

Е.А.Хромова, Э.А.Ахматова, С.А.Сходова, И.А.Семочкин,
В.Г.Хоменков, Н.К.Ахматова, М.П.Костинов

ВЛИЯНИЕ ПРОТИВОГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН НА СУБПОПУЛЯЦИИ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК КРОВИ

НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва

Цель. Исследование влияния сплит-вакцины Ваксигрип, субъединичной Инфлювак и иммуноадьювантной вакцины Гриппол плюс на содержание в крови миелоидных (mDC) и плазмацитоидных (pDC) дендритных клеток (ДК) у вакцинированных здоровых женщин. **Материалы и методы.** Исследовали кровь 30 здоровых женщин 18 — 50 лет через 7 и 30 дней после вакцинации. Проводили иммунофенотипирование pDC (CD14+CD16-/CD85k(ILT3)-PE/CD123-PC5) и mDC (CD14+CD16-/CD85k(ILT3)-PE/CD33-PC5) с использованием МКАТ (Beckman Coulter, Франция) на проточном цитометре Cytomix FC-500 (Beckman Coulter, США). **Результаты.** Использование безадьювантных вакцин Ваксигрип и Инфлювак привело к повышению численности mDC и pDC ($p < 0,05$) в крови вакцинированных только на 7 сутки наблюдения. Гриппол плюс привел к более существенному (в 2,2 — 3,6 раза, $p < 0,05$) увеличению субпопуляций ДК (по сравнению с безадьювантными вакцинами) как на 7 сутки, так и через месяц после вакцинации. **Заключение.** Вакцинация гриппозными вакцинами активирует врожденные эффекторы — первое звено на пути проникновения инфекции — дендритные клетки как миелоидного, так и лимфоидного происхождения. При этом более выраженный и продолжительный эффект такой активации наблюдается при использовании иммуноадьювантной вакцины по сравнению с субъединичной и сплит-вакцинами.

Журн. микробиол., 2016, № 5, С. 23—28

Ключевые слова: гриппозные иммуноадьювантная и безадьювантная вакцины, миелоидные и плазмацитоидные дендритные клетки

Е.А.Схромова, Е.А.Ахматова, С.А.Сходова, И.А.Семочкин,
В.Г.Хоменков, Н.К.Ахматов, М.П.Костин

EFFECT OF INFLUENZA VACCINES ON SUBPOPULATIONS OF BLOOD DENDRITIC CELLS

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Aim. Study the effect of Vaxigrip split, Influvac subunit and Grippol plus immune-adjuvanted vaccines on the content of myeloid (mDC) and plasmacytoid (pDC) dendritic cells (DC) in blood of vaccinated healthy women. **Materials and methods.** Blood of 30 healthy women aged 18-50 years was studied at days 7 and 30 after the vaccination. pDC (CD14+CD16-/CD85k(ILT3)-PE/CD123-PC5) and mDC (CD14+CD16-/CD85k(ILT3)-PE/CD33-PC5) immune phenotyping was carried out using mAbs (Beckman Coulter, France) and flow cytometer Cytomix FC-500 (Beckman Coulter, USA). **Results.** Use of unadjuvanted vaccines Vaxigrip and Influvac resulted in an increase of the numbers of mDC and pDC ($p < 0.05$) in blood of the vaccinated only at day 7 of the observation. Grippol resulted in a more significant (2.2 — 3.6 times, $p < 0.05$) increase of DC subpopulations (compared with unadjuvanted vaccines) at both day 7 and a month after the vaccination. **Conclusion.** Influenza vaccination activated innate effectors — the first component on the way of infection penetration — dendritic cells of both myeloid and lymphoid origin. Wherein, a more pronounced and prolonged effect of such activation is observed when immune-adjuvanted vaccine is used compared with subunit and split vaccines.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 5, P. 23—28

Key words: influenza immune-adjuvanted and unadjuvanted vaccines, myeloid and plasmacytoid dendritic cells

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на то, что вакцинация от гриппа считается наиболее эффективным методом профилактики, использование субъединичных или расщепленных вакцин, особенно среди лиц пожилого возраста, может оказаться не вполне эффективным [8]. Для этой возрастной группы рекомендуется инактивированная вакцина против гриппа, которая содержит вирусный гемагглютинин (НА), белки трех или четырех циркулирующих штаммов гриппа H1N1, H3N2 и штамма В. Низкая эффективность гриппозной вакцины у пожилых по сравнению с молодыми была связана с иммунологическим старением [2], таким как нарушение генерации клеток, секретирующих антитела (ASCs) [8], Т-клеток памяти CD8 + [13] и CD4 + Т-клеток [5]. Однако молекулярные механизмы, лежащие в основе сниженной эффективности вакцины, остаются не исследованными.

Особенно это касается использования в составе вакцин адъювантов. Адъюванты обычно повышают иммуногенность совместно вводимых антигенов, но к сожалению, также мало известно о механизмах их действия. Поэтому в данной работе мы попытались выяснить влияние сплит-вакцины Ваксигрип, субъединичной Инфлювак и иммуноадъювантной вакцины Гриппол плюс на содержание в крови дендритных клеток миелоидного и плазмацитоидного происхождения у иммунизированных лиц.

Дендритные клетки (ДК) являются специализированными антиген-представляющими клетками (АРС), которые играют ключевую роль в иммунном ответе, являясь связующим звеном между врожденным и адаптивным иммунитетом [15]. Они созревают при распознавании патогенов и сверхрегулируют экспрессию МНС молекул и костимулирующих рецепторов для активации антиген-специфических CD4 (+) и CD8 (+) Т-клеток. В настоящее время установлено, что ДК являются неоднородной популяцией, состоящей из различных субпопуляций со специализированными функциями в иммунном ответе на конкретные патогены. При вирусных инфекциях, плазмацитоидные ДК (pDCs) быстро продуцируют большое количество IFN- α , который обладает мощным противовирусным эффектом и активирует несколько типов других иммунных клеток. Но, тем не менее, pDCs могут индуцировать толерогенный цитокин IL-10 CD4 (+) Т-клетками. В противоположность им, миелоидные ДК (mDCs) являются очень мощными АРС и обладают уникальной способностью праймировать наивные Т-клетки и, следовательно, инициировать первичный адаптивный иммунный ответ. Были определены различные субпопуляции mDCs со специализированными функциями. Установлено, что CD8 α (+) mDCs захватывают антигенный материал от некротических клеток, секретируют высокий уровень IL-12, а также праймируют Th1 и цитотоксические Т-клетки для контроля за внутриклеточными патогенами. С другой стороны, CD8 α (-) mDCs преимущественно праймируют CD4 (+) Т-клетки и способствуют Th2 или Th17 дифференциации. BDCA-3 (+) mDC2 являются человеческим гомологом CD8 α (+) mDCs, так как они разделяют экспрессию нескольких ключевых молекул, способность к кросс-презентации антигенов CD8 (+) Т-клеткам и продуцируют IFN- λ [3]. Показано, что pDCs могут координировать события при вирусной инфекции, атопии, аутоиммунных заболеваниях и раке [9].

Цель статьи — определение субпопуляций дендритных клеток в крови женщин, иммунизированных адъювантной и безадъювантными вакцинами против гриппа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании принимали участие 30 здоровых женщин 18 — 50 лет, которых иммунизировали адьювантной (Гриппол плюс) и безадьювантными (Ваксигрип и Инфлювак) вакцинами против гриппа. Исследовали кровь через 7 и 30 дней после вакцинации.

Забор крови у женщин осуществляли строго натошак из локтевой вены обследуемых в стерильных условиях. Исследовали кровь с раствором антикоагулянта — динатриевой соли ЭДТА (Serva) в конечной концентрации 0,26%. Кровь инкубировали с МкАТ к плазмацитоидным (CD14+CD16-/CD85k(ILT3)-PE/CD123-PC5) и миелоидным (CD14+ CD16-/CD85k(ILT3)-PE/CD33-PC5) ДК. Все процедуры по иммунофенотипированию ДК проводили согласно инструкции производителя (Beckman Coulter, Франция). Пробы анализировали на проточном Cytomix FC-500 (Beckman Culter, США) в течение 6 часов после иммунного окрашивания. Гейт (окно) популяции клеток устанавливали на основе комбинации прямого и бокового светорассеяния и размера клеток. Сначала гейтировали область всех лейкоцитов (PBMC), затем выстраивали значения всех гейтированных событий так, чтобы FL4 (CD123-PC5) отображалось против SS. Лейкоциты гейтировали регионом А, а регионом В отсекали все CD123-негативные клетки. События по FL1 (CD14+CD16)-FITC располагали против FL2 (ILT3-PE). Выделяли регион С с CD(14+16)-/ILT3+ клетками. Визуально эозинофилы отображались в правом нижнем углу области С. После чего события гейтировали по регионам А и В и С: FL4 (CD123-PC5) располагали против FL2 (ILT3-PE). Регион D ограничивал CD123^{bright}/ILT3^{bright} события. Процент ДК среди PBMC рассчитывался путем деления числа событий в гейте D на число событий в гейте PBMC.

Статистическая значимость различий уровня ДК между группами оценивали непараметрическими методами исследования с помощью критерия Манна—Уитни. Статистически достоверными считали различия при $P \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Как видно из табл., содержание плазмацитоидных ДК (pDC) в группе лиц, вакцинированных Ваксигрипом, на 7 сутки (0,712%) повышалось по сравнению с группой до вакцинации (0,381%) в 1,87 раза, миелоидных дендритных клеток (mDC) (1,366%) в 2,96 раза, $p < 0,05$, соответственно повышались их абсолютные показатели с 8,51 до 9,16 кл/мл (pDC) и с 10,23 до 12,94 кл/мл (mDC). Через месяц после вакцинации все эти показатели практически возвращались к уровню нормальных.

Инфлювак по механизму действия мало отличался от Ваксигрипа, но все же проявлял тенденцию к меньшему нарастанию численности как pDC, так и mDC по сравнению с последним.

Вакцинация Грипполом плюс более существенно ($p < 0,001$) по сравнению с исследуемыми безадьювантными вакцинами повышала уровень ДК в крови. Через 7 дней уровень pDC достигал 1,61%/16,16 кл/мл в группе с Грипполом (больше уровня в группе с Ваксигрипом в 2,26/1,76 раза, в группе с Инфлюваком в 3,12/1,83 раза), а через месяц — 1,414%/15,76 кл/мл (больше уровня в группе с Ваксигрипом в 3,52/1,79 раза, в группе с Инфлюваком в 3,58/1,85 раза).

Уровень mDC у вакцинированных Грипполом плюс также был выше по сравнению с группой с Ваксигрипом и Инфлюваком. Через 7 дней: соответственно выше в 1,68/1,5 раза (2,3%/19,38 кл/мл) и 3,95/1,55 раза (0,582%/

12,48 кл/мл); через 1 мес. — 2,89/1,7 раза (1,734%/18,74 кл/мл) и в 3,67/1,77 раза (0,472%/10,6 кл/мл).

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что продуктивный иммунный ответ определяется клональной экспансией антиген-специфических Т- и/или В-клеток. Этот процесс изначально требует представления антигена наивным Т-клеткам с участием TCRs или В-клеткам, экспрессирующих иммуноглобулиновые рецепторы. Но кроме этих условий для формирования полноценного адаптивного ответа необходимы еще и другие сигналы: доставка костимуляторных молекул или цитокинов антигенпрезентирующими клетками для праймирования Т-хелперов. Эти процессы запускают антиген-специфическую помощь для В-клеток и цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) [15].

Все эти факторы должны учитываться при конструировании вакцин. В настоящее время для профилактики гриппозной инфекции используют как адьювантные, так и безадьювантные вакцины. В отсутствие адьюванта может возникнуть слабый иммунный ответ, и наивные антиген-специфические Т-клетки при распознавании антигена могут стать толерогенными.

Как видно из наших исследований, использование сплит-вакцины Ваксигрип приводило к повышению численности ДК ($p < 0,05$) в крови вакцинированных (с небольшим перевесом в сторону клеток миелоидного происхождения) только на 7 сутки наблюдения. Через месяц эти показатели уже не отличались от исходного уровня. Аналогичная картина наблюдалась и в отношении субъединичной вакцины Инфлювак. Ее активность даже была несколько ниже Ваксигрипа, что, вероятно, можно объяснить содержанием в сплит-вакцине более широкого набора вирионных белков.

Изменение динамики плазматомных и миелоидных дендритных клеток периферической крови здоровых лиц в ходе вакцинации против гриппа сплит (Ваксигрип), субъединичной (Инфлювак) и иммуноадьювантной (Гриппол плюс) вакцинами

Маркеры ДК	Содержание клеток	M±σ (%); Ме±(Q ₁ -Q ₃)					
		Ваксигрип		Гриппол плюс		Инфлювак	
		7 сут	1 мес.	7 сут.	1 мес.	7 сут.	1 мес.
CD14+ CD16- / CD85k(ILT3) / CD123 (Плазматомные ДК)	% клеток на 100 тыс. лейкоцитов	0,381±0,0067 0,38 (0,38—0,385)	0,402±0,018 0,4 (0,4—0,42)	1,61±0,136**# 1,56 (1,52—1,7)	1,414±0,168**# 1,39 (1,3—1,4)	0,516±0,027* 0,51 (0,5—0,53)	0,395±0,016 0,39 (0,38—0,4)
	Клеток/мл	8,51±0,45 9,39 (9,398-6,7)	8,798±0,291 8,79 (8,53-9)	16,16±2,0**# 16,7 (15,8—17,3)	15,76±2,08**# 15,8 (15,1—17)	9,06±0,27* 9,1 (8,9—9,2)	8,5±0,41 8,5 (8,4—8,7)
CD14+ CD16- / CD85k(ILT3) / CD33 (Миелоидные ДК)	% клеток на 100 тыс. лейкоцитов	0,461±0,05 0,475 (0,42—0,49)	0,598±0,14 0,53 (0,49—0,7)	2,3±0,28**# 2 (1,9—2,1)	1,734±0,143**# 1,77 (1,61—1,85)	0,582±0,07* 0,55 (0,53—0,64)	0,472±0,043 0,47 (0,44—0,51)
	Клеток/мл	10,23±0,94 10,4 (9,87—10,9)	10,9±0,85 10,9 (10,8—11)	19,38±1,37**# 19,5 (18,3—20,1)	18,74±1,2**# 19,5 (18,1—19,9)	12,48±1,06* 12,8 (11,8—13,2)	10,6±0,51 10,6 (10,2—11)

Примечание. M±σ — средняя арифметическая ± стандартное отклонение; Ме — медиана значений, Q₁-Q₃ — нижний и верхний квартили. * P < 0,05; ** P < 0,001 — достоверность полученных значений по сравнению с группой до вакцинации; # P > 0,001 — по сравнению с группой лиц, вакцинированных вакиной Ваксигрип и Инфлювак (Mann—Whitney U-test).

Гриппол плюс приводил к более существенному ($p < 0,001$) увеличению субпопуляций ДК также на 7 сутки, но при этом отмечалось сохранение этого уровня практически через 1 мес. после вакцинации.

Этот факт, вероятно, можно объяснить с позиций концепций иммуногенности. Во-первых, связанных с понятием географической обусловленности иммунной реактивности, где индукция иммунного ответа критически зависит от антигена (сигнал 1), достигшего регионарных лимфоидных органов. Антиген, который не достигает дренирующих лимфатических узлов, является неотвечающим [7].

Во-вторых, теории эффекта депо, которая подчеркивает важность локализации антигена в течение продолжительного периода времени после иммунизации для активации Т-клеток в лимфатических узлах; удержание антигена на фолликулярных ДК внутри лимфоузла отвечает за стимулирование продолжительной продукции антител [14].

В-третьих, парадигма, когда адьюванты действуют как сигнал 0; то есть распознавание консервативных микробных структур, так называемых патоген-ассоциированных микробных структур (PAMPs) [6], при помощи патоген-распознающих рецепторов (PRRs), которые конститутивно экспрессируются на клетках врожденной иммунной системы [4]. В отличие от клонально экспрессированных гипервариабельных антиген-специфических рецепторов на Т- и В-клетках, генерированных случайными генными реаранжировками, распознавание молекул врожденными иммунными клетками (PRRs) кодируется неререаранжируемыми генами, которые не отличаются генетической пластичностью и зависят от половых мутаций. Поскольку PRRs играют важную роль в формировании сигнала 2 на APCs, они направляют иммунный ответ таким образом, что клетки приобретенной иммунной системы получают «инструкцию», когда, где и как реагировать [9].

Было высказано предположение, что адьюванты могут имитировать микробные структуры, а также было выдвинуто предположение, что в основе их иммуногенности может быть распознавание определенных микробных дериватов по филогенетически древним PRRs, присутствующих на клетках врожденного иммунитета [7]. Это, вероятно, относится к адьювантам на основе микробных компонентов, таких как коклюшный токсин, микобактерии, мурамилпептиды, LPS, липид А или CpG-богатые мотивы. С3d компонент компонента, конъюгированный с антигеном, также активно стимулирует антиген-специфический антительный ответ, и может рассматриваться как молекулярный адьювант врожденного иммунитета [1].

В-четвертых, гипотеза, что адьюванты индуцируют или выступают в качестве молекул опасности; сигналы опасности от стрессированных или поврежденных тканей поступают к антиген-представляющим клеткам, в результате чего усиливается экспрессия костимулирующих молекул. При этом, передача сигналов рекомбинантных цитокинов или костимуляторных молекул имитирует классическую адьювантную активность. Этапы, связанные с передачей сигналов с PRR, сигналов опасности и доставкой костимулирующих молекул APCs способствуют презентации антигена Т- и В-клеткам с последующим их праймированием. Сигналы, идущие от APCs, в свою очередь, могут служить в качестве природных адьювантов [11, 12].

Резюмируя вышеизложенное, можно сделать предположение, что вакцинация гриппозными вакцинами активизирует врожденные эффекторы — первое звено на пути проникновения инфекции — дендритные клетки как миелоидного, так и лимфоидного происхождения. При этом, более выраженный и

продолжительный эффект такой активации наблюдается при использовании иммуoadъювантной вакцины по сравнению с субъединичной и сплит-вакцинами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bergmann-Leitner E.S., Leitner W.W., Tsokos G.C. Complement 3d: from molecular adjuvant to target of immune escape mechanisms. *Clin. Immunol.* 2006, Nov; 121 (2): 177-185.
2. Duraisingham S.S., Rouphael N., Cavanagh M.M. et al. Systems biology of vaccination in the elderly. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2013, 363: 117-142.
3. Geginat J., Nizzoli G., Paroni M. et al. Immunity to pathogens taught by specialized human dendritic cell subsets. *Front. Immunol.* 2015, Oct 13; 6: 527.
4. Iwasaki A., Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat. Immunol.* 2015, Apr; 16 (4): 343-353.
5. Kang I., Hong M.S., Nolasco H. et al. Age-associated change in the frequency of memory CD4+ T cells impairs long term CD4+ T cell responses to influenza vaccine. *J. Immunol.* 2004, 173: 673-681.
6. Martins K.A., Bavari S., Salazar A.M. Vaccine adjuvant uses of poly-IC and derivatives. *Expert. Rev. Vaccines.* 2015, Mar; 14 (3): 447-459.
7. Moyer T.J., Zmolek A.C., Irvine D.J. Beyond antigens and adjuvants: formulating future vaccines. *J. Clin. Invest.* 2016, Mar 1; 126 (3): 799-808.
8. Sasaki S., Sullivan M., Narvaez C.F. et al. Limited efficacy of inactivated influenza vaccine in elderly individuals is associated with decreased production of vaccine-specific antibodies. *J. Clin. Invest.* 2011, 121: 3109-3119.
9. Schenten D., Medzhitov R. The control of adaptive immune responses by the innate immune system. *Adv. Immunol.* 2011, 109: 87-124.
10. Schettini J., Mukherjee P. Physiological role of plasmacytoid dendritic cells and their potential use in cancer immunity. *Clin. Dev. Immunol.* 2008;2008:106321. doi: 10.1155/2008/106321.
11. Schijns V. Immunological concepts of vaccine adjuvant activity. *Commentary. Curr. Op. Immunol.* 2000, 12: 456-463.
12. Trumpfheller C., Longhi M.P., Caskey M. et al. Dendritic cell-targeted protein vaccines: a novel approach to induce T-cell immunity. *J. Intern. Med.* 2012, Feb; 271 (2): 183-192.
13. Wagar L.E., Gentleman B., Pircher H. et al. Influenza-specific T cells from older people are enriched in the late effector subset and their presence inversely correlates with vaccine response. *PLoS ONE.* 2011, 6: e23698.
14. Wang C., Liu P., Zhuang Y. et al. Lymphatic-targeted cationic liposomes: a robust vaccine adjuvant for promoting long-term immunological memory. *Vaccine.* 2014, Sep 22; 32 (42): 5475-5483.
15. Yoo S., Ha S.J. Generation of tolerogenic dendritic cells and their therapeutic applications. *Immune Netw.* 2016, Feb; 16 (1): 52-60.

Поступила 23.03.16

Контактная информация: Ахматова Нелли Кимовна,
105064, М.Казенный пер., 5а, р.т. (495)917-07-74