

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ И КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ»**

ДОПУСТИТЬ К ПРЕДСТАВЛЕНИЮ ГЭК
Руководитель отдела образования и
научно-организационной деятельности,
к. биол. наук Л.В. Гришина

« 14 » сентября 2018 г.

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД

об основных результатах подготовленной научно – квалификационной работы
(диссертации)

**ХАРАКТЕРИСТИКА Т-КЛЕТОЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА,
ИНДУЦИРОВАННОГО ДЕНДРИТНЫМИ КЛЕТКАМИ, НАГРУЖЕННЫМИ
АНТИГЕНАМИ ВИРУСА ГЕПАТИТА С**

по основной образовательной программе подготовки научно-педагогических кадров в
аспирантуре
направление подготовки 30.06.01 – Фундаментальная медицина


Олейник Екатерина Александровна

Научный руководитель
член-корр. РАН, д-р. мед. наук,
профессор

 Е.Р. Черных
подпись

« 14 » сентября 2017 г.

Автор работы
Аспирант

 Е.А. Олейник
подпись

Новосибирск-2018

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Хронический гепатит С (ХГС) характеризуется широкой распространенностью, является одной из наиболее частых причин поражения печени и существенно повышает риск развития цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы [Petruzziello A. et al, 2016], в силу чего относится к социально значимым инфекциям, представляющим глобальную проблему для здравоохранения во всем мире. В настоящее время «золотым стандартом» лечения ХГС является терапия препаратами пегилированного интерферона- α (IFN- α) в сочетании с рибавирином, обеспечивающая устойчивый вирусологический ответ (УВО) в 40-50% случаев при инфицировании вирусом гепатита С (HCV) 1 генотипа. Наличие быстрого вирусологического ответа (БВО) через 1 месяц лечения прогнозирует достижение УВО у 83% пациентов с генотипом 1 HCV. Напротив, отсутствие БВО – отрицательный предиктор в отношении УВО практически в 100% случаев. Тем не менее, препараты IFN- α (в виде монотерапии или в сочетании с рибавирином) эффективны только у 40–50% пациентов с генотипом 1 [Ghany M.G et al, 2009] и часто вызывают развитие тяжелых побочных эффектов, вынуждающих прекратить лечение. Таргетная терапия ингибиторами протеаз, обещающая стать прорывом в лечении ХГС, также имеет ряд серьезных побочных эффектов, показана только для пациентов с генотипом 1 и на сегодняшний день ограничена высокой стоимостью [Thompson A.J. et al, 2015].

Согласно современным представлениям, элиминацию вируса и исход в выздоровление у пациентов с вирусным гепатитом С связывают с запуском сильного мультиэпитопного (с широкой кросс-реактивностью) ответа CD8⁺ и CD4⁺ Т-клеток, продуцирующих цитокины первого типа [Klenerman P. et al, 2012]. Соответственно, исход в хронизацию и персистенция вирусной инфекции ассоциированы с недостаточностью Т-клеточного ответа [Rosen H.R. et al, 2013]. Ведущая роль в запуске Т-клеточного ответа отводится дендритным клеткам (ДК), способным эффективно презентировать антигены, активировать наивные Т-клетки и индуцировать эффекторные Т-клетки. Многочисленные исследования выявили нарушения ДК при ХГС, проявляющиеся задержкой созревания, изменением продукции цитокинов и снижением аллостимуляторной активности ДК, включая миелоидные и плазмацитоидные ДК [Sachdeva M. et al, 2015]. С этой точки зрения индукция сильного иммунного ответа с помощью генерированных *ex vivo* ДК рассматривается в качестве новой стратегии создания лечебных вакцин при ХГС [Zhou Y. et al, 2012]. Развитие сильного и устойчивого Т-клеточного иммунного ответа играет важную роль не только в подавлении репликации вируса, но и детерминирует чувствительность к терапии пегилированными интерферонами совместно с рибавирином, способствуя достижению устойчивого вирусологического ответа.

Учитывая низкое содержание ДК в периферической крови, достаточное для клинических исследований количество ДК обычно получают путем генерации ДК из моноцитов [Turner B. et al, 1999]. *In vitro* дифференцировка моноцитов в ДК отражает физиологические процессы развития ДК из моноцитарных предшественников *in vivo* [Randolph G.J. et al, 1998]. Кроме того, дифференцированные из моноцитарных предшественников ДК могут быть в меньшей степени иммунокомпрометированы вирусом.

Традиционно для генерации ДК моноцитов культивируют в присутствии GM-CSF и интерлейкина-4 (IL4-ДК) [Thurner B. et al, 1998]. Нагруженные или трансфицированные вирусными антигенами IL4-ДК продемонстрировали *in vitro* способность индуцировать HCV-специфический ответ Т-клеток как у здоровых доноров, так и пациентов с ХГС, однако оказались недостаточно эффективными для индукции устойчивого сильного иммунного ответа у пациентов при использовании в качестве лечебных вакцин [Zabaleta A. et al, 2015]. Дифференцировка моноцитов в ДК индуцируется также при замене IL-4 на IFN- α . Генерированные в присутствии GM-CSF и IFN- α ДК (ИФН-ДК) характеризуются частично зрелым фенотипом и обладают свойствами миелоидных, плазматоцитозидных и натуральных киллерных клеток [Echeverria I. et al, 2011]. Эти клетки отличаются от IL4-ДК более стабильным (в отсутствие цитокинов) фенотипом, продуцируют IFN- α , обладают более высокой миграционной активностью, а также большей эффективностью к кросс-презентации длинноразмерных пептидов, стимуляции цитотоксических Т-клеток и экспансии Т-клеток памяти [Farkas A. et al, 2011]. Более высокая эффективность ИФН-ДК в индукции вирус-специфических CD8⁺Т клеток по сравнению с IL4-ДК продемонстрирована не только *in vitro*, но и на иммунодефицитных мышах *in vivo* [10]. Тем не менее, способность IFN-ДК индуцировать *in vitro* антигенспецифический клеточный ответ и усиливать HCV-специфический адаптивный иммунный ответ у пациентов с ХГС до настоящего времени не изучалась. Согласно полученным ранее данным ИФН-ДК больных ХГС обладают сохранной аллостимуляторной активностью и не отличаются от ДК доноров по продукции интерферона-гамма (IFN- γ) и интерлейкина 10 (IL-10) [Leplina O.U. et al, 2011], что свидетельствует об их возможном использовании в качестве клеточных вакцин. Более того, вакципотерапия с использованием ИФН-ДК показала хорошую переносимость и безопасность в пилотном клиническом исследовании при часто рецидивирующей герпетической инфекции [Leplina et al, 2011]. Это позволяет полагать, что нагруженные HCV-антигенами ИФН-ДК способны активировать Th1 клетки и индуцировать генерацию цитотоксических Т-лимфоцитов. Согласно данным литературы структурные (Core) и неструктурные (NS3) белки содержат большое количество эпитопов, распознаваемых CD4 и CD8 Т-клеткам, способных индуцировать Т-клеточный иммунный ответ, включая активацию Th1 клеток и генерацию цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) [Roohvand F. et al, 2012]. При этом, учитывая, что полноразмерные HCV белки обладают иммуносупрессивной активностью [Zhu W. et al, 2010], большой интерес для загрузки ДК представляет использование усеченных фрагментов белков или пептидов.

В связи с вышеизложенным, была сформулирована **цель** работы:

Изучить *in vitro* и *ex vivo* способность IFN- α -индуцированных дендритных клеток, нагруженных рекомбинантными белками Core (aa 1–123) и NS3 (aa 1192–1457) стимулировать антигенспецифический клеточный ответ.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

1. Изучить влияние рекомбинантных вирусных белков HCV core (aa 1–123) и NS3 (aa 1192–1457) на созревание и функциональную активность ИФН-ДК доноров.
2. Оценить способность ИФН-ДК, нагруженных рекомбинантным вирусными белками Core и NS3, индуцировать антигенспецифическую пролиферацию, продукцию Th1-(IFN- γ)/T2(IL-4,IL-6) цитокинов и деградуляцию CD8 Т-клеток в культурах аутологичных МНК серонегативных доноров.

3. Исследовать способность ИФН-ДК, нагруженных рекомбинантными вирусными белками Core и NS3, индуцировать антигенспецифическую пролиферацию, продукцию Th1/Th2 цитокинов и дегрануляцию CD8⁺ Т-клеток в культурах аутологичных МНК пациентов с хроническим гепатитом С.
4. Оценить параметры, характеризующие антигенспецифический ответ, митогенную реактивность, содержание регуляторных Т-клеток и вирусную нагрузку в динамике иммунотерапии дендритными клетками у больных хроническим вирусным гепатитом С.
5. Исследовать параметры иммунитета (HCV-специфического клеточного ответа, митогенной реактивности, содержания регуляторных Т-клеток) и вирусную нагрузку у больных вирусным гепатитом С в динамике ДК-вакцинаций в комбинации с противовирусной терапией интерфероном и рибавирином.

Научная новизна. Впервые показано, что рекомбинантные белки HCV Core (aa 1–123) и NS3 (aa 1192–1457) при краткосрочной инкубации с ИФН-ДК не проявляют цитотоксической активности и не оказывают ингибирующего действия на экспрессию HLA-DR, CD80, и CD25; продукцию ДК про- и противовоспалительных цитокинов (TNF-α, IL-10 и IL-6); а также способность ДК стимулировать пролиферацию и продукцию Th1 и Th2 цитокинов в культурах аллогенных Т-клеток. Установлено, что нагруженные Core и NS3 белками ИФН-ДК (ДКCore/NS3) серонегативных доноров индуцируют пролиферацию, продукцию IFN-γ и активацию цитотоксических CD8⁺Т-клеток (в тесте дегрануляции) в культурах аутологичных мононуклеарных клеток (МНК). ДКCore/NS3 пациентов обладают сохранной стимуляторной активностью и также индуцируют HCV-специфические клеточные реакции в культурах аутологичных МНК. Показано, что вакцинация пациентов ДКCore/NS3 приводит к возрастанию пролиферации, продукции IFN-γ и дегрануляции CD8⁺ Т-клеток в ответ на стимуляцию МНК Core и NS3 белками, однако не приводит к активации Th2 ответа и экспансии CD4⁺CD25⁺CD127⁺ регуляторных Т-клеток. Возрастание Core и NS3-специфической пролиферации и дегрануляции CD8⁺ Т-клеток регистрируются после первого курса вакцинаций и более выражено при стимуляции Core. Усиление продукции IFN-γ наблюдается позже - после второго курса вакцинотерапии. При этом отмечается гетерогенность пациентов по типу и выраженности иммунного ответа. Установлено, что уровень NS3-специфической пролиферации и продукции IFN-γ после иммунотерапии ДК обратно коррелируют с репликацией вируса, однако выраженное (на 1 log и более) и стойкое снижение вирусной нагрузки регистрируется только у 20% пациентов. Продemonстрировано, что противовирусная терапия интерфероном и рибавирином не ингибирует развитие ДК-индуцированного иммунного ответа и комбинированная терапия позволяет добиться быстрого вирусологического ответа у большинства (86%) пациентов.

Теоретическая и практическая значимость. Теоретическая значимость работы заключается в расширении знаний о влиянии HCV белков на дендритные клетки человека моноцитарного происхождения, генерированные в присутствии интерферона-α, в частности, об отсутствии ингибирующего эффекта усеченных рекомбинантных белков Core (1-120) и NS3 (1192 – 1457) HCV (генотипа 1b) на созревание и функции ИФН-ДК. Полученные данные также демонстрируют способность ИФН-ДК серонегативных доноров, нагруженных Core (1-120) и NS3 (1192 – 1457) белками, стимулировать *in vitro* первичный клеточный ответ, включающий пролиферацию наивных Т-клеток, индукцию

Th1 ответа и активацию цитотоксических Т-клеток. Кроме того, результаты исследования свидетельствуют о состоятельности ИФН-ДКCore/NS3 пациентов с ХГС индуцировать *in vitro* и *in vivo* HCV-специфический иммунный ответ. Продемонстрированная индивидуальная гетерогенность HCV-специфического ответа по типу клеточных реакций, их выраженности и устойчивости, указывает на иммунопатогенетическую разнородность хронической HCV-инфекции. Выявление обратной взаимосвязи между репликацией вируса и NS3-индуцированным ответом свидетельствует о важной роли NS3-специфических Т-клеток в ограничении репликации вируса.

Значение работы в прикладном аспекте заключается в разработке протокола иммунотерапии на основе ИФН-ДК (патент №2637631 РФ) и его клинической апробации у больных ХГС. Полученные результаты свидетельствуют о хорошей переносимости и отсутствии побочных эффектов/осложнений и индукции/усилении антигенспецифических клеточных реакций на фоне вакцинотерапии пациентов ДК в виде монотерапии. Однако индуцированный иммунный ответ является недостаточным для элиминации вируса, что обосновывает целесообразность комбинирования терапии ИФН-ДК с противовирусными препаратами. Показано, что терапия интерфероном-α и рибавирином не оказывает ингибирующего эффекта на ДК-индуцированный иммунный ответ и в сочетании с иммунотерапией ДК позволяет добиться раннего вирусологического ответа у большинства пациентов.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Усеченные рекомбинантные белки Core (1-120) и NS3 (1192 – 1457) вируса гепатита С при кратковременной инкубации с ИФН-ДК не оказывают ингибирующего влияния на созревание и функции (продукцию про- и противовоспалительных цитокинов, аллостимуляторную активность ИФН-ДК и способность ДК стимулировать Т-клетки к продукции Th1 и Th2 цитокинов).
2. ИФН-ДК доноров и больных ХГС, нагруженные HCV Core (1-120) и NS3 (1192 – 1457) белками, стимулируют в культурах аутологических МНК антигенспецифические клеточные реакции в виде пролиферации, продукции IFN-γ и дегрануляции CD8+ Т-клеток.
3. Вакцинация пациентов ИФН-ДКCore/NS3 в виде монотерапии индуцирует HCV-специфический клеточный ответ (включая стимуляцию Th1 и цитотоксических CD8+ Т-клеток), развитие которого не подавляется противовирусными препаратами.

Апробация работы. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на: Всероссийских научно-практической конференции «V Конгресс Евро-Азиатского общества по инфекционным болезням» (Новосибирск, 2018), на 15-ом международном симпозиуме по дендритным клеткам - 15th International Symposium on Dendritic Cells.Forum on Vaccine Science. Апробация диссертации состоялась 28 июня 2018 г на семинаре клинического отдела НИИ фундаментальной и клинической иммунологии.

Работа выполнена в лаборатории клеточной иммунотерапии отдела клинической иммунологии НИИ фундаментальной и клинической иммунологии (руководитель лаборатории д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН Е.Р. Черных).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 7 печатные работы, зарегистрирован клинический протокол.

Объем и структура диссертации. Диссертация написана в традиционном стиле и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 4 глав собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения и выводов. Материал изложен на 123 страницах машинописного текста, включающего 20 таблиц и 21 рисунок. Работа выполнена в лаборатории клеточной иммунотерапии НИИФКИ, руководитель профессор Черных Е.Р. в рамках ПНИ: «Иммунотерапия с использованием аутологичных дендритно-клеточных вакцин в комплексном лечении больных с хроническим вирусным гепатитом С», ПНИ: «Характеристика Т-клеточного иммунного ответа, индуцированного дендритными клетками, нагруженными антигенами вируса гепатита С. (Иммунотерапия с использованием аутологичных дендритно-клеточных вакцин в комплексном лечении больных с хроническим вирусным гепатитом С)».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика больных, включенных в исследование

Диссертационная работа основана на результатах иммунологического обследования 51 донора крови, выполненного за период 2015-2017 гг. Также в исследование были включены 19 больных с ХГС (6 мужчин и 13 женщин), которые наблюдались в НИИФКИ СО РАМН с 2015-2018 гг.

Иммунологические исследования

Мононуклеарные клетки (МНК) из венозной гепаринизированной крови выделяли стандартным методом градиентного центрифугирования на фиколле-верографине. Прилипающую фракцию МНК (полученную как указано в предыдущем протоколе) инкубировали в полной культуральной среде RPMI-1640 (Sigma) в присутствии GM-CSF (Sigma-Aldrich, 40нг/мл), IFN α (Роферон-А, Roche, Швейцария 1000 Ед/мл) и 2,5% сыворотки крови плодов коровы (БиолоТ, Санкт-Петербург) в течение 4 суток при 37°C в CO₂-инкубаторе при 5% CO₂ с последующим добавлением на 24 ч в качестве дозревающего стимула липополисахарида (ЛПС E.colli 0114:B4, Sigma-Aldrich, 10 мкг/мл). После чего проводился подсчет ДК, а также сбор супернатантов ДК в необходимых объемах для тестирования. Клеточный выход составлял в среднем $1,3 \pm 0,28 \times 10^5$ ДК.

Для нагрузки ИФН-ДК использовали комбинацию рекомбинантных протеинов, кодируемых фрагментами генов иммунодоминантных районов белков Core (1-120) и NS3 (1192 – 1457) HCV генотипа 1b, полученных в лаборатории рекомбинантных белков ЗАО Вектор-Бест (Новосибирск). Генерированные в 4-суточных культурах незрелые, интактные ИФН-ДК инкубировали в течение 1 ч с рекомбинантными белками HCV Core и NS3 в дозе по 5 мкг/мл, после чего клетки однократно отмывали и индуцировали конечное созревание добавлением ЛПС (10 мкг/мл на 24 ч).

Оценку поверхностных маркеров проводили методом проточной цитофлуориметрии, используя моноклональные анти- CD14, -CD83, -CD80, -HLA-DR, -CD25 антител, меченных фикоэритрином (PE) и флуоресценции изотиоцианатом (FITC), (BD PharMingen, США).

Оценку аллостимуляторной активности ИФН-ДК оценивали в смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ) при культивировании МНК доноров ($0,1 \times 10^6$ /лунку) в 96-луночных круглодонных планшетах в присутствии аллогенных ИФН-ДК ($0,1 \times 10^5$ /лунку) в соотношении 10:1. Интенсивность пролиферации оценивали на 5 сут радиометрически

по включению 3H-тимидина, вносимого в лунки за 18 ч до конца культивирования в дозе 1 мккю/лунку. Индекс влияния ДК в алло-СКЛ рассчитывали как отношение пролиферативного ответа МНК в присутствии ДК к уровню спонтанной пролиферации МНК.

Определение продукции цитокинов осуществлялось методом иммуноферментного анализа (TNF- α , IL-6, IL-10) в супернатантах ЛПС-стимулированных ИФН-ДК, используя соответствующую тест-систему производства «Вектор-Бест» (г. Новосибирск).

Оценка способности ИФН-ДК активировать Th1- и Th2-ответ оценивали в алло-СКЛ (как описано выше). В качестве отвечающих клеток использовали МНК доноров ($0,1 \times 10^6$ МНК/лунку), истощенных от фракции адгезивных клеток. Культуральные супернатанты собирали на 5 сут, и оценивали содержание Th1- (IFN- γ) и Th2- (IL-6) цитокинов методом иммуноферментного анализа, используя соответствующие тест-системы («Вектор-Бест», Новосибирск).

Оценка способности ИФН-ДК индуцировать антигенспецифический ответ оценивали при культивировании МНК доноров ($0,2 \times 10^6$ /лунку) в 96-луночных круглодонных планшетах в присутствии аутологичных ИФН-ДК ($0,2 \times 10^5$ /лунку) в соотношении 10:1. Интенсивность пролиферации оценивали на 5 сут радиометрически по включению 3H-тимидина, вносимого в лунки за 18 ч до конца культивирования в дозе 1 мккю/лунку. Индекс влияния ДК в ауто-СКЛ рассчитывали как отношение пролиферативного ответа МНК в присутствии ДК к уровню спонтанной пролиферации МНК. Культуральные супернатанты собирали на 5 сут, и оценивали содержание Th1- (IFN- γ) и Th2- (IL-4, IL-6) цитокинов. Оценку антигенспецифической экстернализации CD107a на поверхности CD8 Т-клеток проводили путем добавления моноклонального антитела BD PharMingen, США) и APC-меченного моноклонального анти-CD107a (BD PharMingen, США) в культуры МНК совместно с ДК, нагруженными Core или NS3. В качестве контроля, использовали нестимулированные (негативный контроль) и анти-CD3 стимулированные (позитивный контроль) культуры МНК. Через 18 часов по окончании культивирования МНК с Core или NS3 антигенами клетки инкубировали с FITC-конъюгированными анти-CD3 и PE-конъюгированными анти-CD8-антителами согласно стандартной методике для определения поверхностных антигенов на клетке. Уровень экспрессии CD107a оценивали на проточном цитометре в гейте CD8⁺ клеток.

Клинические испытания иммунотерапии (ИТ) с использованием ИФН-ДК как монотерапии и в комбинации с противовирусным лечением интерфероном- α и рибавирином были проведены в соответствии с разработанным протоколом, утвержденным Ученым советом Института (протокол № 4 от 7 апреля 2015 г.) и одобрен локальным этическим комитетом.

Иммунотерапия включала два курса вакцинации. Первый курс состоял из 4 подкожных инъекций ДК (средняя доза 5×10^6 клеток), нагруженных рекомбинантным Core и NS3 антигенами, с недельным интервалом (общей продолжительностью 1 мес). Второй курс проводился после завершения первого и состоял из 6 вакцинаций с кратностью 1 раз в месяц (общей продолжительностью 6 мес). В качестве адъюванта использовали рекомбинантный IL-2 (Ронколейкин, «Биотех» Санкт-Петербург), который вводили подкожно в дозе 250 000 ЕД. Вакцинации проводили внутривенно в область плеча. Препарат IL-2 вводили аналогичным образом рядом с местом введения вакцины.

Противовирусное лечение включало ежедневный пероральный прием Рибавирина и еженедельные инъекции Альгерона. Дозировка данных препаратов рассчитывалась на массу тела пациента.

Для оценки иммуностимулирующего эффекта оценивали влияние вакцинации на индукцию специфического иммунного ответа, определяемого по пролиферации, продукции Th1 (IFN- γ) и Th2 (IL-4, IL-6) цитокинов, генерации ЦТЛ в культурах МНК, стимулированных Core или NS3 антигенами. Кроме того, оценивали эффект вакцинации на пролиферацию Т-клеток в ответ на стимуляцию конканавалином А (неспецифическая, митогенная реактивность) и генерацию регуляторных Т-клеток (CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg).

Статистическая обработка полученных результатов проводилась методами описательной, параметрической и непараметрической статистики на персональном компьютере с использованием программы «STATISTICA 6.0».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Чтобы оценить эффект вирусных рекомбинантных белков (Core+NS3) на созревание и функции ДК, исследовали влияние краткосрочной инкубации ИФН-ДК с указанными антигенами на экспрессию поверхностных маркеров и продукцию цитокинов в культурах ЛПС-активированных ДК, а также их аллостимуляторную активность и способность стимулировать Т-клетки к продукции Th1 и Th2 цитокинов в алло-СКЛ.

Сравнительный анализ поверхностных маркеров ЛПС-стимулированных ИФН-ДК показал (табл. 1), что средняя интенсивность флюорисценции HLA-DR, CD80 и CD25 в культурах ДК, нагруженных вирусными белками, и контрольных культурах значимо не различалась. Единственным выявленным отличием ДК, нагруженных вирусными белками, было незначительное снижение относительного содержания клеток, экспрессирующих CD83 ($pU=0,035$). Тем не менее, средняя интенсивность флюорисценции данного маркера достоверно не менялась ($pU=0,18$).

Таблица 1

Влияние рекомбинантных HCV белков Core/NS3 на фенотип ЛПС-стимулированных ИФН-ДК

Примечание: относительное содержание ДК и среднюю интенсивность флюорисценции

Маркер	Относительное содержание ИФН-ДК _{ЛПС} (%)		Средняя интенсивность флюоресценции (усл. ед.)	
	Контроль	+Core/NS3	Контроль	+Core/NS3
HLA-DR	87 (84-93)	93 (88,5-95)	891 (629-1721)	1022 (562-1618)
CD80	49 (29-62)	50 (35-54)	66,5 (59-145)	75 (55-120)
CD25	14,5 (5-26)	14 (7-28)	63,5 (53-80)	53 (40-70)
CD83	14 (11-20)	11 (7-18) *	48(39-66)	39 (35-57)
CD83 ⁺ CD14 ⁺	10 (7-16,5)	8 (5-14,5) *		

поверхностных маркеров оценивали в культурах ЛПС-стимулированных ИФН-ДК здоровых доноров (n=8), ненагруженных (Контроль) и нагруженных вирусными белками

(+Core/NS3). Данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона (в скобках). * - $pU < 0,05$; достоверность различий по сравнению с контролем.

Далее был проведен анализ влияния вирусных белков на продукцию TNF- α , IL-10 и IL-6 в культурах ЛПС-стимулированных ИФН-ДК. Как видно из данных рисунка 1, уровень продукции исследуемых цитокинов в культурах ИФН-ДК, нагруженных вирусными белками, был сопоставим с контрольными культурами ДКЛПС. Таким образом, нагрузка ИФН-ДК вирусными антигенами не оказывала значимого влияния на продукцию про- и противовоспалительных цитокинов.

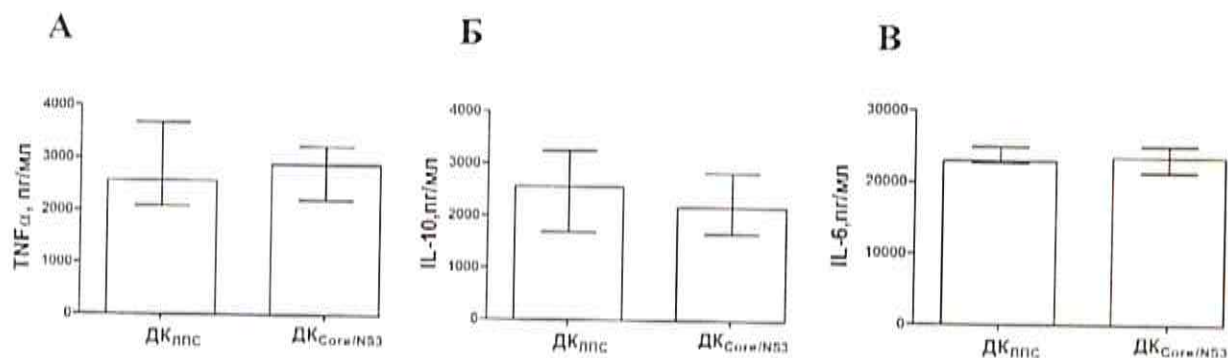


Рисунок 1. Влияние рекомбинантных HCV белков Core/NS3 на продукцию цитокинов ЛПС-стимулированными ИФН-ДК.

Представлены данные (Me; IQR) по продукции (pg/ml) TNF- α (n=4), IL-10 (n=4), и IL-6 (n=7) в культурах ЛПС-стимулированных ИФН-ДК здоровых доноров, ненагруженных (ДКЛПС) и нагруженных вирусными белками (ДК_{Core/NS3}).

Оценка влияния вирусных белков на аллоstimуляторную активность ИФН-ДК показала (рис. 2А), что уровень пролиферативного ответа МНК в алло-СКЛ в присутствии ИФН-ДК, нагруженных вирусными Core/NS3 белками, не отличался от такового в присутствии ЛПС-стимулированных ИФН-ДК, ненагруженных вирусными антигенами. Индексы влияния интактных ДК, и ДК, преинкубированных с рекомбинантными HCV белками, были сопоставимы между собой. Эти данные четко указывают на то, что нагрузка ИФН-ДК вирусными Core и NS3 антигенами не оказывает негативного влияния на их способность индуцировать пролиферацию Т-клеток в ответ на стимуляцию аллоантигенами. Нагрузка вирусными антигенами также не влияла на способность ИФН-ДК активировать Т-лимфоциты к продукции Th1- (IFN- γ) и Th2- (IL-6) цитокинов (рис. 2Б).

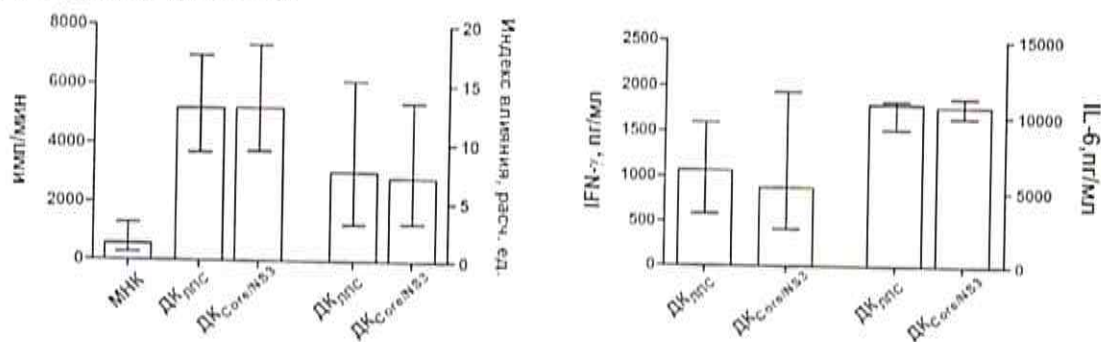


Рисунок 2. Влияние рекомбинантных HCV белков Core/NS3 на функциональную активность ИФН-ДК.

Представлены данные (Me; IQR; n=15) по пролиферации (имп/мин) МНК в отсутствие ИФН-ДК, а также в алло-СКЛ в присутствии ЛПС-стимулированных ИФН-ДК.

ненагруженных (ДК_{ЛПС}) и нагруженных вирусными белками (ДК_{Core/NS3}). Представлены также индексы влияния (расч.ед.) ДК в алло-СКЛ (рис.2А). На рис. 2Б представлены данные (Me; IQR; n=6) по продукции (пг/мл) Th1- (IFN- γ) и Th2- (IL-6) цитокинов в алло-СКЛ в присутствии ЛПС-стимулированных ИФН-ДК, ненагруженных (ДК_{ЛПС}) и нагруженных вирусными белками (ДК_{Core/NS3}).

Таким образом, нагрузка ИФН-ДК рекомбинантными Core и NS3 белками не влияет негативно на созревание и функциональную активность ДК.

Убедившись, что рекомбинантные вирусные белки Core и NS3 при нагрузке ИФН-ДК не оказывают ингибирующего действия на ДК, на следующем этапе была исследована способность ИФН-ДК, нагруженных вирусными белками, индуцировать антигенспецифический клеточный ответ в культуре МНК здоровых доноров.

Способность ДК индуцировать антигенспецифический пролиферативный ответ при нагрузке ДК Core и NS3 антигенами была исследована в культурах МНК 12 доноров. Медианный индекс стимуляции ДК_{Core/NS3} составил 1,55 (1,17-2,047) и значимо превышал уровень ответа, индуцированного ДК₀. Усиление пролиферации МНК в присутствии ДК_{Core/NS3} отмечалось в культурах МНК всех 12 тестируемых доноров. При этом ИС варьировал от 1,11 до 2,93, (Рис.3).

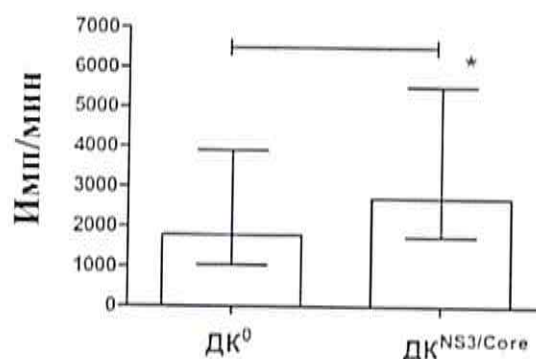


Рисунок 3. Способность ДК доноров, нагруженных Core и NS3 антигенами, индуцировать пролиферативный ответ МНК.

Данные представлены в виде среднего значения, интерквартильного диапазона, минимальных и максимальных значений. ДК₀ – интактные ДК, ДК_{Core/NS3} – ДК нагруженные Core и NS3 антигенами.

Поскольку одним из важнейших медиаторов противовирусного Т-клеточного ответа при HCV-инфекции является IFN- γ , была также исследована способность ИФН-ДК стимулировать продукцию IFN- γ . ДК, нагруженные HCV белками, стимулировали продукцию IFN- γ в половине случаев (у 5 из 10 доноров). Индекс стимуляции ДК_{Core/NS3} в подгруппе «ответчиков» составил в среднем 1,4 расч.ед., варьируя от 1,1 до 2,16 (рис.4).

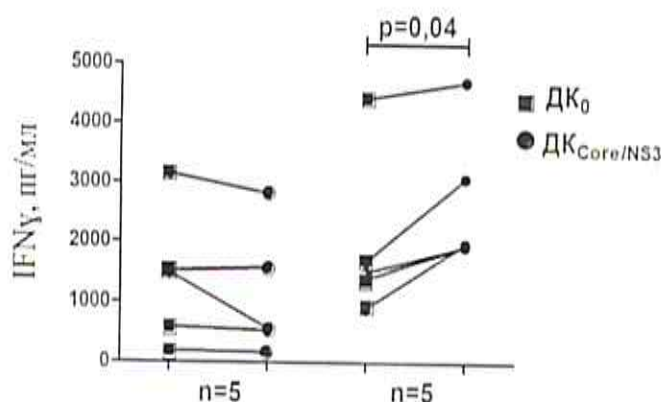


Рисунок 4. Способность ДК доноров, нагруженных Core и NS3 антигенами, индуцировать продукцию IFN- γ в культурах аутологичных МНК.

Данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона, а также индивидуальных значений. ДК₀ – интактные ДК, ДК_{Core/NS3} – ДК нагруженные Core и NS3 антигенами. n=10.

Концентрация IL6 в культурах МНК, стимулированных аутологичными ДК_{Core/NS3}, не превышала таковую в культурах МНК, активированных ДК₀ (Pw=0,62). Аналогичным образом, продукция IL-4 в культурах МНК, стимулированных ДК_{Core/NS3} и ДК₀, значимо не различалась (Pw=1,0). При анализе индивидуальных ответов возрастание IL-6 и IL-4 выявлялось только у одного из 4 доноров (рис.5А, Б).

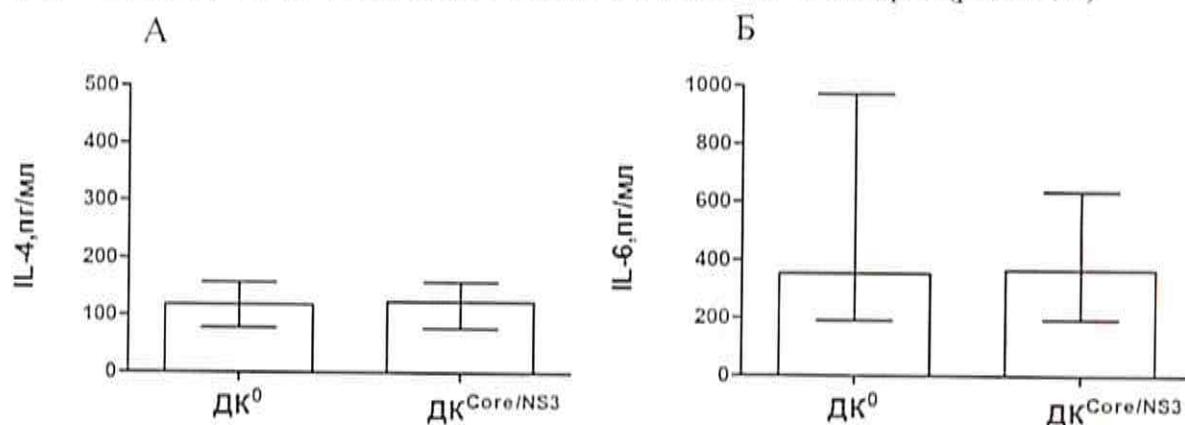


Рисунок 5А,Б. Способность ДК доноров, нагруженных Core и NS3 антигенами, индуцировать продукцию IL-6 и IL-4 в культурах аутологичных МНК.

Данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона. ДК₀ – интактные ДК, ДК_{Core/NS3} – ДК нагруженные Core и NS3 антигенами. n=4.

Исследование способности ДК_{Core/NS3} индуцировать антигенспецифические цитотоксические Т-клетки показало, что относительное количество CD3⁺CD8⁺CD107a⁺ Т-клеток в культурах МНК, стимулированных ДК_{Core/NS3} было достоверно выше, чем в культурах МНК, индуцированных ДК₀, что свидетельствует о способности ДК доноров примировать антигенспецифические цитотоксические лимфоциты. ИС ДК_{Core/NS3} у всех 10 тестируемых доноров превышал 1,3 (рис.6).

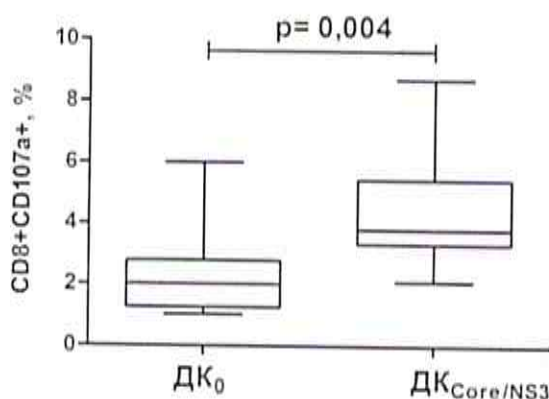


Рисунок 6. Способность ДК доноров, нагруженных Core и NS3 антигенами, активировать аутологичные цитотоксические Т-лимфоциты в тесте дегрануляции CD8+Т-клеток.

Данные представлены в виде медианы, интерквартильного диапазона, максимальных и минимальных значений. ДК₀ – интактные ДК, ДК_{Core/NS3} – ДК нагруженные Core и NS3 антигенами. n=10.

Таким образом, ДК, нагруженные рекомбинантами HCV Core и NS3 белками, способны индуцировать антигенспецифический клеточный ответ в культурах МНК серонегативных доноров, о чем свидетельствует более высокие уровни пролиферации, продукции IFN- γ и содержания CD8⁺CD107a⁺ Т-клеток в культурах МНК, стимулированных ДК_{Core/NS3} по сравнению с таковыми в культурах МНК, стимулированных контрольными ДК (ДК₀).

Далее была исследована способность ДК индуцировать или усиливать клеточный ответ на рекомбинантные антигены в культурах аутологичных МНК у больных ХГС (генотип 1в). ДК_{Core/NS3} индуцировали пролиферативный ответ у 6 из 7 пациентов. Медианный ИС ДК_{Core/NS3} составил 1,42 (1,37-1,72) и уровень пролиферативного ответа, индуцированного ДК_{Core/NS3}, значительно превышал таковой в культурах с ДК₀ (P=0,017) (Рис 7).

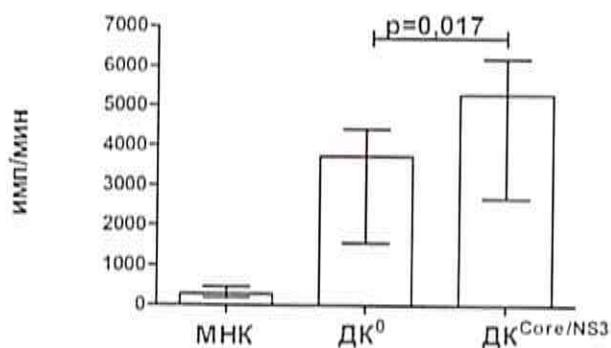


Рисунок 7. Способность ДК пациентов, нагруженных Core и NS3 антигенами, индуцировать пролиферативный ответ в культурах аутологичных МНК.

Данные представлены в виде медианы, интерквартильного диапазона. МНК – МНК в отсутствие ИФН-ДК, ДК₀ – интактные ДК, ДК_{Core/NS3} – ДК нагруженные Core и NS3 антигенами. n=10.

ДК, нагруженные Core и NS3 стимулировали продукцию IFN- γ в культурах МНК 4 из 7 тестируемых пациентов. Индекс стимуляции ДК_{Core/NS3} в этой подгруппе варьировал от 1,13 до 2,29 (Рис 8).

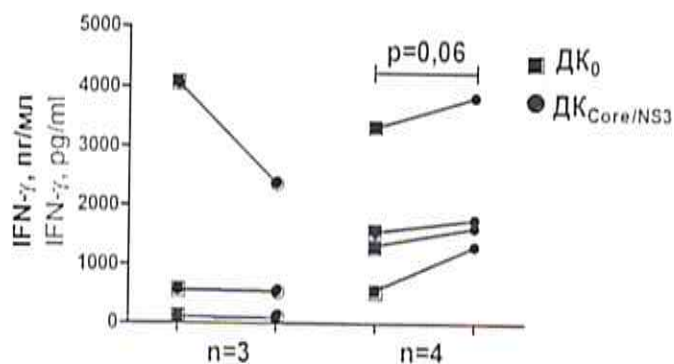


Рисунок 8. Способность ДК пациентов, нагруженных Core и NS3 антигенами, индуцировать продукцию IFN- γ в культурах аутологичных МНК.

Данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона, а также индивидуальных значений. ДК₀ – интактные ДК, ДК_{Core/NS3} – ДК нагруженные Core и NS3 антигенами. n=7.

При оценке влияния ДК_{Core/NS3} на продукцию IL-6 и IL-4, было выявлено, что Медианный уровень IL-6 в культурах МНК, стимулированных ДК_{Core/NS3}, не превышал таковой в культурах МНК с ДК₀. Аналогичным образом, продукция IL-4 в культурах МНК, стимулированных ДК_{Core/NS3} и ДК₀, значимо не различалась. Индексы стимуляции ДК_{Core/NS3} при оценке продукции IL-6 и IL-4 составили, соответственно 1,08 и 0,93. Тем не менее, при индивидуальном анализе у двух из 5 тестируемых пациентов ДК_{Core/NS3} умеренно повышали продукцию IL-6 и IL-4 (Рис. 9 А, Б).

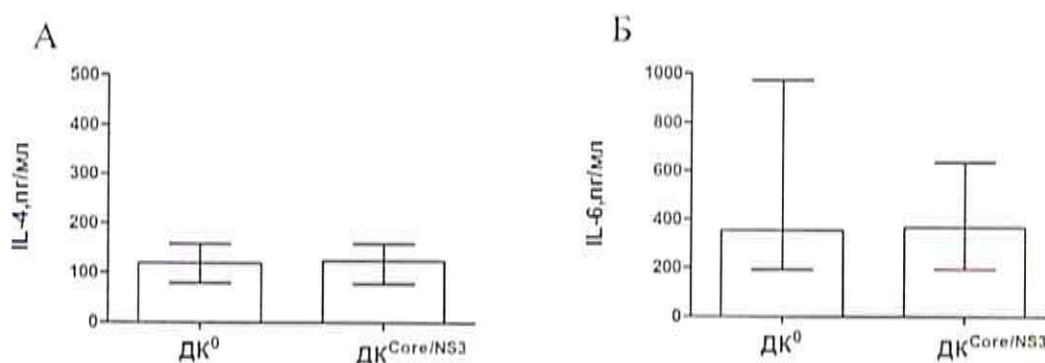


Рисунок 9 А,Б. Способность ДК пациентов, нагруженных Core и NS3 антигенами, индуцировать продукция IL-6 и IL-4 в культурах аутологичных МНК.

Данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона. ДК₀ – интактные ДК, ДК_{Core/NS3} – ДК нагруженные Core и NS3 антигенами. n=4.

Исследование способности ДК больных индуцировать дегрануляцию CD8⁺ цитотоксических Т-клеток выявило незначительное возрастание относительного количества CD8⁺CD107a⁺ Т-клеток в культурах МНК, стимулированных ДК_{Core/NS3} по сравнению с ДК₀. Медианна ИС ДК_{Core/NS3} составила 1,29 (0,96-1,94). (Рис 10).

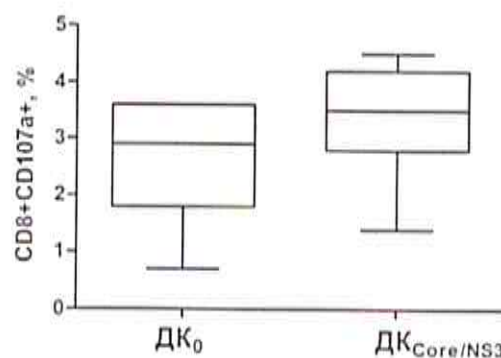


Рисунок 10. Способность ДК пациентов, нагруженных Core и NS3 антигенами, активировать аутологичные цитотоксические Т-лимфоциты в тесте дегрануляции CD8⁺ Т-клеток.

Данные представлены в виде медианы, интерквартильного диапазона, максимальных и минимальных значений. ДК₀ – интактные ДК, ДК_{Core/NS3} – ДК нагруженные Core и NS3 антигенами. n=7.

Сравнительный анализ антигенспецифического ответа, индуцированного ДК больных и ДК доноров показал, что ДК_{Core/NS3} пациентов не отличались от таковых у доноров по способности стимулировать пролиферацию МНК, индуцировать Т-клетки к продукции IFN-γ, активировать антигенспецифические цитотоксические Т-клетки. (таб.2)

Таблица 2

Сравнительная оценка антигенспецифического ответа МНК, индуцированного ДК Core/NS3 доноров и больных ХГС

Параметры	Доноры	Пациенты
<u>Пролиферация</u>		
- частота ответа (n/n)	100% (12/12)	86% (6/7)
- имп/мин	2700 (1780 – 5360)	5290 (2670 – 6190)
- ИС (расч. ед.)	1,55 (1,2 – 2,5)	1,42 (1,37 – 1,72)
<u>Продукция IFN-γ</u>		
- частота ответа (n/n)	50% (5/10)	57% (4/7)
- уровень IFN-γ в группе «ответчиков» (нг/мл)	1960 (1920 – 3080)	1690 (1470 – 2790)
- ИС в группе «ответчиков» (расч. ед.)	1,4 (1,31 – 1,84)	1,2 (1,14 – 1,75)
<u>Дегрануляция CD8+ Т-клеток</u>		
- частота ответа (n/n)	100% (10/10)	57% (4/7)
- % CD3+CD8+CD107a+ Т-клеток	3,8 (3,5 – 4,9)	3,5 (2,8 – 4,2)
- ИС (расч. ед.) в общей группе	2,0 (1,6 – 2,3)	1,29 (0,96-1,94)*
ИС (расч. ед.) в группе «ответчиков»	2,0 (1,6 – 2,3)	1,65 (1,33 - 3,97)

Примечание: представлены данные (M±m; Me; IQR-в скобках).

Полученные данные о сохранной аллостимуляторной активности и способности ИФН-ДК у больных ХГС индуцировать антигенспецифический ответ в культурах МНК пациентов, послужили основанием для апробации ИФН-ДК с целью индукции или усиления иммунного ответа при хронической HCV-инфекции.

Вакцинация аутологичными ИФН-ДК, нагруженными Core и NS3 вирусными антигенами, характеризовалась хорошей переносимостью.

Для оценки индукции антигенспецифического иммунного ответа на фоне иммунотерапии ДК исследовали пролиферативный ответ, продукцию Th1-(IFN-γ)/Th2(IL-4) цитокинов и активацию CD8⁺Т-клеток ответ на стимуляцию МНК Core и NS3 белками. Кроме того, исследовали эффект вакцинации на митогенную реактивность МНК при стимуляции конканавалин А (неспецифическая реактивность) и генерацию регуляторных Т-клеток (CD4⁺CD25⁺CD127⁻).

До начала терапии МНК HCV-позитивных пациентов слабо отвечали пролиферацией на стимуляцию вирусными антигенами (таб.3). После иницирующего курса регистрировалось значимое усиление специфического ответа на Core, которое выявлялось у всех 10 пациентов. Антигенспецифический ответ на Core белок сохранялся у 8 пациентов через 6 месяцев по окончании терапии. После иницирующего курса вакцинотерапии отмечалось умеренное возрастание ИВ_{NS3} по сравнению с показателями до терапии. Возрастание уровня NS3-специфического пролиферативного ответа сохранялось после поддерживающего курса и 6-месячного периода наблюдения.

Таким образом, вакцинотерапия приводила к выраженному и достоверному возрастанию Core-специфического пролиферативного ответа МНК и умеренному (на уровне тренда) усилению NS3-специфического ответа.

Таблица 3

Прролиферативный ответ МНК больных ХГС на Core и NS3 антигены в динамике иммунотерапии ДК

		До вакцино-терапии	После иницирующего курса	После поддерживающего курса	Через 6 мес наблюдения
Core	Пролиферация (имп/мин)	660 (285-1090)	2065 (605-2519) Pu=0,034	3875 (2504-7263) Pu=0,0005	5359 (1515-5576) Pu=0,002
	Индекс влияния (ИВ, расч. ед)	1,5 (1-4,9)	5,2 (2,3-11,5) Pu=0,019	7,8 (5,4-10,6) Pu=0,002	5,0 (1,8-25,2) Pu=0,04
	Количество пациентов с ИВ>2,0	4/10	8/10	10/10	7/10
NS3	Пролиферация (имп/мин)	1316 (589-1794)	1575 (677-2345)	1646 (1329-3824)	1618 (1147-2351)
	Индекс влияния (ИВ, расч. ед)	2,5 (1,8-5,2)	3,3 (1,9-5,9)	3,0 (1,8-5,7)	3,0 (1,6-7,6)
	Количество пациентов с ИВ>2,0	5/10	6/10	7/10	6/10

Примечание: данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона (в скобках); р - значимость различий показателей по сравнению со значениями до вакцинации. U-критерий Манна-Уитни.

Анализ митогенной реактивности МНК больных ХГС показал, что вакцинотерапия восстанавливала исходно сниженную неспецифическую митогенную реактивность Т-клеток. (таб.4)

Таблица 4

Митогенная реактивность МНК больных ХГС в динамике иммунотерапии ДК

Контрольные точки	Прролиферативный ответ (имп/мин)	Индекс влияния (расч.ед.)
До вакцинации	10699 (2577-15200)	15(10-60)
После иницирующего курса	20982 (17167-24833) *	83 (68-117) *
После поддерживающего курса	23327 (22096-29587) *	104 (61-145) *
После 6 месячного периода наблюдения	35015(26286-37388) *	81 (66-154) *

Примечание: данные 10 больных ХГС представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона (в скобках); индекс влияния рассчитывали как отношение ответа в КонА-

стимулированных культурах к спонтанной пролиферации МНК; * - $p < 0,05$; значимость различий по сравнению со значениями до вакцинации. U- непараметрический критерий Манна-Уитни.

Вакцинотерапия ДК, нагруженными Core и NS3 антигенами индуцировала антигенспецифический Th1 ответ, который проявлялся усилением продукции IFN- γ в культурах МНК, стимулированных Core или NS3 антигенами, что особенно проявлялось после поддерживающего курса вакцинаций и сохранялось через 6 месяцев наблюдения (рис.11).

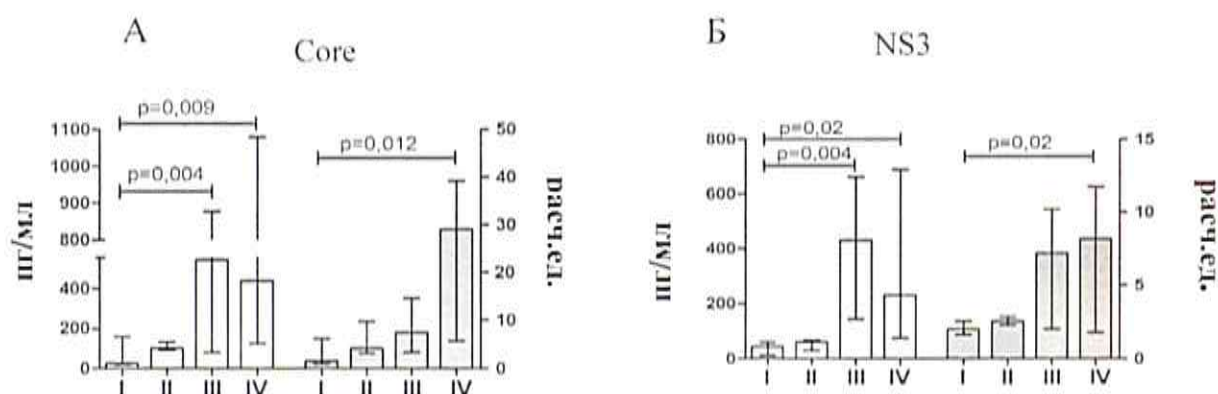


Рисунок 11. Продукция IFN- γ в культурах МНК, стимулированных Core и NS3 антигенами, в динамике иммунотерапии ДК.

Представлены данные (Me; UQ-LQ) по продукции IFN- γ (А, Б) в культурах МНК пациентов с ХГС (n=10) до начала иммунотерапии (I), после иницирующего курса (II), после поддерживающего курса (III) и через 6 мес наблюдения (IV). По левой оси ординат - продукция IFN- γ (нг/мл), по правой - индексе влияния вирусных антигенов (расч. ед.). р - достоверность различия по сравнению с исходными значениями (U – критерий Манна-Уитни).

Вакцинация ДК нагруженными Core и NS3 антигенами не индуцировала антигенспецифический Th2 ответ, что проявлялось стабильным уровнем концентрации IL-4 и IL-6 на протяжении всего периода лечения и наблюдения (рис.12).

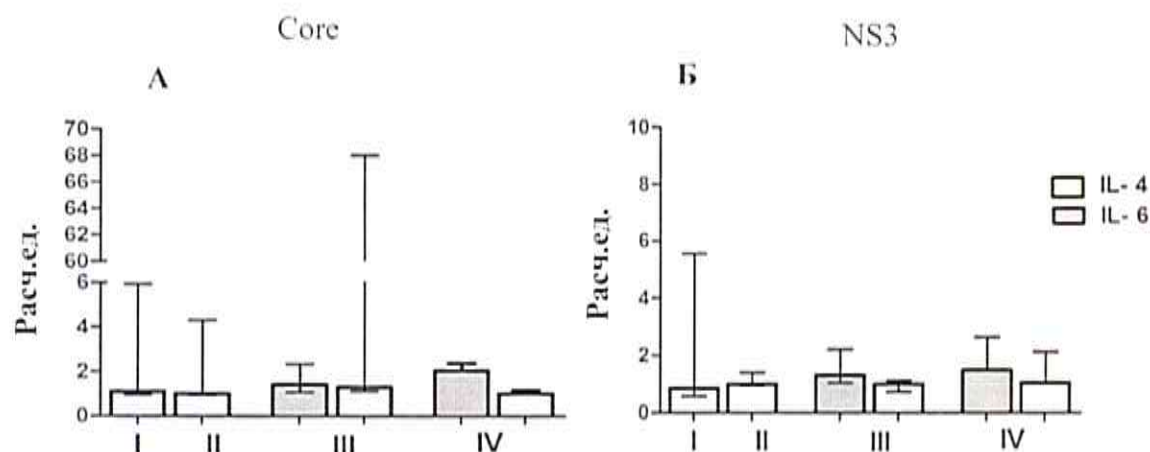


Рисунок 12. Продукция IL-4 и IL-6 в культурах МНК, стимулированных Core и NS3 антигенами, в динамике иммунотерапии ДК.

Представлены данные (Me; UQ-LQ) по продукции IL-4, IL-6 в культурах МНК пациентов с ХГС (n=10) до начала иммунотерапии (I), после иницирующего курса (II), после поддерживающего курса (III) и через 6 мес наблюдения (IV).

Анализ взаимосвязей между антигенспецифической пролиферацией и продукцией цитокинов показал наличие значимой корреляционной связи между продукцией IFN- γ и уровнем пролиферации в NS3-стимулированных культурах МНК ($R_s=0,83$; $p=0,04$) и между продукцией IFN- γ и ИВ_{Core} в Core-стимулированных культурах ($R_s=0,78$; $p=0,036$) через 6 мес после завершения вакциноотерапии.

Для мониторингирования ответа цитотоксических Т-клеток исследовали антигениндуцированную дегрануляцию CD8⁺Т-клеток, используя цитофлюориметрическую оценку мобилизации молекулы CD107a. Уровень спонтанной дегрануляции CD8⁺ Т-клеток у больных ХГС не отличался от такового у доноров и составлял до начала терапии $3,7 \pm 0,6\%$. Стимуляция Core- и NS3 антигенами приводила к существенному возрастанию CD8⁺CD107a⁺ лимфоцитов. Относительное содержание Core- и NS3-индуцированных CD8⁺CD107a⁺ лимфоцитов было повышено исходно (перед терапией) и возрастало на фоне вакциноотерапии, а к исходу 6-месячного наблюдения снижалось до исходного уровня (Рис. 13 А,Б). Характерно, что по силе ответа Core-специфическая дегрануляция CD8⁺ Т-клеток превышала NS3-индуцированный цитотоксический ответ. Эти различия были достоверны после первого ($pW=0,04$) и ($pW=0,02$) второго курса вакцинаций и регистрировались в виде тренда после 6-месячного наблюдения ($pW=0,07$).

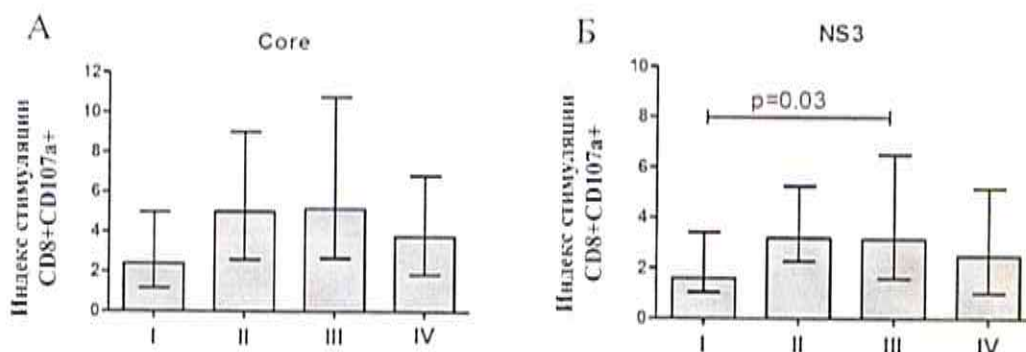


Рисунок 13. Оценка антигенспецифических CD8⁺ цитотоксических клеток в динамике иммунотерапии пациентов с ХГС.

Результаты представлены как индексы стимуляции (Me; IQR) антигенспецифической дегрануляции CD8⁺Т-клеток у вакцинированных пациентов до начала иммунотерапии (I), после иницирующего курса (II), после поддерживающего курса (III) и через 6 мес наблюдения (IV). $pW < 0,05$, значимость различий по сравнению с исходным уровнем (I); W, тест Уилкоксона.

При оценке относительного содержания CD4⁺CD25⁺CD127⁻Treg в периферической крови больных в динамике лечения было показано, что относительное содержание Treg после проведения иницирующего курса вакциноотерапии, а также к исходу 6 месячного наблюдения после завершения иммунотерапии значимо не увеличивалось (рис.14). Следует также отметить, что исходно (перед началом иммунотерапии) и на момент завершения исследования между количеством Treg и антигенспецифическим ответом не выявлялось какой-либо взаимосвязи.

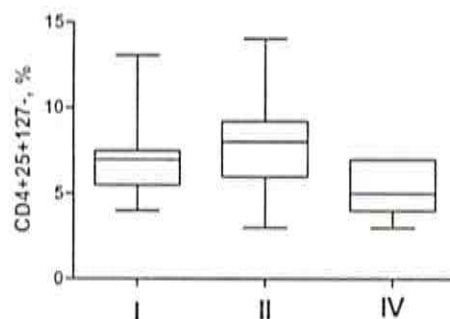


Рисунок 14. Относительное содержание $CD4^+CD25^+CD127^-$ Treg в динамике иммунотерапии ДК.

Данные представлены в виде среднего значения, интерквартильного диапазона, минимальных и максимальных значений. I - до начала иммунотерапии, II - после иницирующего курса и IV - через 6 мес наблюдения.

Иммунотерапии ДК не оказывала значимого влияния на вирусную нагрузку. Медианный уровень HCV RNA исходно составлял $12,3 (3,5-94) \times 10^4$ ЕД/мл и значимо не изменялся после первого курса ($10,2; 4,1-35 \times 10^4$ ЕД/мл), второго курса ($12,0; 6,5-56 \times 10^4$ МЕ/мл) и 6-месячного периода наблюдения ($20,5; 4,7-40 \times 10^4$ МЕ/мл). Анализ индивидуальных данных динамики вирусной нагрузки показал, что временное снижение HCV RNA (около 1 log10) после первого курса терапии (через 1 месяц) отмечалось у 4 пациентов. Однако только у двух из них эффект сохранялся спустя 6 месяцев после завершения второго курса иммунотерапии.

Несмотря на отсутствие значимого вирусологического ответа на фоне вакцинотерапии важно отметить, что через 6 мес после завершения вакцинотерапии между уровнем вирусной нагрузки и пролиферативным ответом на NS3 антигены выявлялась обратная корреляционная связь ($R_s = -0,62; p = 0,05$). Кроме того, показатели вирусной нагрузки обратно коррелировали с NS3-специфической продукцией IFN- γ ($R_s = -0,82; p = 0,001$). Обратная взаимосвязь вирусной нагрузки с уровнем Core-специфической продукции IFN- γ регистрировалась на уровне тренда уже после иницирующего курса и сохранялась к моменту завершения 6 мес наблюдения ($R_s = -0,56; p = 0,08$).

Полученные данные свидетельствуют, что вакцинация аутологичными ИФН-ДК, нагруженными рекомбинантными HCV белками, в виде монотерапии вызывает развитие антигенспецифического ответа, который подтверждается возрастанием пролиферации, продукции IFN- γ и дегрануляции CD8 T-клеток при стимуляции МПК Core (aa 1–123) и NS3 (aa 1192–1457) белками. Иммунный ответ индуцируется у всех пациентов, хотя характеризуется индивидуальной гетерогенностью по типу клеточных реакций, а также выраженности и продолжительности ответа. Полученные данные об обратной корреляционной связи между индуцированным иммунным ответом (NS3-специфическая пролиферация и продукция IFN- γ) и вирусной нагрузкой после проведения иммунотерапии ДК свидетельствуют о способности T-клеток контролировать репликацию вируса.

Следующий этап работы был посвящен клинической апробации ИФН-ДК в комбинации с противовирусным лечением интерфероном- α и рибавирином.

Проводимая терапия характеризовалась хорошей переносимостью, поскольку не вызывала серьезных нежелательных явлений, включая обострение хронических

заболеваний и ситуаций, требующих госпитализации пациента. Введение ДК вакцин не влияло на показатели крови и не вызывало токсических реакций со стороны различных органов. Тем не менее, на фоне лечения регистрировалось временное снижение количества нейтрофильных гранулоцитов (нейтропения), что является частым побочным эффектом терапии интерферонами. Через 6 месяцев лечения количество нейтрофилов восстанавливалось до уровня нормативных значений. У 3 из 8 пациентов на фоне противовирусной терапии интерфероном- α и рибавирином были отмечены побочные эффекты в виде тромбоцитопении (Больной №5), лекарственной токсикодермии (Больной №1) и токсической кардиомиопатии (Больной №2). В связи с развитием данных побочных реакций пациенты отказались от дальнейшего продолжения противовирусной терапии и поэтому были выведены из исследования. Также, у одного пациента терапия была прекращена через 3 месяца (на 2 контрольной точке) в связи со стабильной вирусной нагрузкой, отражающей резистентность к базисным препаратам.

До начала терапии МНК пациентов слабо отвечали пролиферацией на стимуляцию NS3 (Таблица 5). Наличие антигенспецифического ответа ($IS > 3,0$) выявлялось у 2-х из 8 пациентов. Через 1 мес. терапии IS_{NS3} возрастал до 1,7 расч. ед. и наличие антигенспецифического ответа определялось уже у 5 из 6 пациентов. Через 3 мес. лечения IS_{NS3} достигал 19 расч. ед. и через 6 мес снижался до 3,2, однако по-прежнему превышал исходные значения. Анализ Core-специфического ответа показал, что через 1 мес. терапии регистрировалось усиление пролиферативного ответа на Core, что проявлялось возрастанием IS_{Core} с 3,6 до 4,3 расчет. ед. Анализ Core-специфического ответа показал, что через 1 мес. терапии регистрировалось усиление пролиферативного ответа на Core, что проявлялось возрастанием IS_{Core} с 3,6 до 4,3 расчет. ед. После завершения 3-месячного лечения IS_{Core} незначительно снижался до 2,7 расчет. ед. по сравнению с исходными данными, а спустя 6 месяцев терапии опять повышался до уровня 4 расч. ед. Наличие антиген-специфического ответа на Core антиген в эти сроки сохранялось у 2-х из 4-х пациентов.

Таким образом, вакцинация пациентов ДК на фоне противовирусной терапии приводила к выраженному и достоверному возрастанию NS3-специфического пролиферативного ответа МНК и умеренному усилению Core-специфического ответа.

Таблица 5

Антигенспецифический пролиферативный ответ МНК на Core и NS3 антигены

Точки обследования	NS3			Core		
	Пролиферативный ответ (имп/мин)	Индекс влияния (расч.ед.)	Частота пациентов с ИВ $> 3,0$	Пролиферативный ответ (имп/мин)	Индекс влияния (расч.ед.)	Частота пациентов с ИВ $> 3,0$
До терапии n=6	691 (407-1311)	1,1 (0,7-1,9)	1/8	1794 (1303-2694)	2,8 (1,6-3,9)	3/6
Через 1 мес. терапии, n=6	526 (305-1223)	1,7 (1,6-3,8)	2/6	1074 (778-1302)	4,3 (1,9-5,8)	4/6
Через 3 мес. терапии.	2456 (2353-4683)*	19 (5-21)*	4/6	817 (602-2143)	2,7 (1,6-6,6)	2/5

n=5						
Через 6 мес. терапии, n=4	401 (279-3145)	3,2 (2,2-5,1)	2/3	994 (115-2481)	4,0 (1,3-5,6)	2/4

Примечание: данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона (в скобках); n=количество наблюдений. * - $p_U < 0,05$; достоверность различия показателей по сравнению с исходными значениями. U- критерий Манна-Уитни.

Анализ митогенной реактивности МНК больных ХГС в динамике терапии показал, что через 1 мес. терапии интенсивность КонА-стимулированной пролиферации достоверно снижалась и к моменту завершения 6-месячного курса лечения оставалась на сниженном уровне.

Следует отметить, что исходно уровень КонА-стимулированной пролиферации достоверно коррелировал с Core- ($R_s = 0,73$, $p = 0,03$, $n = 8$) и после месяца лечения с NS3-специфическим ответом ($R_s = 0,9$, $p = 0,03$; $n=5$). В то же время после 3-6 месяцев лечения эта корреляционная связь становилась статистически незначимой ($R_s = 0,5$, $p = 0,1$ с Core- и $R_s = 0,5$, $p = 0,1$ с NS3-специфической пролиферацией). Это указывало на то, что в процессе иммунотерапии снижение неспецифической резистентности не влияло критическим образом на индукцию Core- и NS3-специфического иммунного ответа.

Исследование влияния терапии на ЦТЛ показало, что проведение терапии сопровождалось возрастанием ответа $CD8^+$ Т-клеток в тесте Core и NS3-индуцированной дегрануляции, что свидетельствовало о возрастании доли HCV-специфических ЦТЛ в динамике терапии (Таблица 6)

Таким образом, вакцинация ДК на фоне противовирусной терапии индуцировала появление сенсibilизированных $CD8^+$ Т-клеток, способных отвечать дегрануляцией на стимуляцию вирусными белками, причем Core-специфический ответ характеризовался большей выраженностью.

Таблица 6

Относительное содержание $CD8^+CD107a^+$ цитотоксических Т-лимфоцитов в динамике комбинированной терапии

Периоды обследования	NS3	Core	Anti-CD3
До терапии n=7	1,0 (0,3-3,3)	1,2(0,1-2,7)	4,4 (3,3-7,7)
Через 1 мес. терапии, n=7	1,6 (0,5-2,9)	6,8 (1,9-11,4)*	11,6 (10-20)*
Через 3 и 6 мес. терапии, n=9#	2,3 (0,1-5,0)	5,6 (0,5-7,4)*	20 (13,8-36)*

Примечание: Относительное количество $CD3^+CD8^+CD107a^+$ Т-клеток в динамике вакцинотерапии рассчитывалось по формуле (% $CD3^+CD8^+CD107a^+$ опыт - $CD3^+CD8^+CD107a^+$ контроль, где опыт - NS3-, Core- или anti-CD3 стимулированные культуры; контроль - интактная культура). Данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона (в скобках); n=количество наблюдений). Количество $CD8^+CD107a^+$ Т-лимфоцитов (%) в культурах МНК больных-НCV нестимулированных антигенами (0) и в ответ на NS3, Core и anti-CD3 в динамике терапии. *- достоверность различий по сравнению с показателями до терапии. Частотный анализ, как количество пациентов с увеличением относительного содержания $CD3^+CD8^+CD107a^+$ клеток по

сравнению со значениями до терапии. # - результаты обследования через 3 и 6 мес. объединены в силу немногочисленной выборки.

Оценка влияния комбинированной терапии на генерацию $CD4^+CD25^+CD127^-$ T-reg показала, что проведение лечения не сопровождалось возрастанием доли регуляторных Т-клеток на всех исследуемых точках терапии (рис. 15). Также корреляционный анализ не выявил связи между уровнем регуляторных Т-клеток и пролиферативным ответом на NS3 и Core- на фоне терапии (общая выборка через 1 и 3 месяца, $n=10$) ($R_s=0,3$, $p=0,3$ и $R_s=-0,3$, $p=0,3$; соответственно), что свидетельствует об отсутствии стимулирующего действия терапии на генерацию T-reg несмотря на снижение неспецифической реактивности Т-клеток.

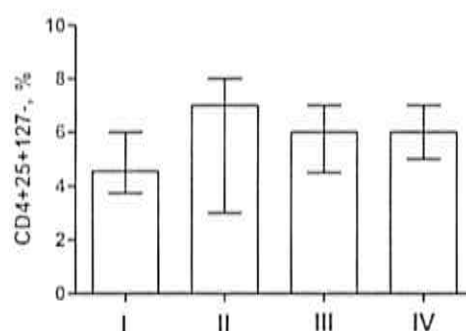


Рисунок 15. Относительное содержание $CD4^+25^+127^-$ регуляторных Т-клеток в динамике терапии.

Данные представлены в виде среднего значения, интерквартильного диапазона. Относительное содержание T-reg: I - до начала терапии ($n=6$), II – после 1 мес. терапии ($n=6$), III - через 3 мес. терапии ($n=3$), через 6 мес.терапии ($n=3$).

Далее был проведен анализ вирусной нагрузки с помощью количественного ПЦР на РНК вируса гепатита С до терапии, через месяц лечения, через 3 и 6 месяцев лечения (Таблица 7).

Оценка быстрого вирусологического ответа (БВО; снижение или отсутствие РНК вируса в крови через 1 месяц терапии) была проанализирована у 7 пациентов. БВО был достигнут у 6 из 7 пациентов (86%). Через 6 мес терапии двое пациентов с недетектируемым уровнем РНК сохранили аналогичный показатель. Еще у двоих пациентов (со снижением вирусной нагрузки через месяц лечения) – на 2-ой и 3-ей контрольных точках наблюдалось снижение вирусной РНК до недетектируемого уровня. В итоге, у всех 4-х пациентов, прошедших 6-месячный курс лечения был достигнут устойчивый вирусологический ответ в виде отсутствия РНК HCV вируса в крови.

Таблица 7

Характеристика вирусной нагрузки пациентов в динамике терапии

Пациент N п.п	До терапии, n=8	Через 1 мес. терапии, n=7	Через 3 мес. терапии, n=5	Через 6 мес. терапии, n=4
1. Больной А.М.	$8,8 \cdot 10^4$	выбыл	выбыл	выбыл
2. Больной Р.Н.	$3,5 \cdot 10^5$	$6,5 \cdot 10^3$	выбыл	выбыл
3. Больной Л.М.	$3,5 \cdot 10^4$	$6,9 \cdot 10^4$	$9,4 \cdot 10^4$	выбыл

4. Больной Б.Б.	$2,4 \times 10^4$	$7,4 \times 10^2$	<60	<60
5. Больной Т.Д.	$3,2 \times 10^5$	$5,8 \times 10^4$	выбыл	выбыл
6. Больной М.Е.	$3,9 \times 10^5$	<60	<60	<60
7. Больной П.А.	$1,3 \times 10^6$	$1,5 \times 10^3$	<60	<60
8. Больной Б.Р.	$3,4 \times 10^5$	<60	<60	<60

Примечание: определение РНК вируса гепатита С в сыворотке крови методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией в режиме «реального времени».

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об отсутствии ингибирующего эффекта противовирусной терапии на индукцию антигенспецифического ответа, проявляющегося усилением Core- и NS3-специфической пролиферации и дегрануляции CD8⁺T-клеток при стимуляции МНК Core- и NS3 белками, в динамике терапии. При этом снижение митогенной реактивности не связано с экспансией CD4⁺CD25⁺CD127⁺ T-reg. Во-вторых, вакцинация пациентов ДКCore/NS3 на фоне противовирусной терапии приводила к более выраженному NS3-специфическому пролиферативному ответу (по сравнению с ответом на Core-) через 3 мес. лечения. БВО наблюдался у 6 из 7 пациентов (86%), а у всех 4 пациентов, получивших 3-месячное лечение, регистрировалось полное прекращение репликации вируса, которое сохранялось к исходу 6-мес лечения, т.е. достигался устойчивый вирусологический ответ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные в данной работе исследования позволяют заключить, что нагрузка ИФН-ДК соответствующими усеченными фрагментам рекомбинантных HCV белков Core (1-120) и NS3 (1192-1457), не влияет негативно на созревание и функциональную активность ДК.

Полученные в настоящей работе данные свидетельствуют о возможности индукции *in vitro* антигенспецифического Т-клеточного ответа у больных ХГС.

Установлено, что специфическая иммунотерапия аутологичными дендритными клетками, генерируемыми из моноцитов в присутствии IFN- α и нагруженными рекомбинантными вирусными белками Core (ак 1–123) и NS3 (ак 1192–1457), как монотерапия или проводимая на фоне ПБТ, характеризуется хорошей переносимостью, не вызывает тяжелых нежелательных явлений, а также выраженных местных и системных аллергических и/или воспалительных реакций. Проведение иммунотерапии сопровождается индукцией антигенспецифического иммунного ответа.

Мы продемонстрировали, что иммунотерапия ИФН-ДК способствует генерации антигенспецифического иммунного ответа на вирусные Core и NS3 антигены, продукции IFN- γ и дегрануляции CD8⁺ Т-лимфоцитов. Вакцинация ДК индуцировала сильный антигенспецифический ответ на Core антиген, который сохранялся еще 6 месяцев по завершению монотерапии у 8 из 9 пациентов. NS3-стимулированный ответ был более слабым и нестабильным, по сравнению с Core ответом и регистрировался у 3 из 9 HCV-больных через 6 месяцев по окончании лечения. Так же было показано, что Core/NS3 стимулированное возрастание пролиферативной активности не было связано с неспецифической активацией Т-клеток, так как ConA-индуцированная пролиферация не коррелировала с антигенспецифическими ответами. ДК-вакцинация стимулировала продукцию ИФН- γ , которая регистрировалась позже пролиферативных ответов на антигены, а именно после второго курса вакцинации, у 9 пациентов, но при этом не стимулировала продукцию IL-4 и IL-6. Эти данные подтверждают ведущую роль Th1 – ответов в противовирусной защите.

Мониторинг субпопуляции CD4⁺CD25⁺CD127⁺ Т-клеток в динамике моно- и комбинированной терапии не выявил возрастания содержания регуляторных Т-клеток в периферической крови, что исключает толерогенные свойства ДК, генерируемых *in vitro*.

Было показано, что специфическая иммунотерапия, как монотерапия, не приводила к значительному снижению вирусной нагрузки. Не смотря на отсутствие выраженного противовирусного действия иммунотерапии, была обнаружена обратная корреляционная связь между вирусной нагрузкой и антиген-специфическим иммунным статусом. В целом полученные данные позволили рассматривать данный вид терапии в качестве дополнения к лечению пегилированными интерферонами и рибавирином для улучшения результатов по достижению полной элиминации вируса.

Мы продемонстрировали, что иммунотерапия ИФН-ДК, проводимая на фоне лечения интерферонами и рибавирином, способствует генерации антигенспецифического иммунного ответа на вирусные Core и NS3 антигены, продукции IFN- γ и дегрануляции CD8⁺ Т-лимфоцитов. Так же было показано, что NS3 стимулированное возрастание пролиферативной активности не было связано с неспецифической активацией Т-клеток, так как ConA-индуцированная пролиферация не

коррелировала с антигенспецифическими ответами. Важно отметить, что вакцинотерапия на фоне ПБТ сопровождалась снижением митогенной реактивности Т-клеток у больных ХГС.

Через 1 месяц лечения регистрировалось значимое повышение доли дегранулирующих Т-лимфоцитов ($CD3^+CD8^+CD107a^+$), стимулированное Core антигеном, которое через 6 месяцев лечения сохранялось на достигнутом уровне. NS3-стимулированная активация дегрануляции была не такой значительной, но уже через 1 месяц терапии была выше исходных значений.

Анализ субпопуляции $CD4^+CD25^+CD127^-$ Т-клеток в динамике комбинированной терапии не выявил возрастания содержания регуляторных Т-клеток в периферической крови, что исключает иммуносупрессивное действие данного метода лечения.

Результаты исследования применения интерфероновой терапии совместно с иммунотерапией ДК показали, что интерфероновая терапия не способствует ингибированию антигенспецифического ответа и не обладает иммуносупрессивным действием.

Значительное снижение вирусной нагрузки HCV RNA (в среднем на 3 \log_{10}) отмечалось уже после 1 месяца лечения и регистрировалось у 6 из 7 пациентов, из которых у двух РНК HCV находилась ниже детектируемых значений. Через 3 месяца лечение у 4 из 5 пациентов РНК HCV не определялась. У троих пациентов, дошедших до 4 контрольной точки, уровень РНК HCV был ниже пороговых значений.

В целом, полученные данные позволяют рассматривать комбинацию специфической ДК-вакцинации и интерфероновой терапии, как метод тотальной элиминации вируса гепатита С.

ВЫВОДЫ

1. Кратковременная преинкубация ИФН-ДК с рекомбинантными белками HCV Core (aa 1–123) и NS3 (aa 1192–1457) сопровождается умеренным снижением экспрессии CD83, однако не оказывает ингибирующего действия на экспрессию антигенпрезентирующих (HLA-DR), костимуляторных (CD80) и активационных (CD25) молекул; продукцию про- и противовоспалительных цитокинов; а также аллостимуляторную и Th1/Th2 стимуляторную активность ДК, что свидетельствует об отсутствии супрессорного влияния указанных белков на созревание и функциональную активность ИФН-ДК.
2. ИФН-ДК серонегативных доноров, нагруженные Core и NS3 белками, индуцируют *in vitro* антигенспецифический ответ, о чем свидетельствует более высокий уровень пролиферации, продукции IFN- γ и дегрануляции CD8⁺ Т-клеток при стимуляции аутологичных МНК ДК_{Core/NS3}, чем при стимуляции ДК, не нагруженными HCV антигенами.
3. ДК пациентов с ХГС, обладают сохранной аллостимуляторной активностью и аналогично ДК доноров при нагрузке Core и NS3 белками способны стимулировать пролиферативный ответ, продукцию IFN- γ и дегрануляцию CD8⁺Т-клеток в культурах аутологичных МНК, что свидетельствует о сохранной антигенпрезентирующей и стимулирующей активности ИФН-ДК при хронической HCV-инфекции.
4. Вакцинация ДК_{Core/NS3} в виде монотерапии сопровождается возрастанием пролиферации, продукции IFN- γ и дегрануляции CD8⁺ Т-клеток при стимуляции МНК пациентов Core и NS3 белками и восстановлением митогенной реактивности Т-клеток в отсутствие усиления продукции Th2 (IL-4, IL-6) цитокинов и экспансии CD4⁺CD25⁺CD127⁺ регуляторных Т-клеток, что свидетельствует о способности ИФН-ДК стимулировать HCV-специфический противовирусный иммунный ответ при ХГС.
5. Уровень NS3-специфической пролиферации и продукция IFN- γ после проведения иммунотерапии ДК_{Core/NS3} обратно коррелирует с репликацией вируса, однако выраженное (на 1 log и более) и стойкое снижение вирусной нагрузки регистрируется только у 20% пациентов, что с одной стороны свидетельствует об участии NS3-специфических Т-клеток в контроле за репликацией вируса, а с другой - о недостаточной выраженности Т-клеточного ответа для полной элиминации вируса.
6. Вакцинация ДК_{Core/NS3} в сочетании с интерфероном- α и рибавирином приводит к усилению пролиферативного ответа и дегрануляции CD8⁺Т-клеток в ответ на стимуляцию МНК Core и NS3 белками несмотря на подавление митогенной реактивности Т-клеток, что свидетельствует об отсутствии ингибирующего действия противовирусной терапии на способность ИФН-ДК индуцировать HCV-специфический ответ. При этом комбинированная терапия позволяет достичь быстрого вирусологического ответа у большинства (86%) пациентов и устойчивого вирусологического ответа в виде полного угнетения репликации вируса у всех пациентов, завершивших 6 месячный курс лечения.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Олейник Е.А., Леплина О.Ю., Тыринова Т.В., Тихонова М.А., Пыринова Г.Б., Останин А.А., Старостина Н.М., Черных Е.Р. Влияние рекомбинантных белков Core и NS3 вируса гепатита С на созревание и функции дендритных клеток, генерируемых *in vitro* в присутствии интерферона-альфа // Иммунология, 2016, Т. 37, № 5, С. 239-245.
2. Олейник Е.А., Леплина О.Ю., Останин А.А., Старостина Н.М., Черных Е.Р. Адаптивный Т-клеточный ответ в патогенезе вирусной инфекции, обусловленной вирусом гепатита С // Медицинская иммунология, 2016, Т. 18, № 4, С. 309-316.
3. Леплина О.Ю., Старостина Н.М., Блинова Д.Д., Желтова О.И., Олейник Е.А., Тыринова Т.В., Останин А.А., Черных Е.Р. Результаты пилотного клинического исследования на основе дендритных клеток в лечении рецидивирующей герпесвирусной инфекции // Медицинская иммунология, 2016, Т. 18, № 5, С. 425-436.
4. Олейник Е.А., Леплина О.Ю., Курочкина Ю.Д., Останин А.А., Старостина Н.М. Результаты пилотного клинического исследования дендритно-клеточных вакцин в лечении хронической HCV-инфекции // Медицинская иммунология, 2017, Т. 19, специальный выпуск, С. 221.
5. Chernykh E., Leplina O., Oleynik E., Tyrinova T., Tikhonova M., Starostina N., Ostanin A. Immunotherapy with interferon- α induced dendritic cells for chronic HCV infection (the results of pilot clinical trial) – 2017-Journal: Immunologic Research (DOI: 10.1007/s12026-017-8967-2)
6. Черных Е.Р., Олейник Е.А., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Курочкина Ю.Д., Старостина Н.М., Останин А.А. Индукция Т-клеточного иммунного ответа у пациентов с хроническим гепатитом С на фоне иммунотерапии дендритными клетками. // 2017 Т.19, С. 387-400
7. Oleynik E., Chernykh E., Starostina N., Leplina O., Tyrinova T. Immunotherapy with interferon- α -induced dendritic cells for chronic HCV infection in combination with antiviral treatment// Eur.J.Immunol. 2018.48 (Suppl.1):1-193 (DOI:10.1002/eji.201871000)