

ОЛЕЙНИК Екатерина Александровна

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

14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (НИИФКИ).

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, профессор  
член-корреспондент РАН

**Черных Елена Рэмовна**

**Официальные оппоненты:**

**Повещенко Ольга Владимировна**, доктор медицинских наук, доцент, заведующая лабораторией клеточных технологий «Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии», филиала Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики» Сибирского отделения Российской академии наук»

**Ширшев Сергей Викторович**, доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, заведующий лабораторией иммунорегуляции Института экологии и генетики микроорганизмов Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук

**Ведущее учреждение:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН)

Защита состоится «17» января 2019 года в \_\_\_\_\_ часов  
на заседании диссертационного совета Д 001.001.01 по адресу: 630099, г.  
Новосибирск, ул. Ядринцевская, д. 14.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИИФКИ и на сайте  
<http://niikim.ru/ru/диссовет/объявления-диссовета>

Автореферат разослан \_\_\_\_\_ 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат медицинских наук

**Хантакова Юлия Николаевна**

## 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 [Petruzzello A. et al., 2016]. В силу этих обстоятельств ХГС относят к социально значимым инфекциям, представляющим глобальную проблему для здравоохранения во всем мире. В настоящее время «золотым стандартом» лечения ХГС является терапия препаратами пегилированного интерферона- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) в сочетании с рибавирином, обеспечивающая устойчивый вирусологический ответ (УВО) в 40-50% случаев при инфицировании вирусом гепатита С (HCV) 1b генотипа. При этом наличие быстрого вирусологического ответа (БВО) через 1 месяц лечения является предиктором достижения УВО у 83% ответивших пациентов [Alter A. et al., 2007]. Тем не менее, в половине случаев препараты IFN- $\alpha$  (в виде монотерапии или в сочетании с рибавирином) не эффективны и часто вызывают развитие тяжелых побочных эффектов, вынуждающих прекратить лечение. Таргетная терапия ингибиторами протеаз, обещающая стать прорывом в лечении ХГС, также имеет ряд серьезных ограничений - 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 HCV-инфицированных пациентов, связывают с запуском сильного мультиэпитопного (с широкой кросс-реактивностью) ответа CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> Т-клеток, продуцирующих Th-1 цитокины [Klenerman P. et al., 2012]. Соответственно, хронизация вирусной инфекции ассоциирована 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-лимфоциты. Развитие сильного и устойчивого Т-клеточного ответа играет важную роль не только в подавлении репликации вируса, но и детерминирует чувствительность к терапии интерферонами, способствуя достижению УВО.

Многочисленные исследования выявили дисфункции ДК при ХГС, проявляющиеся задержкой созревания, изменением продукции цитокинов и снижением аллостимуляторной активности миелоидных и плазмацитоидных ДК [Sachdeva M. et al., 2015]. С этой точки зрения индукция сильного иммунного ответа с помощью генерированных *ex vivo* ДК (в качестве лечебных вакцин) рассматривается как новая стратегия лечения ХГС [Zhou Y. et al., 2012]. При проведении клинических исследований ДК (учитывая их низкое содержание в периферической крови) обычно генерируют *in vitro* из моноцитов. Дифференцировка моноцитов в ДК является не только витральным феноменом, но и активно происходит *in vivo*, особенно при воспалительных процессах [León B. et al., 2008]. Причем дифференцированные из моноцитарных предшественников ДК могут быть в меньшей степени иммунокомпromетированы вирусом.

Традиционно ДК получают путем культивирования моноцитов с GM-CSF и IL-4 (ИЛ4-ДК) [Thurner B. et al., 1998]. Нагруженные или трансфицированные вирусными

антигенами ИЛ4-ДК продемонстрировали *in vitro* способность индуцировать HCV-специфический Т-клеточный ответ как у здоровых доноров, так и пациентов с ХГС, однако оказались недостаточно эффективными для индукции сильного и устойчивого иммунного ответа при использовании в качестве лечебных вакцин [Zabaleta A. et al., 2015, Gowans E.J. et al., 2010]. Дифференцировка моноцитов в ДК индуцируется также при замене ИЛ-4 на IFN- $\alpha$ . Генерированные в присутствии GM-CSF и IFN- $\alpha$  ДК (ИФН-ДК) характеризуются частично зрелым фенотипом и обладают свойствами миелоидных, плазмацитоидных и натуральных киллерных клеток [Echeverria I. et al., 2011]. Эти клетки отличаются от ИЛ4-ДК более стабильным фенотипом; продуцируют IFN- $\alpha$ ; 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<sup>+</sup> Т-клеток продемонстрирована не только *in vitro*, но и *in vivo* на иммунодефицитных мышях [Larenta C. et al., 2006]. Тем не менее, способность ИФН-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- $\gamma$ ) [Леплина О.Ю. и др., 2009], что свидетельствует об их возможном использовании в качестве клеточных вакцин. Более того, вакциноterapia с использованием ИФН-ДК показала хорошую переносимость и безопасность в пилотном клиническом исследовании при часто рецидивирующей герпетической инфекции [Lepkina O. et al., 2011]. Это позволяет полагать, что нагруженные HCV-антигенами ИФН-ДК будут способны индуцировать HCV-специфический клеточный ответ. Согласно данным литературы структурные (Core) и неструктурные (NS3) белки содержат большое количество эпитопов, индуцирующих Т-клеточный иммунный ответ, включая активацию Th1 клеток и генерацию цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) [Roohvand F. et al., 2012]. 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.

**Цель работы:** изучить *in vitro* и *ex vivo* способность IFN- $\alpha$  - индуцированных дендритных клеток, нагруженных рекомбинантными белками вируса гепатита С, стимулировать антигенспецифический клеточный ответ.

**Задачи:**

- 1) Изучить влияние вирусных рекомбинантных белков, кодируемых усеченными фрагментами генов Core (1-120) и NS3 (1192 – 1457) HCV генотипа 1b 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- $\gamma$ )/Th2(IL-4,IL-6) цитокинов и дегрануляцию CD8<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> Т-клеток в культурах аутологичных МНК пациентов с хроническим гепатитом С.

4) Оценить параметры, характеризующие антигенспецифический ответ, митогенную реактивность, содержание регуляторных Т-клеток (Treg) 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 Treg) 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, кодируемые усеченными фрагментами генов HCV Core (1-120) и NS3 (1192-1457) при краткосрочной инкубации с ИФН-ДК не проявляют цитотоксической активности и не оказывают ингибирующего действия на уровень экспрессии HLA-DR, CD80, CD25 и CD83, а также на способность ДК стимулировать пролиферацию и продукцию Th1 и Th2 цитокинов в культурах аллогенных Т-клеток. Установлено, что нагруженные Core и NS3 белками ИФН-ДК (ДК<sub>Core/NS3</sub>) серонегативных доноров индуцируют пролиферацию, продукцию IFN- $\gamma$  и активацию цитотоксических CD8<sup>+</sup> Т-клеток (в тесте дегрануляции) в культурах аутологичных мононуклеарных клеток (МНК). ДК<sub>Core/NS3</sub> пациентов также обладают стимуляторной активностью и способны индуцировать HCV-специфические клеточные реакции в культурах аутологичных МНК. Показано, что вакцинация пациентов ДК<sub>Core/NS3</sub> приводит к возрастанию пролиферации, продукции IFN- $\gamma$  и дегрануляции CD8<sup>+</sup> Т-клеток в культурах МНК при стимуляции Core и NS3 белками, однако, не сопровождается активацией Th2 ответа и экспансией CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> регуляторных Т-клеток. Возрастание Core и NS3-специфической пролиферации и дегрануляции CD8<sup>+</sup> Т-клеток регистрируются после первого курса вакцинаций и более выражено при стимуляции Core. Усиление продукция IFN- $\gamma$  наблюдается после второго курса вакцинотерапии. При этом отмечается гетерогенность пациентов по типу и выраженности иммунного ответа. Установлено, что уровень NS3-специфической пролиферации и продукции IFN- $\gamma$  после иммунотерапии ДК обратно коррелируют с репликацией вируса, однако выраженное (на 1 порядок и более) и стойкое снижение вирусной нагрузки регистрируется только у 20% пациентов. Продемонстрировано, что противовирусная терапия интерфероном и рибавирином не ингибирует развитие ДК-индуцированного иммунного ответа.

#### **Теоретическая и практическая значимость**

Теоретическая значимость работы заключается в расширении знаний о влиянии HCV белков на ДК моноцитарного происхождения, генерированные в присутствии интерферона- $\alpha$ , в частности, об отсутствии ингибирующего эффекта рекомбинантных белков, кодируемых усеченными фрагментами генов Core (1-120) и NS3 (1192-1457) HCV генотипа 1, на созревание и функции ИФН-ДК. Полученные результаты также

демонстрируют способность ИФН-ДК серонегативных доноров, нагруженных Core (1-120) и NS3 (1192-1457) белками, стимулировать *in vitro* первичный иммунный ответ, включающий пролиферацию наивных Т-клеток, индукцию Th1 ответа и активацию цитотоксических Т-клеток. Кроме того, данные о способности ДК<sub>Core/NS3</sub> пациентов индуцировать *in vitro* и *in vivo* HCV-специфический иммунный ответ свидетельствуют о сохранении антигенпрезентирующей и стимулирующей функций генерированных из моноцитов ИФН-ДК при хронической HCV-инфекции. Продемонстрированная индивидуальная гетерогенность HCV-специфических ответов по типу клеточных реакций, их выраженности и устойчивости указывает на иммунопатогенетическую разнородность пациентов с хронической HCV-инфекцией. 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 нового метода иммунотерапии хронического гепатита С на основе ИФН-ДК (патент РФ № 2637631 «Способ иммунотерапии хронического вирусного гепатита С» и клинической апробации данного подхода (ClinicalTrials.gov NCT02309086). Показано, что иммунотерапия ДК в виде монотерапии не вызывает тяжелых нежелательных явлений или выраженных побочных эффектов и сопровождается индукцией/усилением антигенспецифических клеточных реакций. При этом комбинация ИФН-ДК с противовирусными препаратами позволяет добиться быстрого вирусологического ответа у большинства пациентов. Полученные данные используются при обучении клинических ординаторов НИИФКИ по специальности «аллергология и иммунология».

#### **Методология и методы исследования**

Диссертационная работа базировалась на исследованиях *in vitro* и проведении клинических исследований с оценкой динамики клеточных реакций *ex vivo*. Оценка клеточных реакций включала исследование антигенспецифического ответа (пролиферация, продукция цитокинов и дегрануляции цитотоксических Т-клеток) и неспецифических реакций (митогенная реактивность, генерация регуляторных Т-клеток). Рекрутирование пациентов проводилось с учетом критериев включения и исключения. Клинические и иммунологические исследования дополнялись оценкой вирусологического ответа.

#### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Рекомбинантные белки, кодируемые усеченными фрагментами генов Core (1-120) и NS3 (1192-1457) вируса гепатита С, при кратковременной инкубации с ИФН-ДК не оказывают ингибирующего влияния на созревание и функции ИФН-ДК (способность ИФН-ДК стимулировать пролиферацию аллогенных Т-клеток и продукцию Th1- и Th2 цитокинов).

2. Генерированные из моноцитов ИФН-ДК доноров и больных ХГС при нагрузке HCV Core (1-120) и NS3 (1192-1457) белками способны стимулировать *in vitro* антигенспецифические клеточные реакции (пролиферацию, продукцию IFN- $\gamma$  и дегрануляцию CD8<sup>+</sup> Т-клеток).

3. Вакцинация пациентов с ХГС ИФН-ДК<sub>Core/NS3</sub> индуцирует HCV-специфический клеточный ответ (включая стимуляцию Th1 и цитотоксических CD8<sup>+</sup> Т-клеток), развитие которого не подавляется на фоне противовирусной терапии интерфероном- $\alpha$  и рибавирином.

#### **Степень достоверности, апробация результатов и личное участие автора**

Достоверность полученных результатов подтверждается продуманным дизайном исследования, использованием современных иммунологических методов с автоматизированной оценкой результатов и адекватных методов статистической обработки. Диссертация апробирована на заседании клинического отдела НИИФКИ с участием членов Ученого совета и клинического совета (протокол № 6 от 28 июня 2018 г.). Основные положения работы доложены и обсуждены на 15-ом международном симпозиуме по дендритным клеткам (Германия, 2018 г.), V Конгрессе Евро-Азиатского общества по инфекционным болезням (Новосибирск, 2018 г.), XVI Всероссийском научном форуме с международным участием «Дни иммунологии в С.-Петербурге» 2017 г. Автор лично участвовал в разработке дизайна исследования, рекрутировании пациентов и проведении иммунологических исследований. Обработка полученных данных и статистический анализ проведены автором самостоятельно.

#### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 4 статьи и 2 тезисов докладов на российских и международных конференциях, получен 1 патент.

#### **Объем и структура диссертации**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 4 глав собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения и выводов. Материал изложен на 134 страницах машинописного текста, включающего 21 таблиц и 17 рисунков. Прилагаемая библиография содержит ссылки на 191 литературный источник. Работа выполнена на базе лаборатории клеточной иммунотерапии и отделения иммунологии клиники иммунопатологии НИИФКИ в рамках темы НИР 041 «Исследование молекулярно-клеточных основ регуляции иммунного ответа и разработка новых технологий в клеточной иммунотерапии онкологических, инфекционных и аутоиммунных заболеваний» и поискового научного исследования «Иммунотерапия с использованием аутологичных дендритно-клеточных вакцин в комплексном лечении больных хроническим вирусным гепатитом С».

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

#### *Клинические исследования*

Диссертационная работа основана на результатах обследования 52 доноров крови, негативных по сывороточным маркерам вирусного гепатита С, и 38 сопоставимых по полу и возрасту пациентов с ХГС с генотипом 1, умеренной вирусной нагрузкой (РНК  $\geq 10^4$  МЕ/мл), минимальной или средней степенью активности гепатита по уровню трансаминаз крови, без трансформации в цирроз (фиброз 0-III по шкале METAVIR). Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли путем центрифугирования венозной крови в градиенте плотности фиколла-верографина.

*Генерация и оценка ДК.* Для генерации ДК адгезивную к пластику фракцию МНК культивировали при 37<sup>0</sup>С в СО<sub>2</sub>-инкубаторе в течение 4 сут в 6-луночных планшетах (Nunc, Дания) в среде RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 5мМ HEPES-буфера, 100 мкг/мл гентамицина и 5% сыворотки плодов коровы (FCS, БиолоТ, Санкт-Петербург), в присутствии GM-CSF (40 нг/мл, Sigma-Aldrich) и IFN- $\alpha$  (1000 Ед/мл, Роферон-А, Roche, Швейцария) с последующим дозреванием в течение 24 ч с липополисахаридом (10 мкг/мл, ЛПС, E.colli 0114:B4, Sigma-Aldrich) при исследованиях *in vitro* или азоксимер бромидом (Полиоксидоний, Петровакс Фарм, Москва; 2 нг/мл) при приготовлении ДК-вакцин. ДК нагружали рекомбинантными белками, кодируемыми фрагментами генов Core (1-120) и NS3 (1192 – 1457) HCV генотипа 1b (ЗАО Вектор-Бест, Новосибирск). Генерированные на 4-ые сутки ИФН-ДК инкубировали в течение 1 ч с белками HCV Core и NS3 (по 5 мкг/мл) и после отмывки индуцировали созревание добавлением ЛПС (10 мкг/мл на 24 ч). Поверхностные маркеры ДК оценивали методом проточной цитофлуориметрии (FACS Calibur, Becton Dickinson, США) с использованием (PE) и (FITC)-меченных CD14, CD83, CD80, HLA-DR и CD25 моноклональных антител (BD PharMingen, США). Функциональную активность ДК оценивали по способности индуцировать пролиферацию и продукцию цитокинов в алло-СКЛ. Для этого ДК (0,1x10<sup>5</sup>/лунку) культивировали с аллогенными МНК доноров в соотношении 1:10 в течении 5 суток.

*Индукция и оценка антигенспецифического ответа.*

Антигенспецифический ответ *in vitro* стимулировали путем культивировании МНК в течение 5 суток с аутологичными ИФН-ДК, нагруженными Core и NS3 антигенами (ДК<sub>Core/NS3</sub>), в соотношении 10:1. Контролем служили МНК, культивированные с ДК, не нагруженными антигенами. Для *ex vivo* оценки антигенспецифического ответа МНК пациентов (0,2x10<sup>6</sup>/лунку) культивировали в течение 5 суток с рекомбинантными HCV белками Core и/или NS3 в дозе 5 мкг/мл. Об индукции HCV-специфического клеточного ответа судили по усилению пролиферации, продукции Th1 (IFN- $\gamma$ ) и Th2 (IL-4, IL-6) цитокинов и активации цитотоксических Т-лимфоцитов (в тесте дегрануляция CD8<sup>+</sup> Т-клеток) в присутствии рекомбинантных HCV белков или ДК<sub>Core/NS3</sub> по сравнению с контролем. Индекс стимуляции рассчитывали, как отношение ответа в присутствии HCV Core и/или NS3 белков, либо ДК<sub>Core/NS3</sub>, к уровню ответа в контрольных культурах. Интенсивность пролиферации оценивали на 5 сутки радиометрически по включению H<sup>3</sup>-тимидина, вносимого в лунки за 18 ч до конца культивирования в дозе 1 мкКю/лунку. Продукцию цитокинов (IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6) в супернатантах культур МНК, стимулированных ДК<sub>Core/NS3</sub> или растворимыми Core/NS3 антигенами определяли методом иммуноферментного анализа, используя соответствующие тест-системы («Вектор-Бест», Новосибирск). Активацию цитотоксических Т-лимфоцитов оценивали по дегрануляции CD8<sup>+</sup> Т-клеток методом проточной цитофлуориметрии. Поскольку стимуляция CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов через Т-клеточный рецептор вызывает перемещение литических гранул из цитоплазмы к мембране и экстернализацию молекулы CD107a (компонент литических гранул), оценка CD8<sup>+</sup>CD107a<sup>+</sup> Т-лимфоцитов позволяет идентифицировать активированные цитотоксические Т-клетки. Для оценки

дегрануляции CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты в ответ на рекомбинантные антигены МНК (0,2x10<sup>6</sup>/лунку) культивировали с монензином А (BD PharMingen, США) в присутствии HCV антигенов (5 мкг/мл). Негативным контролем служили культуры МНК в отсутствие антигенов, позитивным контролем – культуры МНК, стимулированные анти-CD3 моноклональными антителами (ООО «Биоспектр», 1 мкг/мл). Для оценки дегрануляции CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов, индуцированной ДК<sub>Core/NS3</sub>, МНК с ДК<sub>Core/NS3</sub> (в соотношении 10:1) культивировали 5 суток, и за 6 часов до окончания культивирования вносили монензин А. Негативным контролем служили МНК, культивированные с интактными ИФН-ДК. По завершении культивирования клетки метили анти-CD107a (APC) и анти-CD8(PE) антителами (BD PharMingen, США) и оценивали экспрессию CD107a в гейте CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>клеток.

*Апробация иммунотерапии (ИТ) с использованием ИФН-ДК в режиме монотерапии и в комбинации с противовирусной терапией (интерферон-α и рибавирин) проводилась в дизайне открытых проспективных пилотных исследований с контролем «до-после» согласно протоколу, утвержденному решением Ученого Совета (протокол № 4 от 7 апреля 2015 г.) и одобренному локальным этическим комитетом в рамках поискового научного исследования. Все манипуляции по получению и культивированию клеток проводили в условиях специализированной лаборатории, лицензированной для работы с клетками (лицензия на трансплантацию костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток, ФС-54-01-002049). Включение в исследование пациентов проводилось только после подписания письменного информированного согласия. Иммунотерапия включала два курса вакцинации - 4 подкожных инъекции ДК<sub>Core/NS3</sub> (средняя доза 5×10<sup>6</sup> клеток) с недельным интервалом (1-ый курс) и 6 вакцинаций с кратностью 1 раз в месяц (2-ой курс). В качестве адьюванта использовали рекомбинантный ИЛ-2 (Ронколейкин, «Биотех» С.-Петербург), который вводили подкожно в дозе 250 000 ЕД. Противовирусное лечение включало пероральный прием рибавирина и инъекции пегилированного интерферона-α (Альгерон). Для оценки иммуностимулирующего эффекта оценивали влияние вакцинации на специфический иммунный ответ (усиление пролиферации, продукции Th1(IFN-γ) и Th2(IL-4, IL-6) цитокинов и активацию ЦТЛ в культурах МНК в ответ на стимуляцию Core или NS3 антигенами), а также конканавалин А (КонаА) – индуцированную пролиферацию Т-клеток и генерацию регуляторных Т-клеток (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>; Treg). Ответ МНК на КонаА (15 мкг/мл, Sigma,) оценивали на 3 сутки радиометрически, регуляторные Т-клетки - методом проточной цитофлюориметрии с использованием анти-CD4 (FITC), анти-CD25 (PE-Cy7) и анти-CD127 (Alexa Fluor 647) моноклональных антител (BD Biosciences, USA).*

*Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программы «STATISTICA 6.0». Данные представлены в виде медианных значений (Me), интерквартильного диапазона (IQR, 25–75% квартили). Для выявления значимых различий сравниваемых показателей использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни (p<sub>U</sub>) и W-критерий Вилкоксона (p<sub>W</sub>). Различия считали достоверными при уровне значимости p<0,05.*

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Эффект рекомбинантных белков (Core+NS3) на созревание и функции ДК исследовали по влиянию краткосрочной инкубации ДК с указанными протеинами на экспрессию поверхностных маркеров, аллостимуляторную активность и способность ДК стимулировать Т-клетки к продукции Th1- и Th2-цитокинов в алло-СКЛ. Преинкубация ДК с рекомбинантными белками не влияла на уровень средней интенсивности флюоресценции CD14, HLA-DR, CD80, CD25 и CD83 (Табл.1). При анализе относительного содержания ДК, экспрессирующих исследуемые маркеры, единственным изменением было умеренное снижение относительного содержания CD83<sup>+</sup> ДК клеток.

**Таблица 1**

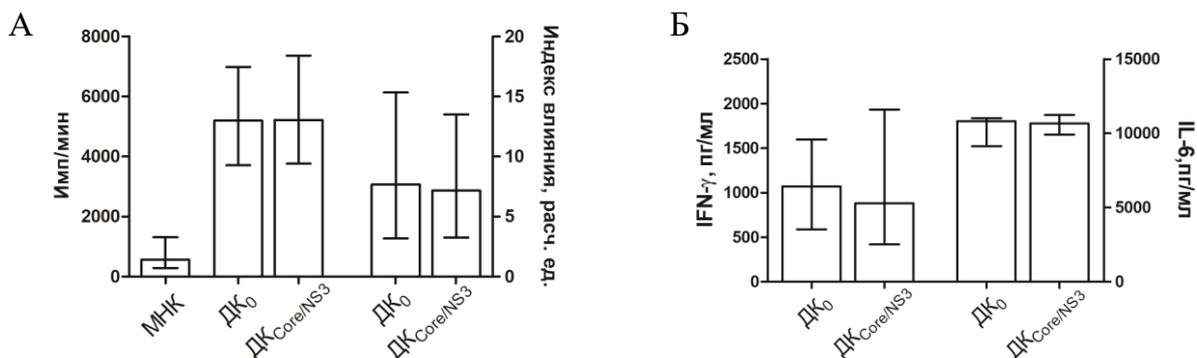
Влияние рекомбинантных HCV белков Core/NS3 на фенотип ЛПС-активированных ИФН-ДК

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

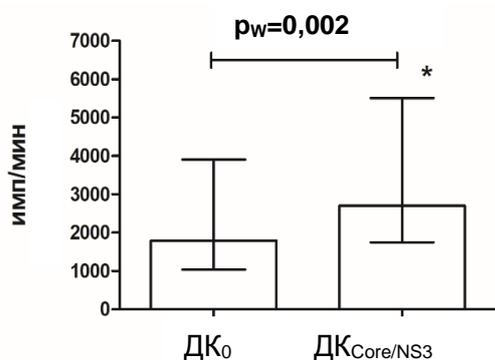
*Примечание:* относительное содержание ДК и среднюю интенсивность флюоресценции поверхностных маркеров оценивали в культурах ИФН-ДК здоровых доноров (n=8), преинкубированных с белками (+Core/NS3) или средой в качестве контроля. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона (Me; IQR). \* - p < 0,05, достоверность различий по сравнению с контролем.

Преинкубация с вирусными белками не ингибировала аллостимуляторную активность ИФН-ДК (рис. 1А). Показатели пролиферативного ответа и индексы влияния ДК в алло-СКЛ, индуцированной контрольными ДК и ДК, преинкубированными с Core/NS3 белками, были сопоставимы. Аналогичным образом, преинкубация ДК с Core/NS3 белками не подавляла способность ДК активировать аллогенные Т-лимфоциты к продукции Th1- (IFN- $\gamma$ ) и Th2- (IL-6) цитокинов (рис. 1Б). Таким образом, нагрузка ИФН-ДК рекомбинантными белками Core (1-120) и NS3 (1192-1457) HCV, генотипа 1 не оказывала ингибирующего влияния на созревание и функциональную активность ДК.

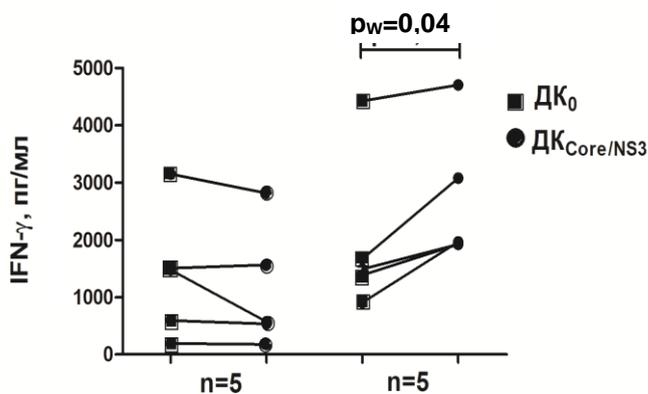
Убедившись в отсутствии супрессивного влияния рекомбинантных белков Core (1-120) и NS3 (1192-1457) на ИФН-ДК, на следующем этапе была исследована способность ИФН-ДК, нагруженных вирусными белками, индуцировать антигенспецифический клеточный ответ в культурах МНК серонегативных здоровых доноров (рис.2).



**Рисунок 1.** Влияние рекомбинантных HCV белков Core/NS3 на функциональную активность ИФН-ДК. А - представлены данные (Me; UQ-LQ) пролиферативного ответа и индексов влияния в алло-СКЛ (n=15), стимулированной контрольными ДК (ДК<sub>0</sub>) и ДК, преинкубированными с Core/NS3 белками (ДК<sub>Core/NS3</sub>); Б - представлены данные (Me; UQ-LQ) продукции ИФН-γ и IL-6 в алло-СКЛ (n=6), индуцированной ДК<sub>0</sub> и ДК<sub>Core/NS3</sub>.



**Рисунок 2.** Способность ДК доноров, на грузенных Core и NS3 антигенами, индуцировать пролиферативный ответ МНК. Представлены данные пролиферативной активности МНК (Me; UQ-LQ; n=12), стимулированных ДК<sub>0</sub> и ДК<sub>Core/NS3</sub>. \* - достоверность различий.



**Рисунок 3.** Способность ДК доноров, нагруженных Core и NS3 антигенами, индуцировать продукцию ИФН-γ в культурах аутологичных МНК. Представлены индивидуальные значения концентрации ИФН-γ в культурах МНК, стимулированных ДК<sub>0</sub> и ДК<sub>Core/NS3</sub>.

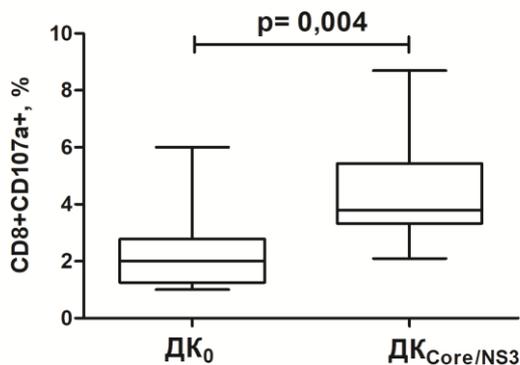
Пролиферативный ответ МНК, стимулированных ДК<sub>Core/NS3</sub>, значительно превышал уровень ответа, индуцированного ДК<sub>0</sub>. Усиление пролиферации отмечалось в культурах МНК всех 12 тестируемых доноров. Медианный индекс стимуляции ДК<sub>Core/NS3</sub> составил 1,55, варьируя от 1,11 до 2,93. Поскольку одним из важнейших медиаторов противовирусного Т-клеточного ответа при HCV-инфекции является ИФН-γ, была также исследована способность ИФН-ДК стимулировать продукцию ИФН-γ. ДК, нагруженные HCV белками, стимулировали продукцию ИФН-γ в половине случаев (у 5 из 10 доноров). Индекс стимуляции ДК<sub>Core/NS3</sub> в подгруппе «ответчиков» составил в среднем 1,4, варьируя от 1,1 до 2,16 (рис.3).

Концентрация IL-6 в культурах МНК, стимулированных аутологичными ДК<sub>Core/NS3</sub>, не превышала таковую в культурах МНК, активированных ДК<sub>0</sub> – 366 (304-548) против 354 (225-786) пг/мл;  $p_w = 0,62$ . Аналогичным образом, продукция IL-4 в культурах МНК, стимулированных ДК<sub>Core/NS3</sub> и ДК<sub>0</sub>, значительно не различалась – 124 (92-149) и 119 (82-154),

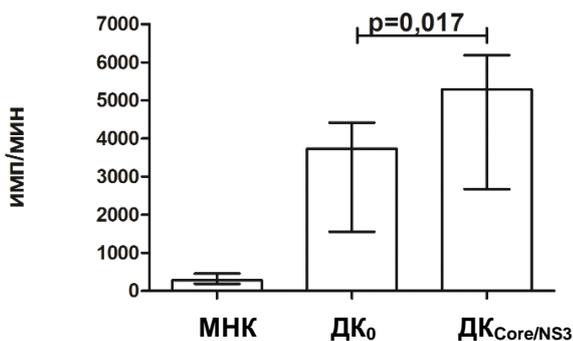
соответственно  $p_w=0,98$ .

Исследование способности ДК<sub>Core/NS3</sub> индуцировать антигенспецифические цитотоксические Т-клетки показало, что доля CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD107a<sup>+</sup> Т-клеток в культурах МНК, стимулированных ДК<sub>Core/NS3</sub>, была достоверно выше, чем при стимуляции ДК<sub>0</sub>, что свидетельствует о способности ДК доноров примировать антигенспецифические ЦТЛ (рис.4).

ИС ДК<sub>Core/NS3</sub> у всех 10 тестируемых доноров превышал 1,3. Таким образом, ДК<sub>Core/NS3</sub> серонегативных доноров обладали способностью индуцировать антигенспецифические клеточные реакции, проявляющиеся усилением пролиферации, продукции IFN- $\gamma$  и дегрануляцией CD8<sup>+</sup>CD107a<sup>+</sup> Т-клеток.

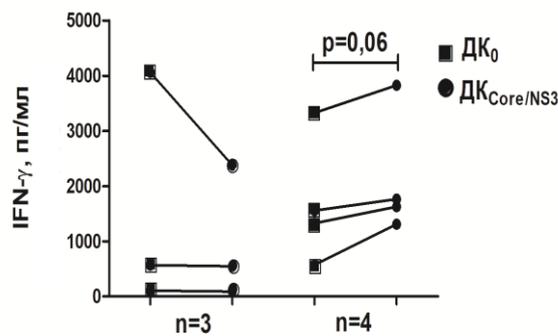


**Рисунок 4.** Способность ДК<sub>Core/NS3</sub> доноров активировать цитотоксические Т-лимфоциты. Представлены данные относительного содержания CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD107a<sup>+</sup> Т-клеток (Ме; UQ-LQ; Min; Max; n=10) в культурах МНК, стимулированных ДК<sub>0</sub> и ДК<sub>Core/NS3</sub>.



**Рисунок 5.** Способность ДК<sub>Core/NS3</sub> пациентов индуцировать пролиферативный ответ в культурах аутологичных МНК. Представлены данные пролиферативной активности МНК (Ме; UQ-LQ; n=7), стимулированных ДК<sub>0</sub> и ДК<sub>Core/NS3</sub>.

Далее исследовали способность ДК индуцировать/усиливать *in vitro* антигенспецифический ответ у больных ХГС. Как видно (рис. 5), уровень пролиферативного ответа, индуцированного ДК<sub>Core/NS3</sub>, значительно превышал таковой в культурах с ДК<sub>0</sub> ( $p_U=0,017$ ). Усиление пролиферации отмечалось у 6 из 7 пациентов. Медианный ИС ДК<sub>Core/NS3</sub> составил 1,42 (1,37-1,72). Усиление продукции IFN- $\gamma$  при стимуляции ДК<sub>Core/NS3</sub> (рис.6) выявлялось у 4 из 7 пациентов. ИС ДК<sub>Core/NS3</sub> в этой подгруппе варьировал от 1,13 до 2,29 (рис. 6).



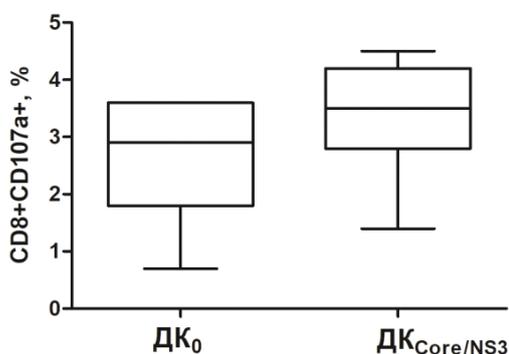
**Рисунок 6.** Способность ДК<sub>Core/NS3</sub> индуцировать продукцию IFN- $\gamma$  в культурах аутологичных МНК. Представлены индивидуальные значения концентрации IFN- $\gamma$  в культурах МНК, стимулированных ДК<sub>0</sub> и ДК<sub>Core/NS3</sub>.

При оценке влияние ДК<sub>Core/NS3</sub> на продукцию IL-6 и IL-4 было выявлено, что медианный уровень IL-6 в культурах МНК, стимулированных ДК<sub>Core/NS3</sub>, не превышал таковой в культурах МНК с ДК<sub>0</sub> - 321 (248-357) и 311 (302-375) пг/мл, соответственно,

$p_w=0,34$ ).

Продукция IL-4 в культурах МНК, стимулированных ДК<sub>Core/NS3</sub> и ДК<sub>0</sub>, также значимо не различалась - 141(86-247) и 121(60-195) пг/мл;  $p_w=0,95$ . Индексы стимуляции IL-6 и IL-4 составили, соответственно, 1,08 и 0,93.

Исследование способности ДК больных активировать ЦТЛ (рис.7) выявило умеренное возрастание CD8<sup>+</sup>CD107a<sup>+</sup> Т-клеток в культурах МНК, стимулированных ДК<sub>Core/NS3</sub>, по сравнению с ДК<sub>0</sub> (Рис 7). Медианна ИС<sub>ДК<sub>Core/NS3</sub></sub> составила 1,29 (0,96-1,94). На уровне индивидуальных значений отчетливое усиление дегрануляции CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов выявлялась у 4 из 7 пациентов. ИС<sub>ДК<sub>Core/NS3</sub></sub> в этой подгруппе варьировал от 1,3 до 6,0. При этом по сравнению с донорами МНК пациентов отличали более высоким уровнем дегрануляции CD8<sup>+</sup> Т-клеток в контрольных культурах - 2,0 (1,3-2,8) против 2,9 (1,0-3,6).



**Рисунок 7.** Способность ДК<sub>Core/NS3</sub> пациентов, активировать цитотоксические Т-лимфоциты. Представлены данные относительного содержания CD8<sup>+</sup>CD107a<sup>+</sup> Т-клеток (Me; UQ-LQ; Min; Max; n=7) в культурах МНК, стимулированных ДК<sub>0</sub> и ДК<sub>Core/NS3</sub>.

Сравнительный анализ антигенспецифического ответа (табл.2) показал, что как и у доноров, ДК<sub>Core/NS3</sub> пациентов стимулировали пролиферацию МНК в большинстве случаев. Активация Т-клеток к продукции IFN- $\gamma$  при стимуляции ДК<sub>Core/NS3</sub> больных ХГС регистрировалась с меньшей частотой, чем пролиферативный ответ, однако такая же закономерность наблюдалась и для ДК доноров. В то же время стимулирующий эффект ДК пациентов на CD8<sup>+</sup> Т-клетки выявлялся с меньшей частотой, что, возможно,

объяснялось повышенной дегрануляцией CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов при стимуляции контрольными ДК.

Полученные данные о способности ИФН-ДК больных ХГС индуцировать антигенспецифический ответ в аутологических культурах МНК послужили основанием для апробации ИФН-ДК с целью индукции/усиления иммунного ответа при хронической HCV-инфекции. Вакцинация аутологичными ДК<sub>Core/NS3</sub> характеризовалась хорошей переносимостью и не вызвала тяжелых нежелательных явлений или выраженных побочных реакций. Исследование клеточно-опосредованного иммунного ответа включало *ex vivo* оценку пролиферативного ответа, продукции цитокинов и дегрануляции CD8<sup>+</sup> Т-клеток при стимуляции МНК пациентов рекомбинантными антигенами до начала ИТ (точка I), после первого (инициирующего) курса (точка II), после второго (поддерживающего) курса (точка III) и спустя 6 мес (точка IV) после завершения иммунотерапии (ИТ). При анализе индивидуальных значений к «респондерам» относили пациентов с развитием позитивного ответа (для антигенспецифической пролиферации - ИС >3,0, для продукции IFN- $\gamma$  - уровень IFN- $\gamma$  >

60 пг/мл, для дегрануляции - ИС  $\geq 3,0$ ) и/или его усилением.

**Таблица 2**

Сравнительная оценка способности ДК<sub>Core/NS3</sub> доноров и больных ХГС индуцировать *in vitro* антигенспецифический ответ

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-<math>\gamma</math></u>		
- частота ответа (n/n)	50% (5/10)	57% (4/7)
- уровень IFN- $\gamma$ в группе «ответчиков» (пг/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<sup>+</sup> Т-клеток</u>		
- частота ответа (n/n)	100% (10/10)	57% (4/7)
- % CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD107a <sup>+</sup> 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:* данные представлены в виде Ме (UQ-LQ) и частоты встречаемости (%). \* - достоверность различий,  $p < 0,05$ ; U – здесь и далее - критерий Манна-Уитни.

В целом по группе пролиферативный ответ на стимуляцию Core до начала терапии практически отсутствовал, но значительно нарастал после первого и второго курса, превышая исходный уровень через 6 мес после терапии (табл.3). Количество респондеров составило – 9 человек, включая 3 пациентов с усилением исходно позитивного ответа и 6 пациентов с появлением позитивного ответа после первого (n=3) и второго (n=3) курса ИТ.

**Таблица 3**

Антигенспецифический пролиферативный ответ МНК пациентов в динамике ИТ

Параметры		До ИТ (I)	После 1-го курса ИТ (II)	После 2-го курса ИТ(III)	Через 6 мес. после 2-го курса (IV)
Core	Пролиферация (имп/мин)	660 (285-1090)	2065* (605-2519)	3875** (2504-7263)	5359* (1515-5576)
	Индекс влияния (ИВ)	1,5 (1-4,9)	5,2* (2,3-11,5)	7,8* (5,4-10,6)	5,0* (1,8-25,2)
	Количество пациентов с ИВ $>3,0$	3/10	6/10	9/10	7/10
NS3	Пролиферация (имп/мин)	1316 (589-1794)	1575 (677-2345)	1646 (1329-3824)	1618 (1147-2351)
	Индекс влияния (ИВ)	2,5 (1,8-5,2)	3,3 (1,9-5,9)	3,0 (1,8-5,7)	3,0 (1,6-7,6)

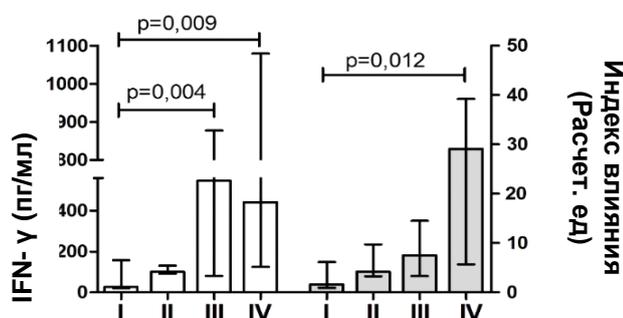
Количество пациентов с ИВ>3,0	4/10	5/10	5/10	5/10
-------------------------------	------	------	------	------

*Примечание:* представлены данные (Me; UQ-LQ - в скобках). \*,\*\*  $p_U < 0,05$  и  $0,001$ - достоверность различий с показателями на точке (I).

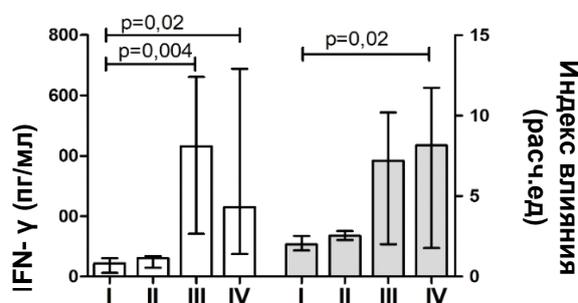
Медианный уровень NS3-специфического пролиферативного ответа незначительно возростал (на уровне тренда) после 1-го курса иммунотерапии и сохранялся на этом уровне после 2-го курса и 6-мес периода наблюдения. Тем не менее, число пациентов, ответивших как минимум на одной точке обследования, составило 8 человек (в четырех случаях наблюдалось усиление исходно позитивного ответа и в 4 случаях - появление ответа). Наряду со стимуляцией антигенспецифического ответа, ИТ восстанавливала исходно сниженную неспецифическую митогенную реактивность Т-клеток. Так, если исходно ответ МНК на КонА составлял 10699 (2577-15200) имп/мин, то на II, III и IV точках обследования был значимо ( $p_U < 0,05$ ) выше - 20982 (17167-24833), 23327 (22096-29587) и 35015(26286-37388) имп/мин, соответственно.

Анализ антиген-стимулированной продукции IFN- $\gamma$  (рис. 8) показал, что исходно стимуляция МНК Core-антигеном практически не усиливала продукцию IFN- $\gamma$ . После второго курса ИТ ответ на Core значимо возростал, сохраняясь на достаточно высоком уровне после 6 мес наблюдения. Появление позитивного ответа было зарегистрировано у 9 пациентов. NS3-стимулированная продукция IFN- $\gamma$  исходно и после 1-го курса практически не определялась и возростала только после 2-го курса, оставаясь повышенной после 6 мес наблюдения. Появление позитивного ответа на NS3 также регистрировалось у 9 пациентов.

А



Б

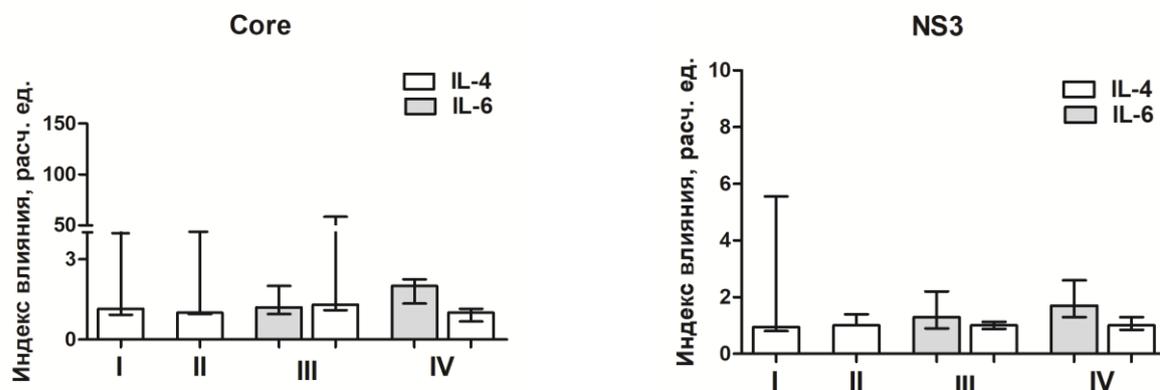


**Рисунок 8.** Продукция IFN- $\gamma$  в культурах МНК, стимулированных Core (А) и NS3 (Б) антигенами, в динамике иммунотерапии ДК. Представлены данные (Me; UQ-LQ; n=10) по продукции IFN- $\gamma$  в культурах МНК пациентов до начала ИТ (I), после первого курса (II), после второго курса (III) и через 6 мес наблюдения (IV).  $p_U$  - достоверность различий с точкой (I).

В то же время вакцинация ДК<sub>Core/NS3</sub> не индуцировала антигенспецифический Th2 ответ (рис.9), что подтверждалось отсутствием изменений в продукции IL-4 и IL-6 в культурах МНК пациентов на протяжении всего периода лечения и наблюдения.

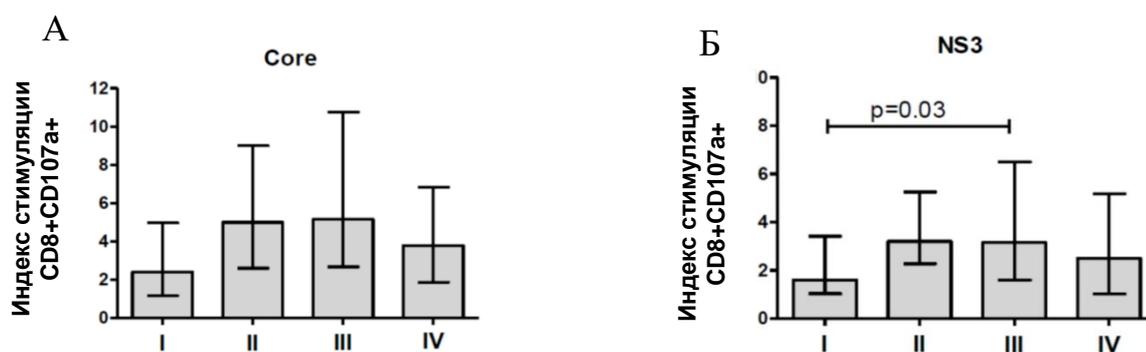
Характерно, что если до ИТ пролиферативный ответ не коррелировал с IFN- $\gamma$ -секретирующей активностью МНК, то через 6 мес после лечения продукция IFN- $\gamma$  в NS3- и Core-стимулированных культурах МНК коррелировала с пролиферативным ответом ( $R_s=0,83$ ;  $p=0,04$  и  $R_s=0,78$ ;  $p=0,036$ , соответственно).

Мониторинг цитотоксических Т-клеток (рис.10) показал, что уровень Core- и NS3-



**Рисунок 9.** Продукция IL-4 и IL-6 в культурах МНК, стимулированных Core и NS3 антигенами, в динамике иммунотерапии ДК. Представлены данные (Ме; UQ-LQ;  $n=10$ ).

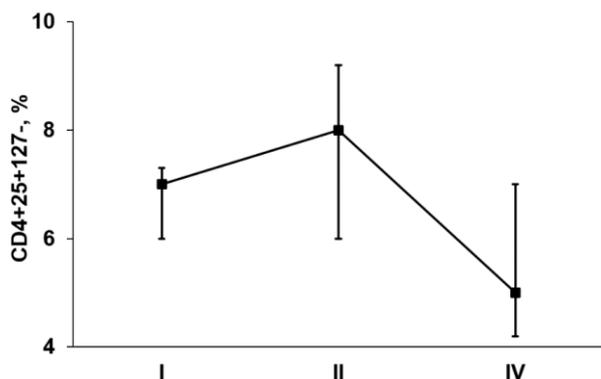
индуцированной дегрануляция CD8<sup>+</sup> Т-клеток возрастал после 1-го курса ИТ, сохранялся повышенным после второго курса ИТ и умеренно снижалась к исходу 6-мес наблюдения. Количество респондеров, ответивших возрастанием Core- и NS3-специфической дегрануляции CD8<sup>+</sup> Т-клеток составило, соответственно, 9 и 8 человека. По силе ответа Core-специфическая дегрануляция CD8<sup>+</sup> Т-клеток превышала NS3-индуцированный цитотоксический ответ. Эти различия были статистически достоверны после первого ( $p_w=0,04$ ) и ( $p_w=0,02$ ) второго курса вакцинаций и регистрировались в виде тренда после 6-месячного наблюдения ( $p_w=0,07$ ).



**Рисунок 10.** Оценка антигенспецифических CD8<sup>+</sup> цитотоксических клеток в динамике иммунотерапии. Данные представлены в виде индексов стимуляции (Ме; UQ-LQ) антигенспецифической дегрануляции CD8<sup>+</sup> Т-клеток;  $p_w$  - значимость различий по сравнению с исходным уровнем (I).

При оценке относительного содержания CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> Т-клеток в периферической крови больных в динамике лечения (рис. 11) было показано, что доля исследуемых Т-клеток в периферической крови пациентов после проведения первого курса вакцинотерапии (II), а также к исходу 6 месячного наблюдения после завершения иммунотерапии (IV) значимо не увеличивалась. Следует также отметить, что перед

началом ИТ и на момент завершения исследования между количеством  $CD4^+CD25^+CD127^-$  Т-клеток и антигенспецифическими ответами не выявлялось какой-либо взаимосвязи.



**Рисунок 11.** Относительное содержание  $CD4^+CD25^+CD127^-$  Т-клеток в динамике иммунотерапии ДК. Представлены данные Ме и UQ-LQ. По оси ординат-точки обследования.

Анализ индивидуальных параметров антигенспецифического ответа, характеризующих пролиферацию, продукцию  $IFN-\gamma$  и дегрануляцию  $CD8^+$  Т-клеток в динамике ИТ показал, что иммунный ответ индуцировался у всех пациентов, хотя характеризовался выраженной индивидуальной гетерогенностью по типу клеточных реакций, их выраженности и устойчивости ответа. Индукция всех трех типов Core-специфического ответа (пролиферация, продукция  $IFN-\gamma$  и дегрануляция  $CD8^+$  Т-клеток) выявлялась у 7 из 10 пациентов,

хотя время развития различных клеточных реакций варьировало. Индукция всех трех типов NS3-специфического ответа выявлялась у 5 пациентов.

Исследование вирусной нагрузки с помощью количественного ПЦР на РНК вируса гепатита С показало, что вакцинотерапия не сопровождалась значимым снижением виремии. Медианный уровень HCV РНК исходно составлял  $12,3 (3,5-94) \times 10^4$  Ед/мл и после 1-го курса ИТ, 2-го курса ИТ и 6-месячного периода наблюдения значимо не изменялся. При анализе индивидуальных данных стойкое снижение вирусной нагрузки на 1 порядок наблюдалось только у 2-х из 10 пациентов. Тем не менее, уровень вирусной нагрузки через 6 мес после ИТ обратно коррелировал с NS3-индуцированным пролиферативным ответом ( $R_s=-0,62$ ;  $p=0,05$ ) и продукцией  $IFN-\gamma$  ( $R_s=-0,82$ ;  $p=0,001$ ) и на уровне тренда - с Core-специфической продукцией  $IFN-\gamma$  ( $R_s=-0,56$ ;  $p=0,08$ ).

Ограниченная эффективность стандартной противовирусной терапии интерферонами и рибавирином у пациентов с ХГС генотипом 1 (ответ – в 40-50% случаев) и зависимость противовирусного эффекта от Т-клеточного ответа позволили предположить, что комбинация иммунотерапии ДК с противовирусными препаратами позволит усилить вирусологический ответ. Кроме того, учитывая данные о негативном влиянии противовирусных препаратов на функции ДК, представлялось важным выяснить, оказывает ли противовирусная терапия супрессивный эффект на развитие HCV-специфического иммунного ответа, индуцированного ИФН-ДК. Поэтому заключительный этап был посвящен клинической апробации ИФН-ДК в комбинации с противовирусной терапией интерфероном- $\alpha$  и рибавирином. Для этого в группе 8 пациентов были исследованы показатели иммунного ответа и вирусной нагрузки в динамике комбинированной ИТ. Проводимое лечение не вызывало тяжелых нежелательных явлений. Тем не менее, на фоне комбинированной ИТ регистрировалась

умеренная транзиторная нейтропения, что является частым побочным эффектом терапии интерферонами. Кроме того, у 3-х из 8 пациентов отмечались и другие характерные для терапии интерферонами побочные эффекты, побудившие к отказу пациентов от дальнейшего продолжения противовирусной терапии. Эти пациенты были выведены из исследования. Еще у одного пациента терапия была прекращена через 3 месяца в связи со стабильной вирусной нагрузкой, отражающей резистентность к базисным препаратам.

Оценка пролиферативного ответа *ex vivo* выявила 2-х фазный характер изменений Core-индуцированной пролиферации (табл. 4). Через 1 мес от начала терапии Core-специфический ответ (ИС<sub>Core</sub>) повышался, к исходу 3 месяцев лечения возвращался к исходному уровню, а спустя 6 мес вновь возрастал. Появление или усиление позитивного ответа на Core было зарегистрировано у 4 из 8 пациентов.

NS3- специфический пролиферативный ответ до начала терапии практически не детектировался - наличие позитивного ответа (ИС<sub>NS3</sub>>3,0) выявлялось у 1-го из 8 пациентов. Через 1 мес терапии ИС<sub>NS3</sub> возрастал до 1,7; через 3 мес - достигал 19,0 и к исходу 6 мес снижался до 3,2, превышая исходный уровень. Число респондеров составило 5 человек. Таким образом, вакцинация пациентов ДК<sub>Core/NS3</sub> на фоне противовирусной терапии приводила к выраженному и достоверному возрастанию NS3-специфического пролиферативного ответа МНК и умеренному усилению Core-

**Таблица 4**

Core/NS3-специфический и Кона-индуцированный пролиферативный ответ МНК в динамике комбинированной ИТ

Точки обследования	NS3		Core		Ответ на Кона (имп/мин)
	Индекс влияния (расч.ед.)	Частота пациентов с ИВ >3,0	Индекс влияния (расч.ед.)	Частота пациентов с ИВ >3,0	
До терапии n=8	1,1 (0,7-1,9)	1/8	2,8 (1,6-3,9)	3/8	27706 (24483-36401)
Через 1 мес. терапии, n=6	1,7 (1,6-3,8)	2/6	4,3 (1,9-5,8)	4/6	13866 (6776-22062)*
Через 3 мес. терапии, n=5	19* (5-21)	4/5	2,7 (1,6-6,6)	2/5	11728 (8769-12858)*
Через 6 мес. терапии, n=4	3,2 (2,2-5,1)	3/4	4,0 (1,3-5,6)	1/4	14652 (8671-41436)

*Примечание:* представлены данные Ме; (UQ-LQ) в скобках и n-количество наблюдений. \* -  $p < 0,05$ ; достоверность различия показателей по сравнению с исходными значениями.

специфического ответа. В то же время комбинированная ИТ сопровождалась снижением неспецифической Кона-стимулированной пролиферации МНК. Анализ митогенной реактивности МНК больных ХГС в динамике терапии показал, что через 1 и 3 мес терапии интенсивность Кона-стимулированной пролиферации достоверно уменьшалась и к моменту завершения 6-месячного курса лечения оставалась сниженной (табл. 4).

Следует отметить, что на начальных этапах (до ИТ либо через 1 мес после начала терапии) уровень КонА-стимулированной пролиферации достоверно коррелировал с Core- специфическим ( $R_s = 0,73$ ,  $p = 0,03$ ) и NS3-специфическим ответом ( $R_s = 0,9$ ,  $p = 0,03$ ). В то же время после 3-6 месяцев лечения эта корреляционная связь нивелировалась. Таким образом снижение неспецифической митоген-стимулированной пролиферативной активности Т-клеток в процессе комбинированной ИТ не влияло критическим образом на индукцию Core- и NS3-специфического пролиферативного ответа.

Исследование влияния терапии на ЦТЛ выявило усиление ответа  $CD8^+$  Т-клеток через 1 и 3-6 месяцев в тесте Core- и NS3-индуцированной дегрануляции, что свидетельствовало о возрастании доли HCV-специфических ЦТЛ в динамике терапии (табл. 5). При этом Core-специфический ответ характеризовался большей выраженностью.

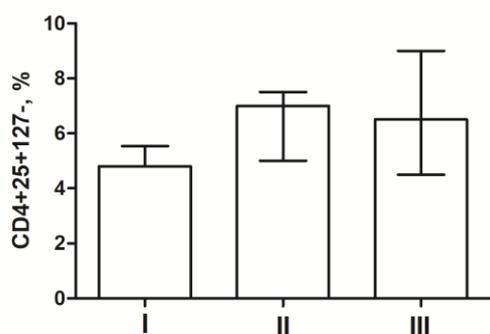
**Таблица 5**

Ответ цитотоксических Т-клеток на стимуляцию Core и NS3 в динамике комбинированной ИТ

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

*Примечание:* приведены индексы стимуляции Core и NS3 в тесте дегрануляции  $CD8^+$  Т-лимфоцитов, рассчитанные как отношение относительного содержания  $CD3^+CD8^+CD107a^+$  Т-клеток в Core или NS3- стимулированных МНК к таковым в нестимулированных культурах МНК. Представлены данные Me, UQ-LQ (в скобках) и n (количество наблюдений). \*-  $p < 0,05$ ; достоверность различий по сравнению с показателями до терапии. #-результаты обследования через 3 и 6 мес. объединены.

Оценка влияния комбинированной ИТ на генерацию  $CD4^+CD25^+CD127^-$  Т-клеток не выявила возрастания доли регуляторных Т-клеток в динамике терапии (рис. 12). Корреляционный анализ также не показал взаимосвязи между уровнем  $CD4^+CD25^+CD127^-$  Т-клеток и пролиферативным ответом на NS3 и Core- на фоне терапии ( $R_s = 0,02$ ; и  $R_s = -0,4$ ;  $p = 0,9$ ; соответственно,  $n = 11$ ), что свидетельствует об отсутствии стимулирующего действия комбинированной ИТ на генерацию регуляторных  $CD4^+CD25^+CD127^-$  Т-клеток несмотря на снижение митоген-индуцированной пролиферативной активности Т-лимфоцитов.



**Рисунок 12.** Относительное содержание CD4<sup>+</sup>25<sup>+</sup>127<sup>-</sup> регуляторных Т-клеток в динамике терапии. Приведено относительное содержание CD4<sup>+</sup>25<sup>+</sup>127<sup>-</sup> Т-клеток до начала терапии (I) - (n=6), II – после 1 мес. терапии (n=6). III - через 3 и 6 мес. терапии (n=6), Представлены данные Me и UQ-LQ.

Анализ вирусной нагрузки до терапии, а также через 1, 3 и 6 месяцев лечения (табл. 6) показал, что БВО (снижение или отсутствие РНК вируса в крови через 1 месяц терапии) 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 точках обследования 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 6**

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.	$8,8 \times 10^4$	выбыл	выбыл	выбыл
2. Больной Р.Н.	$3,5 \times 10^5$	$6,5 \times 10^3$	выбыл	выбыл
3. Больной Л.М.	$3,5 \times 10^4$	$6,9 \times 10^4$	$9,4 \times 10^4$	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».

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования позволяют заключить, что рекомбинантные белки, кодируемые усеченными фрагментами генов HCV Core (1-120) и NS3 (1192-1457), при использовании в качестве антигенов для нагрузки ДК не оказывают ингибирующего действия на созревание и функциональную активность генерируемых из моноцитов ИФН-ДК. Нагруженные указанными антигенами ДК (ДК<sub>Core/NS3</sub>) серонегативных доноров стимулируют *in vitro* антигенспецифические клеточные реакции, в частности, индуцируют пролиферативный ответ, продукцию IFN- $\gamma$  и дегрануляцию CD8<sup>+</sup> Т-клеток. ДК<sub>Core/NS3</sub> пациентов с ХГС также обладают способностью индуцировать *in vitro* антигенспецифические реакции в культурах аутологических МНК, хотя с меньшей

эффективностью в отношении активации цитотоксических Т-клеток. Клиническая апробация ДК<sub>Core/NS3</sub> в виде монотерапии показала отсутствие тяжелых нежелательных явлений и хорошую переносимость иммунотерапии. Курсовое введение ДК<sub>Core/NS3</sub> сопровождалось усилением пролиферативного ответа, продукции IFN- $\gamma$  и дегрануляции CD8<sup>+</sup> Т-клеток при стимуляции МНК Core и NS3 белками. Core/NS3-специфический пролиферативный ответ и активация цитотоксических Т-клеток наблюдались уже после первого курса вакцинаций, причем Core-индуцированный ответ был более выраженным, чем ответ на NS3. Усиление продукции IFN- $\gamma$  в ответ на стимуляцию Core и NS3 происходило позже – после второго курса вакцинаций. При этом иммунотерапия не приводит к активации Th2 ответа и экспансии CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> (регуляторных) Т-клеток. Следует отметить, что многократная вакцинация ДК<sub>Core/NS3</sub> вызывала развитие антигенспецифического иммунного ответа у всех пациентов, хотя параметры ответа (тип клеточных реакций, их выраженность и продолжительность ответа) характеризовались индивидуальной гетерогенностью. Монотерапия ДК<sub>Core/NS3</sub> не приводила к элиминации вируса. Стойкое снижение вирусной нагрузки на 1 порядок регистрировалось только у 20% пациентов. Тем не менее, между вирусной нагрузкой и уровнем NS3-специфического ответа (пролиферация и продукция IFN- $\gamma$ ) регистрировалась обратная корреляционная зависимость, свидетельствующая о роли NS3-специфического клеточного ответа в ограничении репликации вируса. С другой стороны, недостаточная эффективность ДК-вакцины в виде монотерапии послужила обоснованием целесообразности комбинации вакцинотерапии с противовирусными препаратами.

Апробация иммунотерапии ДК в комплексном лечении больных ХГС (в комбинации с интерфероном- $\alpha$  и рибавирином) показала отсутствие тяжелых нежелательных явлений, хотя у больных отмечались побочные реакции, связанные с применением интерферонов. Несмотря на снижение КонА-стимулированной пролиферации на фоне противовирусной терапии вакцинация ДК<sub>Core/NS3</sub> приводила к усилению Core- и NS3- специфической пролиферации и дегрануляции CD8<sup>+</sup>Т-клеток. Таким образом, противовирусной терапии не оказывала выраженного ингибирующего эффекта на индукцию антигенспецифического ответа. Характерно, что вакцинация пациентов ДК<sub>Core/NS3</sub> на фоне противовирусной терапии в большей степени стимулировала NS3-специфический пролиферативный ответ и в меньшей - ответ на Core. В то же время ответ цитотоксических Т-клеток был более выраженным и устойчивым в отношении Core антигена. При этом снижение митоген-стимулированной пролиферации МНК на фоне противовирусной терапии не было связано с экспансией CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup> Treg. Комбинированная ИТ позволяла достичь быстрого вирусологического ответа у 86% (6/7) больных и устойчивого вирусологического ответа в виде полного угнетения репликации вируса у всех пациентов с быстрым вирусологическим ответом, завершивших 6 месячный курс лечения. Учитывая, что устойчивый вирусологический ответ на терапии интерфероном- $\alpha$  и рибавирином регистрируется лишь у половины пациентов, полученные данные позволяют сделать предварительное заключение о более высокой эффективности противовирусной терапии, проводимой на фоне вакцинации ДК<sub>Core/NS3</sub>.

## ВЫВОДЫ

1. Кратковременная преинкубация ИФН-ДК с рекомбинантными HCV белками, кодируемыми усеченными фрагментами генов Core (1-120) и NS3 (1192-1457), не оказывает ингибирующего действия на экспрессию дендритными клетками антигенпрезентирующих, костимуляторных и активационных молекул, а также аллостимуляторную и Th1/Th2 стимулирующую активность ДК, что свидетельствует об отсутствии супрессорного влияния указанных белков на созревание и функции ИФН-ДК.

2. ИФН-ДК серонегативных доноров, нагруженные Core и NS3 белками, индуцируют *in vitro* антигенспецифические клеточные реакции, о чем свидетельствуют более высокие уровни пролиферации, продукции IFN- $\gamma$  и дегрануляции CD8<sup>+</sup> Т-клеток в культурах аутологичных МНК, стимулированных ДК<sub>Core/NS3</sub>, по сравнению с ответами при стимуляции контрольными ДК.

3. ДК пациентов с ХГС при нагрузке рекомбинантными Core (1-120) и NS3 (1192-1457) белками способны стимулировать пролиферативный ответ, продукцию IFN- $\gamma$  и дегрануляцию CD8<sup>+</sup> Т-клеток в культурах аутологичных МНК, что свидетельствует о сохранении антигенпрезентирующей и стимулирующей функций генерированных из моноцитов ИФН-ДК при хронической HCV-инфекции.

4. Вакцинация ДК<sub>Core/NS3</sub>, в виде монотерапии сопровождается возрастанием пролиферации, продукции IFN- $\gamma$  и дегрануляции CD8<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> регуляторных Т-клеток, что свидетельствует о способности ИФН-ДК стимулировать HCV-специфический иммунный ответ у пациентов с ХГС.

5. Уровень NS3-специфической пролиферации и продукции IFN- $\gamma$  после проведения иммунотерапии ДК<sub>Core/NS3</sub>, обратно коррелирует с репликацией вируса, однако выраженное (на 1 порядок 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<sub>Core/NS3</sub>, в сочетании с интерфероном и рибавирином приводит к усилению пролиферативного ответа и дегрануляции CD8<sup>+</sup> 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 иммунный ответ. При этом комбинированная терапия позволяет достичь быстрого вирусологического ответа у большинства (86%) пациентов.

## 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, Т19, специальный выпуск, С. 221.
5. Chernykh E, Leplina O, **Oleynik E**, Tyrinova T, Tikhonova M, Starostina N, Ostanin A. Immunotherapy with interferon- $\alpha$  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. // Медицинская иммунология 2017, Т19, С. 387-400.
7. **Oleynik E.**, Chernykh E., Starostina N., Leplina O., Tyrinova T. Immunotherapy with interferon- $\alpha$ -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)
8. Пат. 2637631 РФ. Способ иммунотерапии хронического вирусного гепатита С / Черных Е.Р., Леплина О.Ю., Старостина Н.М., Тыринова Т.В., **Олейник Е.А.**, Останин А.А. - № 2016120503, заявл. 25.05.2016; опубл. 05.12.2017, Бюл. 34.

## Список сокращений

ДК	Дендритные клетки
ДК <sub>0</sub>	Интактные ДК
ДК <sub>Core/NS3</sub>	ДК нагруженные Core и NS3 антигеном
ИЛ4-ДК	ДК, генерированные в присутствии интерлейкина-4
ИФН-ДК	ДК, генерированные в присутствии интерферон-альфа
МНК	Мононуклеарные клетки
СКЛ	Смешанная культура лейкоцитов
УВО	Устойчивый вирусологический ответ
ХГС	Хронический гепатит С
ЦТЛ	Цитотоксические Т-лимфоциты
CD	Кластер дифференцировки
GM-CSF	Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий
HLA-DR	фактор МНС II класса
IFN- $\alpha$	Интерферон-альфа
ИФН- $\gamma$	Интерферон-гамма
IL-2, IL-4 и др.	Интерлейкин-2, интерлейкин-4 и др.
НСV	Вирус гепатита С
Th1 и Th2	Субпопуляции Т-хелперных клеток 1 и 2 типа