

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ МЕДИЦИНСКИХ НАУК

УДК

№ госрегистрации

Инв.№

УТВЕРЖДАЮ
Директор ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН,
академик РАМН
_____ В.А. Козлов
«__» _____ 2012 г.

ОТЧЕТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ
по Государственному контракту от 01 сентября 2010 г. № 14.740.11.0007

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ СОЗДАНИЯ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ВАКЦИН НА БАЗЕ
ИННОВАЦИОННЫХ ПОДХОДОВ ГЕНЕРАЦИИ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИНТЕРФЕРОНА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ И
ИНФЕКЦИОННЫХ (ВИРУСНЫХ) ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА

по теме:
ОЦЕНКА ПЕРЕНОСИМОСТИ И КЛИНИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ВАКЦИН НА
ОСНОВЕ ИФН-ДК В ЛЕЧЕНИИ ХРОНИЧЕСКОЙ РЕЦИДИВИРУЮЩЕЙ
ГЕРПЕТИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ
(промежуточный, 5 этап)

Руководитель работ
Член-корр. РАМН, проф., д.м.н.

_____ Е.Р. Черных
подпись

Новосибирск 2012

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

<p>Руководитель работ Член-корр. РАМН, проф., д.м.н.</p>	<hr style="width: 100%;"/> подпись	<p>Е.Р. Черных (все разделы отчета)</p>
Исполнители		
<p>гл.н.с., проф., д.м.н.</p>	<hr style="width: 100%;"/> подпись	<p>А.А. Останин (все разделы отчета)</p>
<p>вед.н.с., д.м.н.</p>	<hr style="width: 100%;"/> подпись	<p>Н.А. Хонина (раздел 2.1)</p>
<p>с.н.с., д.м.н.</p>	<hr style="width: 100%;"/> подпись	<p>О.Ю. Леплина (разделы 1, 2.1, 2.2)</p>
<p>с.н.с., к.м.н.</p>	<hr style="width: 100%;"/> подпись	<p>Е.Я. Шевела (раздел 2.2)</p>
<p>с.н.с., к.м.н.</p>	<hr style="width: 100%;"/> подпись	<p>М.А. Тихонова (разделы 2.1, 2.2)</p>
<p>с.н.с., к.б.н.</p>	<hr style="width: 100%;"/> подпись	<p>Л.В. Сахно (разделы 2.1, 2.2)</p>
<p>зав. отделением Клиники иммунопатологии, к.м.н.</p>	<hr style="width: 100%;"/> подпись	<p>Н.М. Старостина (разделы 2.1, 2.2)</p>
<p>врач-ординатор Клиники иммунопатологии, к.м.н.</p>	<hr style="width: 100%;"/> подпись	<p>О.И. Желтова (разделы 2.1, 2.2)</p>
<p>врач-ординатор Клиники иммунопатологии</p>	<hr style="width: 100%;"/> подпись	<p>М.В. Шипунов (разделы 2.1, 2.2)</p>
<p>м.н.с., к.б.н.</p>	<hr style="width: 100%;"/> подпись	<p>Т.В. Тыринова (разделы 2.1, 2.2)</p>
<p>м.н.с.</p>	<hr style="width: 100%;"/> подпись	<p>Е.В. Баторов (раздел 2.1)</p>
<p>студент НГМУ</p>	<hr style="width: 100%;"/> подпись	<p>А.Е. Горбачева (раздел 2.1)</p>
<p>студент НГМУ</p>	<hr style="width: 100%;"/> подпись	<p>О.М. Павлова (раздел 2.1)</p>
<p>студент НГМУ</p>	<hr style="width: 100%;"/> подпись	<p>С.Э. Сланова (раздел 2.1)</p>
<p>студент НГМУ</p>	<hr style="width: 100%;"/> подпись	<p>С.И. Ворошилов (раздел 2.1)</p>
<p>нормоконтролер</p>	<hr style="width: 100%;"/> подпись	<p>Н.В. Сычева</p>
Соисполнители		
<p>Руководитель темы в Институте цитологии и генетики СО РАН, зав. лабораторией, д.б.н.</p>	<hr style="width: 100%;"/> подпись	<p>С.С. Богачев (разделы 2.3, 2.4, 2.5, 2.6)</p>
<p>н.с., к.б.н.</p>	<hr style="width: 100%;"/> подпись	<p>А.С. Проскурина (разделы 2.4, 2.5, 2.6)</p>

н.с., к.б.н.	_____	К.Е. Орищенко (разделы 2.3, 2.5, 2.6)
	подпись	
аспирант	_____	Е.А. Алямкина (разделы 2.5, 2.6)
	подпись	
аспирант	_____	Е.В. Долгова (разделы 2.5, 2.6)
	подпись	
аспирант	_____	А.В. Прокопенко (разделы 2.5, 2.6)
	подпись	
студент НГМУ	_____	Т.С. Гвоздева (разделы 2.5, 2.6)
	подпись	
студент НГУ	_____	Т.Б. Маланханова (разделы 2.5, 2.6)
	подпись	
студент КарГУ	_____	Е.А. Лебедева (разделы 2.5, 2.6)
	подпись	
студент ДВГУ	_____	Е.С. Петрова (разделы 2.5, 2.6)
	подпись	

Реферат

Отчет 68 с., 5 таблиц, 3 рисунка, 28 источников.

Ключевые слова – дендритные клетки, интерферон- α , двуцепочечная ДНК человека, рИЛ-2, цитокины, иммунотерапия, вакцины, герпесвирусная инфекция.

Объектом исследования являются дендритные клетки человека.

Целью настоящего этапа явилось завершение и анализ результатов пилотных клинических исследований по оценке переносимости и клинической эффективности вакцин на основе интерферон-альфа-индуцированных дендритных клеток (ИФН-ДК) в лечении хронической рецидивирующей герпетической инфекции. В рамках тематики этапа предполагалось решить следующие задачи: 1) Завершение пилотных клинических испытаний; 2) Формирование отчетной документации по лечению хронической рецидивирующей герпетической инфекции; 3) Оценка переносимости и безопасности ДК-вакцин; 4) Разработка программы внедрения результатов НИР в образовательный процесс; 5) Оценка изменения цитокинового баланса в крови здоровых доноров при использовании в качестве индуктора препарата ДНК Панаген; 6) Сравнение изменения цитокинового баланса в крови здоровых доноров после использования препарата Панаген и некоторых иммуномодулирующих коммерчески доступных препаратов.

Было установлено, что проведение специфической иммунотерапии с использованием индивидуальных, аутологичных лечебных вакцин на основе ИФН-ДК в виде курса подкожных инъекций у больных с хронической и часто рецидивирующей герпетической инфекцией позволяет уменьшить число/выраженность клинических проявлений рецидивов и увеличить продолжительность безрецидивного периода за счет эффективной активации антиген-специфического противовирусного иммунного ответа и восстановления функциональной реактивности Т-клеток. Проведение ДК-вакцинаций характеризовалось хорошей переносимостью.

При исследовании влияния препарата двуцепочечной ДНК человека («Панаген») на уровень продукции цитокинов клетками крови здоровых доноров в культуре *in vitro* было установлено, что препарат двуцепочечной ДНК стимулирует продукцию целого ряда цитокинов IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , IFN- α , IFN- γ , MCP, VEGF, IL-1RA и IL-10, при этом его стимулирующий эффект был близким или сравнимым с действием комплекса митогенов.

В целом, проведенные исследования обосновывают новые подходы в лечении инфекционных (вирусных) и онкологических заболеваний с использованием аутологичных ДК-вакцин.

Степень внедрения – разработана необходимая регламентирующая документация – протокол клинических исследований, форма информированного согласия, регистрационная карта динамического наблюдения больных, стандарты операционных процедур (SOPs) получения дендритноклеточных вакцин, проведения вакцинотерапии, оценки антиген-специфического иммунного ответа.

Рекомендации по внедрению результатов НИР – требуется подготовить и утвердить новую медицинскую технологию по использованию дендритноклеточных вакцин в лечении хронической и часто рецидивирующей герпесвирусной инфекции.

Область применения – клиники и специализированные медицинские центры по борьбе с хроническими вирусными инфекциями.

Результаты проведенной работы научно обосновывают целесообразность использования ИФН-ДК в качестве клеточной основы при создании индивидуальных лечебных вакцин, которые могут быть использованы в комплексной терапии больных с хроническими вирусными заболеваниями для индукции/усиления противоинфекционного иммунного ответа.

Экономическая эффективность или значимость работы заключается в том, что результаты работы могут быть использованы для создания новой медицинской технологии применения индивидуальных дендритноклеточных

вакцин для лечения онкологических и инфекционных (вирусных) заболеваний человека, которая после регистрации в Росздравнадзоре может быть внедрена в практическое здравоохранение.

Результаты, полученные в ходе реализации проекта, используются в виде разделов курса иммунологии, читающегося на кафедре иммунологии Новосибирского государственного медицинского университета, и курса клинической иммунологии, читающегося студентам 4 курса медицинского факультета Новосибирского государственного университета, а также в виде лекционного материала в обучении клинических ординаторов и аспирантов НИИ клинической иммунологии СО РАМН.

Предусмотренные календарным планом задания выполнены полностью.

Содержание

Определения, обозначения и сокращения	8
Введение	9
Основная часть	15
1 Литературный обзор	15
2 Результаты и обсуждение	20
2.1 Завершение пилотных клинических испытаний.....	20
2.2 Формирование отчетной документации по лечению хронической рецидивирующей герпетической инфекции	34
2.2.1 Протокол клинических испытаний «Оценка безопасности и эффективности специфической иммунотерапии в лечении больных рецидивирующей герпетической инфекцией»	34
2.2.2 Информированное согласие.....	37
2.2.3 Регистрационная карта.....	38
2.2.4 Стандарты операционных процедур (SOPs)	45
2.3 Оценка переносимости и безопасности ДК-вакцин	47
2.4 Разработка программы внедрения результатов НИР в образовательный процесс.....	48
2.5 Оценка изменения цитокинового баланса в крови здоровых доноров при использовании в качестве индуктора препарата ДНК Панаген.....	48
2.6 Сравнение изменения цитокинового баланса в крови здоровых доноров после использования препарата Панаген и некоторых иммуномодулирующих коммерчески доступных препаратов.....	53
Заключение	57
Список использованных источников	65

Определения, обозначения и сокращения

ГМ-КСФ – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

ДК – дендритные клетки

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИВ – индекс влияния

ИЛ-2, ИЛ-4 и др. – интерлейкин-2, интерлейкин-4 и др.

ИФН- α – интерферон- α

ИФН- γ – интерферон- γ

ИФН-ДК – дендритные клетки, полученные в присутствии интерферона- α

МНК – моноклеарные клетки

ФНО α – фактор некроза опухоли- α

CD – кластер дифференцировки

Th0, Th1, Th2 – субпопуляции Т-хелперных клеток

Введение

Дендритные клетки (ДК) являются высокоспециализированными антигенпрезентирующими клетками, способными индуцировать иммунный ответ против различных антигенов, включая опухолевые и вирусные антигены. Соответственно технологии генерации ДК и использования их в качестве индивидуальных вакцин рассматриваются в качестве перспективных клеточных технологий, направленных на усиление противоопухолевого и противовирусного иммунитета.

Тем не менее, ДК представляют собой гетерогенную популяцию клеток, различающихся по степени зрелости (незрелые, частично-зрелые или зрелые ДК) и соответственно, по уровню функциональной активности. Кроме того, ДК в культуре *in vitro* могут быть получены с использованием различных протоколов, например, либо в присутствии ГМ-КСФ и ИЛ-4 (ИЛ4-ДК) или в присутствии ГМ-КСФ и ИФН- α (ИФН-ДК). Важнейшим отличием применения ИФН- α для активации и получения ДК *in vitro* от классического индуктора ИЛ-4, является более физиологичный путь генерации ДК, поскольку ИФН- α является ранним медиатором врожденного иммунитета, тогда как продукция ИЛ-4 в высоких дозах *in vivo* представляется маловероятной.

По нашим данным, полученным в ходе выполнения предыдущих этапов работы, ИФН-ДК имеют ряд преимуществ:

- 1) генерируются быстрее по времени;
- 2) характеризуются высокой способностью к захвату антигена (поскольку имеют фенотип «частично зрелых» клеток), сохраняя при этом антиген-презентирующую активность (т.к. экспрессируют костимуляторные молекулы [CD86] и молекулы главного комплекса гистосовместимости [HLA-DR]);
- 3) обладают цитотоксическим потенциалом, поскольку экспрессируют молекулы B7-H1 и TRAIL, и отличаются повышенным содержанием плазмацитоидных CD123+ ДК;

4) сохраняют функциональную стабильность и способны эффективно индуцировать реакции клеточного и гуморального иммунитета, поскольку активно секретируют Th1/провоспалительные (ИФН- γ , ИЛ-2, ИЛ-17, ИЛ-1 β) и Th2/противовоспалительные цитокины (ИЛ-10, ИЛ-5), а также ростовые гемопозитические факторы (Г-КСФ) и хемокины (MCP-1);

5) ИФН-ДК обладают схожей с ИЛ-4-ДК способностью активировать Т-клетки к продукции Th1/провоспалительных (ИЛ-2, ИЛ-1 β , ФНО- α , ИЛ-12p70, ИЛ-17) и Th2/противовоспалительных цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-13), ростовых факторов гемоиммунопоза (ИЛ-7, Г-КСФ, ГМ-КСФ), а также СХС и СС хемокинов (ИЛ-8, MCP-1);

6) ИФН-ДК оказывают более выраженный стимулирующий эффект на Th1 и Th2-клетки, что проявляется достоверно более высоким уровнем продукции ИФН- γ и ИЛ-5, а также СС хемокина – MIP-1 β ;

7) ИФН-ДК обладают более выраженной способностью активировать Th1-клетки и индуцируют 10-кратный прирост количества CD3+ИФН- γ + Т-клеток в смешанной культуре лимфоцитов;

8) ИФН-ДК характеризуются наличием умеренной Th2-стимуляторной активности (индуцируют увеличение количества CD3+ИЛ-4+ Т-клеток в смешанной культуре лимфоцитов), которая практически отсутствует у ИЛ4-ДК;

9) ИФН-ДК характеризуются способностью к активации цитотоксических CD8+ Т-лимфоцитов, экспрессирующих внутриклеточно перфорин, при этом данная функциональная активность ИФН-ДК может быть дополнительно усилена при использовании в качестве дозревающего стимула ДНК человека.

Таким образом, результаты проведенной работы научно обосновывают целесообразность использования ИФН-ДК в качестве клеточной основы при создании индивидуальных лечебных вакцин, которые могут быть использованы в комплексной терапии больных с онкопатологией или

хроническими вирусными заболеваниями для индукции/усиления противоопухолевого или противоинфекционного иммунного ответа.

При этом исследования, выполненные на 3 этапе работы, показали принципиальную возможность генерации *ex vivo* из моноцитов крови больных с онкопатологией (злокачественными глиомами, гемобластомами) и инфекционными заболеваниями (гепатиты В и С, туберкулез легких) популяции ИФН-ДК в количествах, достаточных для проведения иммунотерапии с использованием индивидуальных лечебных вакцин.

Было установлено также, что ИФН-ДК, генерируемые у пациентов с онкопатологией и инфекционными заболеваниями, характеризуются некоторой задержкой дифференцировки/созревания, что проявляется увеличением клеток с фенотипом моноцитов (CD14+) и ДК промежуточной степени зрелости (CD1a, CD83+CD1a+, CD11+CD123+), а с другой стороны – снижением доли клеток, экспрессирующих молекулы зрелых и активированных ДК (CD83+, CD83+CD1a–, CD25+). Среди больных с онкопатологией эти признаки были наиболее выражены в группе больных со злокачественными лимфомами, в меньшей степени – в группе пациентов со злокачественными глиомами и минимальны – у больных с множественной миеломой. Среди больных с инфекционными заболеваниями наиболее выраженные нарушения дифференцировки/созревания ДК регистрировались у пациентов с хроническими вирусными гепатитами с исходом в цирроз печени, а также у больных туберкулезом легких с туберкулиновой анергией (сниженным пролиферативным ответом Т-клеток на ППД).

Изменения фенотипа ИФН-ДК, как правило, ассоциируются с нарушениями функциональной (цитокин-секреторной и Th1/Th2-стимуляторной) активности ИФН-ДК, которые в зависимости от вида патологии имеют различную степень выраженности – от выраженных дисфункций до их минимальных проявлений или отсутствия таковых.

В целом, полученные данные четко свидетельствуют, что у отдельных групп больных (например, у пациентов с хроническими вирусными

гепатитами с исходом в цирроз; туберкулезом легких с туберкулиновой анергией; злокачественными лимфомами) проведение клеточной иммунотерапии с использованием ДК-вакцин должно предусматривать поиск путей коррекции возможных дисфункций генерируемых ДК, а также возможность комбинации с адьювантной цитокинотерапией (например, с использованием препаратов рекомбинантного ИЛ-2 и/или ИФН- α), которая позволит активировать *in vivo* дополнительное количество ДК и цитотоксических Т-лимфоцитов. В то же время, у больных злокачественными глиомами, множественной миеломой, хроническими вирусными гепатитами (не осложненными развитием цирроза печени), туберкулезом легких (с сохраненным антиген-специфическим ответом на ППД) генерируемые *in vitro* ИФН-ДК в целом сохраняют свою функциональную активность (в частности, способность активировать эффективный Th1 ответ), что обосновывает принципиальную возможность их клинической апробации в качестве индивидуальных лечебных вакцин.

Изменение свойств генерируемых *in vitro* ДК при патологии свидетельствуют о необходимости коррекции нарушенных функций ДК с целью их последующего более эффективного использования в качестве аутологичных лечебных вакцин. Исследования, проведенные в ходе реализации 4 этапа работы, показали, что иммуномодулирующие препараты («Полиоксидоний», «Суперлимф»), препарат двуцепочечной ДНК человека («Панаген»), а также гормон ДГЭАС характеризуются выраженным стимулирующим эффектом на процесс дифференцировки/созревания ИФН-ДК. Так, например, Панаген по своему стимулирующему действию на ДК был сопоставим с «классическим» дозревающим стимулом – липополисахаридом стенки бактерий. В свою очередь, стимулирующий эффект ДГЭАС проявлялся не только в отношении ДК здоровых доноров, но и в модели «толерогенных» ДК, полученных от женщин с физиологической беременностью. При этом было установлено, что стимулирующий эффект ДГЭАС на созревание ИФН-ДК во многом обусловлен усилением

эндогенной продукции ФНО α – цитокина, который является одним из мощных «созревающих» стимулов для ДК.

При исследовании влияния биоактивных препаратов на функциональные свойства ДК, полученных от больных с онкопатологией (злокачественные опухоли головного мозга и лимфомы) и туберкулезом легких, была показана принципиальная возможность восстановления сниженной функциональной активности ДК у больных с тяжелыми онкологическими и инфекционными заболеваниями с помощью различных биоактивных препаратов («Полиоксидоний», «Суперлимф», «Ронколейкин», «Панаген»), добавление которых на этапе конечного созревания ДК позволяет значимо повысить аллостимуляторную и цитотоксическую активность генерируемых *in vitro* ИФН-ДК.

Целью настоящего этапа явилось завершение и анализ результатов пилотных клинических исследований по оценке переносимости и клинической эффективности вакцин на основе ИФН-ДК в лечении хронической рецидивирующей герпесвирусной инфекции. В результате было установлено, что проведение специфической иммунотерапии с использованием индивидуальных, аутологичных лечебных вакцин на основе ИФН-ДК в виде курса подкожных инъекций у больных с хронической и часто рецидивирующей герпетической инфекцией позволяет уменьшить число/выраженность клинических проявлений рецидивов и увеличить продолжительность безрецидивного периода, что сопряжено с активацией специфического и неспецифического иммунного ответа. Проведение ДК-вакцинаций характеризовалось в целом хорошей переносимостью. Системных побочных реакций в виде повышения температуры тела, аллергических и/или инфекционных осложнений не было отмечено ни в одном случае.

Кроме того, были проведены исследования по оценке влияния препарата двуцепочечной ДНК человека («Панаген»), а также некоторых других иммуномодулирующих коммерческих препаратов на уровень продукции

цитокинов клетками крови здоровых доноров в культуре *in vitro*. Было установлено, что значимый стимулирующий эффект препарата «Панаген» достигается уже через 6 ч инкубации. Пик продукции цитокинов и выход на плато происходит в промежутке 6-24 ч. Препарат двуцепочечной ДНК человека способен оказывать значительный стимулирующий эффект на продукцию целого ряда цитокинов мононуклеарами цельной крови: IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , IFN- α , IFN- γ , MCP, VEGF, IL-1RA и IL-10. Препараты «Дезоксил» и «Ридостин» продемонстрировали невысокую иммуностимуляцию мононуклеарных клеток периферической крови. Препарат «Панаген» оказывал значимый эффект на продукцию TNF- α , IL-1 β , IL-1RA, IL-10, IL-8 и IL-6, при этом его стимулирующий эффект был близким или сравнимым с действием комплекса митогенов. Это указывает на то, что двуцепочечная ДНК человека обладает выраженным иммуностимулирующим действием на мононуклеарные клетки периферической крови условно здоровых доноров.

Основная часть

1 Литературный обзор

ДК являются высокоспециализированными антиген-презентирующими клетками, способными индуцировать иммунный ответ против различных антигенов, включая опухолевые и вирусные антигены [1]. ДК играют центральную роль в поддержании врожденного иммунитета и обеспечивают взаимосвязь между врожденным и приобретенным иммунитетом благодаря способности инициировать антигенспецифический иммунный ответ и детерминировать его направленность. ДК обладают уникальной способностью активировать как CD4, так и CD8–клетки. При этом стимулирующий эффект ДК в 10-100 превышает стимулирующее действие макрофагов и других антиген-презентирующих клеток в силу более высокого уровня экспрессии костимуляторных молекул, медленной внутриклеточной деградации антигена и длительной презентации антигена на поверхности клеток. Кроме того, ДК являются единственными антигенпрезентирующими клетками, которые способны активировать наивные Т-клетки [2, 3].

Известно, что специфическая иммунотерапия на основе клеточных вакцин широко применяется в онкологической практике. В последние годы появились публикации о клинической эффективности и безопасности применения дендритных клеток, нагруженных *ex vivo* специфическими антигенами, при некоторых инфекционных заболеваниях: хронических вирусных гепатитах, папилломавирусной инфекции, инфекциях, вызванных вирусом иммунодефицита человека [4-6].

Лечение больных хроническими вирусными инфекциями, в частности, рецидивирующей герпетической инфекцией, представляет определенные трудности как из-за отсутствия четкого понимания отдельных механизмов заболевания, обуславливающих частое рецидивирование инфекции, так и в связи с отсутствием высокоэффективных противовирусных химиопрепаратов. Учитывая, что при хронических заболеваниях с длительной персистенцией вируса, развиваются иммунодефицитные

состояния, обусловленные недостаточностью различных звеньев иммунной системы, для повышения эффективности проводимого лечения в схемы терапии включают иммуностимулирующие препараты. Однако даже при применении современных схем комплексной терапии не всегда удается избежать повторного рецидивирования заболевания и добиться нормализации иммунологических показателей.

ДК, будучи наиболее эффективными антигенпрезентирующими клетками, играют важную роль в запуске противовирусного иммунного ответа [1]. Поэтому использование ДК, нагруженных вирусными антигенами, рассматривается в качестве перспективной стратегии активации иммунного ответа при лечении хронических рецидивирующих форм вирусных инфекций.

В настоящее время клинические исследования с использованием вакцин на основе дендритных клеток, нагруженных HbsAg, проведены у больных хроническим вирусным гепатитом [7]. Эти исследования показали развитие эффективного антигенспецифического иммунного ответа на вирусный антиген и хорошую переносимость вакцинаций. Открытые пилотные испытания ДК-вакцин были проведены Luo J. и соавт. в группе 380 пациентов гепатитом В [8]. В ходе лечения у 46% пациентов наблюдался положительная динамика вирусологического ответа (отрицательная ПЦР-реакция). Нормализация аланинаминотрансферазы (АЛТ) была отмечена как у HBeAg-позитивных, так и HBeAg-негативных пациентов. Причем проведение иммунотерапии не вызывало никаких побочных/токсических реакций.

Еще в одном исследовании двукратное подкожное введение ДК, нагруженных HBeAg с интервалом в 2 недели в группе 19 пациентов хроническим вирусным гепатитом В сопровождалось эффективным подавлением репликации вируса и снижением вирусной нагрузки у 52% пациентов [9]. Причем, у пациентов, имевших до лечения высокие

показатели биохимической активности наблюдалась нормализация трансаминаз.

Клинических испытаний ДК-вакцин при рецидивирующих формах вирусной инфекции, вызванной вирусами герпеса I и II типа, не проводилось. Тем не менее, в модели на мышах внутривенное введение пульс-меченых HSV-2 антигеном костномозговых дендритных клеток приводило к снижению смертности от генитального герпеса и вызывало стойкую ремиссию у части животных. Причем иммунный ответ был ассоциирован с усилением продукции ИФН- γ , количества CD4⁺ ИФН- γ -секретирующих клеток и специфических антител в ответ на стимуляцию HSV-2-антигеном. Т.е. введение *ex vivo* генерируемых ДК, нагруженных специфическим антигеном, обеспечивало развитие протективного иммунитета против вируса генитального герпеса [10].

Герпесвирусная инфекция является одной из самых распространенных вирусных инфекций человека, нередко отличающейся упорным хроническим течением с частыми рецидивами. Характер патогенетических изменений в организме больных обусловлен интеграцией генома вируса в геном клетки-хозяина, тропностью герпесвирусов к клеткам иммунной системы. Это способствует пожизненной персистенции структур вируса герпеса в организме человека и обуславливает изменение клеточного и гуморального иммунитета. Основная роль в формировании противогерпетического иммунитета принадлежит клеточным факторам, от их состояния зависит исход первичного инфицирования, частота и напряженность рецидивов.

Хотя точные механизмы персистенции вируса герпеса до конца не раскрыты, одной из основных причин хронизации признают дефект клеточного иммунитета, в частности, нарушение антигенспецифического ответа, направленного на элиминацию вируса [11]. При проникновении в организм вирусы непосредственно взаимодействуют с системой интерферона (ИФН). При этом состояние системы ИФН четко отражает динамику развития заболевания. В норме для интерферонового статуса характерна

низкая концентрация сывороточного ИФН и выраженная способность лейкоцитов продуцировать ИФН в ответ на адекватную индукцию. При хронических вирусных инфекциях с невысокой степенью активности заболевания наблюдается изменение картины интерферонового статуса: на фоне заметно сниженного уровня сывороточного ИФН отмечается повышение способности лейкоцитов к продукции индуцированного ИФН. Хроническая вирусная инфекция с выраженной активностью (с частыми рецидивами) сопровождается углублением дисбаланса системы интерферонов, когда общий сывороточный ИФН мало отличается от фоновых значений и сочетается с резким понижением индуцированной продукции до 5-10% от уровня нормы в отдельных случаях. В такой ситуации приходится констатировать глубокую депрессию системы интерферонов, когда отсутствие свободно циркулирующего в крови ИФН объясняется почти полным подавлением способности к его продукции. При этом система интерферонов уже не в состоянии осуществлять своих непосредственных функций и не в силах препятствовать дальнейшему углублению патологии. Рецидивы герпетической инфекции возникают только у людей с нарушениями функции иммунной системы.

Предполагается, что дендритные клетки больных рецидивирующей герпетической инфекции, генерированные *ex vivo* и нагруженные вирусными антигенами, при последующем введении пациенту могут активировать наивные Т-клетки и/или стимулировать существующий антигенспецифичный клеточный иммунитет.

Известно также, что даже однократное введение ДК, нагруженных вирусным антигеном (в частности, вируса гриппа) индуцирует появление цитотоксических Т-клеток и антител [12].

Существует несколько протоколов генерации ДК *in vitro*. Наиболее распространенным методом является культивирование прилипающей фракции моноклеарных клеток периферической крови в присутствии GM-CSF и IL-4 в течение 5-7 дней с последующей стимуляцией их созревания в

течение 24-48 ч с различными факторами. Такие клетки хорошо изучены и охарактеризованы. В то же время, в последние годы в литературе активно обсуждается возможность быстрой генерации частично зрелых ДК при замене ИЛ-4 на ИФН- α [13]. ИФН-ДК представляют большой интерес благодаря ряду особенностей: они быстрее генерируются, сохраняют стабильность в отсутствие цитокинов, обладают промежуточным по степени зрелости фенотипом даже без добавления созревающих стимулов, обладают сохранной фагоцитарной активностью, способны к дальнейшему созреванию при действии дозревающих стимулов. ИФН-ДК отличаются выраженной АГ-презентирующей способностью, вызывая интенсивную пролиферацию Т-клеток (по способности стимулировать пролиферацию CD8 Т-лимфоцитов превышают активность ИЛ4-ДК), и обладают способностью индуцировать Т-клетки к продукции цитокинов как Th1, так и Th2 профиля. Кроме того, важным свойством данного типа ДК является их высокая способность к захвату и презентации антигена; более высокая миграционная активность за счет высокого уровня экспрессии СС-хемокинового рецептора R7 (CCR7); активация преимущественно Th1-ответа и продукции ИФН- α , обладающего противовирусной активностью. Согласно нашим предварительным данным ИФН-ДК у больных с рецидивирующей герпетической инфекцией обладают сохранной аллостимуляторной активностью и способны индуцировать антигенспецифический ответ Т-клеток к вирусным антигенам, что свидетельствует об их возможном использовании в качестве клеточных вакцин.

Учитывая эти данные можно полагать, что вакцинация больных ДК, нагруженными вирусными антигенами, может усилить иммунный ответ против вируса и повысить продолжительность ремиссии у больных с хронической рецидивирующей герпесвирусной инфекцией.

С целью проверки этого предположения было проведено пилотное клиническое исследование по оценке безопасности и эффективности

иммунотерапии с использованием дендритноклеточных вакцин у больных с рецидивирующей герпетической инфекцией.

2 Результаты и обсуждение

2.1 Завершение пилотных клинических испытаний

К отчетному периоду проведение одного курса вакцинаций ДК завершено в группе 19 пациентов с хронической рецидивирующей герпесвирусной инфекцией. Все эти пациенты получили 6 подкожных инъекций ИФН-ДК (5×10^6 клеток), нагруженных рекомбинантными антигенами вируса герпеса с 2-недельным интервалом и были обследованы иммунологически до и после проведения иммунотерапии.

Отбор больных и лечение проводилось на базе иммунологического отделения Клиники иммунопатологии ИКИ СО РАМН в период с мая 2008 по май 2012 г. Клиническое испытание проводилось в дизайне открытого проспективного пилотного исследования с контролем «до-после». Протокол испытаний был утвержден на заседании Ученого Совета (протокол № 9 от 11 декабря 2007 г.) и одобрен локальным этическим комитетом.

В соответствии с протоколом в исследование были включены 19 пациентов (13 женщин и 6 мужчин) в возрасте от 22 до 49 (средний возраст – $30,2 \pm 1,8$ лет) с орофациальной и генитальной локализацией герпетической инфекции. Длительность заболевания составила в среднем $13,2 \pm 2$ года (от 3 до 40 лет), а количество обострений от 7 до 25 в год, (в среднем $13 \pm 1,2$ обострений в течение прошедшего года). Лечение проводилось согласно протоколу после подписания пациентами информированного согласия (см. раздел 2.2). Распределение пациентов по локализации основного заболевания представлено в таблице 1.

Таблица 1 – Характеристика пациентов

	Орофациальная локализация (n=13)	Генитальная локализация (n=6)
Возраст	29,9±2,5 (22 - 49)	30,2±1,8 (25 - 36)
Пол	♀10 ♂3	♀3 ♂3
Продолжительность заболевания (лет)	16,8±2,4	5,5±1,72
Количество обострений (в год)	12,4±1,4	14,7±2,4
Межрецидивный период (мес)	20,8±4,3	24,8±7,6

Обследование и иммунотерапию проводили по следующей схеме: в первый день утром после первичного осмотра и сбора анамнеза заболевания натошак проводились общий анализ крови, биохимическое обследование, электрокардиограмма, оценка уровня пролиферативного ответа на антиген и митоген. Затем, после завтрака, из кубитальной вены в условиях палаты интенсивной терапии, выполняли эксфузию периферической крови в объеме 200 мл. Эксфузия периферической крови осуществлялась в период вне обострения.

Мононуклеарные клетки (МНК) периферической крови выделяли центрифугированием цельной, гепаринизированной венозной крови в градиенте плотности фиколла-верографина ($\rho=1,078$, фиколл-Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Швеция; верографин-Spofa, ЧССР).

ДК генерировали из прилипающей фракции МНК периферической крови больного. Для этого МНК в концентрации 3×10^6 /мл инкубировали в течение 2 ч при 37°C в стерильных флаконах площадью 75 или 150 cm^2 (Falcon) с последующим удалением неприлипших к пластику клеток. Для получения незрелых ДК во флакон добавляли полную культуральную среду RPMI-1640, дополненную 1,5% аутоплазмы, 40 нг/мл GM-CSF (Sigma-Aldrich) и 1000 Ед/мл IFN- α (Роферон-А, Roche, Швейцария) и

культивировали в течение 3 сут при 37⁰ в CO₂-инкубаторе при 5% CO₂. Конечное созревание незрелых ДК проводили в присутствии полиоксидония (НПО ПетроваксФарм, Москва) в дозе 2 нг/мл в течение дополнительных 24 ч. Полученные в результате зрелые ДК нагружали в зависимости от типа герпесвирусной инфекции специфическим рекомбинантным антигеном вируса герпеса – HSV1gD и/или HSV2gD (American Research Production, USA) в дозе 5 мкг/мл во время часовой инкубации при 37⁰С с последующим криоконсервированием аликвот в растворе 10% DMSO и 90% альбумина в концентрации 6,0x10⁶/мл в программном замораживателе (Planer Kryo 560-16, USA) и хранением при –80⁰С до последующего использования.

Введение дендритноклеточной вакцины проводилось в верхнюю треть плеча (при орофациальной локализации) или бедра (при генитальной локализации) в четыре точки (по две в каждую конечность) с применением Ронколейкина 250000 Ед в качестве адьюванта в две точки в условиях процедурного кабинета. Вакцинация осуществлялась каждые 2 недели в период ремиссии.

Для оценки антигенспецифического пролиферативного ответа МНК пациентов в концентрации 0,1x10⁶ на лунку культивировали 72 часа при 37⁰С во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂, в 96-луночных круглодонных планшетах для иммунологических исследований в полной культуральной среде RPMI-1640 (Sigma USA), дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 5 мМ HEPES-буфера, 100 мкг/мл гентамицина и 10% инактивированной сыворотки доноров АВ(IV) группы в присутствии HSV1gD 5 мкг/мл. Оценку пролиферативного ответа МНК больных на митоген Конкановалин А 15 мкг/мл (КонаА, Sigma-Aldrich) оценивали в аналогичных культуральных условиях. Интенсивность пролиферации оценивали через 72 часа по включению метки в нуклеопротеидные фракции клеток ³Н-тимидина, вносимого за 18 часов до окончания культивирования в дозе 1 мкг/мл. Подсчет радиоактивности производили в жидкостном сцинтиляционном

счетчике SL-30(Intertechnic, Франция). Результаты представляли в виде среднего счета (имп/мин) из трех идентичных культур.

Эффективность ДК-вакцинаций

На фоне терапии пациенты отметили уменьшение числа рецидивов до 1-3 обострений за период лечения (3 месяца) – в среднем до $1,4 \pm 0,16$ или $0,46 \pm 0,05$ в месяц. Все пациенты субъективно отмечали быстрое купирование симптомов обострения, меньшую площадь поражения, быстрое заживление вторичных элементов.

В ходе терапии было показано нарастание антигенспецифического и митоген-индуцированного иммунного ответа после проведения одного курса иммунотерапии (таблица 2). Исходно все больные характеризовались отсутствием ответа на стимуляцию вирусным антигеном ($ИВ - 1,21 \pm 0,08$) и низким уровнем Кон-А-индуцированной пролиферации 14590 ± 1125 имп/мин. После курса иммунотерапии (через 3 мес от начала лечения) $ИВ_{АГ}$ достоверно возрастал до $4,07 \pm 0,79$ ($p_U = 0,000276$), что свидетельствовало о появлении антигенной реактивности МНК. Кроме того, отмечалось достоверное возрастание митогенной реактивности, которая достигала 24760 ± 2296 имп/мин, что соответствует нижнему уровню нормативного диапазона у доноров (23278 ± 2117 имп/мин).

Таблица 2 – Динамика пролиферативного ответа МНК больных (имп/мин) на HSV1gD антиген и КонА

Пациент	Пролиферативная активность (имп/мин)				
	МНК(0)	МНК(АГ+)	ИВ _{АГ}	МНК(КонА+)	ИВ _{КонА}
До лечения					
1. З-а	160	124	0,78	8320	52,0
2. К-а	248	266	1,07	16715	67,4
3. П-ц	384	234	0,6	7994	20,8
4. З-а	320	420	1,3	20400	63,8
5. С-о	170	146	0,85	11806	69,4

6. П-а	149	296	1,9	7660	156,3
7. Л-а	126	85	0,68	13308	105,6
8. З-а	104	204	1,96	9856	94,8
9. Ю-а	200	280	1,4	21400	107,0
10. С-Н	110	200	1,8	14680	133,5
11. Ф-а	210	296	1,4	16800	80,0
12. А-В	120	180	1,5	14600	121,7
13. П-В	110	116	1,05	12400	112,7
14. Ч-Н	280	286	1,01	14650	52,3
15. Ч-В	285	290	0,04	16200	56,8
16. Б-В	180	215	1,09	18400	102,2
17. С-а	96	99	1,03	6374	66,4
18. Т-а	215	286	1,33	14580	67,8
19. Т-а	186	215	1,15	24200	130,1
N=19					
M±SE	191,4±19,3	229,9±19,9	1,21±0,08	14590±1125	86,9±33,7
Mediana	183,0	224,5	1,17	14625	79
LQ-UQ	115,0-261,5	163,0-288,0	1,02-1,4	10831-17600	65-109
После лечения					
1. З-а	105	160	1,52	23654	225,2
2. К-а	112	360	3,2	20356	181,8
3. П-ц	80	1025	12,8	17636	220,5
4. З-а	360	1875	5,2	4382	12,2
5. С-о	120	1482	12,35	7277	60,6
6. П-ц	165	1425	5,38	22630	85,4
7. Л-а	126	169	1,34	19187	152,2
8. З-а	120	210	1,75	18620	155,2
9. Ю-а	320	1250	3,9	37400	116,9
10. С-Н	128	252	1,96	24800	189,4
11. Ф-а	249	1235	4,99	37500	150,6
12. А-В	278	524	1,88	30520	109,8
13. П-В	334	1441	4,3	29400	88,0
14. Ч-Н	218	546	2,5	27400	125,7
15. Ч-В	186	520	2,79	21580	117,5

16. Б-в	198	394	1,99	34856	176,0
17. С-а	210	780	3,7	40425	192,5
18. Т-а	220	325	1,48	24800	112,7
19. Т-а	185	394	2,1	27800	150,3
N=19					
M±SE	204,8±19,9	784,2±127,7*	4,07±0,79*	24760±2296*	135,2±54,7*
Mediana	204,0	535,5	3,0	24225	138,0
LQ-UQ	120,0-265,0	360-1250	188-4,96	19187-30520	109-176

Примечание: данные представлены в виде индивидуальных и средних значений пролиферативного ответа ($M \pm SE$) МНК больных герпесвирусной инфекцией в отсутствие (МНК0) и в присутствии МНК(АГ+) и МНК(КонА). $ИВ_{АГ}$ – индекс влияния антигена, отношение МНК(АГ+) к МНК(0); $ИВ_{Кон-А}$ – отношение МНК(КонА+) к МНК(0). * – достоверность различий, $p_U < 0,05$, u -критерий Вилкоксона-Манна-Уитни.

Отдельно была проанализирована группа 6 пациентов с генитальным герпесом. В этой группе пациентов проводилась вакцинация ДК, нагруженными одновременно вирусами 1 и 2 типа (HSV1gD и HSV2gD). В ходе терапии, после курса 6 вакцинаций кроме нарастания антигенспецифического ответа на антиген вируса лабиального герпеса наблюдалось также усиление антигенспецифического ответа на HSV2gD-антиген, а также усиление митогенной реактивности на поликлональный активатор конконовалин А (таблица 3).

Клинически у пациентов с рецидивирующим генитальным герпесом в среднем отмечалось урежение рецидивов с $14,7 \pm 2,4$ (от 10 до 25 исходно в течение года до обращения) до $1,5 \pm 0,34$ (от 0 до 2 рецидивов) на фоне терапии (в течение 3 месяцев). Течение обострения характеризовалось значительным уменьшением площади поражения. У части пациентов – abortивное течение (безпузырьковая форма) с быстрым (в течение 2 дней) купированием симптомов.

Таблица 3 – Динамика пролиферативного ответа МНК больных (имп/мин) на HSV2gD антиген и КонА у больных генитальным герпесом

	Пролиферативная активность (имп/мин)				
	МНК (0)	МНК(АГ)	ИВ _{АГ}	МНК (КонА)	ИВ _{КонА}
До лечения (n=6)	186,3±29,6	194,5±31,3	1,1±0,3	13284±1882	73,6±10,8
	174,3	180,5	0,99	14650	66,4
	98-215	115-270	0,78-1,4	12400-16200	56,8-80,0
После лечения (n=6)	230,3±22,9	619,558,9*	2,82±0,39*	31315±3389*	134,9±17,5*
	214	608	2,8	29400	127,5
	184-249	586-715	1,85-3,8	27400-37500	117-150

Примечание: данные представлены в виде средних ($M \pm SE$) и медианных значений, а также интерквартильного диапазона (LQ-UQ) пролиферативного ответа МНК больных герпесвирусной инфекцией в отсутствие (МНК0) и в присутствии МНК(АГ+) и МНК(КонА). ИВ_{АГ} – индекс влияния антигена, отношение МНК(АГ+) к МНК(0); ИВ_{КонА} – отношение МНК(КонА+) к МНК(0). * – достоверность различий, $p_U < 0,05$, u -критерий Вилкоксона-Манна-Уитни.

Таким образом, проведение иммунотерапии не вызывает выраженных побочных/токсических реакций, хорошо переносится пациентами и позволяет достичь нарастания антигенспецифического иммунного ответа, что сопровождается клиническим улучшением в виде уменьшения числа рецидивов.

Отдельно была проанализирована группа пациентов, которым иммунотерапия была проведена в полном объеме, состоящем из 2-х курсов вакцинаций. Эту группу составили 7 женщин (средний возраст – 29,7±3,5 лет) с орофациальной локализацией герпетической инфекции, длительность заболевания у которых составляла в среднем 14,3±1,3 года, а количество обострений – 11,9±0,96 в год.

При анализе клинической эффективности было показано достоверное уменьшение числа обострений на фоне лечения (4,0±0,7 против 5,93±0,48 эпизодов до лечения; $p_U < 0,05$) и в течение последующих 6 месяцев наблюдения (2,4±0,97; $p_U < 0,05$). Соответственно, межрецидивный период на фоне терапии возрос до 81,6±13,8 дней, и в период 6 мес. наблюдения после

терапии составил $67,1 \pm 16,2$ дня, что было достоверно выше соответствующего показателя до лечения ($18,7 \pm 3,2$; $p_U < 0,05$) (рисунок 1).

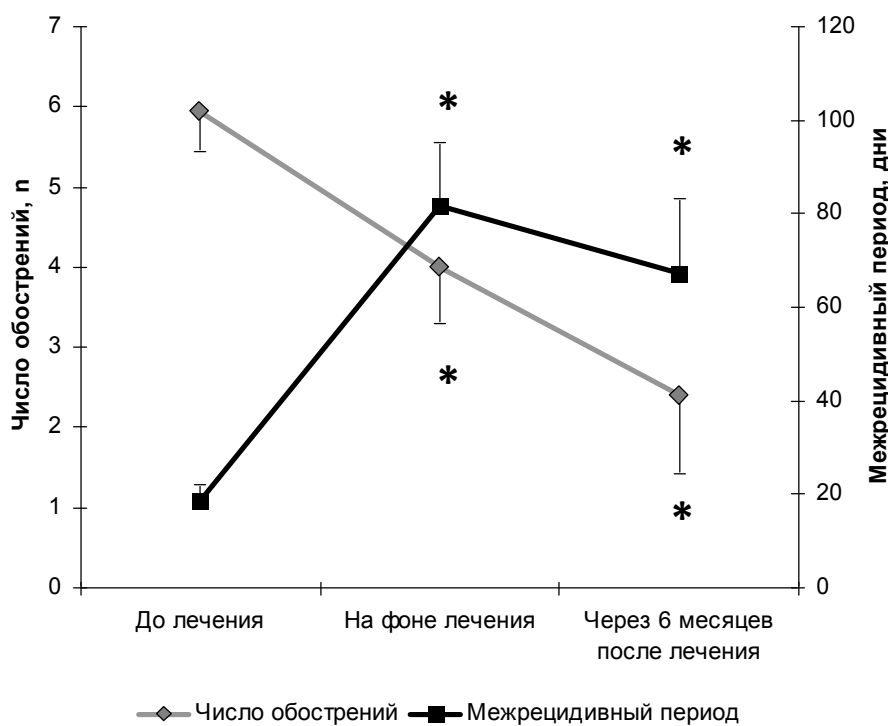


Рисунок 1 – Клиническая эффективность специфической иммунотерапии. Звездочкой (*) отмечены достоверные различия по сравнению с показателями до лечения, $p_U < 0,05$, u -критерий Вилкоксона-Манна-Уитни.

При этом у 3 пациентов в период 6-месячного наблюдения не было зарегистрировано ни одного обострения, а у 4-х, имевших рецидивы, обострения протекали более мягко с меньшей площадью высыпаний и умеренной интоксикацией. Исследование антигенспецифического и митоген-индуцированного пролиферативного ответа в культурах МНК больных показало, что исходно исследуемые пациенты характеризовались сниженным уровнем Кон-А стимулированной пролиферации (12314 ± 1840 против 49240 ± 990 имп/мин у здоровых доноров, $p_U < 0,05$) и отсутствием реактивности на стимуляцию вирусным антигеном. Так, медианное значение индекса стимуляции в антиген-стимулированных культурах МНК составляло 0,98. После первого курса иммунотерапии (через 3 месяца от начала лечения) ИВ_{АГ} возрастал в среднем в 5 раз (таблица 4), что свидетельствовало о

появлении антигенной реактивности МНК. При этом интенсивность ответа на стимуляцию митогеном оставалась низкой. По завершении второго курса (через 12 месяцев после начала терапии) интенсивность антигенспецифического ответа оставалась на достаточно высоком уровне, хотя отмечалась тенденция к незначительному ослаблению антигенного ответа. При этом отмечалось 2-кратное возрастание митогенной реактивности, которая достигала нижнего уровня нормативного диапазона у доноров (24000 имп/мин). Через 6 месяцев наблюдения после завершения второго курса терапии интенсивность антигенспецифического ответа у больных сохранялась на высоком уровне и соответствовала уровню ответа после первого курса иммунотерапии. Кроме того, отмечалось дальнейшее возрастание митоген-индуцированного ответа до среднего уровня митогенной реактивности у здоровых доноров (59240 ± 3990 имп/мин).

Таблица 4 – Динамика пролиферативного ответа МНК больных (имп/мин) на HSV1gD антиген и КонА

	Пролиферативная активность (имп/мин)		
	МНК(0)	МНК(АГ+)	МНК(КонА+)
До лечения	198±44	208,1±44 (1,1±0,23)	12314±1840 (58,4±8,9)
После 1 курса иммунотерапии	167±45	932,0±280* (5,2±2,3)	16444 ±2861 (112±24,6)
После 2 курса иммунотерапии	150 ±27	598±222* (3,8±1,6)	25979 ±4453* (186±36)
Через 6 месяцев после иммунотерапии	208±43	1196 ±552* (5,4±2,8)	64450±18050* (306±59)

Примечание: данные представлены в виде средних значений пролиферативного ответа ($M \pm SE$) МНК больных герпесвирусной инфекцией в отсутствие (МНК0) и в присутствии МНК(АГ+). В скобках приведен индекс влияния: $ИВ_{АГ}$ – отношение МНК(АГ+) к МНК(0), $ИВ_{Кон-А}$ – отношение МНК(КонА+) к МНК(0). * – достоверность различий, $p_U < 0,05$, u-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни.

Таким образом, проведение иммунотерапии сопровождалось достоверным усилением антигенспецифического ответа, который сохранялся

повышенным до 6 месяцев после завершения терапии (таблица 4). Кроме того, у больных отмечалось значимое усиление исходно сниженной пролиферативной активности МНК на поликлональный митоген конканавалин А.

Согласно данным литературы, стандартная противовирусная терапия не всегда позволяет избежать рецидива заболевания и добиться нормализации иммунологических показателей у данной категории пациентов. В связи с этим разработка новых подходов к терапии, направленных на активацию специфического иммунного ответа, является важным компонентом комплексного лечения герпесвирусной инфекции. Судя по полученным данным, специфическая иммунотерапия на основе ДК позволяет уменьшить число рецидивов и соответственно увеличить продолжительность безрецидивного периода, выраженность их проявлений, что сопряжено с активацией специфического и неспецифического иммунного ответа. Таким образом, интерферон- α -индуцированные ДК, нагруженные HSV1gD антигеном, могут быть перспективными кандидатами при проведении специфической иммунотерапии.

Клинические примеры.

Пример 1. Пациентка З., 24 г., история болезни № 684, наблюдалась в отделении иммунологии клиники иммунопатологии НИИКИ СО РАМН с 15 мая 2008 г. по 07 сентября 2009 г. При поступлении в отделение предъявляла жалобы на рецидивирующие пузырьковые высыпания на красной кайме губ (с частотой 1 раз в месяц), повышение температуры тела до субфебрильных значений ($37,2-37,3^{\circ}\text{C}$), преимущественно во второй половине дня, повышенную утомляемость, слабость, сниженную работоспособность.

По данным анамнеза, считает себя больной около 17 лет. Герпетические высыпания рецидивировали более 5 раз в год, для местного лечения использовались противовирусные препараты. В течение трех лет перед обращением частота рецидивов увеличилась до ежемесячных

обострений и составила 12 раз/год. В то же время отмечалось постепенное усиление клинических проявлений в виде увеличения площади поражения, появления симптомов общей интоксикации, субфебрилитета как в период обострения, так и в межрецидивный период. Рецидивы провоцировались переохлаждением и/или острыми респираторными инфекциями. В лечении применяла системные и местные противовирусные препараты с кратковременным неполным эффектом.

Для генерации дендритных клеток 15.05.2008 была проведена гемоэксфузия периферической крови в объеме 200 мл. После 3-суточного культивирования прилипающей фракции мононуклеарных клеток в присутствии GM-CSF (40 нг/мл) и интерферона-альфа (1000 Ед/мл) с последующим дозреванием в течение 24 ч в присутствии полиоксидония (2 нг/мл), полученные ДК нагружали («пульсировали») рекомбинантным антигеном вируса герпеса (HSV1gD в дозе 5 мкг/мл, 1 час при 37⁰С). Полученные антиген-специфические ИФН-ДК криоконсервировали при – 80⁰С в растворе 10% DMSO и 90% альбумина аликвотами по 5x10⁶ клеток для последующего использования. «Индукторный» курс ДК-вакцинаций состоял из 4 подкожных инъекций клеток с интервалом 11-14 дней (21.05.08; 02.06.08; 16.06.08 и 27.06.08). ДК вводили подкожно в верхнюю треть плеча в 4 точки в количестве 1,25x10⁶ ИФН-ДК в каждую точку. В качестве адьюванта использовали рекомбинантный интерлейкин-2 человека (Ронколейкин) в дозе 0,25 мг, подкожно. На фоне проводимого курса обострений не отмечалось. Второй курс иммунотерапии был начат 10.09.2008 г. Была выполнена повторная гемоэксфузия венозной крови объемом 200 мл, и из фракции адгезивных клеток генерированы ИФН-ДК, нагруженные рекомбинантным антигеном вируса герпеса (как описано ранее). Было проведено пять ДК-вакцинаций с интервалом 2-4 недели (15.09.08; 13.10.08; 27.10.08; 10.11.08 и 24.11.08). Проведение специфической иммунотерапии характеризовалось хорошей переносимостью, не вызывало местных и системных аллергических или воспалительных реакций.

На фоне проведения второго курса иммунотерапии было отмечено два обострения лабиального герпеса (после 1-ой и 2-ой вакцинации), но при этом пациентка субъективно отмечала уменьшение площади поражения до 1-2 пузырьков, с быстрым самостоятельным регрессом. По данным катамнеза, первый рецидив после окончания специфической иммунотерапии отмечался в сентябре 2009 года, то есть через 9 месяцев после окончания лечения. При этом больная также отмечала значительно меньшую площадь герпетических высыпаний по сравнению с исходным уровнем.

С целью оценки эффективности индукции/поддержания антиген-специфического иммунного ответа у больной исследовали уровень пролиферативного ответа МНК на стимуляцию вакцинальным антигеном (HSV1gD, 5 мкг/мл) и митогеном (конканавалином А, 15 мкг/мл). До начала иммунотерапии (15.05.2008 г) регистрировалось: низкая митогенная реактивность Т-клеток (8326 имп/мин против 59240 ± 3990 имп/мин у здоровых доноров) и отсутствие пролиферативного ответа на антиген (216 имп/мин; $ИВ_{АГ}=1,1$ расч. ед.). После первого и второго курса ДК-вакцинаций (10.09 и 01.12.2008 г, т.е. через 3 и 6 месяцев от начала лечения) было отмечено постепенное повышение уровня Кон-А-стимулированной пролиферации до 23651 и 27500 имп/мин, соответственно. Происходило также 1,5-2-кратное усиление антиген-специфического ответа ($ИВ_{АГ}=1,5$ и 2,0 расч. ед.). Через 6 месяцев после завершения поддерживающего курса (12.05.2009 г, т.е. через год от начала лечения) митогенная реактивность Т-клеток полностью восстановилась (46400 имп/мин), а интенсивность антиген-специфического ответа составляла 796 имп/мин ($ИВ_{АГ}=4,4$ расч. ед.).

Таким образом, активация антиген-специфического противовирусного иммунного ответа и восстановление функциональной реактивности Т-клеток, которые достигаются путем курсового лечения в виде подкожных вакцинаций аутологичных ИФН-ДК, нагруженных рекомбинантным антигеном вируса герпеса HSV1gD и HSV2gD, в сочетании с препаратом рИЛ-2 в качестве адьюванта, позволяет уменьшить число обострений и

выраженность их клинических проявлений у больных с хронической часто рецидивирующей герпесвирусной инфекцией.

Пример 2. Пациентка Ф., 25 лет, история болезни № 1209, наблюдается в отделении иммунологии с 19 сентября 2011 г. по настоящее время.

При поступлении в отделение предъявляла жалобы на рецидивирующие пузырьковые высыпания, жжение, зуд, трещины слизистой наружных половых органов (половые губы), также учащение и рези при мочеиспускании.

Из анамнеза заболевания известно, что считает себя больной с марта 2008. В течение полугода – ежемесячно пузырьки. В тот период времени проведена ПЦР-диагностика, выявлен ВПГ. Проводилась терапия препаратами интерферона, витамины группы В (В6,В12), противовирусная терапия (Ацикловир, Валтрекс). В иммунотерапии – полиоксидоний, виферон, ридостин. После терапии частота обострений не изменилась (ежемесячные обострения), но клинические проявления – урежения пузырьковой формы до 1 раза в два месяца, ежемесячно – жжение, зуд, болезненность и трещины слизистой. Отмечает хороший, но кратковременный клинический эффект на прием противовирусных препаратов (Ацикловир). Перед обращением обострение зафиксировано в середине августа 2011 года. Общее количество обострений – 11-12 за прошедший год.

В лечении применяла системные и местные противовирусные препараты с кратковременным неполным эффектом. Учитывая соответствие пациентки критериям включения/исключения, она была включена в клиническое исследование.

Для генерации дендритных клеток 19.09.2011 была проведена эксфузия периферической крови в количестве 200 мл. После трехдневного культивирования прилипающей фракции моноклеарных клеток в присутствии GM-CSF 40 нг/мл и INF- α 1000 ЕД/мл с последующим созреванием в течение 24 ч в присутствии полиоксидония 2 нг/мл,

полученные ДК нагружали специфическим рекомбинантным антигеном HSV1gD и HSV2gD в дозе 5 мкг/мл и криоконсервировали по 5×10^6 клеток для последующего использования. Иницирующий курс составил 5 инъекции с интервалом 14 дней (28.09.11; 13.10.11; 27.10.11; 14.11.11 и 28.11.11). ДК вводились подкожно в верхнюю треть бедра в 4 точки в количестве около $1,25 \times 10^6$ клеток в каждую точку. В качестве адъюванта применялся рекомбинантный интерлейкин-2 (Ронколейкин) в дозе 250 000 Ед подкожно в две точки по 125 000 Ед в каждую. На фоне проводимого курса обострений не отмечалось. Проведение специфической иммунотерапии характеризовалось хорошей переносимостью, вызывало местную гиперемию и формирование инфильтрации до 2 см, не требующее назначения дополнительных препаратов и купирующееся самостоятельно в течение 3 дней после инъекции, также отмечалась местная болезненность при введении адъюванта (Ронколейкин). Системных аллергических и воспалительных реакций не отмечалось.

Исходный уровень антиген-специфического и митоген-индуцированного пролиферативного ответа оценивали до начала специфической иммунотерапии (19.09.11). При этом отмечался сниженный уровень Кон-А стимулированной пролиферации (16800 имп/мин) и антиген-специфического ответа (320 имп/мин.). Индекс стимуляции в антиген-стимулированных культурах МНК составил 1,5 расч. ед. После курса ДК-вакцинаций (через 3 месяца от начала лечения) отмечалось нарастания индекса влияния антигена и составило 5,0 расч. ед. (1235 имп/мин), при этом выявлялось повышение уровня и Кон-А стимулированной пролиферации в 2,2 раза по сравнению с исходной.

2.2 Формирование отчетной документации по лечению хронической рецидивирующей герпетической инфекции

2.2.1 Протокол клинических испытаний «Оценка безопасности и эффективности специфической иммунотерапии в лечении больных рецидивирующей герпетической инфекцией»

Дизайн исследования

Проспективные контролируемые пилотные исследования

Цель исследования

Оценка переносимости, безопасности и эффективности иммунотерапии с использованием дендритных клеток у больных рецидивирующей герпетической инфекцией.

Препараты, дозы и путь введения

Лечение состоит из двух курсов антигенспецифической терапии. Первый курс включает 4-6 подкожных инъекций ИФН-ДК, нагруженных рекомбинантными антигенами вируса герпеса (HSV1gD и HSV2gD) с 2-недельным интервалом. Второй курс – 3-6 вакцинаций с кратностью 1 раз в месяц. На предварительном этапе проводят генерацию ИФН-ДК из фракции прилипающих к пластику МНК крови, нагружают ДК антигеном и криоконсервируют. В дальнейшем проводят иммунизацию по разработанной схеме.

Изучение эффективности

Основной критерий эффективности – развитие антигенспецифического иммунного ответа после первого курса иммунотерапии.

Дополнительные критерии – сохранение антигенспецифического иммунного ответа через 6 месяцев после завершения иммунотерапии, увеличение межрецидивного периода после первого и второго курса лечения

Контингент больных

Основной диагноз – рецидивирующая герпетическая инфекция, herpes labialis (обострения более 6 раз в год) et genitalis (обострения более 4 раз в год).

Количество больных

20 человек

Критерии включения

- Возраст от 18 до 60 лет включительно
- Резистентное течение заболевания при использовании стандартных методов терапии
- Отказ от проведения стандартной терапии вследствие развития осложнений или отсутствия финансовых возможностей проведения таковой
- Пациенты в период ремиссии (минимум 2 недели после последнего рецидива).

Критерии исключения

- Одновременное участие в другом клиническом исследовании
- Несоответствие критериям включения
- Выраженная хроническая декомпенсированная сердечно-сосудистая, дыхательная, печеночная, почечная недостаточность
- Декомпенсированный сахарный диабет
- Злокачественные заболевания и болезни крови
- Психические нарушения
- Беременность

Выполнение исследования

Оценка до лечения

Проводится сбор анамнестических данных, общий анализ крови, иммунный статус, маркеры герпесной инфекции, при генитальном герпесе – подтверждение диагноза методом ПЦР.

Схема лечения

I этап. Генерация ИФН-ДК из прилипающей фракции МНК периферической крови и нагрузка антигеном.

II этап. Криоконсервация ДК.

III этап. Иммунизация ДК, нагруженными рекомбинантными антигенами вируса герпеса.

Количество ДК на 1 вакцинацию не менее 5×10^6 . При проведении вакцинаций в качестве адьюванта будет использоваться п/к введение Ронколейкина в дозе 250 тыс. Ед.

Кратность вакцинаций – первый курс – 1 раз в 2 недели, 4-6 вакцинаций; второй курс – 1 раз в 4 недели, 3-6 вакцинаций.

Оценка после лечения

Оценка лечения проводится после первого (через 2-3 месяца) и второго (6-9 месяцев) курса лечения и включает клиническое наблюдение за пациентом, оценку общего анализа крови, иммунологическое обследование.

Сочетанная терапия

Симптоматическая терапия в полном объеме. Не допускается использование цитокин-содержащих препаратов или их индукторов в ходе всего исследования (интерфероны, колониестимулирующие ростовые факторы, беталейкин и т.д.) и противовирусных препаратов.

Прекращение лечения

Лечение прекращается в следующих случаях:

- Завершение исследования согласно протоколу.
- Появление признаков прогрессии заболевания
- Отказ пациента или его ближайших родственников от проведения лечения

К протоколу прилагаются: информированное согласие (приложение №1) и регистрационная карта (приложение №2).

2.2.2 Информированное согласие

ИНФОРМИРОВАННОЕ СОГЛАСИЕ

Вы страдаете рецидивирующей герпетической инфекцией. Этим подписанным Вами документом Вы даете согласие на проведение специфической иммунотерапии с использованием дендритных клеток.

ОБЪЯСНЕНИЕ:

Цель терапии – использование профессиональных антигенпрезентирующих дендритных клеток (ДК) для усиления иммунного ответа и элиминации патологического агента. Для достижения этой цели используется ДК-вакцина, полученная путем генерации *in vitro* аутологичных дендритных клеток, меченых в последующем специфическим антигеном.

ОПИСАНИЕ ПРОЦЕДУРЫ:

Для проведения специфической иммунотерапии забирается 100-150 мл крови пациента, выделяют антигенпрезентирующие клетки и активируют их вирусным антигеном, после чего вводят пациенту в виде подкожных инъекций. Через 5-7 суток начинается вакцинация с интервалом 2 недели 4-6 процедур (устанавливается индивидуально) с поддерживающим курсом (3-6) ревакцинаций 1 раз в месяц. Клетки вводятся подкожно или внутривожно в область дельтовидной мышцы (или в подлопаточную область) в 3-4 точки.

РИСК:

Данный метод лечения является новым и цель проводимых исследований – оценить переносимость и клиническую эффективность и возможные побочные эффекты терапии. В течение первых 24-48 ч после вакцинации возможно повышение температуры тела до 37-38⁰С, покраснение в месте инъекции, слабость, головокружение. При проведении инвазивных манипуляций не исключается риск хирургических осложнений. Поскольку данный метод лечения является новым, перечислить все его вероятные осложнения не представляется возможным. Ответственность за следование врачебным рекомендациям и за своевременное сообщение об осложнениях лечащему врачу лежит на самом пациенте.

КЛИНИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ:

Результатом проводимого лечения может быть удлинение межрецидивного периода. Такой результат, однако, не может быть гарантирован, заболевание может прогрессировать, несмотря на проводимое лечение.

ПОДТВЕРЖДЕНИЕ СОГЛАСИЯ:

Так как практическая медицина не является точной наукой, никто не давал мне никаких гарантий, письменных или устных, в отношении благополучного исхода моего заболевания. Мой врач _____ и его коллеги, обсудили со мной все интересующие меня аспекты лечения. Я получил(а) удовлетворившие меня ответы на все заданные мной вопросы. Я разрешаю моему лечащему врачу и медицинскому персоналу Института клинической иммунологии СО РАМН проводить мне вышеуказанное лечение и выполнять необходимые для этого медицинские манипуляции. Я знаю, что имею право прервать лечение в любое время. Я имею повышенную чувствительность к следующим препаратам _____, о чем сообщил(а) лечащему врачу.

Я удостоверяю, что текст данного информированного согласия мною внимательно прочитан, мне понятно назначение данного документа, и независимо от исхода заболевания, я не буду иметь претензий к учреждению, в котором проводилось вышеуказанное лечение.

Дата _____ Время _____

Подпись пациента и ее расшифровка _____

Адрес _____ телефон _____

Если пациент не может подписать документ, следует указать причину _____ В этом случае подпись ставит ответственное лицо (близкий родственник или супруг)

2.2.3 Регистрационная карта

<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		КАРТА ДИНАМИЧЕСКОГО НАБЛЮДЕНИЯ БОЛЬНЫХ <u>ГЕРПЕСОМ</u>		Дата заведения карты <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> / <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> / 200 <input type="checkbox"/>		Критерии включения: <input type="checkbox"/> возраст от 18 до 60 лет включительно <input type="checkbox"/> согласие на участие <input type="checkbox"/> подписание информированного согласия <input type="checkbox"/> длительность анамнеза не менее 2 лет <input type="checkbox"/> частота рецидивов не менее 4 раз в год <input type="checkbox"/> резистентное течение заболевания при использовании стандартных методов терапии	
Ф.И.О			Пол: М <input type="checkbox"/> Ж <input type="checkbox"/>			Критерии исключения <input type="checkbox"/> Одновременное участие в другом клиническом исследовании <input type="checkbox"/> Несоответствие критериям включения <input type="checkbox"/> Выраженная хроническая декомпенсированная сердечно-сосудистая, дыхательная, печеночная, почечная недостаточность <input type="checkbox"/> Декомпенсированный сахарный диабет <input type="checkbox"/> Злокачественные заболевания и болезни крови <input type="checkbox"/> Психические нарушения <input type="checkbox"/> Беременность	
Возраст: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> лет Дата рождения: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> / <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> / 19 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Постоянное место жительства: Индекс: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> г. ул. д. <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> кв Рост <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> см Вес <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> кг Индекс массы тела (вес /рост в м ²)		код города <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> дом. тел <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> раб. Тел <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> сотовый 8 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> e-mail: ICQ # <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		- facialis <input type="checkbox"/> genitalis <input type="checkbox"/> другое <input type="checkbox"/> (_____) -Частота рецидивов в год <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> -Длительность обострений <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> дней -Межрецидивный период <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> дней/мес. -Связь с ОРВИ да <input type="checkbox"/> нет <input type="checkbox"/> - Связь со стрессом да <input type="checkbox"/> нет <input type="checkbox"/>		Факторы риска: -курение да <input type="checkbox"/> нет <input type="checkbox"/> -злоупотр. алкоголем да <input type="checkbox"/> нет <input type="checkbox"/> -перегревание да <input type="checkbox"/> нет <input type="checkbox"/> -переохлаждение да <input type="checkbox"/> нет <input type="checkbox"/> -Эндокринопатия да <input type="checkbox"/> нет <input type="checkbox"/> -очаги хр. инфекций да <input type="checkbox"/> нет <input type="checkbox"/> -нарушение нейрогенной регуляции да <input type="checkbox"/> нет <input type="checkbox"/> - хронический стресс да <input type="checkbox"/> нет <input type="checkbox"/>	
		Диагноз выставлен в <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> г Давность заболевания на момент заведения карты: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> лет/мес		Предлеченность: <i>Противовирусная терапия:</i> да <input type="checkbox"/> нет <input type="checkbox"/> (_____) Доза: _____ Эффективность _____ <i>Индукторы IFN:</i> да <input type="checkbox"/> нет <input type="checkbox"/> (_____) Доза: _____ Эффективность _____ <i>IFN:</i> да <input type="checkbox"/> ; нет <input type="checkbox"/> (_____) Доза: _____ Эффективность _____ <i>Другое:</i> (_____) Доза: _____ Эффективность _____			

лабораторные данные		До лечения	После 1 к вакцина ции _/_/200_ _/_/200_	После <input type="checkbox"/> инъекции поддерж. курса _/_/200_ _/_/200_	После поддерж. курса с _/_/200_ по _/_/200_	Через 6 месяцев после окончания лечения
ОАК	Гемоглобин	г/л				
	Эритроциты	$\cdot 10^{12}/л$				
	Лейкоциты	$\cdot 10^9/л$				
	Тромбоциты	$\cdot 10^9/л$				
	Лимфоциты	%				
	СОЭ	мм/ч				
1. Глюкоза						
2. Фибриноген		г/л				
3. СРБ		отр, мг/л				
4. Общий белок		г/л				
4. АЛТ		мМоль/л				
5. АСТ		мМоль/л				
6. Холестерин		мМоль/л				
Серологические маркеры и ПЦР						
ДНК вируса герпеса 1 (сыв)						
ДНК вируса герпеса 2 (сыв)						
ДНК вируса герпеса 1+2(сыв)						
ДНК вируса герпеса 1 (местн)						
ДНК вируса герпеса 2						

(местн)					
ДНКвируса герпеса1+2 (местн)					
HSV IgM+IgG(1.2)					
HSV IgM (1.2)					
HSV IgG (1.2)					
Авидность+ HSVIgG					
Л-з					
CD3+					
CD4+					
CD8+					
ИРИ					
CD19+					
ЕАф-з(гр)					
ЕАф-з(мон)					
ИМ фга					
ИИМ фга					
ПЭФ фга					
Ig M					
IgA					
IgG					
ЦИК					
К					
ПАМ					
ПАН					
Диагноз					
Антигенный ответ:	1(●)	2(●)		3(●)	
МНК (0) (имп./мин) МНК					

Ответ на АГ (имп./мин)	МНК					
Ответ на Кона.	МНК					
Индекс влияния АГ						

клинико-anamнестические данные	До лечения	После 1к вакцинации --/--/200-- --/--/200--	После <input type="checkbox"/> инъекции поддерж. курса --/--/200--	После поддерж. курса с --/--/200-- по --/--/200--	Через 6 месяцев после окончан ия лечения	Через 1 год после окончан ия лечения	Через 2 года после окончан ия лечения	Через 3 года после окончан ия лечения
Число рецидивов 0. 4-5 1. 5-6 2. 6-7 3. более 7	в год							
Локализация 1. facialis 2. genitallis 3. zoster 4. другое								
Лихорадка во время обострения 0. нет 1. 36.6- 37.6 2. 37.7-37.9 3. более 38								
Лихорадка в межрецидивный период 1. нет 2. 36.6- 37.6 3. 37.7-37.9 4. более 38								
Частота 0- никогда								

	1- несколько раз в день 2- 1 раз в день 3- несколько раз в неделю 4- несколько раз в месяц								
	Слабость по ВАШ от 0 до 10								
	Раздражительность 0- нет; 1- есть								
	Утомляемость 0- нет, 1- при чрезмерных физических нагрузках, 2- при привычных нагрузках 3- при минимальных физических нагрузках, 4- практически при полном покое								
Нарушение сна	0- нет 1- сонливость днем 2- засыпает хорошо, но рано просыпается 3- засыпает плохо 4- плохой сон в течение всей ночи 5- после сна чувствует себя неотдохновшими								
Головные боли	1. есть 2. нет								
Зуд в месте высыпаний	1. есть 2. нет								

Зуд по ВАШ	От 0 до 10								
Боль в месте высыпаний	0- нет 1- не постоянно 2- постоянно								
Интенсивность боли по ВАШ	от 0 до 10								

2.2.4 Стандарты операционных процедур (SOPs)

Получение дендритноклеточных вакцин

ДК генерируют из моноцитов периферической крови больного. Процедуру гемоэкспузии проводят в утренние часы. Для этого, в стерильный флакон, содержащий раствор гепарина (10 000 Ед), забирают 200 мл венозной крови больного, добавляют 40 мл раствора желатиноля и инкубируют 45 мин при 37⁰С. Собранную лейкоцвесь собирают в отдельный флакон, центрифугируют при 1000 об/мин 20 мин. Содержащуюся в надосадке аутоплазму собирают для последующего использования. Осажденные клетки лейкоцвеси однократно отмывают фосфат-забуференным физиологическим раствором (PBS), наслаивают на градиент плотности фиколла-верографина и центрифугируют в течение 20 мин при 3000 об/мин. Собранные из интерфазы МНК двукратно отмывают, и ресуспендируют в культуральной среде RPMI-1640, дополненной 5% аутоплазмы, 5мМ HEPES-буфера и гентамицином в дозе 80 Ед/мл. Затем, выделенные МНК в концентрации 3x10⁶/мл инкубируют в течение 2 ч при 37⁰С в стерильных флаконах площадью 75 или 150 см² (Falcon). Фракцию неприкрепившихся к пластику клеток удаляют. Для получения незрелых ДК к оставшимся во флаконе прикрепившимся клеткам моноцитарно-макрофагального ряда (80-90% CD14+моноцитов) добавляют полную культуральную среду, дополненную 1,5% аутоплазмы, 40 нг/мл ГМ-КСФ (Sigma-Aldrich) и 1000 Ед/мл ИФН-альфа (Роферон-А, Roche, Швейцария) и культивируют в течение 3 суток при 37⁰ в СО₂-инкубаторе при 5% СО₂. Конечное созревание незрелых ИФН-ДК проводят в течение дополнительных 24 ч в присутствии фармакопейного препарата полиоксидония (НПО ПетроваксФарм, Москва) в дозе 2 нг/мл. Полученные в результате зрелые ИФН-ДК нагружают (пульсируют) специфическим рекомбинантным антигеном вируса герпеса – HSV1gD (НПО «Диагностические системы», Нижний Новгород) в дозе 5 мкг/мл во время часовой инкубации при 37⁰С. Таким образом, общее время получения ИФН-ДК, нагруженных

специфическим вирусным антигеном, составляет 4 суток. Затем ИФН-ДК криоконсервируют в растворе 10% DMSO и 90% альбумина в концентрации $6,0 \times 10^6$ /мл и хранят при -80°C до последующего использования.

Проведение вакцинотерапии

Госпитализация больного осуществляется в период ремиссии (как минимум через 2 недели после последнего рецидива). Показанием для проведения специфической иммунотерапии является наличие хронической герпесвирусной инфекции, резистентной к противовирусным препаратам и с частотой обострения более 6 раз в год.

Специфическую иммунотерапию проводят в виде 2 курсов ДК-вакцинаций. Первый «индукторный» курс включает 4-6 подкожных инъекций ИФН-ДК в дозе 5×10^6 клеток с 2-недельным интервалом. Через 3 месяца после завершения первого курса проводят второй «поддерживающий» курс ДК-вакцинаций в виде 3-6 подкожных инъекций ИФН-ДК в дозе 5×10^6 клеток с кратностью 1 раз в месяц. Обязательным условием при проведении ДК-вакцинаций является использование в качестве адьюванта фармакопейного препарата рекомбинантного интерлейкина-2 человека (рИЛ-2, Ронколейкин[®], ООО «Биотех», Санкт-Петербург), который также вводят подкожно в дозе 0,25 мг. Использование рИЛ-2 в качестве адьюванта может значительно усилить антиген-специфический Т-клеточный ответ при проведении ДК-вакцинаций за счет преодоления состояния анергии Т-клеток, предотвращения апоптоза Т-клеток, генерации Т-клеток-памяти, в том числе длительно живущих цитотоксических Т-лимфоцитов.

Оценка антиген-специфического иммунного ответа

Для оценки эффективности индукции/поддержания антиген-специфического иммунного ответа у больных исследуют уровень пролиферативного ответа МНК на стимуляцию вакцинальным антигеном (HSV1gD) и митогеном (конканавалином А). Исследования проводят до начала терапии, после завершения 1-го и 2-го курса ДК-вакцинаций, а также через 6 месяцев после завершения лечения (в среднем через 15 месяцев после

начала лечения). Для этого, из 10 мл гепаринизированной венозной крови больных выделяют МНК центрифугированием в градиенте плотности фиколла-верографина (как было описано ранее). МНК в концентрации $0,1 \times 10^6$ /лунку культивируют при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂, в 96-луночных круглодонных планшетах для иммунологических исследований в полной культуральной среде, содержащей RPMI-1640, дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 5 мМ HEPES-буфера, 80 мкг/мл гентамицина и 10% инактивированной сыворотки доноров АВ(IV) группы. Для стимуляции клеток используют конкановалин А (КонА, Sigma) в дозе 15 мкг/мл и специфический рекомбинантный антиген вируса герпеса – HSV1gD в дозе 5 мкг/мл. Интенсивность пролиферации оценивают через 72 ч по включению в нуклеопротеидные фракции клеток ³H-тимидина, вносимого за 18 ч до окончания культивирования в дозе 1 мкг/мл. Подсчет радиоактивности производят в жидкостном сцинтиляционном счетчике SL-30(Intertechnic, Франция). Результаты представляют в виде среднего счета (имп/мин) из трех идентичных культур.

2.3 Оценка переносимости и безопасности ДК-вакцин

При проведении исследований, подробно описанных в п. 2.1, в группе 19 пациентов хронической рецидивирующей герпесвирусной инфекцией была проведена оценка переносимости и безопасности ДК-вакцин.

Введение ДК-вакцины характеризовалось в целом удовлетворительной переносимостью. Системных побочных реакций в виде повышения температуры тела, аллергических и/или инфекционных осложнений не отмечалось. У 13 пациентов были зафиксированы местные вакцинальные реакции на введение ДК и адьюванта (Ронколейкин): болезненность разной степени выраженности, формирование папулы и гиперемия от 2 до 5 см в месте введения. Местные реакции не требовали назначения дополнительных препаратов и купировались самостоятельно в течение 2-3 дней.

2.4 Разработка программы внедрения результатов НИР в образовательный процесс

Результаты НИР внедрены в образовательный процесс. Полученная научная информация используется в виде разделов курса иммунологии, читающегося на кафедре иммунологии Новосибирского государственного медицинского университета, и курса клинической иммунологии, читающегося студентам 4 курса медицинского факультета Новосибирского государственного университета, а также в виде лекционного материала в обучении клинических ординаторов и аспирантов НИИ клинической иммунологии СО РАМН.

Таблица 5 – Внедрение результатов НИР в образовательный процесс.

	Форма внедрения	Тип внедрения	Место внедрения
1	Образовательная программа курса иммунологии, 10 акад. часов в год	Дополнение/изменение в курс в виде новых лекций по теме: «Перспективы технологии использования дендритных клеток в качестве вакцин»	Новосибирский государственный медицинский университет, кафедра иммунологии
2	Образовательная программа курса клинической иммунологии, 10 акад. часов в год	Дополнение/изменение в курс в виде новых лекций по теме: «Индивидуальные вакцины на основе дендритных клеток как перспективное направление в иммунотерапии»	Новосибирский государственный университет, медицинский факультет
3	Практические занятия, 12 акад. часов в год	Лекция и практические занятия на тему: «Методы иммунотерапии»	НИИКИ СО РАМН, клиническая ординатура

2.5 Оценка изменения цитокинового баланса в крови здоровых доноров при использовании в качестве индуктора препарата ДНК Панаген

Для оценки цитокинстимулирующего действия препарата двуцепочечной ДНК (препарат «Панаген») были использованы образцы периферической крови условно здоровых доноров. От каждого донора было получено письменное информированное согласие на забор крови и использование её для исследовательских целей.

Свежеотобранную в вакутейнеры периферическую венозную кровь в количестве 20 мл в стерильных условиях смешивали с 80 мл культуральной среды DMEM, содержащей гепарин (2,5 ед./мл), гентамицин (100 мкг/мл) и L-глутамин (0,6 мг/мл). Для проведения экспериментов по оценке спонтанной продукции цитокинов, 2 мл полученной разбавленной крови в стерильных условиях переносили во флаконы, после чего инкубировали при 37°C в течение разных промежутков времени (1, 3, 6, 24, 72, 168 часов). После этого клетки крови осаждали при 10000g в течение 3 мин, супернатант переносили в новую пробирку, замораживали и хранили при -70°C до проведения количественного анализа цитокинов.

Одновременно с экспериментами по спонтанной продукции проводили опыты по стимуляции продукции цитокинов одним из препаратов: Дезоксил – 1% раствор для инъекций (натриевая соль дезоксирибонуклеиновой кислоты), Ридостин – смесь натриевых солей двуспиральной рибонуклеиновой кислоты и одноцепочечной РНК, 8 мг/амп (ЗАО "Вектор-Медика", Кольцово, Новосибирск), Реаферон-ЕС – 3млн МЕ/амп, интерферон-альфа 2 рекомбинантный, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций (ЗАО "Вектор-Медика", Кольцово, Новосибирск), Панаген субстанция 5 мг/мл (ООО «Панаген») и Polyinosinic-polycytidylic acid potassium salt (Poly I:Poly C) – синтетический аналог двуспиральной РНК (Sigma). Для определения продукции цитокинов при стимуляции препаратами к 15 мл разбавленной крови в стерильных условиях добавляли один из препаратов до конечной концентрации 10 мкг/мл и тщательно перемешивали. Инкубацию и подготовку проб проводили так же, как и при анализе спонтанной продукции. Опыты по стимуляции продукции цитокинов комплексом митогенов (смесь ФГА, Con A, LPS по 4, 4 и 2 мкг/мл соответственно) проводили согласно инструкции из набора «ЦИТОКИН-СТИМУЛ-БЕСТ».

Концентрацию IFN- γ , IFN- α , TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-2, IL-17, VEGF, MCP и рецепторного антагониста IL-1 (IL-1RA) в исследуемых

образцах измеряли методом “sandwich”-варианта твердофазного иммуноферментного анализа. Для этого были использованы соответствующие наборы реагентов производства ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск).

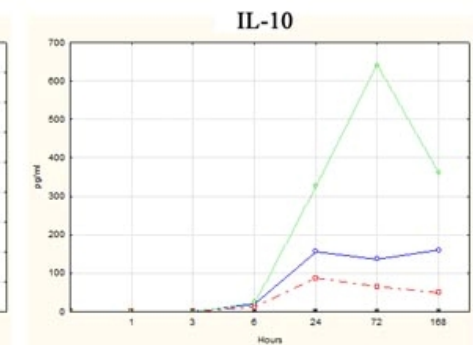
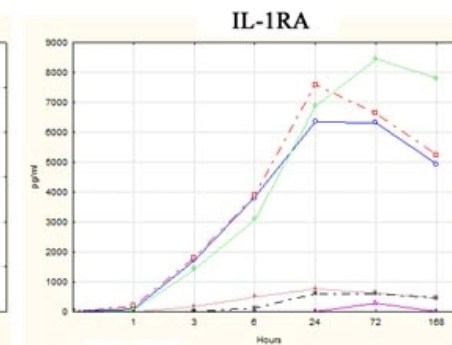
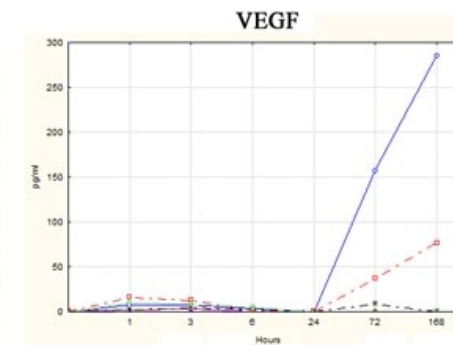
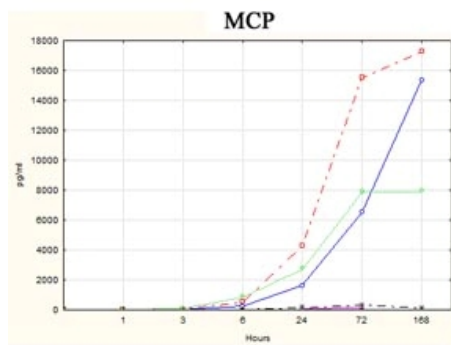
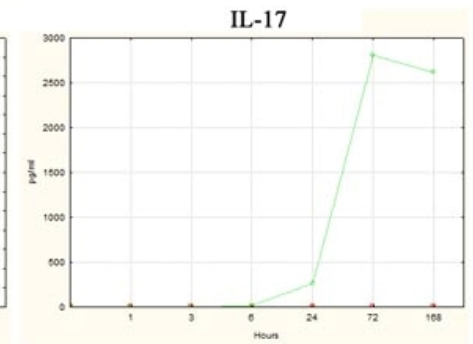
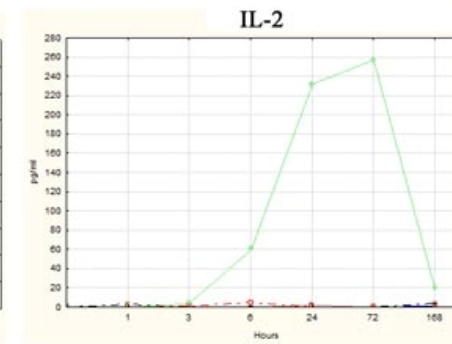
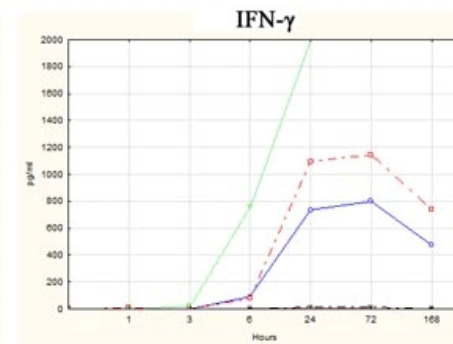
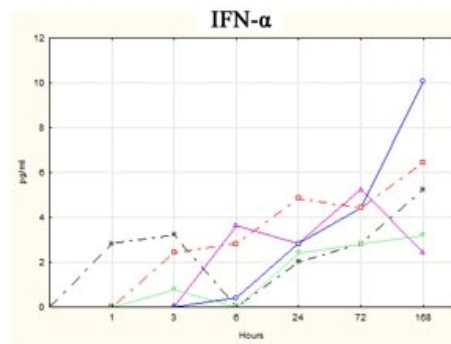
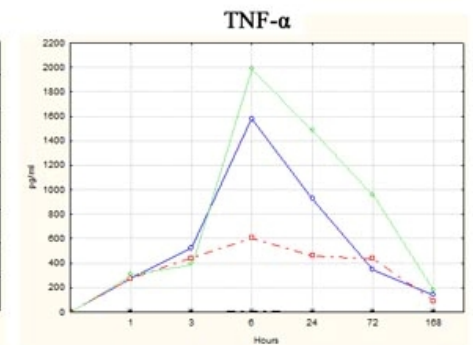
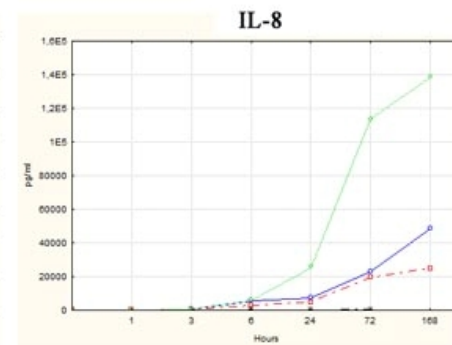
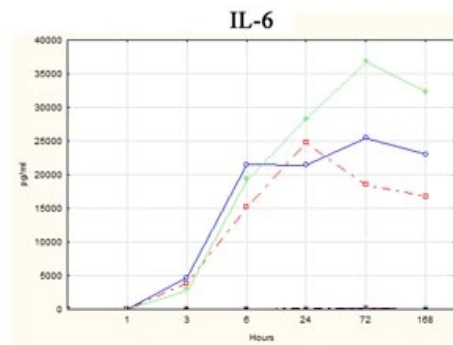
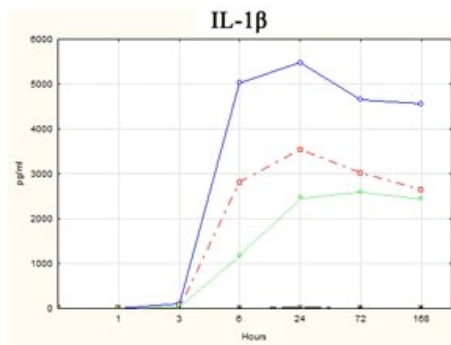
Статистическая обработка полученных результатов проводилась методами описательной, параметрической и непараметрической статистики на персональном компьютере с использованием программы «STATISTICA 6.0». Сравнение вариационных рядов осуществлялось с помощью непараметрического U критерия Вилкоксона-Манна-Уитни.

Была оценена динамика продукции 12 цитокинов мононуклеарными клетками крови индивидуального донора в зависимости от времени инкубации и активации клеток различными препаратами. При оценке сравнивались значения спонтанной продукции цитокинов, что позволяет оценить базовую иммунореактивность клеток крови в организме обследуемого донора, и индуцированной митогеном, или одним из препаратов – что демонстрирует потенциальную возможность к продукции цитокинов.

Исследование стимуляции различными препаратами целого ряда цитокинов клетками цельной крови одного добровольца показало, что препарат двуцепочечной ДНК стимулирует продукцию IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , IFN- α , IFN- γ , MCP, VEGF, IL-1RA и IL-10 (рисунок 2). Причем стимуляция этих цитокинов, за исключением VEGF, детектировалась уже через 6 часов инкубации. При сравнении уровней стимуляции продукции цитокинов препаратом дцДНК и комплексом митогенов было установлено, что препарат ДНК более эффективно стимулирует продукцию IL-1 β (от 1,8 до 4,3 раз в зависимости от времени инкубации), IFN- α (от 1,2 до 3,1 раз) и VEGF (стимуляция комплексом митогенов отсутствовала). Стимуляция продукции MCP и IL-1RA была примерно одинаковой как в случае митогена, так и в случае препарата дцДНК, а синтез IL-6, IL-8, TNF- α , IFN- γ и IL-10 более эффективно стимулирует комплекс митогенов.

Спектр цитокинов, продукцию которых стимулирует препарат Poly I:Poly C, полностью совпадает с таковым для препарата дцДНК человека (рисунок 2). Различия заключаются только в уровне стимуляции некоторых цитокинов. Так препарат ДНК (в точке 24 ч) более эффективно стимулирует продукцию IL-1 β , TNF- α и IL-10, а препарат Poly I:Poly C – IFN- α , IFN- γ , MCP и IL-1RA.

Аналогом препарата дцДНК человека является препарат Дезоксил, который представляет собой натриевую соль дезоксирибонуклеиновой кислоты, получаемую в результате ферментативного гидролиза ДНК молок лососевых рыб. Однако при добавлении данного препарата к клеткам цельной крови не было обнаружено какого-либо стимулирующего эффекта этого препарата на продукцию цитокинов.



- - - Ridostin - - - Mitogen mix - - - dsDNA
 - - - Dezoksil - - - Poly I:Poly C - - - Reaferon

Рисунок 2 – Динамика продукции цитокинов клетками периферической крови донора №3 при инкубации их с различными препаратами. На графиках представлены значения, соответствующие разнице индуцированной и спонтанной продукции.

Препарат Ридостин относится к индукторам интерферона и является стимулятором фагоцитоза. Стимуляция продукции цитокинов Ридостином приводит к незначительному повышению секреции MCP, IL-6, IL-1RA и IL-8. Стимулирующий эффект более чем в 10 раз ниже по сравнению с препаратом дцДНК (фрагментированная геномная ДНК человека), Poly I:Poly C и комплексом митогенов.

Использование Реаферона – рекомбинантного IFN- α -2a приводило лишь к очень слабой стимуляции продукции IL-6 и IL-1RA.

При оценке динамики продукции цитокинов в зависимости от времени инкубации было установлено, что значительный уровень стимуляции достигается уже через 6 часов инкубации. Пик продукции цитокинов и выход на плато происходит в промежутке 6-24 часа.

Таким образом, препарат дцДНК человека способен оказывать значительный стимулирующий эффект на продукцию целого ряда цитокинов мононуклеарами цельной крови (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , IFN- α , IFN- γ , MCP, VEGF, IL-1RA и IL-10). Точка 24 часа является оптимальной для оценки спонтанной и активированной продукции цитокинов мононуклеарными клетками периферической крови.

2.6 Сравнение изменения цитокинового баланса в крови здоровых доноров после использования препарата Панаген и некоторых иммуномодулирующих коммерчески доступных препаратов

Далее была проведена оценка достоверности данных по стимуляции препаратом дцДНК продукции цитокинов мононуклеарными клетками условно здоровых доноров (n=7) в сравнении с коммерчески используемыми препаратами Дезоксил, Ридостин и комплексом митогенов.

Графики, отражающие стимуляцию продукции цитокинов, представлены на рисунке 3. В результате анализа стимуляции продукции цитокинов мононуклеарными клетками крови различными препаратами было обнаружено, что двуцепочечная ДНК человека в значительной степени индуцирует продукцию TNF- α , IL-1RA, IL-1 β , IL-10, IL-6 и IL-8 и в меньшей степени – продукцию IFN- γ и MCP. На продукцию IFN- α , VEGF, IL-2 и IL-17 препарат дцДНК человека не оказывал какого-либо существенного влияния.

Препарат Ридостин приводил к очень слабой стимуляции продукции IL-8, VEGF, IL-1RA и MCP, а Дезоксил вызывал стимуляцию на крайне низком уровне IFN- α , IL-1RA и MCP и только в некоторых образцах.

Цитокины могут продуцироваться разными типами клеток, эффект их действия обладает плеiotропностью и перекрывается. Среди идентифицированных при выполнении данной части работы цитокинов, продукцию которых активировала дцДНК, большую часть можно условно отнести к провоспалительным (5 из 8: TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 и IFN- γ). Полученные результаты согласуются с данными о том, что дцДНК является PAMP и воспринимается клеткой как сигнал опасности. Первыми на этот сигнал реагируют клетки врожденного иммунитета (ДК, моноциты, макрофаги, натуральные киллеры и др.), ответственные за формирование защитной реакции воспаления, направленной на элиминацию патогена. Необходимо отметить, что дцДНК наиболее эффективно активировала продукцию IL-1 β , TNF- α и IL-6 (по сравнению со спонтанным уровнем в 596, 807 и 5367 раз, соответственно). Эти три цитокина являются ключевыми в развитии острой фазы воспаления. Они обеспечивают адгезию лимфоцитов, нейтрофилов, моноцитов и других клеток к эндотелию сосудов и их миграцию к месту локализации патогена, где клетки выполняют свои функции.

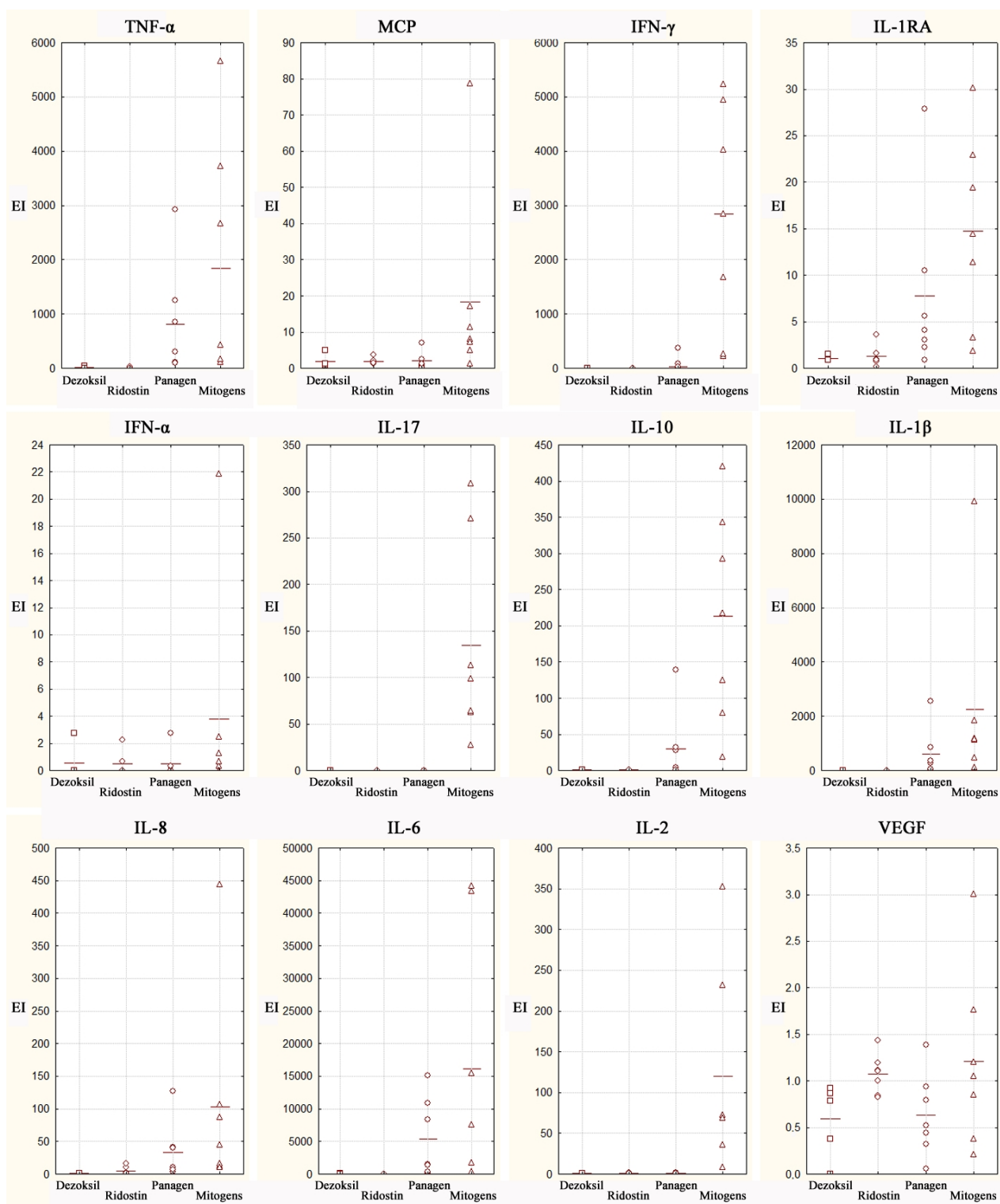


Рисунок 3 – Эффект препарата двуцепочечной ДНК на продукцию цитокинов клетками периферической крови (n=7). Данные представлены в виде индексов влияния, соответствующих отношению индуцированной к спонтанной продукции цитокинов, для каждого донора. Горизонтальный отрезок обозначает среднее значение.

Помимо провоспалительных цитокинов было обнаружено, что при инкубации клеток цельной крови с двуцепочечной ДНК происходит также активация продукции противовоспалительных цитокинов IL-10 и IL-1RA. Они рассматриваются как антагонисты целого ряда цитокинов. Так, IL-10 подавляет продукцию IFN- γ Th1-клетками, тормозит пролиферативный ответ T-клеток на антигены и митогены, а также подавляет секрецию активированными моноцитами IL-1 β , TNF- α и IL-6 [14]. IL-1RA является важным регулятором экспрессии IL-1 за счет его способности связываться с IL-1 и блокировать дальнейшее проведение внутриклеточного сигнала. Увеличение продукции IL-10 и IL-1RA, по всей видимости, можно объяснить тем, что провоспалительные цитокины, продукцию которых индуцирует дцДНК, в свою очередь, активируют транскрипционный фактор STAT3, запускающий транскрипцию генов IL-10 и IL-1RA [15, 16]. Таким образом, можно предположить, что индукция продукции противовоспалительных цитокинов IL-10 и IL-1RA при инкубации клеток цельной крови с препаратом дцДНК связана не с прямым действием дцДНК, а опосредована действием уже секретированных провоспалительных цитокинов.

Из цитокинов, относящихся к группе хемокинов, препарат дцДНК индуцирует продукцию IL-8 и на невысоком уровне MCP-1 (хемотаксический белок 1 моноцитов/макрофагов). Скорее всего, активация этих цитокинов также не связана с прямым влиянием двуцепочечной ДНК, а вызвана действием других цитокинов. Например, показано, что TNF- α индуцирует продукцию как IL-8, так и MCP-1 [17].

Другие иммуномодулирующие препараты, используемые в настоящем исследовании в качестве препаратов сравнения, продемонстрировали невысокую иммуностимуляцию мононуклеаров клеток периферической крови. Препарат Ридостин приводил к очень слабой стимуляции продукции IL-8, VEGF, IL-1RA и MCP, а Дезоксил вызывал стимуляцию на крайне низком уровне IFN- α , IL-1RA и MCP и только в некоторых образцах.

Таким образом, из проанализированных препаратов (за исключением комплекса митогенов) значимый эффект на продукцию цитокинов оказывал только препарат дцДНК, причем в случае TNF- α , IL-1 β , IL-1RA, IL-10, IL-8 и IL-6 его стимулирующий эффект был близким или сравнимым с действием митогена. Это указывает на то, что двуцепочечная ДНК обладает выраженным иммуностимулирующим действием на мононуклеарные клетки периферической крови условно здоровых доноров.

Заключение

Герпесвирусная инфекция является одной из важнейших медико-социальных проблем, что обусловлено ее широким распространением и чрезвычайно большим спектром клинических проявлений и осложнений. Герпесвирусную инфекцию вызывают вирусы простого герпеса I и II типа, а также вирус герпеса других разновидностей. По данным глобального обзора герпесвирусных исследований, инфицированность/заболеваемость герпесом из года в год нарастает. Многообразие клинических проявлений, особенности возбудителей, возможность их распространения практически всеми известными путями передачи позволили Европейскому региональному бюро ВОЗ отнести герпесвирусные инфекции в группу болезней, которые определяют будущее инфекционной патологии в текущем столетии [18, 19]. Важно отметить, что по данным современных эпидемиологических исследований регистрируется увеличение не только количества пациентов с герпетической инфекцией, но также частоты более тяжелых форм течения заболевания с частыми обострениями [20].

В 85-90% случаев вирус находится под контролем иммунной системы. Однако у 10-15% людей при ослаблении иммунитета происходит клиническая манифестация заболевания, при этом частота рецидивов может варьировать от 1-2 до 12-20 раз в год. Как правило, герпесвирусная инфекция проявляется в виде высыпаний на слизистых оболочках тела (губы, нос,

гениталии), повышения температуры тела, синдрома хронической усталости, общего депрессивного состояния. Клиническая картина длится от 5 дней до 2 недель, при этом человек находится в неработоспособном состоянии. В России ежегодно более 2,5 миллионов человек проходят курсы стационарного лечения в инфекционных, офтальмологических, неврологических, дерматологических отделениях.

Если герпес обостряется чаще 1 раза в 3 месяца, то это свидетельствует о хроническом, часто рецидивирующем характере течения заболевания, что является показанием для назначения адекватной этиопатогенетической и иммуномодулирующей терапии.

Как правило, для лечения хронической рецидивирующей герпесвирусной инфекции используют противовирусные препараты в сочетании с препаратами-индукторами интерферонов (патент RU 2373951 C1) или с препаратом рекомбинантного человеческого интерферона 2-альфа (патент RU2391981 C2), а также с другими иммуномодуляторами, биостимуляторами, поливитаминами и препаратами местного действия. Наиболее широко применяются ацикловир, валтрекс, фамцикловир, алпизарин, рибамидил, метисазон (противовирусные препараты), а также иммуномодуляторы – ридостин, интерлок, тималин, ликопад, полиоксидоний, деринат, глутоксим, неовир, циклоферон, витамины группы В. Однако все вышеописанные препараты обладают неспецифическим действием и не способны индуцировать антиген-специфический иммунный ответ, направленный на элиминацию вируса. Клинический опыт применения ацикловира или его аналогов показывает, что противогерпетические средства могут купировать острые проявления, но не предотвращают повторного рецидивирования хронической герпетической инфекции, а в ряде случаев даже не снижают частоту рецидивов. Кроме того, отсутствуют четкие клинико-лабораторные критерии назначения и последовательности применения тех или иных комбинаций различных препаратов. При этом

важно отметить, что к большинству современных противовирусных препаратов формируется резистентность, что также приводит к рецидивам заболевания и новому циклу терапии.

Известно, что ключевую роль в распознавании чужеродных (в том числе, вирусных) антигенов и презентации их эффекторным Т-клеткам играют ДК, способные инициировать антиген-специфический иммунный ответ [1]. ДК обладают уникальной способностью активировать как CD4, так и CD8Т-клетки. При этом стимулирующий эффект ДК в 10-100 раз превышает стимулирующее действие макрофагов и других антиген-презентирующих клеток в силу более высокого уровня экспрессии костимуляторных молекул, медленной внутриклеточной деградации антигена и длительной презентации антигенных пептидов на клеточной мембране. Кроме того, ДК являются единственными антиген-презентирующими клетками, которые способны активировать наивные Т-клетки [2].

Рядом исследований было показано, что хронические инфекционные заболевания вирусной природы четко ассоциируются со снижением количества и/или угнетением функциональной активности ДК, что рассматривается в качестве одного из возможных механизмов персистенции вируса в организме больного [21, 22].

Интерес к изучению ДК при вирусных заболеваниях связан не только с выяснением их патогенетической роли в хронизации/персистенции инфекции, но также с потенциальной возможностью использования ДК для разработки новых клеточных технологий лечения хронических и часто рецидивирующих вирусных инфекций [7, 23], поскольку именно ДК обладают уникальной способностью индуцировать антиген-специфический иммунный ответ.

Развитие новых подходов в создании и использовании лечебных ДК-вакцин стало возможным благодаря разработке методов генерации ДК в культуре *in vitro*. Согласно стандартным протоколам генерации ДК получают

путем культивирования прилипающей фракции мононуклеарных клеток периферической крови (CD14+моноцитов) в присутствии гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) и интерлейкина-4 (ИЛ-4) [24]. Генерируемые таким образом незрелые дендритные клетки (ИЛ4-ДК) обладают высокой способностью к захвату антигена, но слабой стимуляторной активностью в отношении Т-клеток. Поэтому на второй стадии инициируется конечное созревание ДК. Для этого используют различные факторы: бактерии (живые или мертвые), бактериальные продукты (LPS), аналог вирусной РНК – полиинозиновая-цитидиловая кислота (поли-І:С), фрагменты двуцепочечной ДНК, провоспалительные медиаторы и их комбинации (ИЛ-1бетта, ФНО-альфа, ИЛ-6, простагландин-Е2, CD40-лиганд и др.). На стадии конечного созревания ДК могут быть пульсированы (нагружены) «целевым» антигеном, против которого должен быть индуцирован иммунный ответ. В качестве такого антигена могут выступать, например, лизаты опухолевых клеток или бактерий, а также иммуногенные пептиды опухолевых или вирусных антигенов (например, полученные в виде рекомбинантных продуктов). Зрелые ДК стабильно экспрессируют на своей поверхности молекулы главного комплекса гистосовместимости (МНС I и II класса) в комбинации с антигенными пептидами, а также отличаются от незрелых ДК повышенной экспрессией ко-стимуляторных (CD86) и адгезивных (CD54, CD58) молекул, способствующих более эффективному взаимодействию с Т-клетками [25].

Однако использование для генерации дендритных клеток ГМ-КСФ в комбинации с ИЛ-4 не является наиболее оптимальным подходом, поскольку получаемые *in vitro* ИЛ4-ДК обладают низкой миграционной активностью и в условиях дефицита ростовых факторов могут подвергаться обратной трансформации в моноциты, и соответственно, могут быстро терять свои уникальные антиген-презентирующие свойства.

Поэтому был предложен альтернативный способ генерации ДК, при котором ИЛ-4 заменяется на ИФН- α [13]. Такой путь генерации ДК представляется более физиологичным, поскольку ИФН- α является ранним медиатором врожденного иммунитета и продуцируется в больших количествах в ответ на стимуляцию инфекционными антигенами и провоспалительными цитокинами. Кроме того, ИФН-ДК имеют ряд особенностей, которые принципиально отличают их от ИЛ4-ДК и позволяют существенно повысить эффективность их клинического использования. Так, ИФН-ДК генерируются быстрее по времени, характеризуются высокой способностью к захвату антигена, сохраняют стабильность в отсутствие цитокинов и ростовых факторов, имеют более высокую миграционную активность, более активно стимулируют CD8 Т-лимфоциты, индуцируют сбалансированный клеточный и гуморальный иммунный ответ, поскольку способны стимулировать как Th1-, так и Th2-лимфоциты [26, 27]. Учитывая также, что ИФН-ДК по некоторым данным обладают прямой цитотоксической активностью [28], применение данного типа ДК при хронических вирусных инфекциях представляется более перспективным.

С целью проверки данного предположения нами были организованы и проведены пилотные клинические испытания по оценке переносимости и клинической эффективности вакцин на основе ИФН-ДК в лечении хронической рецидивирующей герпетической инфекции. В результате было установлено, что проведение специфической иммунотерапии с использованием индивидуальных, аутологичных лечебных вакцин на основе ИФН-ДК в виде курса подкожных инъекций у больных с хронической и часто рецидивирующей герпетической инфекцией позволяет уменьшить число/выраженность клинических проявлений рецидивов и увеличить продолжительность безрецидивного периода, что сопряжено с активацией специфического и неспецифического иммунного ответа. Проведение ДК-вакцинаций характеризовалось в целом хорошей переносимостью.

Системных побочных реакций в виде повышения температуры тела, аллергических и/или инфекционных осложнений не было отмечено ни в одном случае.

Таким образом, активация антиген-специфического противовирусного иммунного ответа и восстановление функциональной реактивности Т-клеток, которые достигаются путем курсового лечения в виде подкожных вакцинаций аутологичных ИФН-ДК, нагруженных рекомбинантным антигеном вируса герпеса HSV1gD, в сочетании с препаратом рИЛ-2 в качестве адьюванта, позволяет уменьшить число обострений и выраженность их клинических проявлений у больных с хронической часто рецидивирующей герпесвирусной инфекцией.

Дополнительно были проведены исследования по оценке влияния препарата двуцепочечной ДНК человека («Панаген»), а также некоторых других иммуномодулирующих коммерческих препаратов на уровень продукции цитокинов клетками крови здоровых доноров в культуре *in vitro*. Было установлено, что значимый стимулирующий эффект препарата «Панаген» достигается уже через 6 ч инкубации. Пик продукции цитокинов и выход на плато происходит в промежутке 6-24 ч. Препарат двуцепочечной ДНК человека способен оказывать значительный стимулирующий эффект на продукцию целого ряда цитокинов мононуклеарами цельной крови: IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , IFN- α , IFN- γ , MCP, VEGF, IL-1RA и IL-10. Препараты «Дезоксил» и «Ридостин» продемонстрировали невысокую иммуностимуляцию мононуклеарных клеток периферической крови. Препарат Панаген оказывал значимый эффект на продукцию TNF- α , IL-1 β , IL-1RA, IL-10, IL-8 и IL-6, при этом его стимулирующий эффект был близким или сравнимым с действием комплекса митогенов. Это указывает на то, что двуцепочечная ДНК человека обладает выраженным иммуностимулирующим действием на мононуклеарные клетки периферической крови условно здоровых доноров.

Ранее, в ходе выполнения 4 этап работ, нами было показано, что препарат двуцепочечной ДНК человека («Панаген») характеризуется выраженным стимулирующим эффектом на процесс дифференцировки/созревания ИФН-ДК в культуре *in vitro*. Так, например, «Панаген» по своему стимулирующему действию на ДК сопоставим с «классическим» дозревающим стимулом – липополисахаридом стенки бактерий. В совокупности с данными о стимулирующем влиянии препарата «Панаген» на цитокин-секреторную активность клеток крови, полученные в целом результаты свидетельствуют, что препарат двуцепочечной ДНК человека может быть использован в качестве адъюванта при проведении ДК-вакцинаций и, служить, альтернативой рИЛ-2 (препарату Ронколейкин).

В ходе выполнения работ по этапу были разработана необходимая регламентирующая документация – протокол клинических исследований, форма информированного согласия, регистрационная карта динамического наблюдения больных, стандарты операционных процедур (SOPs) получения дендритноклеточных вакцин, проведения вакцинотерапии, оценки антиген-специфического иммунного ответа.

Экономическая эффективность работы заключается в том, что результаты работы могут быть использованы для создания новой медицинской технологии применения индивидуальных ДК-вакцин для лечения инфекционных (вирусных) заболеваний человека, которая после регистрации в Росздравнадзоре может быть внедрена в практическое здравоохранение.

Результаты, полученные в ходе выполнения НИР, используются в виде разделов курса иммунологии, читающегося на кафедре иммунологии Новосибирского государственного медицинского университета, и курса клинической иммунологии, читающегося студентам 4 курса медицинского факультета Новосибирского государственного университета, а также в виде

лекционного материала в обучении клинических ординаторов и аспирантов НИИ клинической иммунологии СО РАМН.

Подготовлена рабочая учебная программа тематического усовершенствования врачей (72 ч) по курсу «Применение клеточных технологий в медицине», в которую также включены лекции с использованием научных данных, полученные в ходе выполнения НИР.

Предусмотренные календарным планом задания выполнены полностью.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Banchereau J., Steinman R.M. Dendritic cells and control of immunity // Nature. – 1998. – V. 392. – P. 245-252.
- 2 Massard G., Tongia M-M., Wihin J-M., Morand G. The dendritic cell lineage: a ubiquitous antigen-presenting organization // Ann. Thorac. Surg. – 1996. – V. 61. – P. 252-258.
- 3 Peters J.H., Gleseler R., Thiele B., Steinbach F. Dendritic cells from ontogenetic orhans to myelomonocytic descendants // Immunol. Today. – 1996. – V. 17. – P. 273-278.
- 4 Akbar S.M, Yoshida O, Chen S, Cesar AJ, Abe M, Matsuura B, Hiasa Y, Onji M. Immune modulator and antiviral potential of dendritic cells pulsed with both hepatitis B surface antigen and core antigen for treating chronic HBV infection // Antivir. Ther. – 2010. – V. 15. – P.887-895.
- 5 García F, Climent N, Assoumou L, Gil C, González N, Alcamí J, León A, Romeu J, Dalmau J, Martínez-Picado J, Lifson J, Autran B, Costagliola D, Clotet B, Gatell JM, Plana M, Gallart T A therapeutic dendritic cell-based vaccine for HIV-1 infection // J. Infect. Dis. – 2011. – V. 203. – N 4. – P.473-478.
- 6 Gowans EJ, Roberts S, Jones K, Dinatale I, Latour PA, Chua B, Eriksson EM, Chin R, Li S, Wall DM, Sparrow RL, Moloney J, Loudovaris M, Ffrench R, Prince HM, Hart D, Zeng W, Torresi J, Brown LE, Jackson DC. A phase I clinical trial of dendritic cell immunotherapy in HCV-infected individuals // J. Hepatol. – 2010. – V. 53. – P.599-607.
- 7 Chen, L., Li, Y. G. Zhang, D. Z. Wang, Z. Y. Zeng, W. Q. Shi, X. F. Guo Y., Guo, S. H Ren. H. Therapeutic effect of autologous dendritic cell vaccine on patients with chronic hepatitis B: a clinical study // World J. Gastroenterol. – 2005. – V. 11. – P. 1806-1808.
- 8 Luo J., Li J., Chen R. L., Nie L., Huang J., Liu Z. W., Luo L., Yan X.J. Autologus dendritic cell vaccine for chronic hepatitis B carriers: A pilot, open

label, clinical trial in human volunteers // *Vaccine*. – 2010. – V. 28. – P. 2497-2504.

9 Li Y., Chen M., Zhang D., Wang Z., Zeng W., Shi X., Guo Y., Guo S., Ren H. Clinical research on the treatment effect of autologous dendritic cell vaccine on the patients with chronic hepatitis B // *Chinese journal of hepatology*. – 2003. – V. 11. – P. 206-208.

10 Shcon E., Harandi A., Nordstrom I. Dendritic cell vaccination protects mice against lethality caused by genital herpes simplex virus type 2 infection // *Journal of Reproductive Immunology*. – 2001. – V. 50. – P. 87-104.

11 Fatahzadeh M., Schwartz R.A. Human herpes simplex virus infections: epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management// *J. Am. Acad. Dermatol.* – 2007. – V. 5. – P. 737-763.

12 Harwood L.J., Gerber H., Sobrino F., Summerfield A., McCullough K.C. Dendritic cell internalization of foot-and-mouth disease virus: influence of heparin sulfate binding on virus uptake and induction of the immune response // *J. Virol.* – 2008. – V. 82. – P. 6379-6394.

13 Santini S., Puccini T., Lapenta C., A new type 1 INF-mediated pathway for the rapid differentiation of monocytes into highly active dendritic cells // *Stem cells*. – 2003. – V. 21. – P. 357-362.

14 Meador BM, Krzysztos CP, Johnson RW, Huey KA. Effects of IL-10 and age on IL-6, IL-1beta, and TNF-alpha responses in mouse skeletal and cardiac muscle to an acute inflammatory insult // *J. Appl. Physiol.* – 2008. – V. 104. – P. 991-997.

15 Samarasinghe R., Tailor P., Tamura T., Kaisho T., Akira S., Ozato K. Induction of an anti-inflammatory cytokine, IL-10, in dendritic cells after toll-like receptor signaling // *J. Interferon Cytokine Res.* – 2006. – V. 26. – P. 893-900.

16 Carl VS, Gautam JK, Comeau LD, Smith MF Jr. Role of endogenous IL-10 in LPS-induced STAT3 activation and IL-1 receptor antagonist gene expression // *J. Leukoc. Biol.* – 2004. – V. 76. – N 3. – P. 735-742.

- 17 Osawa Y, Nagaki M, Banno Y, Brenner DA, Asano T, Nozawa Y, Moriwaki H, Nakashima S. Tumor necrosis factor alpha-induced interleukin-8 production via NF-kappaB and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathways inhibits cell apoptosis in human hepatocytes // *Infect. Immun.* – 2002. – V. 70. – N 11. – P. 6294-6301.
- 18 Шульженко А.Е. Человек и герпес настоящее и будущее // *Физиология и патология иммунной системы.* – 2004. – № 2. – С. 45-61.
- 19 Arduino P.G., Porter S.R. Oral and perioral herpes simplex virus type 1 (HSV-1) infection: review of its management // *Oral. Dis.* – 2006. – V. 12. – N 3. – P. 254-270.
- 20 Латышева Т.В., Хутиева. Л.М Герпесвирусная инфекция в конце XX века // *Новости науки и техн., Серия: Мед. Аллергия, астма и клин, иммунол.* – 2001. – № 4. – С. 16-21.
- 21 Van der Molen R.G, Sprengers D., Binda R.S, et al. Functional impairment of myeloid and plasmacytoid dendritic cells of patients with chronic hepatitis B // *Hepatology.* – 2004. – V. 40. – P. 738-746.
- 22 Zhang Z., Fu J. Zhao Q., et al. Differential restoration of myeloid and plasmacytoid dendritic cells in HIV-1-infected children after treatment with highly active antiretroviral therapy // *J. Immunol.* – 2006. – V. 76. – P. 5944-5951.
- 23 Lu W.L., Arraes C., Ferreira W.T, Andrieu J.M. Therapeutic dendritic-cell vaccine for chronic HIV-1 infection // *Nat. Med.* – 2004. – V. 10. – P. 1359-1365.
- 24 Thurner B., Roder C., Dieckmann D., et al. Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical applications // *J. Immunol. Meth.* – 1999. – V. 223. – P. 1-15.
- 25 Jonuleit H., Kuchn U., Muller C., et al. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions // *Eur. J. Immunol.* – 1997. – V. 27. – P. 3135-3142.

26 Parlato S., Santini S., Lapenta C., et al. Expression of CCR-7, MIP-3b, and Th1 chemokines in type I IFN-induced monocyte-derived dendritic cells – importance for the rapid acquisition of potent migratory and functional activities // *Blood*. – 2001. – V. 98. – P. 3022-3029.

27 Santini S., Belardelli F. Advances in the use of dendritic cells and new adjuvants for the development of therapeutic vaccines // *Stem cells*. – 2003. – V. 21. – P. 495-505.

28 Korthals M., Safaian N., Kronenwett R., et al. Monocyte derived dendritic cells generated by IFN-alpha acquire mature dendritic and natural killer cell properties as shown by gene expression analysis // *J. Transl. Med.* – 2007. – V. 25. – P. 46-48.