

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК И ИНТЕРЛЕЙКИНА-18 ДЛЯ МОДУЛЯЦИИ ИММУННОГО ОТВЕТА ПРОТИВ HBsAg *in vitro*

Ольга Павловна ХРИПКО¹, Елена Владимировна ЯКУШЕНКО¹, Сергей Витальевич СЕННИКОВ¹, Ирина Вадимовна КРАСИЛЬНИКОВА², Владимир Александрович КОЗЛОВ¹

¹ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН
630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14

²Муниципальная инфекционная клиническая больница №1
630099, г. Новосибирск, ул. Семьи Шамшиных, 14

Для модуляции специфического иммунного ответа против HBsAg *in vitro* использовали аутологичные дендритные клетки (ДК), нагруженные рекомбинантным антигеном вирусного гепатита В (HBsAg), культивированные с моноклеарными клетками периферической крови (МНК ПК) больных хроническим вирусным гепатитом В в присутствии рекомбинантного интерлейкина-18 или без него. Эффективность стимуляции иммунного ответа по типу Th1 оценивалась по пролиферативной активности МНК ПК, продукции ими интерферона-γ (ИФН-γ), ИЛ-4 и количеству клеток, содержащих гранулы перфорины. Показано, что совместное культивирование аутологичных ДК и МНК ПК больных хроническим ВГВ не приводит к индукции эффективного ответа против HBsAg, при этом добавление рекомбинантного ИЛ-18 вызывает статистически значимое увеличение количества МНК ПК, продуцирующих ИФН-γ, уровня продукции ими ИФН-γ, количества лимфоцитов, содержащих перфориновые гранулы, и увеличение пролиферативного потенциала МНК ПК. Таким образом, совместное культивирование зрелых ДК, презентующих HBsAg, и МНК ПК больных хроническим ВГВ в присутствии ИЛ-18 способствует эффективной стимуляции антиген-специфических клеточных реакций по Th1 типу.

Ключевые слова: дендритные клетки, иммунный ответ, гепатит В, HBsAg, интерлейкин-18.

Инфицирование вирусом гепатита В вызывает воспалительное заболевание печени различного течения и тяжести. Оно может быть транзиторным (острый гепатит) и персистирующим (хронический), а также иметь крайне тяжелое течение (фульминантная форма). Факторы, определяющие течение гепатита, до сих пор изучены не полностью, однако, известно, что у пациентов с хроническим течением наблюдается более слабый Т-клеточный иммунный ответ [1]. Иммунологические и вирусологические особенности персистирования вируса гепатита В включают в себя, в качестве возможных механизмов, дисбаланс цитокинов, Т-клеточное истощение и анергию, мутации вируса [2]. Вирус гепатита В способен инфицировать дендритные клетки (ДК) [3], которые в результате становятся функционально неполноценными [4].

ДК обладают уникальной способностью представлять антигены наивным Т-лимфоцитам и определять направленность иммунных реакций по клеточному или гуморальному типу, поэтому «перепрограммирование» ДК с помощью соответствующих цитокинов и антигенов

in vitro является перспективным направлением в терапии инфекционных заболеваний. ИЛ-18 — цитокин, продуцирующийся в основном активированными моноцитами и ДК, стимулирует продукцию целого ряда провоспалительных факторов (интерферона-γ (ИФН-γ), фактора некроза опухоли-α (ФНО-α), ИЛ-2, молекул адгезии и др.), принимает участие в формировании врожденного и приобретенного иммунного ответа, в том числе и против антигенов вирусного гепатита В (HBsAg) [5]. В связи с этим цель работы заключалась в исследовании возможностей эффективной модуляции специфического клеточного иммунного ответа против HBsAg с помощью аутологичных дендритных клеток пациентов больных хроническим вирусным гепатитом В и ИЛ-18 *in vitro*.

Материалы и методы

Объект исследования. В работе использовалась гепаринизированная венозная кровь пациентов, больных хроническим вирусным гепатитом В, проходящих лечение на базе муниципальной инфекционной клинической больницы №1 г. Новосибирска (n=20).

Хрипко О.П. — младш.н.с., e-mail: ici@ksn.ru

Якушенко Е.В. — старш.н.с., e-mail: e-yakushenko@mail.ru

Сенников С.В. — зав. лабораторией, e-mail: ici@ksn.ru

Козлов В.А. — директор, e-mail: ici@ksn.ru

Красильникова И.В. — зав. отделением, e-mail: ici@ksn.ru

Получение ДК. Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли путем центрифугирования цельной крови в градиенте плотности фиколюрографина. Прилипающую фракцию клеток получали методом адгезии на пластике («Nunc», Дания) в среде, содержащей 10% эмбриональной сыворотки телят, 2 мМ L-глутамин, 10 мМ HEPES, 0,5 мМ 2-меркаптоэтанол, 80 мкг/мл гентамицина, 100 мкг/мл ампициллина в атмосфере 5% CO₂ при 37°C. Неприлипшие клетки удаляли и сохраняли для дальнейшего использования. Для получения незрелых дендритных клеток (нДК) выделенную фракцию прилипающих МНК культивировали в полной среде с добавлением рекомбинантного человеческого гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (рчГМ-КСФ) (50 нг/мл) и рчИЛ-4 (100 нг/мл) (ООО «Центр инженерной иммунологии») при концентрации клеток 10⁶/мл в течение 24 часов [6]. Через 24 часа культивирования к нДК был добавлен специфический рекомбинантный антиген НВсАг («Диагностические системы», Нижний Новгород) в дозе 5 мкг/мл, а еще через 2 часа для созревания ДК (зДК) — рчФНО-α («Вектор», Кольцово) в дозе 25 нг/мл. В качестве контрольной группы использовались ДК, которым не представлялся антиген.

Фенотип ДК. Для анализа фенотипических характеристик ДК использовались моноклональные антитела anti-CD83-PE, anti-CD86-FITC (BD «Pharmingen»), anti-HLA-DR-FITC («Сорбент», Москва) с последующим анализом на проточном цитометре FACSCalibur (BD «Bioscience»). Анализируемая популяция по параметрам прямого и бокового светорассеяния располагалась в лимфоцитарно-моноцитарном регионе.

Захват FITC-декстрана. Для тестирования способности полученных ДК к рецептор-опосредованному эндоцитозу исследовали активность захвата FITC-декстрана («Sigma», США) [7].

Получение цитотоксических клеток. Полученные зДК подвергались совместному культивированию с мононуклеарными клетками (в соотношении ДК:МНК=1:10) неприлипшей фракции в течение 48 часов для активации распознавания антигена с добавлением 40 нг/мл рчИЛ-18 (ООО «Центр инженерной иммунологии») или без него (группы МНК+ДК (с антигеном) и МНК+ДК (с антигеном)+ИЛ-18). В качестве контроля использовались МНК, культивированные в тех же условиях (группы МНК и МНК+ИЛ-18), а также МНК, культивированные в присутствии ДК, которым

не представлялся НВсАг (группа МНК+ДК (без антигена)).

Продукция ИФН-γ и ИЛ-4. Для определения эффективности ответа на специфический антиген мы использовали количественное определение клеток, продуцирующих ИФН-γ и ИЛ-4, с использованием технологии ELISpot («R&D Systems»). Определение уровня продукции ИФН-γ и ИЛ-4 в кондиционных средах от МНК проводили с помощью иммуоферментного анализа (наборы «Вектор-Бест») через 72 часа культивирования МНК, предварительно культивированных со зДК, в присутствии рчИЛ-18 или без него.

Пролиферативная активность. Пролиферативная активность МНК определялась по включению ³H-тимидина через 72 часа культивирования МНК, предварительно культивированных со зДК, в присутствии рчИЛ-18 или без него.

Цитотоксическая активность. Для определения потенциальной цитотоксической активности лимфоцитов определялось содержание клеток, экспрессирующих внутриклеточный белок перфорин [8], с помощью соответствующих моноклональных антител anti-perforin-PE (BD «Pharmingen») через 72 часа культивирования МНК, предварительно культивированных со зДК, в присутствии рчИЛ-18 или без него.

Статистическая обработка результатов. Результаты представлены в виде медианы и размаха квартилей или в виде среднего и ошибки среднего. Статистическая достоверность различий определялась с помощью непараметрического критерия Вилкоксона с использованием программы Statistica 6.0.

Результаты и обсуждение

Для идентификации популяции получаемых in vitro дендритных клеток мы оценивали экспрессию маркеров созревания CD83 и костимуляции HLA-DR, CD86. Признаком функциональной зрелости дендритных клеток считалось повышение уровня их экспрессии по сравнению с незрелыми ДК (табл. 1).

Для оценки функционального состояния полученных дендритных клеток исследовалась эффективность захвата антигена, в частности FITC-декстрана, при +4°C и при +37°C. При +4°C происходит неспецифическое связывание декстрана с поверхностными рецепторами, а при +37°C связанный декстран проникает в клетку (эндоцитоз). Степень захвата FITC-декстрана ДК определялась как безразмерная величина, соответствующая средней интенсивности флюоресценции меченых клеток

Таблица 1

Фенотипические характеристики дендритных клеток, полученных из моноцитов периферической крови пациентов, больных хроническим вирусным гепатитом (n=6)

Экспрессия маркеров (% позитивных клеток)	Стадия развития ДК	
	Незрелые ДК (%)	Зрелые ДК (%)
CD83+CD86+	30,88±10,71	43,48±10,85*
CD83+HLA-DR+	12,24±2,82	16,93±2,85*

Примечания: данные представлены в виде среднего и ошибки среднего; * — достоверное отличие (p < 0,05) от незрелых ДК.

Таблица 2

Пролиферативный ответ мононуклеарных клеток пациентов, больных хроническим вирусным гепатитом В, культивированных с антиген-активированными ДК (n=20)

Группы	Пролиферативный ответ, имп./мин.	
	Спонтанный	НВсAg-стимулированный
МНК	554,2 [304; 2023]	1005,8 [784; 2533]
МНК+ ИЛ -18	2002,6 [491; 4756]*, **	2056,2 [549; 4870]*, **
МНК+ДК (без антигена)	1508,0 [970; 6136]*	2899,7 [2277; 7342]*, **
МНК+ДК (с антигеном)	3437,3 [1801; 5286]*, **	3567,5 [2099; 7184]*, **
МНК+ДК (с антигеном)+ ИЛ-18	3344,8 [1188; 6246]*	5076,0 [1523; 2648]*

Примечания: данные представлены в виде медианы и размаха квартилей; * — достоверное отличие (p < 0,05) от группы МНК; ** — достоверное отличие (p < 0,05) от группы МНК+ДК (с антигеном)+ИЛ-18.

(MIF — mean intensity of fluorescence), и составляла у нДК 79,19±16,75 MIF при +4°C, достоверно повышаясь до 192,97±34,38 MIF при +37°C, что свидетельствует о способности клеток к эффективному захвату антигена по механизму рецептор-опосредованного эндоцитоза через лектиновые рецепторы, такие как DEC-205/CD205 [7].

Таким образом, нДК, полученные при 24 часах дифференцировки моноцитов периферической крови, обладают способностью к эндоцитозу и могут быть эффективно нагружены антигеном. Через 24 часа созревания в присутствии ФНО-α нДК приобретают фенотип зрелых дендритных клеток, увеличивая экспрессию CD83+CD86+, CD83+HLA-DR+. В работе Obermaier [9] показано, что короткий период получения зрелых ДК *in vitro* способствует более стабильной экспрессии поверхностных маркеров и большему выходу полученных дендритных клеток.

Зрелые ДК взаимодействуют с Т-клетками и могут стимулировать дифференцировку и активацию различных типов Т-лимфоцитов [10]. В присутствии антигена формируются устойчивые взаимодействия Т-клеток с нагруженными антигеном ДК, при этом одна ДК способна взаимодействовать с более чем 10 Т-клетками [11]. Для стимуляции и поддержания направленной дифференцировки наивных Т-клеток в Th1 мы добавляли рчИЛ-18 при совместном культивировании зрелых антиген-активированных ДК и МНК. Для определения эффектив-

ности модуляции иммунного ответа с помощью полученных ДК и рчИЛ-18 оценивалась пролиферативная активность МНК, предварительно культивированных с антиген-активированными ДК, в ответ на НВсAg. Установлено, что антиген-активированные дендритные клетки в комбинации с ИЛ-18 наиболее эффективно повышают пролиферативную активность МНК ПК больных хроническим вирусным гепатитом В *in vitro* (табл. 2).

Для тестирования активации Th1 мы оценивали количество клеток, продуцирующих ИФН-γ и ИЛ-4, с помощью технологии ELISpot и уровень продукции ИФН-γ и ИЛ-4 в кондиционных средах от МНК в ответ на антиген с помощью иммуноферментного анализа.

Установлено, что под действием аутологичных дендритных клеток, презентующих НВсAg, достоверно повышается уровень продукции ИФН-γ МНК в ответ на антиген по сравнению с клетками исходной популяции. Добавление ИЛ-18 при совместном культивировании МНК и ДК приводит к еще более выраженному достоверному повышению уровня продукции ИФН-γ в ответ на НВсAg (табл. 3), что свидетельствует об активирующем влиянии ИЛ-18 на формирование клеточного иммунного ответа как фактора, способствующего дифференцировке Th1. При исследовании влияния указанных воздействий на количество клеток, продуцирующих ИЛ-4 и на уровень его продукции МНК, каких-либо изменений выявлено не было (данные не приводятся).

Таблица 3

Продукция ИФН-γ МНК пациентов, больных хроническим вирусным гепатитом В, культивированных с аутологичными ДК (n=20)

Группы	Количество ИФН-γ-продуцирующих клеток (на 50 000 МНК)		Содержание ИФН-γ в кондиционных средах МНК, пг/мл	
	Спонтанное	НВсAg	Спонтанное	НВсAg
МНК	237 [107; 326]	227 [125; 357]	12,3 [6,1; 15,1]	14,8 [9,9; 18,5]
МНК+ ИЛ -18	241,5 [184; 343]	240 [168; 326]**	11,7[4,3; 18,6]**	15,5[6,6; 81,5]**
МНК+ДК (без антигена)	278,5 [138; 417]	232 [110; 366]**	13,8 [5,2; 47,2]*	16,7 [2,6; 74,2]**
МНК+ДК (с антигеном)	263 [150; 406]**	302 [82; 420]**	17,4 [7,3; 45,7]*	16,7 [3,7; 69,7]*,***
МНК+ДК (с антигеном) + ИЛ-18	299,5 [193; 382]*	336 [196; 373]*	16,8 [6,7; 35,0]*	20,4 [2,9; 171,6]*,***

Примечания: данные представлены в виде медианы и размаха квартилей; * — достоверное отличие от группы МНК; ** — достоверное отличие от группы МНК+ДК+ИЛ-18; *** — достоверное отличие от спонтанного уровня ($p_{Wilcoxon} < 0,05$).

Кроме того, мы исследовали экспрессию молекул перфорина МНК, предварительно культивированными с антиген-активированными ДК, в ответ на специфический антиген. Перфорин — фактор цитотоксичности, мономерный белок, вызывающий образование пор в цитоплазматической мембране, что приводит к лизису инфицированных клеток [12]. Содержание перфорин-позитивных клеток в исходной популяции МНК составило $9,9 \pm 1,9\%$ и $13,98 \pm 2,06\%$ — в популяции МНК, культивированных с антиген-активированными ДК. Добавление ИЛ-18 изменяет этот показатель с $9,91 \pm 1,27\%$ до $16,6 \pm 2,44\%$ соответственно. Достоверное повышение количества перфорин-позитивных клеток служит показателем активации цитотоксических лимфоцитов, необходимых для уничтожения инфицированных клеток *in vivo*.

Заключение

Таким образом, в результате проведенных исследований показана возможность активации специфического иммунного ответа против НВсAg при хроническом вирусном гепатите В с помощью МНК, культивированных в присутствии аутологичных дендритных клеток и ИЛ-18 *in vitro*. Совместное культивирование зрелых ДК, презентующих НВсAg, и МНК ПК больных хроническим вирусным гепатитом В в присутствии ИЛ-18 способствует наиболее эффективной стимуляции антиген-специфических клеточных реакций, что подтверждается увеличением количества МНК, продуцирующих ИФН-γ, и уровня продукции ИФН-γ, количества лимфоцитов, экспрессирующих перфорин-гранулы, и увеличением пролиферативного потенциала МНК больных хроническим вирусным гепатитом В.

Литература

1. Chisari F.V., Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathology // Springer Semin. Immunopathol. 1995. 17: 261-81.
2. Lohr H.F., Gerken G., Schlicht H.J. et al. Low frequency of cytotoxic liver-infiltrating T lymphocytes specific for endogenous processed surface and core proteins in chronic hepatitis B // J Infect Dis 1993. 168. 1133-9.
3. Arima S., Akbar S.M., Michitaka K. et al. Impaired function of antigen-presenting dendritic cells in patients with chronic hepatitis B: localization of HBV DNA and HBV RNA in blood DC by in situ hybridization // Int J Mol Med 2003. 11. 169-74.
4. 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. 40. 738-46.
5. Sun Y., Chen H.Y., Xin S.J. Effect of IL-18 on peripheral blood mononuclear cell of chronic hepatitis B and hepatitis B virus DNA released by HepG2.2.15 cell lines. // Hepatobiliary Dis Int 2004. 3(2). 230-4
6. Della Bella S., Nicola S., Riva A. et al. Functional repertoire of dendritic cells generated in granulocyte macrophage-colony stimulating factor and interferon-α // J. Leukocyte Biol. 2004. 75(1). 106-16
7. Kato M., Neil T.K., Fearnley D.B. et al. Expression of multilectin receptors and comparative FITC-dextran uptake by human dendritic cell // Int. Immunol.- 2000. 11. 1511-1519.
8. Aslan N., Yurdaydin C., Wiegand J. et al. Cytotoxic CD4+ T cells in viral hepatitis. // Journal of Viral Hepatitis 2006. 13. 505-514
9. Obermaier B., Dauer M., Herten J. et al. Development of a new protocol for 2-day generation of mature dendritic cells from human monocytes // Biol Proced Online 2003. 5. 197-203.
10. Adams S, O'Neill DW, Bhardwaj N. Recent advances in dendritic cell biology // J Clin Immunol 2005. 25(3). p.177-88
11. Bouso P, Robey E. Dynamics of CD8+T cell priming by dendritic cells in intact lymph nodes // Nat Immunol 2003. 4. 579-585
12. Kagi D., Ledermann B., Burki K. et al. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice // Nature 1994. 369. 31.

USED DENDRITIC CELL AND INTERLEUKIN-18 FOR MODULATION OF IMMUNE RESPONSE AGAINST HBcAg IN VITRO

Olga Pavlovna KHRIPKO¹, Elena Vladimirovna YAKUSHENKO¹, Sergey Vitalevich SENNIKOV¹, Vladimir Aleksandrovich KOZLOV¹, Irina Vadimovna KRASILNIKOVA²

¹*Research Institute of Clinical Immunology SB RAMS
14, Yadrintsevskaya str., Novosibirsk, 630090*

²*Municipal clinical hospital of infectious diseases №1
40, Sem'i Chamchinykh str., Novosibirsk, 630090*

For modulation of the specific immune response against HBcAg in vitro were used dendritic cells (DC) with mononuclear cells of peripheral blood (PBMC) of the patients with chronic HBV infection in presence recombinant interleukin-18 (rIL-18) or without it. The efficiency of modulation of the immune response was estimated by proliferation of PBMC, production INF- γ , IL-4 and quantity of the perforine-positive cells. It is shown, that cultivation of DC with PBMC is not effective for induction of antiviral response, thus, addition rIL-18 leads to increase in quantity PBMC, producing INF- γ , a level of production INF- γ , quantities lymphocytes, containing perforine granules, and to increase proliferative potential of PBMC. Thus, for the induction of functional-active HBcAg-specific cytotoxic lymphocytes in vitro it is necessary to cultivate DC and PBMC in the presence of rIL-18. Thus, the cocultivation of mature DC, presenting HBcAg, and PBMC of patient with chronic HBV in the presence of IL-18 promotes effective stimulation of antigen-specific immune response on the Th1 type.

Key words: dendritic cell, immune response, hepatitis B, HBcAg, interleukine-18.

Khripko O.P. — research, researcher, e-mail: ici@ksn.ru

Yakushenko E.V. — research, senior researcher, e-mail: e-yakushenko@mail.ru

Sennikov S.V. — research, laboratory manager, e-mail: ici@ksn.ru

Krasilnikova I.V. — branch manager, e-mail: ici@ksn.ru

Kozlov V.A. — research, director, e-mail: ici@ksn.ru