritic cell maturation: functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming. *EMBO J.*, 2014, vol. 33, no. 10, pp. 1104–1116 doi: 10.1002/embj.201488027
7. Doherty M.T., Arditi M. TB, or not TB: that is the question — does TLR signaling hold the answer? *Clin. Invest.*, 2004, vol. 114, no. 12, pp. 1699–1703. doi: 10.1172/JCI23867
8. Dowling J.K., Mansell A. Toll-like receptors: the swiss army knife of immunity and vaccine development. *Clin. Transl. Immunol.*, 2016, vol. 5, no. 5: e85. doi: 10.1038/cti.2016.22
9. Kawai T., Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunol.*, 2010, vol. 11, pp. 373–384. doi: 10.1038/ni.1863
10. Malavasi F., Deaglio S., Funaro A., Ferrero E., Horenstein A.L., Ortolan E., Vaisitti T., Aydin S. Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology. *Physiol. Rev.*, 2008, vol. 88, no. 3, pp. 841–886. doi: 10.1152/physrev.00035.2007

11. Mastelic-Gavillet B., Balint K., Boudousquie C., Gannon P.O., Kandalaf L.E. Personalized dendritic cell vaccines-recent breakthroughs and encouraging clinical results. *Front. Immunol.*, 2019, vol. 11, no. 10: 766. doi: 10.3389/fimmu.2019.00766
12. Paul W.E. Fundamental Immunology, 6th edition. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, 2008. 1603 p.
13. Satoh T., Akira S. Toll-like receptor signaling and its inducible proteins. *Microbiol Spectr.*, 2016, vol. 4, no. 6, pp. 447–453. doi: 10.1128/microbiolspec.MCHD-0040-2016
14. Schetters S.T.T., Jong W.S.P., Horrevorts S.K., Kruijssen L.J.W., Engels S., Stolk D., Daleke-Schermerhorn M.H., Garcia-Vallejo J., Houben D., Unger W.W.J., den Haan J.M.M., Luirink J., van Kooyk Y. Outer membrane vesicles engineered to express membrane-bound antigen program dendritic cells for cross-presentation to CD8⁺ T cells. *Acta Biomater.*, 2019, vol. 91, pp. 248–257. doi: 10.1016/j.actbio.2019.04.033
15. Takeuchi O., Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 2010, vol. 140, no. 6, pp. 805–820. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.022
16. Zhang J., Supakorndej T., Krambs J.R., Rao M., Abou-Ezzi G., Ye R.Y., Li S., Trinkaus K., Link D.C. Bone marrow dendritic cells regulate hematopoietic stem/progenitor cell trafficking. *J. Clin. Invest.*, 2019, vol. 129, no. 7, pp. 2920–2931. doi: 10.1172/JCI124829

Авторы:

Ахматова Н.К., д.м.н., зав. лабораторией механизмов регуляции иммунитета ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;
Грубер И.М., д.м.н., профессор, зав. лабораторией экспериментальной микробиологии ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;
Кукина О.М., младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной микробиологии ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;
Макаренкова И.Д., д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии, ФГБНУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, г. Владивосток, Россия;
Ахматова Э.А., лаборант лаборатории механизмов регуляции иммунитета ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;
Столпникова В.Н., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории механизмов регуляции иммунитета ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;
Калининченко Е.О., младший научный сотрудник лаборатории механизмов регуляции иммунитета ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;
Бишева И.А., младший научный сотрудник лаборатории механизмов регуляции иммунитета ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;
Сходова С.А., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории механизмов регуляции иммунитета ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия.

Authors:

Akhmatova N.K., PhD, MD (Medicine), Head of the Laboratory of Immunity Regulation Mechanisms, Mechnikov Scientific Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
Gruber I.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Experimental Microbiology, Mechnikov Scientific Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
Kukina O.M., Junior Researcher, Laboratory of Experimental Microbiology, Mechnikov Scientific Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
Makarenkova I.D., PhD, MD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Immunology, G.P. Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russian Federation;
Akhmatova E.A., Laboratory Assistant, Laboratory of Immunity Regulation Mechanisms, Mechnikov Scientific Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
Stolpnikova V.N., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Mechanisms of Immunity Regulation, Mechnikov Scientific Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
Kalinichenko E.O., Junior Researcher, Laboratory of Mechanisms of Immunity Regulation, Mechnikov Scientific Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
Bisheva I.A., Junior Researcher, Laboratory of Mechanisms of Immunity Regulation, Mechnikov Scientific Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
Skhodova S.A., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Mechanisms of Immunity Regulation, Mechnikov Scientific Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 04.06.2019
 Отправлена на доработку 18.12.2019
 Принята к печати 15.01.2020

Received 04.06.2019
 Revision received 18.12.2019
 Accepted 15.01.2020