

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

*На правах рукописи*

ОЛЕЙНИК ЕКАТЕРИНА АЛЕКСАНДРОВНА

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

14.03.09 – «Клиническая иммунология, аллергология»

диссертация на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:  
доктор медицинских наук,  
профессор,  
член-корреспондент РАН  
Е.Р. Черных

Новосибирск

2018

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ.....</b>	<b>4</b>
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>13</b>
1.1 . Биологические характеристики вируса гепатита С. ....	13
1.2. Адаптивный иммунный ответ против HCV-инфекции.....	14
1.3.Механизмы неэффективности антигенспецифических CD8 <sup>+</sup> T-клеток при HCV-инфекции.....	18
1.4. Роль дендритных клеток в патогенезе вирусного гепатита С.....	21
1.5.Терапевтический потенциал ДК-вакцин в лечении HCV-инфекции.....	35
1.6.Характеристика интерферон- $\alpha$ -индуцированных дендритных клеток (ИФН-ДК).....	37
<b>ГЛАВА 2.МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....</b>	<b>42</b>
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....</b>	<b>52</b>
3.1. Влияние рекомбинантных вирусных белков HCV Core (1–120) и NS3 (11921457) на созревание и функциональную активность ИФН-ДК.....	52
3.2. Индукция HCV-специфического клеточного ответа дендритными клетками, нагруженными рекомбинантными вирусными белками Core и NS3 в культурах МНК доноров.....	56
3.3.Индукция HCV-специфического клеточного ответа дендритными клетками, нагруженными рекомбинантными вирусными белками Core и NS3, в культурах МНК пациентов с хроническим гепатитом С.....	62
3.4. Исследование HCV-специфического клеточного ответа у пациентов с хроническим гепатитом С на фоне иммунотерапии дендритными клетками.....	69
3.5. Исследование HCV-специфического клеточного ответа у пациентов с хроническим гепатитом С на фоне иммунотерапии дендритными клетками в комбинации с противовирусной терапией интерфероном и рибавирином.....	84

<b>ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ .....</b>	<b>94</b>
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>106</b>
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>109</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....</b>	<b>111</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>113</b>

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность исследования

Хронический гепатит С (ХГС) характеризуется широкой распространенностью, является одной из наиболее частых причин поражения печени и существенно повышает риск развития цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы [126], в силу чего относится к социально значимым инфекциям, представляющим глобальную проблему для здравоохранения во всем мире. В настоящее время «золотым стандартом» лечения ХГС является терапия препаратами пегилированного интерферона- $\alpha$  в сочетании с рибавирином, обеспечивающая устойчивый вирусологический ответ (УВО) в 40-50% случаев при инфицировании HCV 1 генотипа [105]. Тем не менее, препараты интерферона- $\alpha$  (в виде монотерапии или в сочетании с рибавирином) эффективны только у 40-50% пациентов с генотипом 1 и часто вызывают развитие тяжелых побочных эффектов, вынуждающих прекратить лечение [105]. Таргетная терапия ингибиторами протеаз, обещающая стать прорывом в лечении ХГС, также имеет ряд серьезных ограничений - показана только для пациентов с генотипом 1, и на сегодняшний день ее доступность ограничена высокой стоимостью [172, 178].

Согласно современным представлениям, элиминацию вируса и исход в выздоровление у пациентов с вирусным гепатитом С связывают с запуском сильного мультиэпитопного (с широкой кросс-реактивностью) ответа CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> Т-клеток, продуцирующих цитокины I типа [169]. Соответственно, исход в хронизацию и персистенция вирусной инфекции ассоциированы с недостаточностью Т-клеточного ответа [113]. Развитие сильного и устойчивого Т-

клеточного ответа играет важную роль не только в подавлении репликации вируса, но и детерминирует чувствительность к терапии интерферонами, способствуя достижению УВО [24].

Ведущая роль в запуске Т-клеточного ответа отводится дендритным клеткам (ДК), способным эффективно презентировать антигены, активировать наивные Т-клетки и индуцировать эффекторные Т-клетки [42]. Многочисленные исследования выявили дисфункции ДК при ХГС, проявляющиеся задержкой созревания, изменением продукции цитокинов и снижением аллостимуляторной активности миелоидных и плазмацитоидных ДК [6]. С этой точки зрения индукция сильного иммунного ответа с помощью генерированных *ex vivo* ДК (в качестве лечебных вакцин) рассматривается как новая стратегия лечения ХГС [188].

*In vitro* дифференцировка моноцитов в ДК отражает физиологические процессы развития ДК из моноцитарных предшественников *in vivo* [131]. Причем дифференцированные из моноцитарных предшественников ДК могут быть в меньшей степени иммунокомпromетированы вирусом.

Традиционно для генерации ДК моноциты культивируют в присутствии гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) и интерлейкина-4 (ИЛ4-ДК) [166]. Нагруженные или трансфецированные вирусными антигенами ИЛ4-ДК продемонстрировали *in vitro* способность индуцировать HCV-специфический ответ Т-клеток как у здоровых доноров [100], так и пациентов с ХГС [41], однако оказались недостаточно эффективными для индукции устойчивого сильного иммунного ответа у пациентов при использовании в качестве лечебных вакцин [99]. Дифференцировка моноцитов в ДК индуцируется также при замене ИЛ-4 интерфероном- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ). Генерированные в присутствии GM-CSF и IFN- $\alpha$  ДК (ИФН-ДК) характеризуются частично зрелым фенотипом и обладают свойствами миелоидных, плазмацитоидных и натуральных киллерных клеток. Эти клетки отличаются от ИЛ4-ДК более стабильным (в отсутствие цитокинов) фенотипом, продуцируют интерферон- $\alpha$ , обладают более высокой миграционной активностью, а также

большой эффективностью к кросс-презентации длиннорамерных пептидов, стимуляции цитотоксических Т-клеток и экспансии Т-клеток памяти [57]. На иммунодефицитных мышях была продемонстрирована более высокая эффективность ИФН-ДК в индукции вирус-специфических CD8<sup>+</sup> Т клеток по сравнению с ИЛ4-ДК как *in vitro*, так и *in vivo* [87]. Тем не менее, способность ИФН-ДК индуцировать *in vitro* антигенспецифический клеточный ответ и усиливать HCV-специфический адаптивный иммунный ответ у пациентов с ХГС до настоящего времени не изучалась. Согласно полученным ранее данным ИФН-ДК больных ХГС обладают сохранной аллостимуляторной активностью и не отличаются от ДК доноров по продукции интерферона-гамма (IFN- $\gamma$ ), что свидетельствует об их возможном использовании в качестве клеточных вакцин [1]. Более того, вакцинотерапия с использованием ИФН-ДК показала хорошую переносимость и безопасность в пилотном клиническом исследовании при часто рецидивирующей герпетической инфекции [94]. Это позволяет полагать, что нагруженные HCV-антигенами ИФН-ДК способны активировать Т-хелперные клетки 1 типа (Th1 клетки) и индуцировать генерацию цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ). Согласно данным литературы структурные (Core) и неструктурные (NS3) белки содержат большое количество эпитопов, распознаваемых CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеткам [137], способных индуцировать Т-клеточный иммунный ответ, включая активацию Th1 клеток и генерацию ЦТЛ [63]. Учитывая, что полноразмерные HCV белки обладают иммуносупрессивной активностью [189], большой интерес представляет использование для загрузки ДК усеченных фрагментов белков или пептидов. На основании вышесказанного была сформулирована цель работы.

### **Цель исследования**

Изучить *in vitro* и *ex vivo* способность ИФН $\alpha$ -индуцированных дендритных клеток, нагруженных рекомбинантными белками Core (aa 1–120) и NS3 (aa 1192–1457) стимулировать антигенспецифический клеточный ответ.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи:**

1. Изучить влияние вирусных рекомбинантных белков, кодируемых усеченными фрагментами генов Core (1-120) и NS3 (1192 – 1457) HCV генотипа 1 на созревание и функциональную активность ИФН-ДК доноров.

2. Оценить способность ИФН-ДК, нагруженных рекомбинантным вирусными белками Core и NS3, индуцировать антигенспецифическую пролиферацию, продукцию Th1(IFN- $\gamma$ )/Th2 (IL-4, IL-6) цитокинов и дегрануляцию CD8<sup>+</sup> Т-клеток в культурах аутологичных МНК серонегативных доноров.

3. Исследовать способность ИФН-ДК, нагруженных рекомбинантными вирусными белками Core и NS3, индуцировать антигенспецифическую пролиферацию, продукцию Th1/Th2 цитокинов и дегрануляцию CD8<sup>+</sup> Т-клеток в культурах аутологичных МНК пациентов с хроническим гепатитом С.

4. Оценить параметры, характеризующие антигенспецифический ответ, митогенную реактивность, содержание регуляторных Т-клеток и вирусную нагрузку в динамике иммунотерапии дендритными клетками у больных хроническим вирусным гепатитом С.

5. Исследовать параметры иммунитета (HCV-специфического клеточного ответа, митогенной реактивности, содержания регуляторных Т-клеток) и вирусную нагрузку у больных вирусным гепатитом С в динамике ДК-вакцинаций в комбинации с противовирусной терапией интерфероном и рибавирином.

### **Научная новизна**

Впервые показано, что рекомбинантные белки, кодируемые усеченными фрагментами генов HCV Core (1-120) и NS3 (1192-1457) при краткосрочной инкубации с ИФН-ДК не проявляют цитотоксической активности и не оказывают ингибирующего действия на уровень экспрессии HLA-DR, CD80, CD25 и CD83, а также на способность ДК стимулировать пролиферацию и продукцию Th1 и Th2 цитокинов в культурах аллогенных Т-клеток. Установлено, что нагруженные Core и NS3 белками ИФН-ДК (ДК<sub>Core/NS3</sub>) серонегативных доноров индуцируют пролиферацию, продукцию IFN- $\gamma$  и активацию цитотоксических CD8<sup>+</sup> Т-клеток (в

тесте дегрануляции) в культурах аутологичных мононуклеарных клеток (МНК). ДК<sub>Core/NS3</sub> пациентов также обладают стимуляторной активностью и способны индуцировать HCV-специфические клеточные реакции в культурах аутологичных МНК. Показано, что вакцинация пациентов ДК<sub>Core/NS3</sub> приводит к возрастанию пролиферации, продукции IFN- $\gamma$  и дегрануляции CD8<sup>+</sup> Т-клеток в культурах МНК при стимуляции Core и NS3 белками, однако, не сопровождается активацией Th2 ответа и экспансией CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> регуляторных Т-клеток. Возрастание Core и NS3-специфической пролиферации и дегрануляции CD8<sup>+</sup> Т-клеток регистрируются после первого курса вакцинаций и более выражено при стимуляции Core. Усиление продукция IFN- $\gamma$  наблюдается после второго курса вакцинотерапии. При этом отмечается гетерогенность пациентов по типу и выраженности иммунного ответа. Установлено, что уровень NS3-специфической пролиферации и продукции IFN- $\gamma$  после иммунотерапии ДК обратно коррелируют с репликацией вируса, однако выраженное (на 1 порядок и более) и стойкое снижение вирусной нагрузки регистрируется только у 20% пациентов. Продемонстрировано, что противовирусная терапия интерфероном и рибавирином не ингибирует развитие ДК-индуцированного иммунного ответа.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Теоретическая значимость работы заключается в расширении знаний о влиянии HCV белков на ДК моноцитарного происхождения, генерированные в присутствии интерферона- $\alpha$ , в частности, об отсутствии ингибирующего эффекта рекомбинантных белков, кодируемых усеченными фрагментами генов Core (1-120) и NS3 (1192-1457) HCV генотипа 1, на созревание и функции ИФН-ДК. Полученные результаты также демонстрируют способность ИФН-ДК серонегативных доноров, нагруженных Core (1-120) и NS3 (1192-1457) белками, стимулировать *in vitro* первичный иммунный ответ, включающий пролиферацию наивных Т-клеток, индукцию Th1 ответа и активацию цитотоксических Т-клеток. Кроме того, данные о способности ДК<sub>Core/NS3</sub> пациентов индуцировать *in vitro* и *in vivo* HCV-специфический иммунный ответ свидетельствуют о сохранении антигенпрезентирующей и стимулирующей функций генерированных из



моноцитов ИФН-ДК при хронической HCV-инфекции. Продемонстрированная индивидуальная гетерогенность HCV-специфических ответов по типу клеточных реакций, их выраженности и устойчивости указывает на иммунопатогенетическую разнородность пациентов с хронической HCV-инфекцией. Выявление обратной взаимосвязи между репликацией вируса и NS3-индуцированным ответом свидетельствует о важной роли NS3-специфических Т-клеток в ограничении репликации вируса.

Значение работы в прикладном аспекте заключается в разработке нового метода иммунотерапии хронического гепатита С на основе ИФН-ДК (патент РФ № 2637631 «Способ иммунотерапии хронического вирусного гепатита С» и клинической апробации данного подхода (ClinicalTrials.gov NCT02309086). Показано, что иммунотерапия ДК в виде монотерапии не вызывает тяжелых нежелательных явлений или выраженных побочных эффектов и сопровождается индукцией/усилением антигенспецифических клеточных реакций. При этом комбинация ИФН-ДК с противовирусными препаратами позволяет добиться быстрого вирусологического ответа у большинства пациентов. Полученные данные используются при обучении клинических ординаторов НИИФКИ по специальности «аллергология и иммунология».

### **Методология и методы исследования**

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

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

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

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

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

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 4 глав собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения и выводов. Материал изложен на 138 страницах машинописного текста, включающего 17 таблиц и 21 рисунок. Работа выполнена на базе лаборатории клеточной иммунотерапии и отделения иммунологии клиники иммунопатологии НИИФКИ в рамках темы НИР 041 «Исследование молекулярно-клеточных основ регуляции иммунного ответа и разработка новых технологий в клеточной иммунотерапии онкологических, инфекционных и аутоиммунных заболеваний» и поискового научного исследования «Иммунотерапия с использованием аутологичных дендритно-клеточных вакцин в комплексном лечении больных хроническим вирусным гепатитом С».

### **Апробация работы**

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на: Всероссийской научно-практической конференции «V Конгресс Евро-Азиатского

общества по инфекционным болезням» (Новосибирск, 2018), на 15-ом международном симпозиуме по дендритным клеткам -15th International Symposium on Dendritic Cells.Forum on Vaccine Science ( 10 июня, 2018 г., г. Аахен, Германия). Апробация диссертации состоялась 28 июня 2018 г на семинаре клинического отдела ФГБНУ НИИ фундаментальной и клинической иммунологии. (протокол № 6 от 28 июня 2018 г.).

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 6 печатных работ, включая 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикации материалов диссертационных работ и 1 статью, индексируемую в базе WoS; получен 1 патент.

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

Достоверность полученных результатов подтверждается продуманным дизайном исследования, использованием современных иммунологических методов с автоматизированной оценкой результатов и адекватных методов статистической обработки. Основные положения работы доложены и обсуждены на 15-ом международном симпозиуме по дендритным клеткам (Германия, 2018 г.), V Конгрессе Евро-Азиатского общества по инфекционным болезням (Новосибирск, 2018 г.).

Автор участвовал в разработке идеи исследования и дизайна всех экспериментов. Результаты, представленные в работе, получены автором лично, либо при непосредственном его участии на базе лаборатории клеточной иммунотерапии НИИФКИ. Автор проводил выделение МНК из проб периферической крови условно-здоровых доноров и больных с хроническим вирусным гепатитом С, генерацию ДК из моноцитов, полученных путем адгезии на пластике, преинкубацию дендритных клеток с вирусными Core и NS3 белками, цитофлуориметрический анализ, иммуноферментный анализ. Автор лично участвовал в введении больных хроническим вирусным гепатитом С и заполнении медицинской документации на базе иммунологического отделения НИИФКИ. Автором проведена статистическая обработка результатов и

интерпретация экспериментальных данных. Подготовка основных публикаций по выполненной работе проведена при непосредственном участии автора.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Биологические характеристики вируса гепатита С

Вирус гепатита С (HCV), обнаруженный в 1989 г., принадлежит к роду *Hepacivirus*, семейства *Flaviviridae* и представляет одноцепочечную РНК, содержащую около 9400-9600 нуклеотидных остатков. Геном ВГС не транспортируется в ядро клетки, репликация происходит в эндоплазматическом ретикулуме инфицированного гепатоцита [39]. HCV характеризуется высокой генетической вариабельностью. Выделяют 7 генотипов вируса, которые отличаются нуклеотидной последовательностью на 33 %, и множество подтипов (квазивидов) в пределах одного генотипа, имеющие различия в порядке 11 % нуклеотидных остатков [155]. Такое генетическое разнообразие помогает вирусу избежать действия нейтрализующих антител. Вирус кодирует полипептид, который расщепляется протеазами на 3 структурных и 6 неструктурных белков. Структурные белки, включают гликопротеины оболочки E1 и E2, которые обеспечивает связывание вируса с клетками, и вирусный нуклеокапсидный белок Core, участвующий в формировании вирусной частицы. Неструктурные белки (NS2-NS5) включают 5 полипептидов (NS2-NS5), обладающих ферментативной активностью и участвующих в процессах репликации вируса. NS2 – проявляет активность цинк-зависимой протеазы; NS3 - сериновая протеазы, хеликазы и нуклеотидтрифосфатазы. Полипептид NS4a является кофактором для NS3 протеазы. NS5a определяет устойчивость клетки к интерферону. NS5b обладает активностью РНК-зависимой РНК-полимеразы [40]. Все вирусные белки содержат эпитопы, распознаваемые хелперными (CD4<sup>+</sup>) и цитотоксическими (CD8<sup>+</sup>) Т-клетками, а также В-лимфоцитами. При этом одним из самых

иммуногенных является Core-белок, содержащий большое количество консервативных эпитопов [23]. Острая HCV-инфекция у большинства инфицированных людей протекает бессимптомно [39] и лишь в 15-30% случаев заканчивается выздоровлением. Вирусная РНК определяется в крови уже на 1-2 недели после заражения и достигает пика виремии (до  $10^7$  копий/мл) через 6-10 недель [191]. При разрешении острой инфекции репликация вируса после достижения пика виремии быстро снижается. В то же время при исходе острой инфекции в хронизацию виремия снижается только до определенного уровня (что свидетельствует о частичном контроле над инфекцией), после чего снова возрастает и сохраняется повышенной. Исход HCV-инфекции предопределяется в течение первых 6 месяцев после инфицирования. Учитывая, что пик виремии приходится на 6-10 неделю, реакции врожденного иммунитета, которые развиваются в течение первых дней, не способны контролировать репликацию вируса [163]. В то же время пик вирусной нагрузки совпадает по времени с развитием реакций адаптивного Т-клеточного ответа, эффективность которого во многом определяет исход инфекции [152].

## **1.2. Адаптивный иммунный ответ против HCV-инфекции**

Адаптивный иммунный ответ включает гуморальные и клеточные реакции. Несмотря на то, что вирусная инфекция индуцирует образование HCV-нейтрализующих антител [14], гуморальный иммунный ответ не является решающим в элиминации вируса [93]. В то же время на сегодняшний день накоплено достаточное количество фактов, свидетельствующих о ключевой роли  $CD4^+$  и  $CD8^+$  вирус-специфических Т-клеток в детерминировании исхода HCV-инфекции. Так, спонтанное выздоровление при острой HCV-инфекции ассоциировано с выраженными и устойчивыми ответами  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-клеток,

распознающих множественные вирусные эпитопы [78], тогда как исход в хронизацию сопряжен со слабым преходящим ответом CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток, характеризующимся узкой антигенной специфичностью [161]. В последние годы активное изучение роли антигенспецифических CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток при HCV-инфекции позволило более глубоко осмыслить роль адаптивного иммунного ответа в элиминации вирусного гепатита С и контроле за вирусной репликацией.

Роль CD4<sup>+</sup> Т-клеток в противовирусной защите при HCV-инфекции убедительно продемонстрирована в исследованиях на экспериментальных животных. Деплеция CD4<sup>+</sup> Т-клеток при повторном заражении шимпанзе (с разрешившейся инфекцией после первичного инфицирования) приводит к персистенции вируса из-за несостоятельности ответа CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Это указывает на важную роль CD4<sup>+</sup> Т-клеток в генерации CD8<sup>+</sup> цитотоксических Т-клеток и объясняет персистенцию HCV-инфекции в отсутствие CD4<sup>+</sup> Т-хелперных клеток [55]. Значение CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов подтверждается исследованиями у пациентов с острым ВГС, демонстрирующими, что полиэпитопный антигенспецифический ответ CD4<sup>+</sup> Т-клеток, регистрируемый при острой HCV-инфекции, быстро исчезает после установления персистенции вируса [151]. Отсутствие или слабый ответ CD4<sup>+</sup> Т-клеток, проявляющийся снижением количества антигенспецифических CD4<sup>+</sup> Т-клеток, ингибацией их пролиферации и продукции Th1-цитокинов, характерен также для пациентов с ХГС [152]. С другой стороны, разрешение острой инфекции сопряжено с индукцией выраженного Th1- и Th17-ответа. Согласно современным представлениям, вирусспецифические CD4<sup>+</sup> Т-клетки не обладают прямым противовирусным эффектом, но способствуют генерации и усиливают эффекторную функцию антигенспецифических CD8<sup>+</sup> Т-клеток [170]. Одним из медиаторов, индуцирующих генерацию CD8<sup>+</sup> Т-клеток и их пролиферацию, является IL-2, вырабатываемый Th1-клетками [170]. Кроме того, большое значение в поддержании цитотоксического ответа отводится Th17-клеткам, продуцирующим IL-21. Разрешение острой инфекции сопряжено с возрастанием CD4<sup>+</sup> Т-клеток, продуцирующих IL-17 и IL-21, тогда как у пациентов с исходом в хронизацию

наблюдается потеря IL-21 – продуцирующих CD4<sup>+</sup> Т-клеток. Это обусловлено тем, что дефицит IL-21 приводит к усилению экспрессии Т-клетками коингибиторных молекул (Tim-3, PD-1 and CTLA-4), проводящих сигналы апоптоза, что способствует деплеции Т-клеток. Кроме того, снижение IL-21 продуцирующих Т-клеток неизбежно приводит к экспансии регуляторных Т-клеток (Treg) [73].

Ведущая роль в элиминации ВГС отводится CD8<sup>+</sup> ЦТЛ. Выраженная взаимосвязь между сильным полиэпитопным ответом CD8<sup>+</sup> Т-клеток и разрешением острой инфекции подтверждается данными нескольких исследований, продемонстрировавших сильную корреляцию между количеством вирус-специфических CD8<sup>+</sup> Т-клеток и элиминацией вируса [164]. Кроме того, имеется ряд других аргументов, свидетельствующих о значении вирус-специфических CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Так, деплеция Т-клеток памяти у шимпанзе при повторном инфицировании животных ВГС приводит к персистирующей репликации вируса, несмотря на присутствие CD4<sup>+</sup> Т-клеток памяти [138]. С другой стороны, восстановление жизнеспособности и эффекторных функций CD8<sup>+</sup> Т-клеток на ранней стадии острой инфекции на фоне терапии пегилированным IFN- $\alpha$  коррелирует с положительным вирусологическим ответом на данную терапию [8]. О роли CD8<sup>+</sup> Т-клеток свидетельствует также генетическая детерминированность к спонтанному выздоровлению, обусловленная экспрессией аллелей антигенов гистосовместимости I класса, связывающих иммунодоминантные ВГС-специфические эпитопы, распознаваемые CD8<sup>+</sup> Т-клетками [75, 138]. Ввиду отсутствия моделей HCV-инфекции на трансгенных мышах, механизмы противовирусной активности HCV-специфических CD8<sup>+</sup> Т-клеток до конца не ясны. Тем не менее, предполагается, что действие CD8<sup>+</sup> Т-клеток может быть связано как с прямым цитолитическим эффектом на инфицированные гепатоциты, так и опосредоваться нецитолитическим путем через продукцию IFN- $\gamma$ . Прямой цитотоксический эффект Т-клеток реализуется с вовлечением перфорина, Fas/FasL- и TNF-опосредованных путей [98]. Данный механизм цитотоксичности ЦТЛ напрямую



связан с гибелью печеночных клеток и индукцией воспаления в паренхиме печени. На возможность нецитолитической элиминации вируса указывают результаты исследований, демонстрирующие, что эффективная элиминация вируса у шимпанзе может достигаться в отсутствие значительного поражения печени [164]. Также следует отметить, что у пациентов с разрешившейся острой HCV-инфекцией ЦТЛ на ранних сроках характеризуются дефектной эффекторной функцией, которая восстанавливается на более поздней стадии острой инфекции [165]. В этот период HCV-специфические CD8<sup>+</sup> Т-клетки начинают продуцировать IFN- $\gamma$ , что совпадает с быстрым снижением вирусной нагрузки. Непосредственное участие продуцируемого CD8<sup>+</sup> Т-клетками IFN- $\gamma$  в подавлении репликации ВГС подтверждено в модели *in vitro* [67].

Важно отметить, что, несмотря на важную роль CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток в элиминации вируса, Т-клеточный ответ является критическим фактором, обуславливающим повреждение печени при HCV-инфекции [161]. Поскольку ВГС является нецитопатическим для инфицированных клеток, иммунному ответу отводится ключевая роль в патогенезе печеночного воспаления. Действительно, повреждение клеток печени при остром ВГС совпадает по времени с пиком развития адаптивного иммунного ответа [45]. Иммуносупрессивная терапия сопровождается нормализацией повышенного уровня трансаминаз, а ее отмена – усилением активности ВГС [58]. Наличие гепатита при ВГС-инфекции ассоциировано с инфильтрацией печени эффекторными иммунными клетками [97]. Миграция Т-клеток в печень индуцируется хемокинами (CXCL10, CXCL9 и CCL5), которые продуцируются инфицированными гепатоцитами и взаимодействуют с рецепторами CCR5 и CXCR3 на поверхности Т-клеток [88]. Снижение антигенспецифического ответа приводит к компенсаторному усилению продукции внутрипеченочных хемокинов, что сопровождается рекрутированием неспецифических CD8<sup>+</sup> Т-клеток и развитием воспалительной реакции в печени. Продукция провоспалительных цитокинов Т-клетками, инфильтрирующими печень, инициирует хроническое воспаление и способствует развитию фиброза [51].

### 1.3. Механизмы неэффективности антигенспецифических CD8<sup>+</sup>Т-клеток при HCV-инфекции

Несостоятельность антигенспецифического ответа CD8<sup>+</sup> Т-клеток наиболее характерна для хронической ВГС-инфекции с высокой репликацией вируса и проявляется ослаблением пролиферативной способности CD8<sup>+</sup> Т-клеток, снижением их цитотоксической активности, угнетением продукции IL-2 и IFN-γ [176], а также уменьшением количества и пролиферации CD8<sup>+</sup> Т-клеток памяти [156]. В настоящее время обсуждаются несколько возможных механизмов, обуславливающих дефектность антигенспецифического ответа CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Нарушение функций ЦТЛ может быть связано с дефицитом CD4<sup>+</sup> Т-хелперных клеток, необходимых для генерации и экспансии CD8<sup>+</sup> Т-клеток [152]. Однако в большей степени несостоятельность ЦТЛ связывают с нарушениями в самих CD8<sup>+</sup> Т-клетках, индуцированными так называемыми внутренними и внешними механизмами. К первым относят повышенную экспрессию на Т-клетках ингибиторных молекул, проводящих сигналы апоптоза и анергии [90], ко вторым – подавление функций CD8<sup>+</sup> Т-клеток со стороны регуляторных Т-клеток и иммуносупрессивных цитокинов [107]. Исследования последних лет показали, что Т-клетки пациентов с ХГС характеризуются повышенной экспрессией ингибиторных молекул Vim [89], 2B4 [16], PD-1 [52], CTLA-4 [114] и Tim3 [53]. При этом блокирование *in vitro* молекул PD-1 и CTLA-4 восстанавливает пролиферацию антигенспецифических CD8<sup>+</sup>Т-клеток и продукцию ими IFN-γ и IL-2 [114, 171]. К аналогичному результату приводит блокирование Tim-3, и этот эффект усиливался при одновременном блокировании молекул Tim-3 и PD-1 [53]. Выявление молекулярных мишеней, опосредующих выключение функций ЦТЛ, представляет большой интерес в плане разработки новых стратегий восстановления иммунного ответа при ХГС, основанных на блокировании коингибиторных молекул. Однако следствием такого подхода может стать

неконтролируемая Т-клеточная пролиферация, приводящая к развитию аутоиммунных и лимфопролиферативных заболеваний. Ввиду этого требуются дополнительные исследования в этом направлении.

Супрессорные механизмы подавления функций ЦТЛ при хронической HCV-инфекции опосредуются регуляторными Т-клетками и иммуносупрессивными цитокинами. Печень, будучи органом, в котором активно метаболизируются различные чужеродные антигены, характеризуется «толерогенным» микроокружением. Присутствующие в печени клетки Купфера конститутивно экспрессируют IL-10 и трансформирующий фактор роста- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), которые индуцируют состояние толерантности внутрипеченочных лимфоцитов [182]. В этом аспекте важно отметить, что IL-10 является предиктором хронизации HCV-инфекции, и блокирование TGF- $\beta$  приводит к увеличению продукции IFN- $\gamma$  антигенспецифическими CD8<sup>+</sup> Т-клетками больных с ХГС. Толерогенными свойствами, ассоциированными с незрелым фенотипом, обладают также локализованные в печени ДК [49]. Соответственно, в отличие от лимфоузлов, примирование наивных CD8<sup>+</sup> Т-клеток в печени приводит к генерации ЦТЛ с низкой жизнеспособностью и цитотоксической функцией [20]. У пациентов с ХГС в печени обнаружены IL10-продуцирующие CD8<sup>+</sup> Т-клетки, которые могут оказывать негативное влияние на антигенспецифические CD8<sup>+</sup> Т-клетки [97]. Кроме того, одним из главных источников IL-10 и TGF- $\beta$  являются регуляторные CD4<sup>+</sup> Т-клетки (Treg), способные подавлять пролиферацию Т-клеток и их цитокин-продуцирующую функцию либо непосредственно, либо через иммуносупрессивные цитокины [176]. Исследования на приматах показали, что при первичном введении инфицирующей дозы HCV индуцируется выраженный антигенспецифический ответ, а при повторном введении вируса отмечается экспансия Treg [121]. Treg обладают двойственной функцией при ХГС. С одной стороны, эти клетки защищают клетки печени от избыточного ответа CD8<sup>+</sup> Т-клеток, вызывающих внутрипеченочное воспаление. Так, у пациентов с нормальным уровнем трансаминаз и незначительным воспалением в печени регистрируется более высокое содержание Treg, чем у пациентов с

выраженным цитолитическим синдромом [18]. С другой стороны, Treg причастны к несостоятельности цитотоксических CD8<sup>+</sup> Т-клеток [107]. Дефектность CD8<sup>+</sup> Т-клеток у пациентов с ХГС сопряжена с повышенным содержанием Treg в периферической крови и печени [61], и эти клетки *in vitro* ингибируют пролиферацию HCV-специфических CD8<sup>+</sup> Т-клеток и продукцию ими IFN- $\gamma$  [17].

Другой важной причиной дефекта ЦТЛ при HCV-инфекции является прямое или опосредованное супрессивное действие вирусных антигенов. Например, взаимодействие Core белка с доменом рецептора gC1q на Т-клетках ингибирует активацию, пролиферацию и продукцию IL-2 Т-клетками [76], что приводит к подавлению генерации ЦТЛ и снижению их цитотоксической активности. Кроме того, подобно другим TLR2 лигандам, Core белок индуцирует генерацию и экспансию Treg, подавляющих пролиферацию и продукцию IFN- $\gamma$  Т-клетками [185]. Неполноценность ответа Т-клеток при ХГС может быть обусловлена иммуносупрессивным действием вирусных антигенов на ДК, которые являются профессиональными антиген-презентирующими клетками и активируют наивные CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетки [138]. Так, структурные (Core, E1) и неструктурные (NS3) белки подавляют дифференцировку ДК, усиливают продукцию IL-10 и снижают продукцию IL-12 в культурах ДК; ингибируют способность ДК стимулировать пролиферацию аллогенных Т-клеток; угнетают Th1- и усиливают Th2-стимулирующую активность ДК [35]. Указанные нарушения ДК снижают эффективность примирования Т-клеток [138].

Наконец, несостоятельность иммунного контроля со стороны CD8<sup>+</sup> Т-клеток может быть связана с генетической изменчивостью вируса, что создает предпосылки для его ускользания от иммунного надзора. Генетическая изменчивость HCV обусловлена высокой вариабельностью E1 и E2 белков вследствие частых замен аминокислотных остатков [83], а также появлением новых вариантов вируса (квазивидов) вследствие отсутствия корректирующей 3'-5'-экзонуклеазной активности NS5, что является причиной возникновения ошибок в процессе репликации РНК вируса [15]. У пациентов с ХГС вирусные мутации присутствуют в 50% всех эпитопов, распознаваемых ЦТЛ [79]. Причем появление

мутаций характерно именно для развития хронической инфекции, в то время как у пациентов с исходом в выздоровление такие мутации отсутствуют [162].

#### 1.4. Роль дендритных клеток в патогенезе вирусного гепатита С

##### *Субпопуляции дендритных клеток человека*

ДК представляют гетерогенную популяцию клеток, различающихся по локализации, происхождению и функциям. Костномозговые предшественники ДК, попадают в кровь и дают начало резидентным и циркулирующим ДК, подверженным впоследствии дифференцировке *in situ*. Резидентные ДК локализуются в лимфатической ткани, где они захватывают и презентуют Т-клеткам антигены, содержащиеся в крови и лимфе. ДК нелимфоидных тканей конститутивно мигрируют из тканей в лимфоузлы и презентуют Т-клеткам тканевые антигены. По происхождению выделяют миелоидные и плазмацитоидные ДК. Миелоидные или «обычные» (conventional) ДК (мДК) образуются из гранулоцитарно-макрофагального костномозгового предшественника и разделяются на две субпопуляции: мДК-1, экспрессирующие CD11c и BDCA-1, и мДК-2, несущие на своей поверхности CD141 и BDCA-3. Плазмацитоидные ДК (пДК) образуются из мультилимфоцитарного предшественника костного мозга и несут на своей поверхности BDCA-2 и BDCA-4 [29]. В периферической крови субпопуляция мДК-2 составляет 5–10% от общего пула циркулирующих ДК, тогда как на долю пДК и мДК-1 приходится 45%. Указанные субпопуляции также обнаруживаются в селезенке и миндалинах [19, 190]. ДК миелоидного происхождения могут также дифференцироваться из моноцитов. Такие ДК, названные «неклассическими» мДК или ДК моноцитарного происхождения (моДК), были описаны в тканях и лимфоидных органах в виде третьей субпопуляции CD11c<sup>+</sup>мДК, и первоначально обозначены как

интерстициальные ДК. МоДК более похожи на моноциты и макрофаги, чем мДК-1 и мДК-2, возникают из «классических»  $CD14^{++}CD16^{-}$  моноцитов, и их количество возрастает при инфекции и воспалении [29].

Исход инфекционного процесса во многом зависит от своевременного вовлечения ДК в иммунный ответ. ДК участвуют в противоинфекционном иммунном ответе с самого начала инфекционного процесса, и во многом определяют исход инфекции. Функции ДК сводятся к 1) распознаванию вирусных РНК и/или белков; 2) запуску продукции интерферонов, провоспалительных цитокинов и хемокинов; 3) активации NK-клеток; 4) презентации вирусных антигенов Т-клеткам; 5) запуску и регуляции адаптивного Т-клеточного ответа. Реализация этих функций осуществляется с вовлечением различных типов ДК. Так, пДК являются основными продуцентами интерферонов I типа [187]; классические мДК играют важную роль в антигенной презентации [69]; минорная популяция мДК-2 рассматривается в качестве важного источника продукции интерферона III типа (IFN- $\lambda$ ) [181].

Патогенные микроорганизмы характеризуются наличием молекулярных структур, получивших название патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (PAMPs), которые распознаются с помощью паттерн-распознающих рецепторов (PRRs). PRRs представлены несколькими семействами рецепторов и включают Toll-подобные рецепторы (TLRs), NOD-подобные рецепторы (NLRs), RIG-подобные рецепторы (RLRs) и лектиновые рецепторы C типа [3]. PRRs, экспрессируемые на ДК, являются сенсорами одноцепочечной (ssRNA) и двуцепочечной вирусной РНК (dsRNA), а также структурных и неструктурных вирусных белков [64, 95]. В эндосомальном компартменте полиуридиновые мотивы ssRNA и петли dsRNA распознаются соответственно TLR-3 и TLR-7/8 (Табл. 1).

Таблица 1

Рецепторы ДК, распознающие патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMPs) вируса гепатита С

Локализация	TLR							RLRs	NLRs
	Поверхность клетки					Эндосомальный компартмент		Цитоплазма	
PAMPs	TLR1	TLR2	TLR4	TLR5	TLR6	TLR7, TLR8	TLR3	RIG-1, MDA5	NLRP3
Core	+	+	+	-	-	-	-	-	-
NS3	-	+	+	+	+	-	-	-	-
NS5A	-	-	+	-	-	-	-	-	-
ssRNA	-	-	-	-	-	+	-	+	+
dsRNA	-	-	-	-	-	-	+	+	+

В цитоплазме dsRNA распознается RIG-подобными рецепторами RIG-I и MDA5. Запуск TLR- и RLR-сигнальных путей приводит к активации транскрипционных факторов IRFs, AP-1, NFκB и транскрипции генов воспалительного ответа и интерферонов. NLRs также активируются в присутствии вирусной РНК. В частности, NLR участвующий в формировании инфламсом, распознает dsRNA и ssRNA, и запуск NLRP3-сигнального пути активирует каспазу-1 и секрецию провоспалительного цитокина IL-1β [142]. Структурные и неструктурные HCV белки (Core, NS3, NS5A) также выступают в роли PAMPs и распознаются TLRs (TLR-1, -2, -4, -5 и -6). Так, TLR-2 и TLR-4, которые экспрессируются на мДК-1, являются сенсорами для Core/NS3 и NS5, соответственно.

Распознавание вирусных PAMPs паттерн-распознающими рецепторами ДК индуцирует продукцию интерферонов и провоспалительных цитокинов. Плазмацитоидные ДК распознают ssRNA через TLR-7, сигналинг через который повышает экспрессию HLA-DR и костимуляторных молекул (CD80, CD86),

активирует секрецию IFN- $\alpha/\beta$  и индуцирует Th1-стимулирующую активность ДК [160, 169]. Продуцируемый пДК IFN- $\alpha$ , в свою очередь, способен усиливать экспрессию МНС антигенов I/II класса и костимуляторных молекул на незрелых моДК и индуцировать продукцию IL-12 и TNF- $\alpha$  без усиления синтеза IL-10 [11]. Связывание вирусной РНК с TLR стимулирует также пДК к продукции IFN- $\lambda$  [158]. Однако ключевым источником IFN- $\lambda$ , играющим ведущую роль в подавлении вируса, являются мДК-2 [181]. Данный тип ДК характеризуется высокой экспрессией TLR-3 и низким уровнем TLR-7/9, и запуск секреции IFN- $\lambda$  индуцируется взаимодействием dsRNA с TLR-3 [186]. Субпопуляция мДК-2 при совместном культивировании с HCV-инфицированными гепатоцитами демонстрирует высокий уровень продукции IFN- $\lambda$ . ДК, активированные через TLR-3, -7 или -9 также секретируют IL-12 - цитокин, усиливающий дифференцировку Th1 и продукцию IFN- $\gamma$ . Распознавание различных структурных и неструктурных пептидов через TLR-2 активирует секрецию IL-10, который поддерживает дифференцировку Th2 [142].

Цитокины, продуцируемые ДК, способны активировать и усиливать функции НК-клеток, которые являются одними из самых ранних иммунных респондеров при HCV-инфекции. Противовирусная активность НК обусловлена различными механизмами. НК-клетки продуцируют IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$  и TNF- $\beta$ , которые усиливают экспрессию интерферон-стимулированных генов, подавляют вирусную репликацию, индуцируют созревание ДК, стимулируют продукцию хемокинов и рекрутирование иммунных клеток. Кроме того, НК способны лизировать инфицированные гепатоциты, а также защищать Т-клетки от состояния истощения [27, 39, 174]. Продуцируемые ДК IFN- $\alpha$ , IL-12 и IL-15 поддерживают активацию и выживаемость НК-клеток, а также стимулируют их цитотоксическую активность и продукцию IFN- $\gamma$ . ДК экспрессируют MICA/B, которые являются лигандами для NKG2D рецепторов НК клеток. Исследования *in vitro* показали, что контактное взаимодействие IFN- $\beta$ -стимулированных моДК с НК -клетками усиливает способность последних продуцировать IFN- $\gamma$  и их цитотоксичность [65, 142].



Известно, что важную роль в элиминации вируса играет адаптивный Т-клеточный ответ. Исследования на шимпанзе и у пациентов со статусом выздоровления после острой HCV-инфекции показывают, что элиминация вируса ассоциирована с сильным продолжительным мультиэпитопным ответом CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток [115]. Несмотря на высокую вариабельность вирусного генома, вирус экспрессирует ряд высоко консервативных структурных и неструктурных белков, содержащих HCV-специфические эпитопы, распознаваемые CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т клетками [137].

ДК играют ведущую роль в инициации противовирусного ответа. Незрелые ДК не способны эффективно активировать Т-клетки, но обладают высокой эндоцитарной активностью. После контакта с патогеном ДК созревают и мигрируют в ближайшие лимфоузлы, где презентуют антиген Т-клеткам. Созревание ДК является критическим моментом для презентации антигена, поскольку на этом этапе происходит усиление экспрессии антигенов МНС и костимуляторных молекул, а также продукции цитокинов, необходимых для активации и дифференцировки наивных Т-клеток [85].

ДК являются наиболее «профессиональными» антиген-презентирующими клетками. Благодаря высокой экспрессии антигенов гистосовместимости I и II класса (МНС-II и МНС-I) и костимуляторных молекул, медленной внутриклеточной деградации патогена и длительной презентации антигенных пептидов на клеточной мембране ДК превышают активность других антиген-презентирующих клеток и способны презентовать антигены наивным Т-клеткам [10]. Учитывая также способность ДК продуцировать хемокины и иммунорегуляторные цитокины, детерминирующие тип рекрутируемых Т-клеток и направленность их дифференцировки в Th1, Th2 или цитотоксические Т-клетки [132], очевидно, что ДК играют ключевую роль в индукции и регуляции адаптивного иммунного ответа.

Практически все типы ДК способны поглощать экзогенные вирусные антигены, которые высвобождаются из погибших гепатоцитов. Захваченные ДК HCV-белки подвергаются расщеплению в эндосомах или лизосомах, связываются

в везикулах с МНС-II и транспортируются на поверхность клетки. Анализ Т-клеток памяти у реконвалесцентов после HCV-инфекции позволил выявить от 4 до 14 эпитопов CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов в составе Core, NS3, NS4 и NS5 белков. Также показано, что одним из доминантных белков, индуцирующих ответ CD4<sup>+</sup>Т-клеток, является NS3 [152]. Характерно, что более низкая частота и выраженность HCV-специфического пролиферативного ответа CD4<sup>+</sup> Т-клеток у больных ХГС в сравнении с реконвалесцентами ассоциирована со снижением количества ДК в периферической крови и их стимуляторной активности [31].

Эндогенные, т.е. синтезируемые в ДК вирусные белки, процессируются в цитоплазме протеосомами, после чего комплексы пептид-МНС-I класса перемещаются на поверхность клетки и распознаются CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитами. Способность HCV инфицировать ДК очень низкая. Проникновение вируса в клетку осуществляется путем взаимодействия оболочечных белков E1 и E2 с лектиновыми рецепторами с-типа DC-SIGN и L-SIGN [104]. Однако в отсутствие выраженной вирусной репликации синтеза вирусных белков не происходит, что делает неэффективной прямую презентацию эндогенных вирусных белков CD8<sup>+</sup> Т-клеткам инфицированными ДК. Тем не менее, презентация вирусных антигенов CD8<sup>+</sup> Т лимфоцитам происходит, что подтверждается выявлением значительного количества примированных CD8<sup>+</sup>Т-клеток у реконвалесцентов [92]. Данный процесс получил название кросс-презентации. В этом случае экзогенные вирусные белки презентуются CD8<sup>+</sup> Т-клеткам в комплексе с МНС-I [129]. Сборка молекул МНС-I происходит в эндоплазматическом ретикулуме, куда попадают прошедшие процессинг вирусные пептиды. Процессинг антигенов при кросс-презентации может происходить в цитозоле и вакуолях. В первом случае вирусные белки процессируются в протеосоме, после чего транспортируются в эндоплазматический ретикулум. Во втором случае антигены расщепляются и связываются с МНС-I в эндосомах [68].

Презентация вирусных белков и примирование CD8<sup>+</sup> Т-клеток при HCV-инфекции характеризуется низкой эффективностью, поскольку вирус попадает в организм нелимфотропным путем; размножается в печени, не являющейся местом

примирования; не реплицируется в ДК; является нецитопатическим, что ограничивает поступление экзогенных кросс-презентируемых антигенов [62]. Соответственно, слабая антигенная презентация и примирование CD8<sup>+</sup> Т клеток способствуют хронизации HCV инфекции.

Использование HCV вирусоподобных частиц (HCV-LPs) для изучения захвата, интернализации вируса и презентации антигенов *in vitro* показало, что способность к презентации вирусных пептидов свойственна преимущественно незрелым миелоидным ДК. Взаимодействие HCV-LP с незрелыми мДК приводило к усилению экспрессии костимуляторных молекул и индукции сильного HCV-специфического ответа CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток [13]. Экзогенные вирусные белки могут захватываться всеми типами ДК, однако наибольшей способностью к кросс-презентации обладают миелоидные ДК [19]. Guo Z. с соавт. показали, что мДК, нагруженные HLA-A2-рестриктированными пептидами (в составе E2 и NS3-NS5 белков) индуцировали *in vitro* генерацию эпитоп-специфических цитотоксических Т-клеток у пациентов с HCV-инфекцией (реконвалесцентов и больных ХГС) [59]. Схожие данные были получены Mishra S. с соавт., которые синтезировали высоко консервативные HLA-A2-рестриктированные HCV эпитопы и HLA-DRB1-рестриктированные иммуногенные последовательности (ICS) и продемонстрировали способность ДК при нагрузке указанными пептидами индуцировать специфический ответ наивных Т-клеток доноров, который проявлялся увеличением числа IFN- $\gamma$ -продуцирующих Т-клеток [108]. Первоначально наиболее высокая кросс-презентирующая активность приписывалась CD11c<sup>+</sup>CD141<sup>+</sup> мДК-2, являющимся гомологами мышинных CD8<sup>+</sup> ДК [7]. Тем не менее, более поздние исследования показали, что кросс-презентация является общим свойством ДК человека (мДК, а также мДК и пДК периферической крови). Более того, пДК также обладают способностью презентировать экзогенные антигены в комплексе с МНС-I [17, 116]. Тем не менее, вопрос о роли пДК в кросс-презентации HCV-белков остается открытым.

Поскольку заражение HCV протекает бессимптомно, и клинические проявления инфекции отмечаются лишь у небольшой части пациентов, [144],

возможности исследования ДК в этом периоде весьма ограничены [37]. Содержание мДК в крови пациентов с острым вирусным гепатитом С по данным разных авторов либо не изменено [124], либо снижено [123]. Сообщается также о нарушении дифференцировки и созревания моДК, что проявляется повышенной экспрессией CD14 и сниженной экспрессией CD1a, CD86 и CD83 на незрелых моДК и уменьшением экспрессии CD86 и HLA-DR на зрелых моДК [60]. При этом между количеством/функциями мДК и исходом выявляется взаимосвязь. Так, разрешение инфекции ассоциировано с возрастанием к 6-месячному периоду после инфицирования циркулирующих мДК, тогда как при хронизации инфекции этого не происходит [124]. Кроме того, мДК у пациентов с разрешением инфекции продуцируют более высокие уровни TNF- $\alpha$  при стимуляции ЛПС [123]. Исследования пДК при остром вирусном гепатите С свидетельствуют об уменьшении их количества в периферической крови, а также о незрелом фенотипе, что проявляется низкой экспрессией HLA-DR и хемокинового рецептора CCR7. Кроме того, пДК отличаются сниженной продукцией IFN- $\alpha$  [169]. Данные о взаимосвязи между содержанием пДК и исходом инфекции неоднозначны. Szabo G. с соавт. выявили выраженное снижение количества пДК и продукции ими IFN- $\alpha$  как у пациентов с исходом в хронизацию, так и с выздоровлением [158]. С другой стороны, гиперреактивность ДК на стимуляцию ssRNA, свойственная исходно всем пациентам, была устойчивой только у пациентов с разрешением инфекции [123]. В целом, данные об изменениях количества/функции ДК у пациентов с острым гепатитом С и сопряженности этих нарушений с клиническими исходами свидетельствуют о вовлечении ДК на самых ранних стадиях HCV-инфекции и их возможной роли в развитии адаптивного иммунного ответа, обеспечивающего элиминацию вируса.

#### ***Характеристика ДК при хронической HCV-инфекции***

Свойства ДК у больных ХГС изучены гораздо лучше, чем при острой HCV-инфекции (Табл. 2). Значительная часть этих исследований посвящена анализу моДК и популяциям ДК периферической крови (мДК и пДК). В литературе встречаются единичные сообщения о сохранности функций циркулирующих ДК

при хронической HCV-инфекции [103]. Тем не менее, большинство авторов считают, что ДК пациентов с ХГС отличаются от ДК здоровых доноров [140].

Таблица 2

## Характеристика ДК при хронической HCV-инфекции

Тип ДК	Ссылки
Миелоидные ДК (мДК)	
Количество не изменено	[103]
Количество снижено	[31, 62, 71, 113, 177]
Нарушение созревания	[31]
↓ продукция IL-12 и/или TNF-α	[5, 31, 61, 71, 109]
↓ аллостимуляторная активность	[71, 82, 113, 154]
↓ Th1-стимулирующая активность	[71, 72, 113]
↑ экспрессия PD-1L	[154]
↑ продукция IL-10	[31]
↑ индукция IL-10-секретирующих Т-клеток	[36, 71, 72]
↑ стимуляция пролиферации CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> Т-клеток	[36]
Количество мДК обратно коррелирует с АЛТ	[84, 177]
Продукция IL-12 мДК прямо коррелирует с количеством HCV-специфических Т-клеток	[5]
Th1 ответ прямо и обратно коррелирует с количеством IL-12 <sup>+</sup> и IL-10 <sup>+</sup> мДК соответственно	[31]
Плазмацитоидные ДК (пДК)	
Количество не изменено	[103]
Количество снижено	[31, 71, 86, 95, 113, 157, 177]
Продукция IFN-α не изменена	[69, 103, 127]
↓ продукция IFN-α	[5, 71, 113, 127, 157]
↓ аллостимуляторная активность	[71, 113, 140, 154]
↓ Th1-стимулирующая активность	[71, 97, 180]

↑ экспрессия PD-1L	[154]
↑ индукция IL-10-секретирующих Т-клеток	[71, 72]
Количество пДК прямо коррелирует с продукцией IFN-α	[177]
ДК, генерированные из моноцитов крови (моДК)	
Созревание не нарушено	[103, 127]
Нарушение созревания	[56]
Продукция цитокинов не нарушена	[11, 127]
↓ продукция IL-12 и/или провоспалительных цитокинов	[5, 44]
↓ продукция IFN-α при стимуляции ролу(I:C)	[140]
Аллостимуляторная активность не нарушена	[44, 103, 127]
↓ аллостимуляторная активность	[9, 42, 70, 157]
Стимуляция антиген-специфических Т-клеток не нарушена	[11, 56, 102]
↓ Th1-стимулирующая активность	[36, 125]
↑ продукция IL-10	[56]
↑ индукция IL-10-секретирующих Т-клеток	[36]
↑ стимуляция пролиферации CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> Т-клеток	[36]

**Примечание:** здесь и в Таблице 3 ↑ – увеличение; ↓ – снижение

Несмотря на некоторые разночтения в отношении того, какой тип ДК в циркуляции снижен – мДК, пДК или оба – большинство исследований демонстрирует снижение количества ДК в периферической крови [31, 71, 113, 177]. Количество циркулирующих ДК по данным ряда авторов зависит от активности гепатита. В частности, содержание мДК обратно коррелирует с уровнем АЛТ [84, 177], что может быть обусловлено компартиментализацией ДК в печени у пациентов с высокой активностью гепатита. При этом важно подчеркнуть, что количество IL-12- продуцирующих ДК прямо коррелирует с Th1-ответом, а содержание пДК коррелирует с уровнем продукции IFN-α [177].

Наряду с количественными изменениями ДК больных ХГС характеризуются функциональными нарушениями. Для мДК это проявляется

задержкой созревания [31], сниженной продукцией IL-12 и TNF- $\alpha$  и повышенной секрецией IL-10 [5, 31, 109]. Кроме того, мДК больных ХГС отличаются более низкой аллостимуляторной активностью и способностью стимулировать Th1-ответ [71, 72, 113, 154], но при этом индуцируют пролиферацию регуляторных CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Т-клеток и экспансию IL-10-секретирующих Т-клеток в алло-СКЛ [36].

Для пДК, противовирусная активность которых во многом связана с продукцией IFN- $\alpha$ , показано снижение секреции IFN- $\alpha$  циркулирующими пДК [31, 32, 71, 72, 157, 177]. Однако по данным других авторов способность пДК больных ХГС синтезировать IFN- $\alpha$  не нарушена [103, 127]. Циркулирующие пДК при ХГС характеризуются низкой аллостимуляторной активностью и способностью активировать Th1 ответ [71, 72, 113, 180]. Имеются данные о повышенной экспрессии этими клетками PD-1L [154], являющегося лигандом ингибиторной молекулы PD-1 на Т-лимфоцитах. Плазматоидные ДК, так же, как и мДК способны активировать IL-10-секретирующие CD4<sup>+</sup> Т клетки [72].

Данные, характеризующие моДК у больных ХГС, более противоречивы. С одной стороны показано нарушение созревания моДК [56]; возрастание экспрессии на них PD-1L [36]; снижение продукции Th1/провоспалительных цитокинов и IFN- $\alpha$ , и усиление секреции IL-10 [44, 56, 140]; снижение аллостимуляторной активности [9, 70, 157] и способности активировать Th1 ответ [125]; усиление способности стимулировать пролиферацию регуляторных CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Т-клеток и экспансию IL-10-секретирующих Т-клеток в алло-СКЛ [36]. При этом, несмотря на схожесть дефектов моДК и мДК периферической крови, моДК отличаются от мДК менее эффективным ответом на факторы созревания, в частности сохраняют частично незрелый фенотип после стимуляции ЛПС [6].

С другой стороны, многие авторы не обнаруживают этих изменений со стороны моДК. Riccioli D. с соавт. показали, что незрелые моДК обладают сохранной аллостимуляторной активностью, а также способностью к созреванию и продукции TNF- $\alpha$  в ответ на стимуляцию ЛПС [127]. Схожие результаты о

сохранной способности моДК стимулировать пролиферацию CD4<sup>+</sup>T-клеток в алло-СКЛ получены Fan Z. с соавт [44]. Barnes E с соавт. не выявили различий моДК больных ХГС и здоровых доноров в экспрессии поверхностных маркеров, продукции IL-10 и IL-12p70, аллостимуляторной активности и способности зрелых моДК индуцировать экспансию антиген-специфических CD8<sup>+</sup>T-клеток [11]. Сохранный фенотип зрелых моДК и способность стимулировать пролиферацию аллогенных Т-лимфоцитов, а также индуцировать специфические к антигенам вируса гриппа Т-клетки памяти показаны в исследованиях Longman RS с соавт [102]. Аналогичные данные получены Canaday D.H. с соавт., которые продемонстрировали сохранную антигенпрезентирующую функцию моДК у пациентов с хронической HCV-инфекцией [25]. Возможно, одной из причин имеющихся расхождений является предлеченность пациентов рибавирином и интерфероном- $\alpha$ , которые характеризуется иммуномодулирующим эффектом и могут влиять на функции ДК [12].

Функции ДК во многом определяются балансом костимуляторных и коингибиторных молекул и спектром продуцируемых цитокинов, что ассоциировано со зрелостью ДК. Повышенная экспрессия на ДК антиген-презентирующих и костимуляторных молекул (HLA-DR, CD80, CD86, CD40, OX40L) и секреция провоспалительных цитокинов (IL-12, TNF- $\alpha$ ) способствует Т-клеточной активации, тогда как экспрессия коингибиторных молекул (PD-L1, CTLA-4, IDO) и синтез супрессорных цитокинов (IL-10) индуцирует Т-клеточную толерантность [10].

Механизмы нарушений ДК при HCV-инфекции окончательно не выяснены. Тем не менее, многие дефекты связывают с ингибирующим действием HCV белков. Показано, что структурные и неструктурные HCV белки (Core, NS3, NS4, NS5) при добавлении в культуры моДК (или их трансфекции) ингибируют дифференцировку и индуцируют экспрессию PD-1L, подавляют продукцию IL-12 и усиливают секрецию IL-10, угнетают аллостимуляторную активность ДК и их способность активировать Th1 ответ [21, 34, 149, 168, 175]. Присутствие HCV вируса (генотип 1a, клон H77 или 2a, клон JFH1) в культурах моДК также



вызывает нарушение созревания, усиление продукции IL-10, и подавление способности стимулировать антиген-специфический ответ CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Причем в этом случае нарушение функции ДК не связано с репликацией вируса и экспрессией ДК вирусных белков [143].

Влияние HCV белков на функциональную активность ДК опосредуется с вовлечением различных механизмов (Табл. 3), включая нарушение экспрессии костимуляторных и антиген-презентирующих молекул, блокирование TLR-сигнальных путей и ядерной транслокации NFκB, подавление продукции IL-12, а также активация коингибиторных факторов (PD-1L, IL-10, IDO) [82, 142]. Так, взаимодействие HCV Core с gC1q рецептором на моДК активирует фосфатидилинозитол-3-киназный (PI3K) путь, что приводит к снижению TLR4-индуцированной продукции IL-12 и, соответственно, подавлению Th1-стимулирующей активности ДК [175]

Кроме того, экзогенный HCV Core белок активирует транскрипционный фактор STAT3, который является ингибитором воспалительного ответа ДК. Core-индуцированная активация STAT3 осуществляется с вовлечением PI3K/Akt сигнального пути, аутокринной продукции IL-6 и подавляет активацию ДК, что в свою очередь обуславливает нарушение противовирусного Т-клеточного ответа [159].

**Таблица 3**

Механизмы функциональных нарушений ДК при HCV-инфекции

Механизмы	Дисфункции ДК	Ссылки
Активация PI3K	↓ IL-12 и Th1-стимулирующей активности	[159, 175]
↓ ядерной транслокации NF-κB	Нарушение функций ДК	[48, 82]
Нарушение TRIF и IPS-1 сигнальных путей	↓IL-12 и TNF-α; индукция состояния истощения CD8 Т-клеток	[134]

↓ костимуляторных молекул	↓ аллостимуляторной активности	[82, 130]
↑ PD-L1	Индукция Т-клеточного истощения	[154, 170]
↑ IDO	Индукция толерогенного фенотипа	[150]
↑ SOCS3	Нарушение созревания и индукция толерогенного фенотипа	[101, 130]

При этом усиление продукции IL-6 может являться причиной активации Th17клеток [168]. Активация STAT3 помимо нарушения дифференцировки ДК может приводить к генерации миелоидных супрессорных клеток, также ингибирующих Т-клеточный ответ [28].

NS3/4A HCV-белки, обладая протеазной активностью, способны расщеплять адапторные молекулы TRIF и IPS-1 и ингибировать проведение сигнала, соответственно, через TLR-3 и RIG-I рецепторы, что приводит к угнетению продукции провоспалительных цитокинов (IL-12 и TNF- $\alpha$ ). Взаимодействие таких ДК с Т-лимфоцитами вызывает нарушение функций HCV-специфических CD8<sup>+</sup> Т клеток в виде снижения продукции IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$  и экспрессии дегрануляционного маркера CD107a, обуславливая развитие феномена Т-клеточного истощения [134].

Подавление функций ДК под действием вирусных белков обусловлено снижением костимуляторных молекул и активацией генов, причастных к толерогенному фенотипу ДК. Так, Core и NS5 на этапе ЛПС-индуцированного созревания мДК ингибируют экспрессию HLA-DR, CD83, CD80 и CD86, но при этом усиливают экспрессию PD-L1 и индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO) [130, 171]. PD-L1 является коингибиторной молекулой, которая, взаимодействуя с PD-1 рецептором на Т-клетках, вызывает апоптоз/анергию Т-лимфоцитов [50]. Действительно, экспрессия PD-L1 и соотношение PD-L1/CD86 на ДК больных ХГС обратно коррелирует с их аллостимуляторной активностью [154]. Толерогенные свойства мДК при ХГС могут быть также связаны с повышенной

экспрессией IDO, метаболизирующей триптофан. Дефицит триптофана и появление его токсичных метаболитов приводит к подавлению пролиферации Т-клеток и повышает их чувствительность к апоптозу [43]. Повышенная экспрессия моноцитами и моДК IDO характерна для пациентов с ХГС и ассоциируется с повышенным индексом соотношением кинуренина/триптофана в сыворотке крови и нарушенным созреванием моДК *in vitro*. При этом блокирование активности IDO 1-метил триптофаном восстанавливает способность моДК к созреванию [150]. Кроме того, взаимодействие вирусных белков с ДК активирует белок SOCS3 [130]. Данный белок блокирует цитокин-индуцированный JAK-STAT – сигнальный путь [81], что приводит к нарушению созревания ДК и индукции толерогенного фенотипа [101].

### **1.5. Терапевтический потенциал ДК-вакцин в лечении HCV-инфекции**

Сниженная способность Т-клеток отвечать на стимуляцию HCV антигенами, свидетельствующая о нарушении адаптивного иммунного ответа, рассматривается в качестве одного из ведущих факторов хронизации HCV-инфекции. Поскольку запуск антиген-специфического Т-клеточного ответа непосредственно зависит от ДК, снижение их количества в циркуляции и нарушение функций в результате воздействия вируса/или вирусных белков, а также иммуносупрессивное микроокружение печени, может являться важной причиной несостоятельности иммунного ответа и персистенции вируса. Соответственно, использование ДК, нагруженных вирусными антигенами, для индукции или усиления адаптивного противовирусного иммунитета обсуждается в качестве новой стратегии в комплексном лечении хронической HCV-инфекции. В этом случае в качестве источника ДК предлагается использовать ДК, генерируемые из моноцитов, которые очень схожи с мДК периферической крови.

Способность моДК здоровых доноров индуцировать *in vitro* HCV-специфический Т-клеточный ответ была впервые продемонстрирована Li W. с соавт., которые использовали ДК трансфицированные HCV Core и NS3 генами [99]. На выборке трех репрезентативных доноров было показано, что незрелые Core- и NS3-экспрессирующие ДК активировали в Т-клетках экспрессию мРНК TNF- $\alpha$ , IL-2 и IL-4, а зрелые ДК - экспрессию IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL12-p40, IL-6, IL-10 и в меньшей степени IL-4. Авторы также продемонстрировали индукцию антигенспецифического пролиферативного ответа, который выявлялся у всех трех доноров и был выше при стимуляции Core; а также усиление продукции IFN- $\gamma$ , выявленное у двух доноров [82, 99].

МоДК больных ХГС также были способны индуцировать *in vitro* HCV-специфический ответ. Так, Echeverria I. с соавт. в группе 4 репрезентативных пациентов показали, что моДК, трансфицированные NS3 и адаптерной молекулой CFh40L (экто-домен CD40L), стимулируют NS3-специфический ответ аутологичных Т-клеток, оцениваемый по количеству IFN- $\gamma$  продуцирующих клеток в ELISPOT тесте. Однако в отсутствие адаптерной молекулы ДК пациентов не оказывали стимулирующего эффекта, что, по мнению авторов, было обусловлено снижением стимуляторной активности ДК у больных ХГС и ее восстановлением после трансфекции CFh40L. Чтобы исключить неспецифический ответ на антигены трансфицированного аденовируса, авторы также оценили продукцию IFN- $\gamma$  в ответ на стимуляцию пептидами NS3 белка во вторичных культурах Т-клеток, подверженных экспансии с помощью IL-2, и продемонстрировали возрастание IFN- $\gamma$  у двух из четырех пациентов [41].

Более поздние исследования подтвердили способность моДК, нагруженных иммуногенными HCV пептидами, активировать Th1 ответ и индуцировать генерацию эпитоп-специфических цитотоксических Т-клеток [59, 108].

Возможность использования ДК в качестве терапевтических вакцин была также проанализирована в двух клинических исследованиях [54, 183]. В первом Gowans E.J. с соавт. оценили безопасность и эффективность аутологичных ДК нагруженных HLA-A2.1 рестриктированными HCV-специфическими

липopeптидами (эпитопы цитотоксических Т-клеток, связанные с липидным фрагментом) у 6 больных ХГС [54]. Во втором - Zabaleta A. с соавт. исследовали безопасность и эффективность вакцины на основе моДК, трансфецированными аденовирусом, кодирующим NS3 (AdNS3) и адаптерной молекулой CFh40L [183]. В обоих исследованиях вакцинация ДК не вызывала тяжелых нежелательных явлений и возрастания в сыворотке крови трансаминаз, отражающих активность воспалительного процесса. Однако индуцированный иммунный ответ был преходящим и недостаточно выраженным для подавления вирусной репликации. В исследованиях Gowans E.J. с соавт. значимое возрастание Core-специфических IFN- $\gamma$  секретирующих клеток (в ELISPOT тесте) выявлялось у 4 из 6 пациентов, а возрастание NS3-специфических IFN- $\gamma$  секретирующих клеток – только у одного, но эти ответы были преходящими [54]. Аналогичным образом, вакцинация с использованием моДК, нагруженных AdNS3/ CFh40L, приводила к увеличению числа IFN- $\gamma$  секретирующих Т-клеток в ответ на стимуляцию рекомбинантным NS3 только у одного из 5 пациентов. Ответ цитотоксических Т-клеток в виде прироста CD8<sup>+</sup>CD107a<sup>+</sup> Т-лимфоцитов наблюдался у всех пациентов, но был недостаточно выраженным и неустойчивым [183]. Причинами слабого иммунного ответа в первом исследовании могли быть внутривенный путь введения ДК, недостаточное (для запуска мультиспецифичного ответа) количество используемых Т-клеточных эпитопов, а также низкие дозы ДК. Во втором исследовании авторы связали неэффективность индукции иммунного ответа с повышенной продукцией ДК IL-10 в результате трансфекции AdNS3, что приводило к активации IL-10–продуцирующих Т-клеток. Очевидно, что создание терапевтических анти-HCV ДК-вакцин требует дальнейших исследований с определением оптимальных параметров в отношении доз ДК, источников антигенов для нагрузки ДК, путей введения ДК и адьювантной терапии.

## **1.6. Характеристика интерферон- $\alpha$ -индуцированных дендритных клеток (ИФН-ДК)**

Использование ДК в качестве лечебных клеточных вакцин при инфекционных заболеваниях привлекает в последнее время все большее внимание. Внедрению таких подходов в клиническую практику во многом способствует разработка методов генерации ДК *in vitro* из CD14<sup>+</sup>-моноцитов периферической крови ДК [128]. Чаще всего для этого применяется протокол генерации с использованием гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) и IL-4 [136]. Полученные в данном стандартном протоколе незрелые ДК обладают высокой способностью к захвату антигена, однако не способны индуцировать эффективный Т-клеточный ответ. При воздействии стимулов созревания (TNF- $\alpha$ , IL-1, ЛПС, CD40-лиганд) ДК дифференцируются в зрелые клетки с высокой иммуностимулирующей способностью [135]. Несмотря на то, что такой протокол генерации позволяет получить ДК с высокой антигенпрезентирующей способностью, функциональный потенциал этих клеток может быть неполноценным. Высокое содержание в культуре IL-4 подавляет экспрессию молекул адгезии и хемотаксических агентов и приводит к нарушению миграционной активности ДК [167]. Ранее было показано, что ДК, генерированные из моноцитов в присутствии GM-CSF и интерферон- $\alpha$  (ИФН-ДК) по сравнению с традиционно генерируемыми ДК (которые получают в присутствии GM-CSF и IL-4) характеризуются более высокой миграционной активностью, более эффективно стимулируют пролиферацию цитотоксических Т-клеток и способны продуцировать IFN- $\alpha$ , который влияет на функциональную активность моноцитов через классический гетеродимерный рецептор, включающий рецептор-ассоциированную тирозинкиназу, тирозинкиназу I типа и тирозинкиназу II типа [110, 122, 148]. Эти киназы включают сигнал трансдукции и активации— STAT-1 и STAT-4. Взаимодействие этих факторов индуцирует дифференцировку моноцитов периферической крови в сторону полноценных антигенпрезентирующих ДК. Продукция IFN- $\alpha$  резко возрастает при вирусных инфекциях [32]. Выявлено, что активация системы интерферонов является самым ранним и важным пусковым механизмом для индукции созревания ДК в ответ на внедрение вирусных

патогенов [147]. Поэтому, генерация ДК из моноцитов в присутствии IFN- $\alpha$  является более физиологичной, чем с IL-4.

Клиническая апробация ИФН-ДК, нагруженных рекомбинантным гликопротеином D вируса простого герпеса у пациентов с рецидивирующей герпес-вирусной инфекцией показала хорошие результаты терапии и способность ИФН-ДК индуцировать продолжительный Т-клеточный иммунный ответ [94].

Культивирование МНК с GM-CSF и IFN- $\alpha$  в течение 3-х суток приводит к потере способности клеток прилипать к пластику. Моноциты дифференцируются в ДК со свойственной им морфологией и фенотипическими свойствами. Причем интактные (т.е. не активированные ЛПС) ИФН-ДК обладают более зрелым фенотипом и морфологией, чем ИЛ4-ДК [145, 148]. Созревание ДК сопровождается усилением экспрессии МНСI и МНСII, костимуляторных молекул CD80 и CD86 вместе с CD40-лигандом и молекулой адгезии ICAM-1 (CD54) [32, 120]. В литературе фенотип ИФН-ДК характеризуют как промежуточные по степени зрелости ДК с относительно высоким уровнем экспрессии молекул активации, таких как CD25 и CD83. ИФН-ДК практически не несут на своей поверхности молекулу CD1a. Характерно, что низкая экспрессия этого маркера не влияет на антигенпрезентирующую функцию, но ассоциирована с низкой продукцией IL-12 p70 [120, 147]. Несмотря на то, что ИФН-ДК продуцируют низкие уровни IL-12p70, который активирует Th1-поляризацию, индукция Th1-цитокинов поддерживается большим количеством синтезируемого IFN- $\alpha$  [32, 112]. Показано, что ИФН-ДК способны поляризовать дифференцировку Т-лимфоцитов в сторону Th1 ответа [112, 133]. Незрелые ИФН-ДК высоко экспрессируют PAMPs. Незрелые и зрелые ДК экспрессируют множество PRRs врожденного иммунитета, одни из них это-TLR 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 [111]. При контакте TLR7/8 с одноцепочечной РНК усиливается продукция IL-12p70, IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , экспрессия костимуляторных молекул CD80, CD86 и CD83 на ИФН-ДК [48].

Протокол с использованием GM-CSF и IFN- $\alpha$  позволяет получить полноценные ДК без дополнительных стимулов дозревания (CD40-лиганд, ЛПС

или TNF- $\alpha$ ) [80, 106]. Генерируемые в присутствии IFN- $\alpha$  ДК отличаются от IL-4ДК набором синтезируемых цитокинов. ИФН-ДК продуцируют высокие уровни IFN- $\alpha$ , IL-4, IL-12p40, IL-10, а также IL-15, который усиливает генерацию цитотоксических Т-лимфоцитов и NK-клеток [80, 179].

ИФН-ДК обладают уникальными миграционными свойствами, которые регулируют транспорт этих клеток в зону инфицирования для поглощения антигена и презентации его Т-лимфоцитам. ИФН-ДК с частично зрелым фенотипом экспрессируют как CCR7- рецептор, так и его натуральный лиганд MIP-3 $\beta$  - хемокин, регулирующий перемещение ДК во вторичные лимфоидные органы и играющий важную роль в привлечении наивных Т-клеток [122, 125, 146]. Кроме того, ИФН-ДК несут на своей поверхности высокие уровни IL-23 и IL-27, что способствует индукции кросс-праймаингу CD8<sup>+</sup> Т-клеток против вирусных антигенов [87]. Особенностью ИФН-ДК является экспрессия молекулы CD56 - специфического маркера NK-клеток, которые являются основными цитотоксическими клетками врожденного иммунитета [119]. В некоторых исследованиях было показано, что ИФН-ДК в смешанной культуре лейкоцитов обладают более высокой аллостимуляторной активностью и способностью к продукции IFN- $\gamma$ , по сравнению с ДК, генерированными по стандартному протоколу [147]. Также показана способность ИФН-ДК, нагруженных инактивированными вирионами вируса иммунодефицита человека (HIV) или растворимым антигеном v.influenza, эффективно индуцировать антигенспецифический ответ [117].

Эти данные свидетельствуют о том, что ИФН-ДК обладают частично зрелым фенотипом и высоким функциональным потенциалом для индукции антигенспецифического иммунного ответа, что обосновывает возможность использования этих клеток для стимуляции/усиления клеточного иммунного ответа при хронической HCV-инфекции.

\*\*\*

За последнее десятилетие активное изучение иммунных механизмов, участвующих в элиминации HCV-инфекции привело к пониманию роли



адаптивного иммунного ответа при ХГС. Дисфункция ДК рассматривается как одна из возможных причин неэффективного специфического Т-клеточного ответа против вируса гепатита С. HCV инфекция приводит к снижению количества ДК, уменьшению на этих клетках экспрессии антигенпрезентирующих и костимуляторных молекул, низкой алостимуляторной активности и изменением баланса цитокинов со смещением в сторону доминирования противовоспалительных и иммуносупрессивных циткоинов, способных индуцировать Treg. Изменения ДК проявляются уже на стадии острой инфекции и нивелируются у пациентов с исходом в выздоровление, однако сохраняются у пациентов с персистенцией инфекции. Генерация *ex vivo* ДК позволяет получить их в достаточно больших количествах и при необходимости скорректировать функциональные дефекты. Иммунизация пациентов такими ДК рассматривается в качестве перспективной стратегии лечения ХГС. Данный подход, направленный на индукцию полноценного Т-клеточного ответа, возможно, будет наиболее эффективным в комплексе с противовирусной терапией, учитывая возможность стимуляции иммунологической памяти после элиминация вируса.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Характеристика больных, включенных в исследование

Диссертационная работа основана на результатах обследования 52 доноров крови, негативных по сывороточным маркерам вирусного гепатита С, и 38 сопоставимых по полу и возрасту пациентов с ХГС с генотипом 1, которые наблюдались в НИИФКИ СО РАМН с 2015-2018 гг. Все обследования проводились после получения письменного информированного согласия.

### Иммунологические исследования

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). Клетки в концентрации  $3 \times 10^6$  на лунку культивировали 1,5 часа при  $37^\circ\text{C}$  во влажной атмосфере, содержащей 5%  $\text{CO}_2$ , в 6-луночных плоскодонных планшетах для получения прилипающей фракции моноцитов в полной культуральной среде, содержащей RPMI-1640 (Sigma USA).

### Получение дендритных клеток и супернатантов цельных культур

Прилипающую фракцию МНК инкубировали в полной культуральной среде RPMI-1640 (Sigma) в присутствии GM-CSF (Sigma-Aldrich, 40 нг/мл), IFN- $\alpha$  (Роферон-А, Roche, Швейцария 1000 Ед/мл) и 2,5% фетальной телячьей сывороткой (FCS- БиолоТ, Санкт-Петербург) в течение 4 суток при  $37^\circ\text{C}$  в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе при 5%  $\text{CO}_2$  с последующим добавлением в качестве дозревающего стимула на 24 ч с липополисахара (10 мкг/мл, ЛПС, E.colli 0114:B4, Sigma-Aldrich) при исследованиях *in vitro* или азоксимера бромида (Полиоксидоний, Петровакс Фарм, Москва; 2 нг/мл) при приготовлении ДК-вакцин. После чего

проводился подсчет ДК, а также сбор супернатантов ДК в необходимых объемах для тестирования. Клеточный выход составлял в среднем  $1,3 \pm 0,28 \times 10^5$  ДК из  $1 \times 10^6$  МНК.

### **Нагрузка ИФН-ДК вирусными Core и NS3 антигенами**

Для нагрузки ИФН-ДК использовали комбинацию рекомбинантных протеинов, кодируемых фрагментами генов иммунодоминантных районов белков Core (1-120) и NS3 (1192-1457) HCV генотипа 1, полученных в лаборатории рекомбинантных белков ЗАО Вектор-Бест (Новосибирск). Кратко, фрагменты генов, кодирующих каждый из белков, были получены с помощью обратной транскрипции с РНК HCV генотипа 1 с последующей амплификацией и клонированием в вектор pUC-18. Соответствие полученных последовательностей ДНК генам HCV генотипа 1b было подтверждено секвенированием. Затем полученные фрагменты, кодирующие иммунодоминантные районы белков Core (1-120 ак) и NS3 (1192-1457 ак), были перенесены в плазмиды pET-21 и pET-28 соответственно и экспрессированы в *E. coli* штамма BL21(DE3). Полученные рекомбинантные белки содержали дополнительно олигогистидиновые мотивы и были очищены с помощью хроматографии на смоле His-Bind (Novagen) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя по денатурирующему протоколу в присутствии 8 М мочевины. Очищенные белки с помощью диализа были переведены в фосфатно-солевой буферный раствор (pH=7,2) и профильтрованы через мембрану с диаметром пор 0,2 мкм.

Генерированные в 4-суточных культурах интактные ИФН-ДК инкубировали в течение 1 ч с рекомбинантными белками HCV Core и NS3 в дозе по 5 мкг/мл, после чего клетки однократно отмывали и индуцировали конечное созревание добавлением ЛПС (10 мкг/мл) для исследований *in vitro* и азоксимера бромид (Полиоксидоний - 2 нг/мл) для приготовления вакцин на 24 ч.

### **Определение субпопуляций ДК клеток методом проточной цитофлуориметрии**

Приготовление образцов для определения относительного содержания субпопуляций ДК, экспрессирующих поверхностные CD-маркеры, проводили в

соответствии с методикой Becton Dickinson с небольшими модификациями. Для этого ДК (500 тыс.клеток/50 мкл) отмывали в растворе «А» (5% желатиноля, 0,1% азида натрия, 0,02% ЭДТА, 10% сыворотки доноров АВ (IV) группы в фосфат-забуференном физиологическом растворе), помещали в цитометрические пробирки. К суспензии клеток добавляли рекомендуемое количество моноклональных анти- CD14, -CD83, -CD80, -HLA-DR, -CD25 антител, меченных фикоэритрином (PE) и флуоресцеин изотиоцианатом (FITC), (BD PharMingen, США) и инкубировали 30 мин при 4°C. Затем клетки отмывали от антител раствором «В» (0,1% азида натрия, 0,02% ЭДТА в фосфат-забуференном физиологическом растворе), ресуспендировали и заливали 0,5 мл лизирующего раствора (FACSLyse, Becton Dickinson, США), что обеспечивало фиксацию с полным разрушением остаточных эритроцитов.

Подготовленные таким образом пробы подвергали исследованию на лазерном клеточном сортере-анализаторе FACSCalibur (Becton Dickinson, США) с использованием программы Cell Quest (Becton Dickinson, США). Процент позитивных клеток, экспрессирующих соответствующие CD-маркеры, рассчитывался на 10000 клеток в моноцитарном регионе.

### **Оценка аллостимуляторной активности ИФН-ДК**

Аллостимуляторную активность ИФН-ДК оценивали в смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ) при культивировании МНК доноров ( $0,1 \times 10^6$ /лунку) в 96-луночных круглодонных планшетах в присутствии аллогенных ИФН-ДК ( $0,1 \times 10^5$ /лунку) в соотношении 10:1. Интенсивность пролиферации оценивали на 5 сут радиометрически по включению  $H_3$ -тимидина, вносимого в лунки за 18 ч до конца культивирования в дозе 1 мкКю/лунку. Индекс влияния ДК в алло-СКЛ рассчитывали, как отношение пролиферативного ответа МНК в присутствии ДК к уровню спонтанной пролиферации МНК.

### **Определение продукции цитокинов методом иммуноферментного анализа**

Концентрацию продуцируемых цитокинов в супернатантах ЛПС-стимулированных ИФН-ДК определяли методом иммуноферментного анализа,

используя соответствующую тест-систему производства «Вектор-Бест» (г. Новосибирск).

### **Оценка способности ИФН-ДК активировать Th1- и Th2-ответ**

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

### **Оценка способности ИФН-ДК индуцировать антигенспецифический ответ**

Индукцию антигенспецифического пролиферативного ответа оценивали при культивировании МНК доноров ( $0,2 \times 10^6$ /лунку) в 96-луночных круглодонных планшетах в присутствии аутологичных ИФН-ДК ( $0,2 \times 10^5$ /лунку) в соотношении 10:1. Интенсивность пролиферации оценивали на 5 сут радиометрически по включению  $^3\text{H}$ -тимидина, вносимого в лунки за 18 ч до конца культивирования в дозе 1 мкКю/лунку. Индекс влияния ДК в ауто-СКЛ рассчитывали, как отношение пролиферативного ответа МНК в присутствии ДК к уровню спонтанной пролиферации МНК.

### **Антигенспецифическая продукция Th1- и Th2-цитокинов**

Способность ДК стимулировать антигенспецифическую продукцию Th1- и Th2-цитокинов оценивали по продукции IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6 цитокинов в супернатантах МНК, стимулированных ДК, нагруженными Core и NS3 антигенами. Контролем служили культуры МНК, активированные ДК, ненагруженными вирусными антигенами методом иммуноферментного анализа, используя соответствующие тест-системы («Вектор-Бест», Новосибирск). В качестве отвечающих клеток использовали МНК доноров ( $0,2 \times 10^6$  МНК/лунку). Культуральные супернатанты собирали на 5 сут, и оценивали содержание Th1- (IFN- $\gamma$ ) и Th2- (IL-4, IL-6) цитокинов.

### **Исследование дегрануляции ЦТЛ**

Т-клетки имеют лизосомальные гранулы, содержащие цитолитические белки. В дифференцированных CD8<sup>+</sup> Т-клетках стимуляция через TLR вызывает дегрануляцию, т.е. выброс содержимого литических гранул. При этом, молекула CD107a, являющаяся компонентом литических гранул оказывается на поверхности Т-клетки, что используется в качестве функционального маркера ЦТЛ. Оценку экстернализации CD107a на поверхности CD8<sup>+</sup> Т-клеток проводили путем добавления монензина А (BD PharMingen, США) и APC-меченного моноклонального анти-CD107a (BD PharMingen, США) в культуры МНК совместно с ДК, нагруженными Core или NS3. В качестве контроля, использовали нестимулированные (негативный контроль) и анти-CD3 стимулированные (позитивный контроль) культуры МНК. Через 18 часов по окончании культивирования МНК с Core или NS3 антигенами клетки инкубировали с FITC-конъюгированными анти-CD3 и Ре-конъюгированными анти-CD8-антителами согласно стандартной методике для определения поверхностных антигенов на клетке. Уровень экспрессии CD107a оценивали на проточной цитометре в гейте CD8<sup>+</sup>клеток.

### **Клиническая апробация вакцин на основе ИФН-ДК у больных с ХГС как монотерапия и в сочетании с противовирусной терапией**

Апробация иммунотерапии (ИТ) с использованием ИФН-ДК в режиме монотерапии и в комбинации с противовирусной терапией (интерферон-α и рибавирин) проводилась на базе отделения иммунологии Клиники иммунопатологии НИИФКИ в дизайне открытых проспективных пилотных исследований с контролем «до-после» согласно протокола, утвержденного решением Ученого Совета (протокол № 4 от 7 апреля 2015 г.) и одобренного локальным этическим комитетом в рамках поискового научного исследования. Все манипуляции по получению и культивированию клеток проводили в условиях специализированной лаборатории, лицензированной для работы с клетками (лицензия на трансплантацию костного мозга и гемопоэтических стволовых

клеток, ФС-54-01-002049). Включение в исследование пациентов проводилось только после подписания письменного информированного согласия.

Критериями включения служили: наличие вируса гепатита С, подтвержденного анализом ПЦР на РНК вируса, хроническая форма заболевания, умеренная вирусная нагрузка - РНК  $\geq 10^4$  МЕ/мл, минимальная или средняя степень активности гепатита по уровню трансаминаз крови, отсутствие трансформации в цирроз – (фиброз 0-III по шкале METAVIR).

Данные, характеризующие включенных в исследование пациентов, получающих иммунотерапию ДК в виде монотерапии, представлены в таблице 4. У пяти пациентов вирусная нагрузка - РНК составляла  $10^4$  МЕ/мл, у четырех пациентов -  $10^5$  МЕ/мл и у одного пациента –  $10^6$  МЕ/мл). Степень активности вируса по показателям трансаминаз варьировала от минимальной до умеренной, степень фиброза – от 0 до III по шкале METAVIR.

К критериям исключения относили несоответствие критериям включения; наличие выраженной иммунокомпроментации, обусловленной иммуносупрессивной терапией или сопутствующей ВИЧ-инфекцией; участие пациента в другом клиническом исследовании; наличие выраженной хронической декомпенсированной сердечно-сосудистой, дыхательной, печеночной, почечной недостаточности, декомпенсированного сахарного диабета; декомпенсированные заболевания щитовидной железы, злокачественные заболевания; болезни крови; психические нарушения; беременность.

Иммунотерапия включала два курса вакцинации. Первый (инициирующий) курс состоял из 4 подкожных инъекций ДК (средняя доза  $5 \times 10^6$  клеток), нагруженных рекомбинантным Core и NS3 антигенами, с недельным интервалом (общей продолжительностью 1 мес). Второй (поддерживающий) курс проводился после завершения первого и состоял из 6 вакцинации с кратностью 1 раз в месяц (общей продолжительностью 6 мес). В качестве адьюванта использовали рекомбинантный IL-2 (Ронколейкин, «Биотех» Санкт-Петербург), который вводили подкожно в дозе 250 000 ЕД. Вакцинации проводили внутривенно в

область плеча. Препарат Ронколейкин (IL-2 человека рекомбинантный) вводили аналогичным образом рядом с местом введения вакцины.

Таблица 4

Характеристика исследуемых больных ХГС в динамике монотерапии ДК

Пациент N п.п	Пол	Возраст	АСТ (ЕД/л)	АЛТ (ЕД/л)	Вирусная нагрузка (МЕ/мл)	Степень фиброза по шкале METAVIR
1.Больной М.А.	женский	31	42	31	$5,6 \times 10^4$	II
2.Больной Ю.Е.	женский	30	40	32	$3,2 \times 10^4$	I
3.Больной Ш.Н.	женский	59	65	69	$4,8 \times 10^4$	II
4.Больной М.Н.	женский	35	21	25	$3,5 \times 10^4$	0
5.Больной М.Е.	женский	45	75	37	$9,9 \times 10^5$	I-II
6.Больной Н.А.	мужской	32	118	68	$9,4 \times 10^5$	II-III
7.Больной Б.О.	женский	57	22	24	$1,8 \times 10^6$	Нет данных
8.Больной Ш.И.	женский	31	90	45	$1,9 \times 10^5$	I
9.Больной Ш.О.	женский	37	22	22	$2,2 \times 10^5$	0-I
10.Больной М.Д.	мужской	36	20	24	$1,3 \times 10^4$	I

Обследование пациентов, получающих иммунотерапию ДК в виде монотерапии проводилось до начала лечения, после первого (через 1 мес от начала терапии) и второго курса (через 7 мес после начала терапии) вакцинаций, а также через 6 месяцев наблюдения после завершения иммунотерапии (спустя 13 мес после начала терапии) и включало оценку репликация вируса, общих и биохимических показателей крови, в том числе уровня трансаминаз, состояния внутренних органов с помощью инструментальных методов обследования.



Характеристика пациентов, включенных в апробацию комбинированной иммунотерапии, представлена в таблице 5. Как видно, пациенты, получающие комбинированную терапию, включали 4 женщины и 4 мужчин в возрасте от 30 до 60 лет. У 3-х пациентов вирусная нагрузка – РНК составляла  $10^4$  МЕ/мл, у 4-х пациентов –  $10^5$  МЕ/мл и 1-го пациента –  $10^6$  МЕ/мл. Степень активности гепатита по показателям трансаминаз варьировала от минимальной до умеренной, степень фиброза от 0 до II по шкале METAVIR.

Таблица 5

Характеристика исследуемых больных ХГС в динамике комбинированной терапии.

Пациент N п.п	Пол	Возраст	АСТ (ЕД/л)	АЛТ (ЕД/л)	Вирусная нагрузка (МЕ/мл)	Степень фиброза по шкале METAVIR
1. Больной А.	женский	53	61	53	$8,8 \times 10^4$	Нет данных
2. Больной Р.	женский	58	58	61	$3,5 \times 10^5$	Нет данных
3. Больной Л.	женский	38	18	39	$3,5 \times 10^4$	I-II
4. Больной Б.	женский	55	31	22	$2,4 \times 10^4$	0
5. Больной Т.	мужской	45	40	98	$3,2 \times 10^5$	0
6. Больной М.	мужской	60	85	52	$3,9 \times 10^5$	0-I
7. Больной П.	мужской	52	39	38	$1,3 \times 10^6$	0-I
8. Больной Б.	мужской	30	214	131	$3,4 \times 10^5$	II

При комбинированном лечении (вакцинотерапия и ПВТ) у всех пациентов до начала лечения, через 3 и 6 мес от начала терапии, а также через 6 мес после завершения лечения (спустя 12 мес после начала терапии) в сыворотке крови оценивалась репликация вируса, определялись общие и биохимические показатели крови, в том числе уровень трансаминаз, состояние внутренних органов с помощью инструментальных методов обследования. ПВТ включала ежедневный пероральный прием Рибавирина и еженедельные инъекции

Альгерона. Дозировка данных препаратов рассчитывалась на массу тела пациента.

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

#### **Антигенспецифический Т-клеточный ответ**

Антигенспецифический Т-клеточный ответ оценивали по уровню пролиферации МНК в ответ на стимуляцию Core и NS3 антигенами (5 мг/мл) в 5-суточных культурах. Неспецифический ответ оценивали в 3-суточных культурах по уровню пролиферации МНК в ответ на стимуляцию конканавалином А (15 мкг/мл; Sigma, USA). Пролиферативный ответ оценивали радиометрически по включению Н<sup>3</sup> тимидина, вносимого в лунки за 18 ч до конца культивирования в дозе 1 мкКю/лунку.

#### **Продукция цитокинов**

Продукцию цитокинов (IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6) оценивали в 48-часовых супернатантах МНК, стимулированных Core или NS3 антигенами (5 мкг/мл), методом иммуоферментного анализа с использованием коммерческих тест-систем («Вектор-Бест, Новосибирск»).

#### **Исследование дегрануляции ЦТЛ.**

Оценку экстернализации CD107a на поверхности CD8 Т-клеток проводили путем добавления монензина А (BD PharMingen, США) и APC-меченного моноклонального анти-CD107a (BD PharMingen, США) в культуры МНК совместно с Core или NS3. В качестве контроля, использовали нестимулированные (негативный контроль) и анти-CD3 стимулированные (позитивный контроль) культуры МНК. По окончании культивирования МНК с

Core или NS3 антигенами клетки инкубировали с FITC-конъюгированными anti-CD3 и Ре-конъюгированными анти-CD8-антителами согласно стандартной методике для определения поверхностных антигенов на клетке. Уровень экспрессии CD107a оценивали на проточной цитометре в гейте CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>клеток.

### **Содержание регуляторных Т-клеток**

Содержание регуляторных Т-клеток определяли методом проточной цитометрии по количеству CD4<sup>+</sup>25<sup>+</sup>127<sup>-</sup> Т-клеток в гейте CD4<sup>+</sup> лимфоцитов, используя коммерческий коктейль моноклональных антител, содержащий анти-CD4 (FITC), анти-CD25 (PE-Cy7), анти-CD127 (Alexa Fluor 647), в соответствии с инструкциями производителей (BD Biosciences, USA). Исследование проводили по общепринятой методике с использованием параметров прямого и бокового светорассеяния и флюоресценции по каналам FL-1 (FITC), FL-3(PE-Cy7), FL-4 (Alexa Fluor 647) (“BD FACSCalibur”, США). В тексте относительное содержание описываемых субпопуляций представлено в виде процента от CD4<sup>+</sup> Т-клеток.

### **Статистическая обработка полученных результатов**

Статистическая обработка полученных результатов проводилась методами описательной и непараметрической статистики на персональном компьютере с использованием программы «STATISTICA 6.0». Таблицы и рисунки содержат информацию в виде медианных значений и интерквартильных диапазонов, а также в отдельных случаях представлены значения средних арифметических величин (M) и стандартных ошибок средних (SE), максимальных и минимальных значений. Сравнение вариационных рядов осуществлялось с помощью непараметрического U критерия Манна-Уитни. Корреляционный анализ проводился методом ранговой корреляции Спирмана (r).

### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

#### 3.1. Влияние рекомбинантных вирусных белков HCV Core (1–120) и NS3 (1192–1457) на созревание и функциональную активность ИФН-ДК

Известно, что ДК, генерируемые из моноцитов крови в присутствии GM-CSF и IFN- $\alpha$ , по сравнению с «классическими» ИЛ4-ДК характеризуются более зрелым фенотипом [148]. Поэтому на первом этапе представлялось важным оценить, способны ли ИФН-ДК к дальнейшему созреванию при стимуляции ЛПС через TLR-4. Действительно, как видно из данных таблицы 6, культивирование ИФН-ДК с ЛПС (в качестве дозревающего стимула) сопровождалось достоверным увеличением количества ДК, экспрессирующих CD80 (костимуляторные молекулы), CD25 (активационные молекулы) и CD83 (маркер зрелости), а также возрастанием интенсивности средней флюорисценции HLA-DR и CD80.

**Таблица 6**

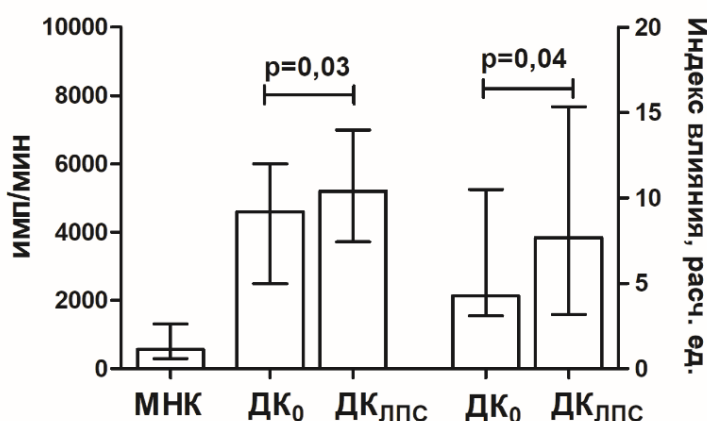
Влияние ЛПС на экспрессию поверхностных маркеров в культурах ИФН-ДК

Маркер	Относительное содержание ИФН-ДК (%)		Средняя интенсивность флюорисценции (усл. ед.)	
	ДК <sub>0</sub>	ДК <sub>ЛПС</sub>	ДК <sub>0</sub>	ДК <sub>ЛПС</sub>
HLA-DR	89 (85-96)	87 (84-93)	451(318-907)	891 (629-1721)*
CD80	39 (22-50)	49 (29-62)	40 (24-57)	66,5 (59-145)*
CD25	3 (2-8,5)	14,5 (5-26)*	57 (39-77)	63,5 (53-80)
CD83	8 (6-12)	14 (11-20)*	56 (51-73)	48 (39-66)
CD83 <sup>+</sup> CD14 <sup>+</sup>	4 (3-7)	10 (7-16,5)*		

**Примечание:** относительное содержание ИФН-ДК и среднюю интенсивность флюорисценции поверхностных маркеров оценивали в культурах

нестимулированных (ДК<sub>0</sub>) и ЛПС-стимулированных ИФН-ДК (ДК<sub>ЛПС</sub>), генерированных из моноцитов крови здоровых доноров (n=8). Данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона (в скобках). \* -  $p < 0,05$ ; достоверность различий по сравнению с ДК<sub>0</sub>.

Значительная часть ДК при этом продолжала ко-экспрессировать CD14, что характерно для ИФН-ДК. Так половина CD83+ клеток несла одновременно молекулу CD14, и количество CD83+CD14+ ИФН-ДК на фоне стимуляции ЛПС возрастало более чем в 2 раза. Индуцированное ЛПС созревание ИФН-ДК сопровождалось стимуляторной активностью в алло-СКЛ. Так, уровни пролиферации в алло-СКЛ и индексы влияния ИФН-ДК в культурах, стимулированных ЛПС-активированными ДК, были значимо выше, чем при стимуляции интактными ДК (Рис. 1).



**Рисунок 1.** Влияние ЛПС на аллостимуляторную активность ИФН-ДК. Представлены данные (Me; IQR; n=15) пролиферации (имп/мин) МНК в отсутствие ИФН-ДК, а также в алло-СКЛ в присутствии нестимулированных (ДК<sub>0</sub>) и ЛПС-стимулированных ИФН-ДК (ДК<sub>ЛПС</sub>), а также индексы влияния (расч.ед.) ДК в алло-СКЛ.

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

Краткосрочная инкубация ИФН-ДК с рекомбинантными вирусными белками не влияла на жизнеспособность генерируемых ДК. Клеточный выход

ИФН-ДК из  $10^6$  МНК при стандартных условиях культивирования, а также после 1-часовой нагрузки Core/NS3 антигенами достоверно не различался и составлял в среднем  $1,3 \pm 0,28$  и  $1,5 \pm 0,26 \times 10^5$  ДК, соответственно. Таким образом, исследуемые рекомбинантные HCV белки в суммарной дозе 10 мкг/мл не оказывали токсического влияния на ИФН-ДК.

Сравнительный анализ поверхностных маркеров ЛПС-стимулированных ИФН-ДК показал (Табл. 7), что средняя интенсивность флюорисценции HLA-DR, CD80 и CD25 в культурах ДК, нагруженных вирусными белками, и в контрольных культурах значимо не различалась. Единственным выявленным отличием ДК, нагруженных вирусными белками, было незначительное снижение относительного содержания клеток, экспрессирующих CD83 ( $p_U=0,035$ ). Тем не менее, средняя интенсивность флюорисценции данного маркера достоверно не менялась ( $p_U=0,18$ ).

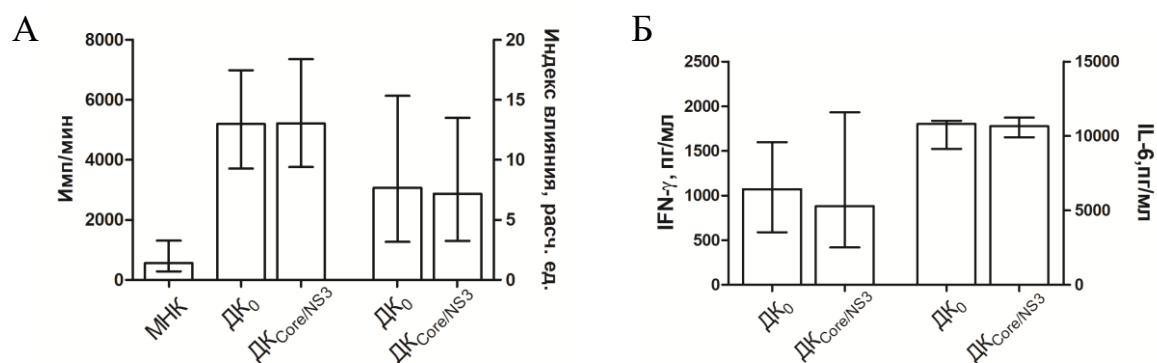
**Таблица 7**

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

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

**Примечание:** относительное содержание ДК и среднюю интенсивность флюорисценции поверхностных маркеров оценивали в культурах ЛПС-стимулированных ИФН-ДК здоровых доноров ( $n=8$ ), преинкубированных с вирусными белками (+Core/NS3) или средой (Контроль). Данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона (в скобках). \* -  $p_U < 0,05$ ; достоверность различий по сравнению с контролем.

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



**Рисунок 2.** Влияние рекомбинантных HCV белков Core/NS3 на функциональную активность ИФН-ДК. А - представлены данные (Me; UQ-LQ) пролиферативного ответа и индексов влияния в алло-СКЛ (n=15), стимулированной контрольными ДК (ДК<sub>0</sub>) и ДК, преинкубированными с Core/NS3 белками (ДК<sub>Core/NS3</sub>); Б - представлены данные (Me; UQ-LQ) продукции IFN- $\gamma$  и IL-6 в алло-СКЛ (n=6), индуцированной ДК<sub>0</sub> и ДК<sub>Core/NS3</sub>.

В целом, полученные данные свидетельствуют, что нагрузка ИФН-ДК рекомбинантными белками, кодируемыми усеченными фрагментами генов HCV Core (1-120) и NS3 (1192-1457), не влияет негативно на созревание и функциональную активность ДК, что обосновывает целесообразность дальнейших исследований ИФН-ДК, нагруженных данными белками, в индукции специфического противовирусного иммунного ответа.

### **3.2. Индукция HCV-специфического клеточного ответа дендритными клетками, нагруженными рекомбинантными вирусными белками Core и NS3, в культурах МНК доноров**

Убедившись, что рекомбинантные вирусные белки core (1–120) и NS3 (1192–1457) при нагрузке ИФН-ДК не оказывают ингибирующего действия на созревание и функциональную активность ДК, на следующем этапе была исследована способность ИФН-ДК, нагруженных вирусными белками, индуцировать антигенспецифический клеточный ответ в культуре МНК здоровых доноров. Чтобы исключить индивидов, имеющих HCV-примированные Т-клетки, в исследования были отобраны доноры, образцы крови которых были серонегативны на антитела к вирусу гепатита С. Ранее показано, что генерированный из моноцитов в присутствии ГМ-КСФ и IL-4 ДК (ИЛ4-ДК) при нагрузке или трансфекции вирусными антигенами индуцируют *in vitro* пролиферацию наивных Т-клеток и их дифференцировку в Th1 и цитотоксические Т-лимфоциты. Однако способность ДК, генерированных из моноцитов в присутствии ИФН- $\alpha$ , индуцировать HCV-специфический ответ при нагрузке вирусными белками, не исследовалась. Соответственно, целью данного раздела настоящего исследования стала оценка способности ИФН-ДК, нагруженных рекомбинантными Core и NS3 антигенами, индуцировать антигенспецифический ответ в культурах мононуклеарных клеток здоровых доноров.

#### **3.2.1. Влияние рекомбинантных HCV белков на функции МНК серонегативных доноров**

Поскольку для нагрузки ДК использовались рекомбинантные HCV антигены, для исключения неспецифических эффектов рекомбинантных белков в предварительной серии было исследовано влияния Core и NS3 антигенов на пролиферацию, продукцию Th1 и Th2 цитокинов и активацию цитотоксических клеток в культурах МНК серонегативных доноров. МНК здоровых доноров (n=8)



эффективно пролиферировали в ответ на стимуляции Т-клеточным митогеном КонА (позитивный контроль) (Табл.8).

**Таблица 8**

Влияние HCV Core и NS3 антигенов на пролиферацию, продукцию IFN- $\gamma$  и дегрануляцию цитотоксических Т-клеток в культурах МНК серонегативных доноров (n=8-12)

МНК		Пролиферация (имп/мин)	Продукция IFN- $\gamma$ (пг/мл)	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD107a <sup>+</sup> (%)
Контроль (МНК0)	Me	850	20	0,67
	IQR	340 – 1100	10 – 64	0,5 – 0,78
Core	Me	510	17,5	0,79
	IQR	240 – 1020	2 – 103	0,7 – 1,4
NS3	Me	750	20	0,56
	IQR	310 – 1050	2 – 51	0,35 – 1,0
ConA	Me	19980 *	2750 *	—
	IQR	16490 – 23990	2420 – 2860	—
анти-CD3	Me	—	—	6,3 *
	IQR	—	—	4,4 - 6,9

**Примечание:** \* -  $P_w$  - различия статистически значимы при сравнении с МНК0,  $p_w < 0,01$ , W-здесь и далее – парный критерий Вилкоксона

В то же время интенсивность пролиферации при стимуляции NS3- или Core- в дозе 5 мкг/мл (т.е. используемой для нагрузки ДК) не отличалась значимо от уровня спонтанной пролиферации. Core и NS3 рекомбинантные белки также не усиливали продукцию IFN- $\gamma$ , тогда как МНК выражено продуцировали IFN- $\gamma$  при стимуляции Т-клеточным митогеном КонА. Для оценки влияния Core и NS3 белков на активность цитотоксических Т-клеток оценивали дегрануляцию CD8<sup>+</sup> Т-клеток в культурах МНК (n=12). Дегрануляция, т.е. выход литических гранул на поверхность Т-клеток, является неотъемлемым атрибутом реализации цитотоксической функции CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов. Поскольку дегрануляция ЦТЛ сопровождается появлением на мембране молекулы CD107a, исследовали относительное содержание CD8<sup>+</sup>CD107a<sup>+</sup> Т-клеток в нестимулированных и

антигенстимулированных культурах МНК. Относительное содержание  $CD3^+CD8^+CD107a^+$  Т-клеток в культурах нестимулированных МНК было менее 1%, указывая на низкий уровень спонтанной дегрануляции МНК. При стимуляции anti-CD3 антителами доля  $CD8^+CD107a^+$  Т-клеток значительно возрастала. В то же время NS3 или Core антигены не оказывали значимого влияния на относительное содержание  $CD3^+CD8^+CD107a^+$  клеток. Поскольку МНК серонегативных доноров не содержали примированных к HCV-антигенам Т-клеток, отсутствие ответа МНК на Core и NS3 антигены свидетельствовало, что исследуемые белки не обладали неспецифической стимулирующей активностью (Табл. 8).

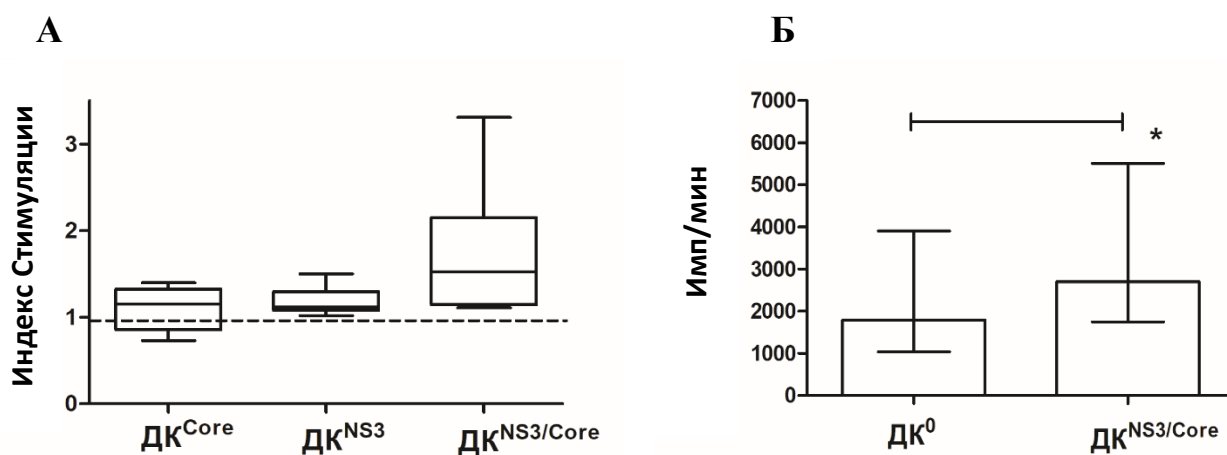
### **3.2.2. HCV-специфический ответ, индуцированный ИФН-ДК здоровых доноров**

Убедившись в отсутствии неспецифической активности используемых вирусных белков, далее исследовали способность ИФН-ДК доноров, нагруженных HCV-антигенами, индуцировать *in vitro* антигенспецифический ответ. Для этого у здоровых серонегативных доноров генерировали ИФН-ДК, которые затем нагружали Core (ДК<sub>Core</sub>), NS3 (ДК<sub>NS3</sub>) или их комбинацией (ДК<sub>Core/NS3</sub>) и культивировали в течение 5 дней с аутологичными МНК. Об индукции ответа судили по усилению пролиферации, продукции цитокинов (IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6) и дегрануляции  $CD8^+$  Т-клеток в культурах МНК при стимуляции ДК, нагруженными вирусными антигенами, по сравнению с ответом МНК в присутствии контрольных ДК (ДК<sub>0</sub>).

Способность ДК индуцировать антигенспецифический пролиферативный ответ при изолированной нагрузке ДК антигенами была исследована в культурах МНК 6 доноров. Пролиферативный ответ МНК, индуцированный ДК<sub>Core</sub> или ДК<sub>NS3</sub>, на 11% превышал уровень ответа, индуцированного ДК<sub>0</sub>. Индексы стимуляции ДК<sub>Core</sub> и ИС ДК<sub>NS3</sub> составляли, соответственно 1,11 и 1,12. Несмотря на низкий уровень ответа, усиление пролиферации в присутствии ДК<sub>NS3</sub> было достоверным, тогда как ответ на ДК<sub>Core</sub> проявлялся в виде тренда. При анализе индивидуальных данных NS3-специфический ответ (ИС > 1,0) выявлялся у всех 6-ти доноров, тогда как Core-специфический ответ - только у 3 из 6 доноров.

Поскольку низкий уровень ответа был очевидно обусловлен малой частотой антигенраспознающих Т-клеток, в следующей серии экспериментов (n=12) пролиферативный ответ индуцировали ДК, нагруженными обоими антигенами (Core+NS3). Медианный индекс стимуляции  $ДК_{Core/NS3}$  составил 1,55 (1,17-2,047) и значимо превышал таковой при стимуляции  $ДК_{Core}$  (p=0,05) или  $ДК_{NS3}$  (p=0,018). Усиление пролиферации МНК в присутствии  $ДК_{Core/NS3}$  отмечалось в культурах МНК всех 12 тестируемых доноров. При этом ИС варьировал от 1,11 до 2,93, (Рис.3).

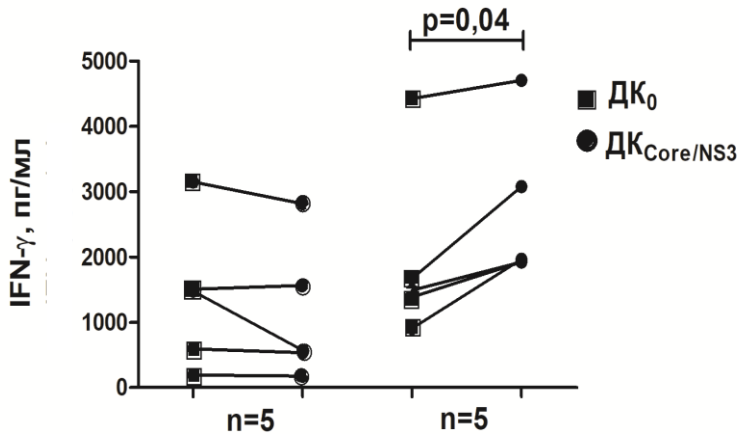
Поскольку одним из важнейших медиаторов противовирусного Т-клеточного ответа при HCV-инфекции является IFN- $\gamma$ , была также исследована способность ИФН-ДК стимулировать продукцию IFN- $\gamma$ .  $ДК_{Core}$  и  $ДК_{NS3}$  в целом по группе не усиливали продукцию IFN- $\gamma$  в культурах аутологичных МНК. Прирост IFN- $\gamma$  при стимуляции  $ДК_{NS3}$  по сравнению с  $ДК_0$  наблюдался только у 1-го, а при стимуляции  $ДК_{Core}$  – у 2-х из 6 доноров.



**Рисунок 3.** Способность ДК доноров, нагруженных Core и NS3 антигенами, индуцировать пролиферативный ответ МНК.  $ДК_0$  – контрольные ДК,  $ДК_{Core}$  – ДК нагруженные Core антигеном,  $ДК_{NS3}$  – ДК нагруженные NS3 антигеном (n=6),  $ДК_{Core/NS3}$  – ДК нагруженные Core и NS3 антигенами (n=12). Данные представлены в виде медианного и средних значений, интерквартильного диапазона, минимальных и максимальных значений.

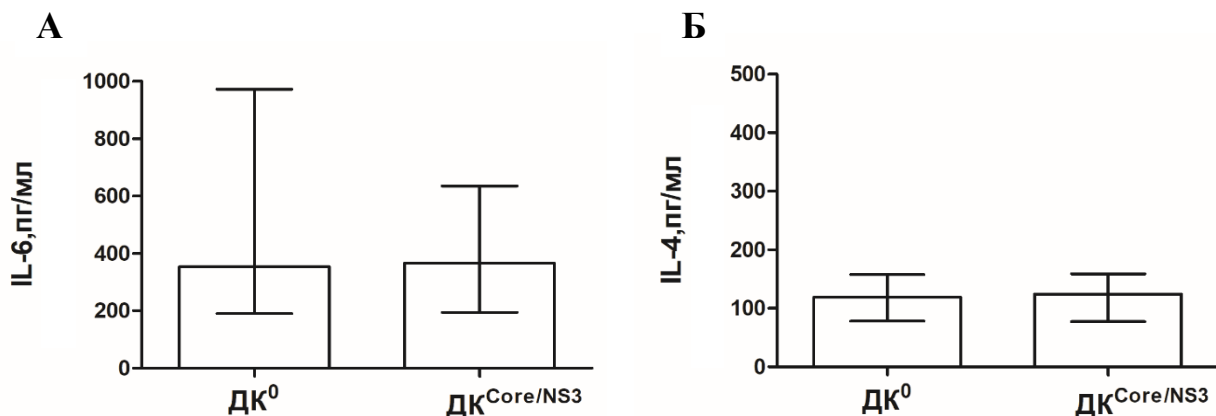
В то же время ДК, нагруженные одновременно двумя HCV белками, стимулировали продукцию IFN- $\gamma$  уже в половине случаев (у 5 из 10 доноров) (Рис.

4). Индекс стимуляции  $DK_{Core/NS3}$  в подгруппе «ответчиков» составил в среднем 1,4 расч.ед., варьируя от 1,1 до 2,16.



**Рисунок 4.** Способность ДК доноров, нагруженных Core и NS3 антигенами, индуцировать продукцию IFN- $\gamma$  в культурах аутологичных МНК. ДК<sub>0</sub> – контрольные ДК, ДК<sub>Core</sub> – ДК нагруженные Core антигеном, ДК<sub>NS3</sub> – ДК нагруженные NS3 антигеном, ДК<sub>Core/NS3</sub> – ДК нагруженные Core и NS3 антигенами. n=10. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона, а также индивидуальных значений.

Наряду с оценкой продукции IFN- $\gamma$ , у части доноров (n=4) было также исследовано влияние ДК<sub>Core/NS3</sub> на продукцию IL-6 и IL-4 (Рис.5 А, Б). Концентрация IL6 в культурах МНК, стимулированных аутологичными ДК<sub>Core/NS3</sub>, не превышала таковую в культурах МНК, активированных ДК<sub>0</sub> ( $p_w=0,62$ ). Аналогичным образом, продукция IL-4 в культурах МНК, стимулированных ДК<sub>Core/NS3</sub> и ДК<sub>0</sub>, значимо не различалась ( $p_w=0,98$ ).



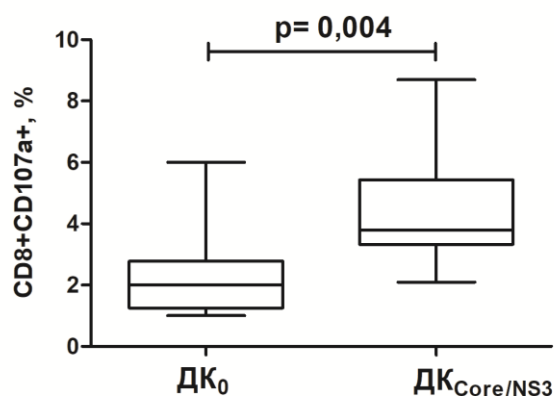
**Рисунок 5А, Б.** Способность ДК доноров, нагруженных Core и NS3 антигенами,

индуцировать продукцию IL-6 и IL-4 в культурах аутологичных МНК. ДК<sub>0</sub> – контрольные ДК, ДК<sub>Core/NS3</sub> – ДК нагруженные Core и NS3 антигенами. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона.

Исследование способности ДК<sub>Core/NS3</sub> индуцировать антигенспецифические цитотоксические Т-клетки показало, что относительное количество CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD107a<sup>+</sup> Т-клеток в культурах МНК, стимулированных ДК<sub>Core/NS3</sub> было достоверно выше, чем в культурах МНК, индуцированных ДК<sub>0</sub>, что свидетельствует о способности ДК доноров примировать антигенспецифические цитотоксические Т-лимфоциты. ИС ДК<sub>Core/NS3</sub> у всех 10 тестируемых доноров превышал 1,3 (Рис.6).

Полученные данные показывают, что ДК, нагруженные рекомбинантами HCV Core и NS3 белками, способны индуцировать антигенспецифический клеточный ответ в культурах МНК серонегативных доноров, о чем свидетельствуют более высокие уровни пролиферации, продукции IFN-γ и содержания CD8<sup>+</sup>CD107a<sup>+</sup> Т-клеток в культурах МНК, стимулированных ДК<sub>Core/NS3</sub> по сравнению с таковыми в культурах МНК, стимулированных контрольными ДК (ДК<sub>0</sub>).

ДК нагруженные одновременно двумя белками, индуцируют более выраженный антигенспецифический ответ, чем ДК, нагруженные только одним антигеном (Core или NS3), что может быть связано с вовлечением в первом случае большего количества антигенспецифических клеток.



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

CD8+Т-клеток. ДК<sub>0</sub> –контрольные ДК, ДК<sub>Core/NS3</sub> – ДК нагруженные Core и NS3 антигенами. Данные представлены в виде медианы, интерквартильного диапазона, максимальных и минимальных значений (n=10).

Первичный ответ МНК на стимуляцию ДК<sub>Core/NS3</sub> в виде усиления пролиферативного ответа и антигенспецифической дегрануляции детектируется в культурах МНК всех тестируемых доноров, тогда как усиление продукции IFN- $\gamma$  отмечалось только в половине случаев, что, возможно, свидетельствует о недостаточности однократной стимуляции Т-клеток *in vitro* для запуска секреции IFN- $\gamma$ . Таким образом, антигенспецифическая индукция Th1 клеток с помощью ДК<sub>Core/NS3</sub> возможно требует дополнительных костимуляторных воздействий.

### **3.3 Индукция HCV-специфического клеточного ответа дендритными клетками, нагруженными рекомбинантными вирусными белками Core и NS3, в культурах МНК пациентов с хроническим гепатитом С**

Далее была исследована способность ДК индуцировать или усиливать клеточный ответ на рекомбинантные антигены в культурах аутологичных МНК у больных ХГС (генотип 1). Учитывая известные данные о снижении функциональной активности Т-клеток и возможной дефектности ДК у пациентов с ХГС, предварительно была проведена сравнительная оценка пролиферативной активности Т-клеток и способности ДК стимулировать пролиферацию аутологичных Т-клеток в культурах МНК пациентов и здоровых доноров. Для этих исследований были отобраны пациенты, не получающие ранее терапии интерферонами или какими-либо иммуностимулирующими препаратами. Проллиферативный ответ МНК пациентов в КонА-стимулированных культурах был достоверно ниже по сравнению с ответом МНК доноров ( $p_U=0,008$ ) (Табл. 9).

Таблица 9

Сравнительная характеристика митогенной реактивности Т-клеток и стимуляторной активности ИФН-ДК доноров и больных ХГС

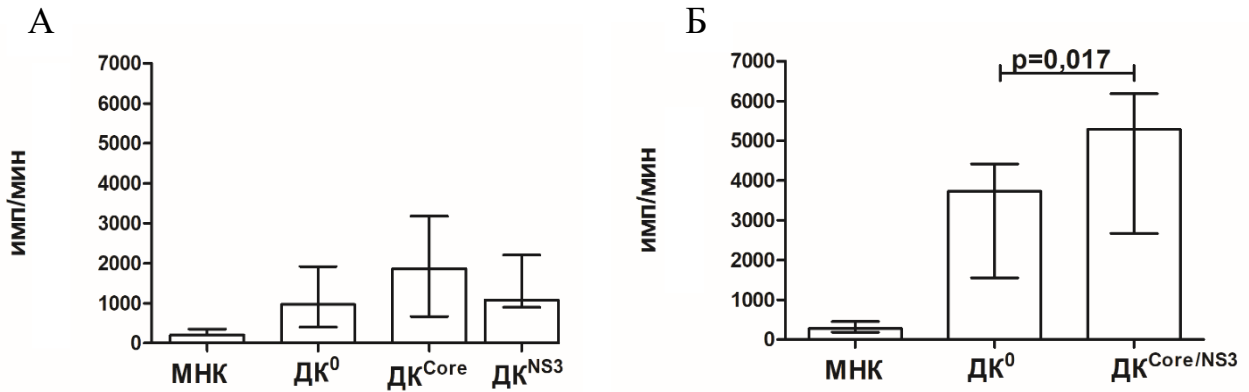
Параметры	Доноры	Пациенты	Pu
Митогенная реактивность			
0 (имп/мин)	462 (324-547)	334 (252-415)	0,15
КонА (имп/мин)	21818 (18873-29946)	12349 (10583-24695)	0,008
ИСКонА	63 (37-77)	41 (15-71)	0,09
n (число наблюдений)	n=18	n=29	
Способность ДК стимулировать пролиферацию аутологичных Т-клеток в ауто-СКЛ			
МНК (имп/мин)	484 (416-687)	243 (150-355)	0,02
МНК+ДК(имп/мин)	2049 (1246-4060)	1979 (573-3958)	0,52
ИС ДК-0	4,5 (2,96-6,87)	8,1 (2,5-11,7)	0,16
n (число наблюдений)	n=18	n=11	

**Примечание:** представлены данные в виде Me и IQR (в скобках).

Однако в силу более низкой спонтанной пролиферации МНК пациентов различия ИСКонА у больных и доноров проявлялись только в виде тенденции ( $p_U=0,09$ ). Уровень пролиферации, индуцированный ДК в культурах с ауто-МНК, у доноров и больных был схожим. Более того, в силу достоверно более низкой спонтанной пролиферации МНК пациентов, ИС<sub>ДК</sub> в ауто-СКЛ пациентов на уровне тенденции превышал аналогичный показатель у доноров (Табл. 9).

Поскольку пролиферативный ответ в ауто-СКЛ отражает активацию аутологичных Т-клеток в процессе распознавания HLA-DR антигенов на ДК, ДК больных не уступали ДК доноров по антигенпрезентирующей активности. Это позволило предположить, что ДК больных, нагруженные HCV рекомбинантными белками, также будут способны стимулировать клеточный ответ на вирусные антигены.

Способность ДК больных, нагруженных HCV рекомбинантными белками, стимулировать пролиферацию Т-лимфоцитов была исследована в культурах аутологичных МНК у 11 пациентов (Рис. 7А, Б).



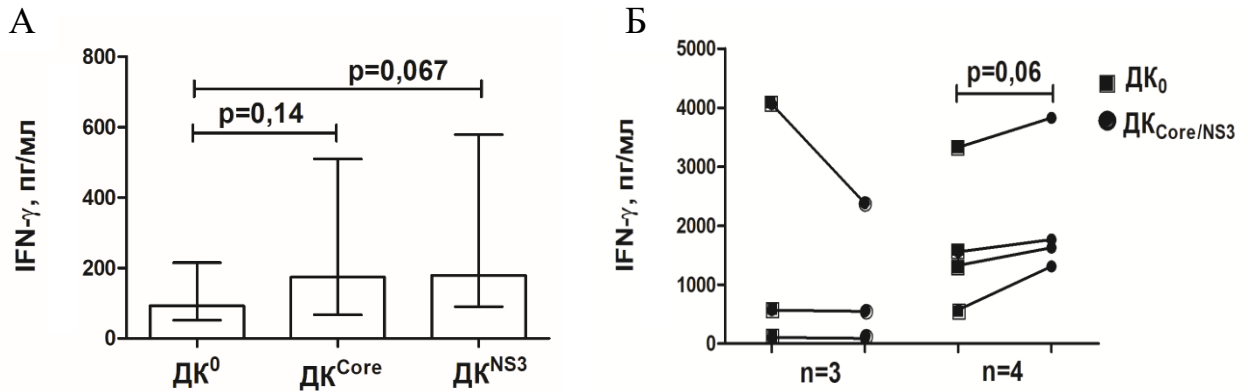
**Рисунок 7 А, Б.** Способность ДК пациентов, нагруженных Core и NS3 антигенами, индуцировать пролиферативный ответ в культурах аутологичных МНК. МНК культивировали в отсутствии ДК (МНК), присутствии контрольными ДК (ДК<sub>0</sub>) и ДК, нагруженных Core (ДК<sub>Core</sub>), NS3 (ДК<sub>NS3</sub>), либо обоими антигенами (ДК<sub>Core/NS3</sub>). Данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона.

Генерируемые ДК 4-х пациентов нагружали изолированно Core и NS3 антигенами (Рис. 7А), ДК 7 пациентов – совместно Core и NS3 белками (Рис.7Б). ДК<sub>Core</sub> усиливали пролиферацию МНК (по сравнению с ДК<sub>0</sub>) у 2-х из 4-х пациентов, ДК<sub>NS3</sub>-у 3-х из 4 больных. Медианные значения индексов стимуляции ДК<sub>Core</sub> и ДК<sub>NS3</sub> составили, соответственно, 1,38 (0,9-4,38) и 2,37 (0,73-6,55). ДК, нагруженные обоими антигенами индуцировали пролиферативный ответ у 6 из 7 пациентов. Медианный ИС ДК<sub>Core/NS3</sub> составил 1,42 (1,37-1,72) и уровень пролиферативного ответа, индуцированного ДК<sub>Core/NS3</sub>, значимо превышал таковой в культурах с ДК<sub>0</sub> ( $p_U=0,017$ ).

Наряду с оценкой антигенспецифической пролиферации, в супернатантах МНК больных оценивалась концентрация IFN- $\gamma$ . Уровень IFN- $\gamma$  в культурах МНК, стимулированных ДК<sub>Core</sub> и ДК<sub>NS3</sub> был выше, чем в контрольных культурах, стимулированных ДК<sub>0</sub> (Рис. 8А). Возрастание продукции IFN- $\gamma$  в ответ на стимуляцию ДК<sub>Core</sub> и ДК<sub>NS3</sub> наблюдалось у трех из четырех тестируемых больных.

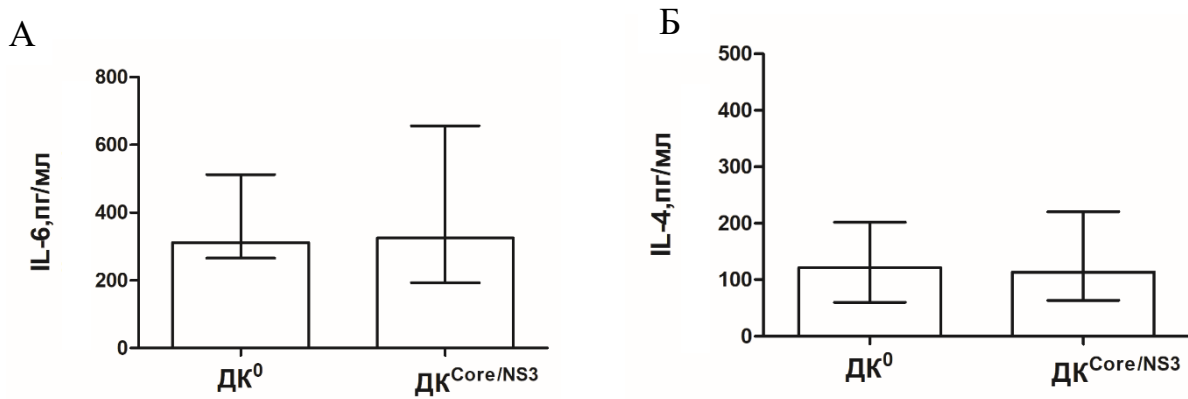


ДК, нагруженные совместно Core и NS3 стимулировали продукцию IFN- $\gamma$  в культурах МНК 4 из 7 тестируемых пациентов (Рис. 8Б). Индекс стимуляции ДК<sub>Core/NS3</sub> в этой подгруппе варьировал от 1,13 до 2,29.



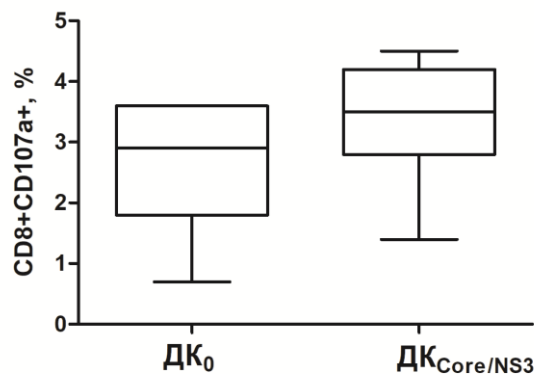
**Рисунок 8.** Способность ДК пациентов, нагруженных Core и NS3 антигенами, индуцировать продукцию IFN- $\gamma$  в культурах аутологичных МНК. А - ДК<sub>0</sub> – контрольные ДК, ДК<sub>Core</sub> – ДК нагруженные Core антигеном, ДК<sub>NS3</sub> – ДК нагруженные NS3 антигеном (n=4). Б - ДК<sub>Core/NS3</sub> – ДК нагруженные Core и NS3 антигенами (n=7). Данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона (А), а также индивидуальных значений (Б).

Чтобы проанализировать возможное влияние ДК больных на активацию Th2-клеток, у пяти пациентов с ХГС была исследована способность ДК<sub>Core/NS3</sub> индуцировать продукцию IL-6 и IL-4 (Рис. 9 А, Б). Медианный уровень IL-6 в культурах МНК, стимулированных ДК<sub>Core/NS3</sub>, не превышал таковой в культурах МНК с ДК<sub>0</sub>. Аналогичным образом, продукция IL-4 в культурах МНК, стимулированных ДК<sub>Core/NS3</sub> и ДК<sub>0</sub>, значительно не различалась. Индексы стимуляции ДК<sub>Core/NS3</sub> при оценке продукции IL-6 и IL-4 составили, соответственно 1,08 и 0,93. При индивидуальном анализе незначительное повышение продукции IL-6 и IL-4 выявлялось только у двух из 5 тестируемых пациентов.



**Рисунок 9.** Способность ДК пациентов, нагруженных Core и NS3 антигенами, индуцировать продукция ИЛ-6 (А) и ИЛ-4 (Б) в культурах аутологичных МНК. ДК<sub>0</sub> – контрольные ДК, ДК<sub>Core/NS3</sub> – ДК нагруженные Core и NS3 антигенами. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона (n=4).

Исследование способности ДК больных индуцировать дегрануляцию CD8<sup>+</sup> цитотоксических Т-клеток (Рис. 10) выявило небольшое возрастание относительного количества CD8<sup>+</sup>CD107a<sup>+</sup> Т-клеток в культурах МНК, стимулированных ДК<sub>Core/NS3</sub> по сравнению с ДК<sub>0</sub>. Медианна ИСДК<sub>Core/NS3</sub> составила 1,29 (0,96-1,94). На уровне индивидуальных значений отчетливое усиление дегрануляции CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов выявлялась у 4 из 7 пациентов. ИВ ДК<sub>Core/NS3</sub> в этой подгруппе варьировал от 1,3 до 6,0. При этом по сравнению с донорами МНК пациентов отличались более высоким уровнем дегрануляции CD8<sup>+</sup> Т-клеток в контрольных культурах - 2,9 (1,0-3,6) против 2,0 (1,3-2,8) %.



**Рисунок 10.** Способность ДК<sub>Core/NS3</sub> пациентов, активировать цитотоксические Т-лимфоциты. Представлены данные относительного содержания CD8<sup>+</sup>CD107a<sup>+</sup> Т-клеток (Me; UQ-LQ; Min; Max; n=7) в культурах МНК, стимулированных ДК<sub>0</sub> и

ДК<sub>Core/NS3</sub>.

Сравнительный анализ антигенспецифического ответа, индуцированного ДК больных и ДК доноров, показал, что ДК<sub>Core/NS3</sub> пациентов не отличались от таковых у доноров по способности стимулировать пролиферацию МНК. ИС ДК<sub>Core/NS3</sub> пациентов и доноров, так же, как и уровень индуцированной пролиферации МНК значимо не различались. При этом ДК больных индуцировали антигенспецифический пролиферативный ответ МНК у большинства тестируемых пациентов (85,6%), т.е. практически с такой же частотой, как и ДК доноров (100%). Активация Т-клеток к продукции IFN- $\gamma$  при стимуляции ДК<sub>Core/NS3</sub> пациентов регистрировалась с меньшей частотой, чем пролиферативный ответ (в 57%). Однако такая же закономерность наблюдалась и для ДК доноров. Поэтому частота IFN- $\gamma$  -секреторного ответа, индуцированного ДК пациентов и доноров, не различалась (57 против 50%). Сравнение уровня продукции IFN- $\gamma$  и ИС<sub>ДК</sub> в группах «ответчиков» также не выявило значимых различий в стимуляторной активности ДК пациентов и доноров. При сравнении способности активировать антигенспецифические цитотоксические Т-клетки, ДК пациентов стимулировали дегрануляцию CD8<sup>+</sup> Т-клеток только в 57% случаев, тогда ДК доноров - в 100% случаев ( $P_{\text{ТМФ}}=0,05$ ), что возможно объяснялось повышенной способностью ДК<sub>0</sub> индуцировать дегрануляцию в культурах МНК ряда пациентов. Соответственно ИС<sub>ДК</sub> пациентов был ниже, чем ИС<sub>ДК</sub> доноров ( $p_U=0,05$ ). Тем не менее, ИС<sub>ДК</sub> пациентов в группе «ответчиков» значимо не различался от ИС<sub>ДК</sub> доноров (Табл. 10).

Таблица 10

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

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

**Примечание:** данные представлены в виде Me (UQ-LQ) и частоты встречаемости (%).

Таким образом, так же как и у доноров ДК пациентов с ХГС при нагрузке рекомбинантными Core и NS3 белками, способны индуцировать антигенспецифический клеточный ответ в культурах аутологичных МНК. ДК<sub>Core/NS3</sub> пациентов не отличаются от таковых у доноров по способности стимулировать пролиферацию и продукцию IFN-γ в культурах МНК, но обладают меньшей стимулирующей активностью в отношении активации цитотоксических Т-клеток, что может быть связано с повышенной способностью ДК индуцировать дегрануляцию CD8<sup>+</sup> Т-клеток у некоторых пациентов в контрольных культурах.

### 3.4. Исследование HCV-специфического клеточного ответа у пациентов с ХГС на фоне иммунотерапии дендритными клетками

Полученные данные о сохранной аллостимуляторной активности и способности ИФН-ДК больных ХГС индуцировать антигенспецифический ответ, а также полученные ранее данные о хорошей переносимости вакцин на основе ИФН-ДК при часто рецидивирующей герпетической инфекции послужили основанием для апробации ИФН-ДК с целью индукции или усиления иммунного ответа при хронической HCV-инфекции. Данный раздел был выполнен в рамках поискового научного исследования.

#### 3.4.1. Переносимость и безопасность иммунотерапии

Вакцинация аутологичными ИФН-ДК, нагруженными Core и NS3 вирусными антигенами, характеризовалась хорошей переносимостью. Ни у одного из пациентов иммунотерапия не была прекращена в связи с развитием серьезных нежелательных явлений, включая обострение хронических заболеваний и ситуаций, требующих госпитализации пациента. Введение ДК вакцин не влияло на показатели крови и не вызывало токсических и воспалительных реакций, а также нарастания биохимическим проявлений активности гепатита (Табл. 12).

**Таблица 12**

Показатели крови пациентов с ХГС в динамике иммунотерапии ДК

	До вакцино терапии	После инициирующ его курса	После поддерживаю щего курса	Через 6 месяцев наблюдения
Биохимический анализ крови:				
АЛТ(ЕД/л)	1 (22-75)	28 (22-61)	43 (21-67)	32,5 (18,4-63)
АСТ (ЕД/л)	37±5 31 (24-45)	34±5 26 (24-44)	41±9 32 (26-45)	32±4 30,2 (23-38)
ГГТП (ЕД/л)	19 (17-34)	21 (16-27)	17 (15-27)	21 (15-50)
Билирубин	13,3 (12-20)	9,5 (6,7-13)	8,3 (5-13,1)	8,8 (6-11,7)

общий (мкМоль/л)				
Билирубин прямой (мкМоль/л)	3,2 (2,9-5)	2,4 (1,6-3,6)	2,3 (1,6-3,3)	3,2 (2,4-3,8)
Общий анализ крови:				
Лейкоциты [ $\times 10^9/\text{л}$ ]	5,3 (4,9-5,5)	5,7 (5-6,1)	5,0 (4,8-5,4)	5,2 (4,8-6,1)
Эритроциты [ $\times 10^{12}/\text{л}$ ]	4,8 (4,6-5)	4,5 (4,3-4,7)	4,8 (4,7-5)	4,7 (4,6-5,2)
Гемоглобин [г/л]	143 (131-152)	127 (124-142)	137 (121-143)	135 (121-150)
Тромбоциты [ $\times 10^9/\text{л}$ ]	232 (211-278)	239 (217-263)	215 (189-250)	230 (188-265)
Лимфоциты [%]	37,5 (34-40)	37 (36-40)	37,5 (35-39)	38,5 (37-40)
СОЭ [мм/час]	7,5 (5-25)	14 (6-21)	8 (6-16)	8,5 (5-12)

**Примечание:** представлены данные (Me; IQR-в скобках) показателей крови 10 больных ХГС в динамике вакцинотерапии.

Местные поствакцинальные реакции в виде покраснения, припухлости, зуда и болезненности в месте введения вакцины регистрировались в 37,5-80% случаев (Табл.13) и были в первую очередь обусловлены подкожным введением Ронколейкина в качестве адьюванта. Общие реакции в виде озноба, субфебрильной лихорадки, головной боли и недомогания отмечались в 6,6-32,5% случаев. Поствакцинальные реакции купировались самостоятельно в течение 24-48 ч.

**Таблица 13**

Поствакцинальные реакции пациентов с ХГС в динамике иммунотерапии ДК

Тип реакций	Частота поствакцинальных реакций (n, %) в динамике иницирующего курса	Частота поствакцинальных реакций (n, %) в динамике поддерживающего курса
Локальные:		
Покраснение	24/40 (60%)	43/60 (71,6%)
Болезненность	32/40 (80%)	42/60 (70%)

Зуд	15/40 (37,5%)	24/60(40%)
Системные:		
Озноб	9/40 (22,5%)	7/60 (11,6%)
Субфебрилитет	13/40 (32,5%)	7/60 (11,6%)
Головная боль	10/40 (25%)	4/60(6,6%)
Миалгии	10/40 (25%)	9/60 (15%)

**Примечание:** представлены данные в виде отношения случаев поствакцинальных реакций к общему числу вакцинаций (%) пациентов после иницирующего курса и поддерживающего курса.

### 3.4.2. Индукция иммунного ответа у пациентов с ХГС в динамике иммунотерапии ИФН-ДК

Для оценки индукции антигенспецифического иммунного ответа на фоне иммунотерапии ДК исследовали пролиферативный ответ, продукцию Th1-(IFN- $\gamma$ )/Th2(IL-4) цитокинов и активацию CD8<sup>+</sup> Т-клеток (в тесте дегрануляции) в ответ на стимуляцию МНК рекомбинантными Core (1–120) и NS3 (1192–1457) белками. Кроме того, исследовали эффект вакцинации на митогенную реактивность МНК при стимуляции Кона (неспецифическая реактивность) и генерацию регуляторных Т-клеток (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>).

#### *Антигенспецифический пролиферативный ответ*

Перед началом терапии МНК HCV-позитивных пациентов слабо отвечали пролиферацией на стимуляцию вирусными антигенами (Табл.14). Медианное значение индекса стимуляции Core (ИС<sub>Core</sub>) составляло 1,4. После первого и второго курса иммунотерапии Core-специфическая пролиферация (ИС) возрастала до 5,2 и 7,8, соответственно. Спустя период последующего 6 месячного наблюдения медианный уровень Core-специфической пролиферации снижался, однако по-прежнему значимо превышал исходный (до терапии) уровень.

Медианный уровень NS3-специфической пролиферации (ИС<sub>NS3</sub>) до терапии был также низким (Me ИС<sub>NS3</sub>=2,5), умеренно возрастал после первого курса вакцинаций и сохранялся на этом уровне после второго курса и 6-месячного

наблюдения. Однако возрастание NS3-специфической пролиферации было статистически не значимо. NS3-специфический ответ после второго курса и периода 6-месячного наблюдения был достоверно ниже Core-специфической пролиферации ( $p_U=0.004$  и  $p_U=0,02$ ; соответственно).

Таблица 14

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

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

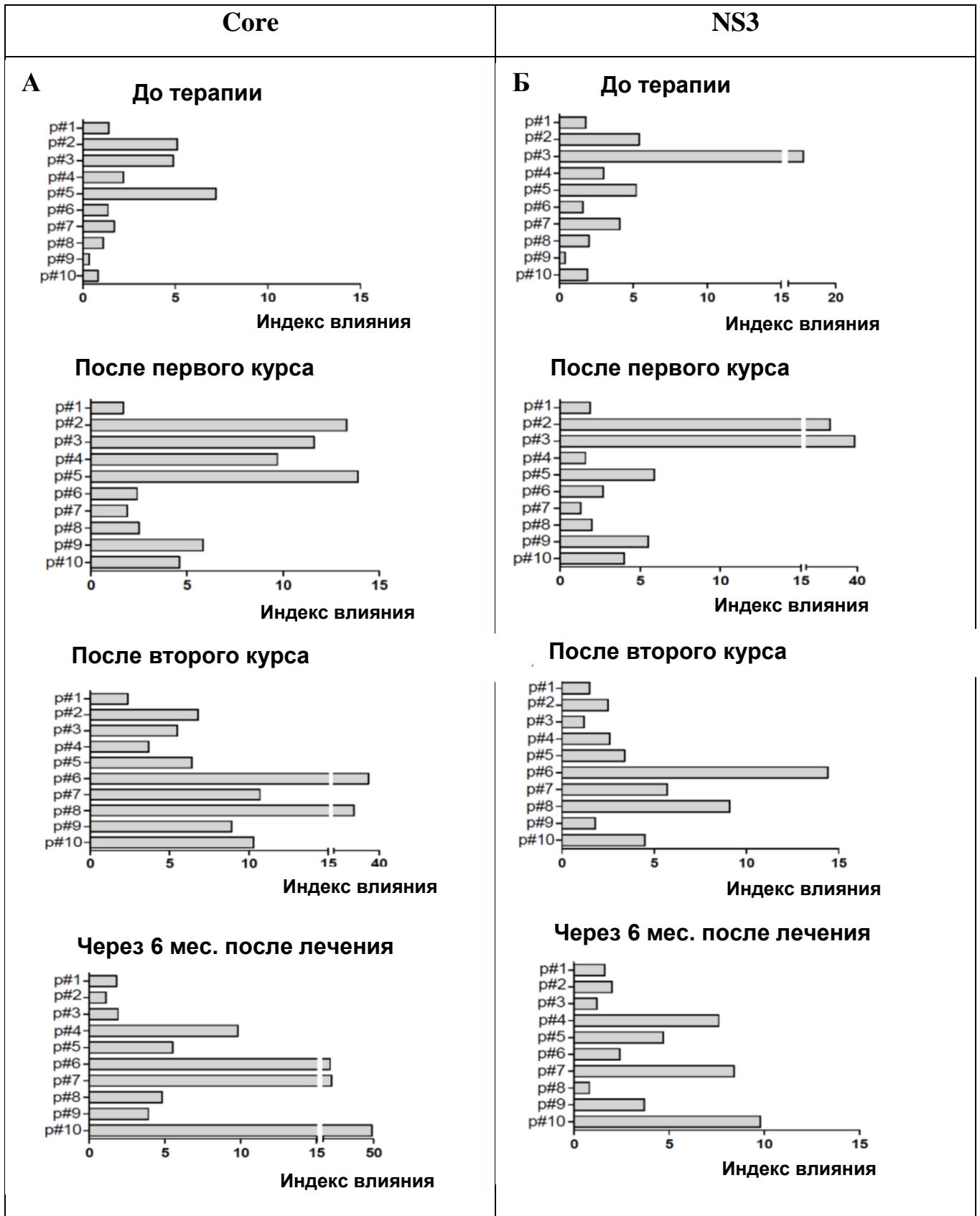
**Примечание:** данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона (в скобках); p - значимость различий показателей по сравнению со значениями до вакцинации. U-критерий Манна-Уитни.

Анализ индивидуальных данных (Рис.11А) выявил наличие Core-специфического пролиферативного ответа у 9 пациентов. В трех случаях, у пациентов с исходным позитивным ответом на Core ( $ИС_{Core}>3,0$ ), отмечалось возрастание уровня ответа после первого курса вакцинаций (n=3), которое



сохранялось после второго курса. Шесть пациентов, которые исходно не отвечали, продемонстрировали позитивные ответы после первого (n=3) и второго (n=3) курса иммунотерапии. Важно отметить, что у 5-ти пациентов возрастание Core-специфической пролиферации регистрировалось на двух последовательных точках. Пять пациентов продемонстрировали развитие позитивных ответов во время иммунотерапии. Важно отметить, что появление или усиление NS3-специфического ответа у разных пациентов регистрировалось на различных временных точках и у большей части пациентов (6/9) было нестабильным.

Таким образом, иммунотерапия индуцировала выраженный и устойчивый пролиферативный ответ на Core, однако была менее эффективной в отношении индукции пролиферативного ответа к NS3.



**Рисунок 11 А, Б.** Антигенспецифический пролиферативный ответ (ИВ) МНК пациентов на стимуляцию Core и NS3 антигенами. Представлены индивидуальные значения.

### Митогенная реактивность

При оценке антигенспецифической пролиферации на вирусные антигены в качестве позитивного контроля оценивался ответ МНК на КонА (Табл. 15). До начала иммунотерапии пролиферативный ответ МНК больных на КонА был в 2 раза ниже, чем ответ МНК здоровых доноров – (Me ИС КонА 58; IQR 45-77 vs 101; IQR 86-129;  $p_U < 0,05$ ). После первого курса иммунотерапии пациенты восстанавливали исходно сниженную митогенную реактивность и поддерживали ее на нормативном уровне после второго курса и 6-мес периода наблюдения.

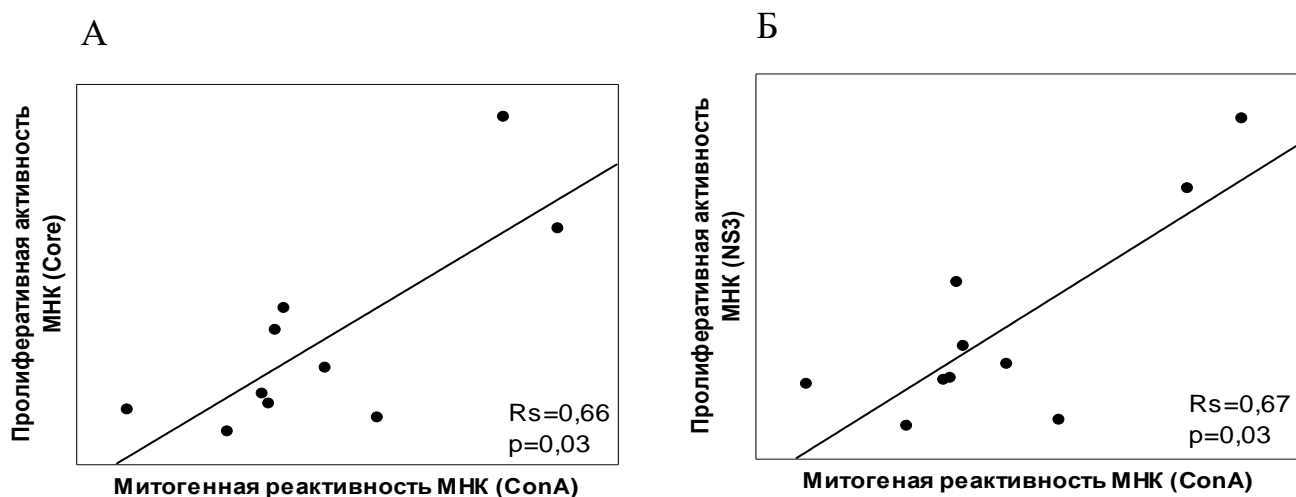
**Таблица 15**

Митогенная реактивность МНК больных ХГС в динамике иммунотерапии

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

**Примечание:** данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона (в скобках); индекс влияния рассчитывали как отношение ответа в КонА-стимулированных культурах к спонтанной пролиферации МНК; \* -  $p_U < 0,05$ ; значимость различий по сравнению со значениями до вакцинации. У-непараметрический критерий Манна-Уитни.

Следует отметить, что исходно (Рис. 12 А, Б) уровень КонА-стимулированной пролиферации достоверно коррелировал с Core- ( $R_s = 0,66$ , при  $p=0,03$ ) и NS3- специфическим ответом ( $R_s = 0,67$ ;  $p=0,03$ ;  $n=10$ ).

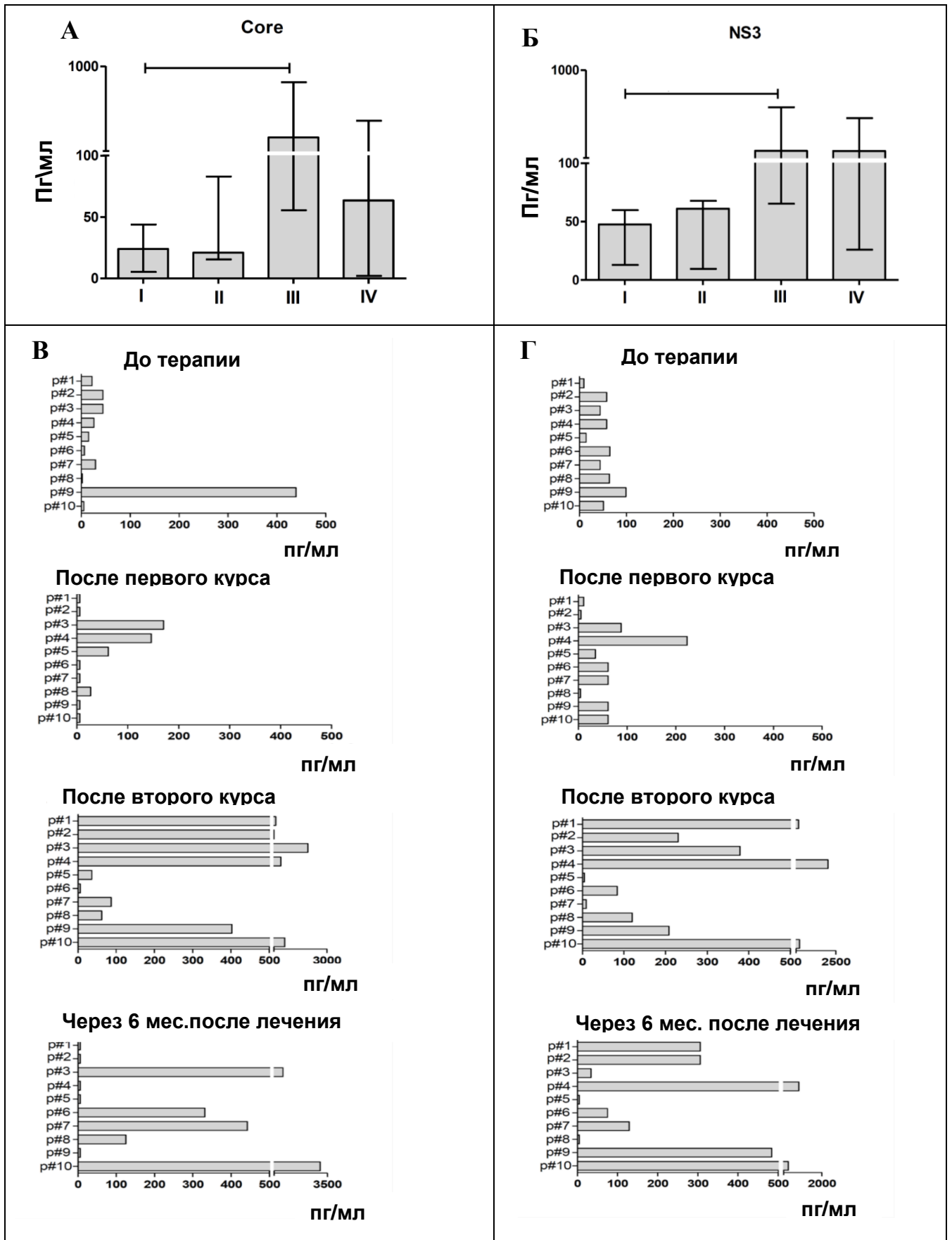


**Рисунок 12.** Корреляционная связь между антигенспецифическим ответом на Core (А) и NS3 (Б) антигены и митогенной реактивностью МНК после второго курса вакцинотерапии.  $R_s$ =коэффициент корреляции Спирмена,  $p$ -значимость различий.

В то же время после второго курса вакцинаций эта корреляционная связь ослабевала и становилась статистически незначимой ( $R_s = 0,47$ ,  $p=0,16$  с Core-, и  $R_s = 0,44$ ,  $p = 0,2$  с NS3-специфической пролиферацией). Таким образом, хотя индукция устойчивого ответа на Core и преходящего ответа на NS3 в процессе иммунотерапии происходила на фоне восстановления исходно сниженной митогенной реактивности Т-клеток, отсутствие значимой корреляции между ответом на HCV антигены и КонА указывало на то, что усиление антигенспецифического ответа не было связано исключительно с неспецифической активацией Т-клеток.

#### *Th1/Th2- антигенспецифический ответ*

Для анализа индукции Th1 ответа в процессе иммунотерапии, оценивали продукцию IFN- $\gamma$  в культурах МНК, стимулированных Core или NS3 антигенами (Рис 13). Медианные уровни Core- и NS3-индуцированной продукции IFN- $\gamma$  до лечения и после первого курса иммунотерапии были низкими, значимо возрастали после второго курса вакцинаций и снижались к моменту завершения 6-месячного наблюдения (Рис. 13А, Б).



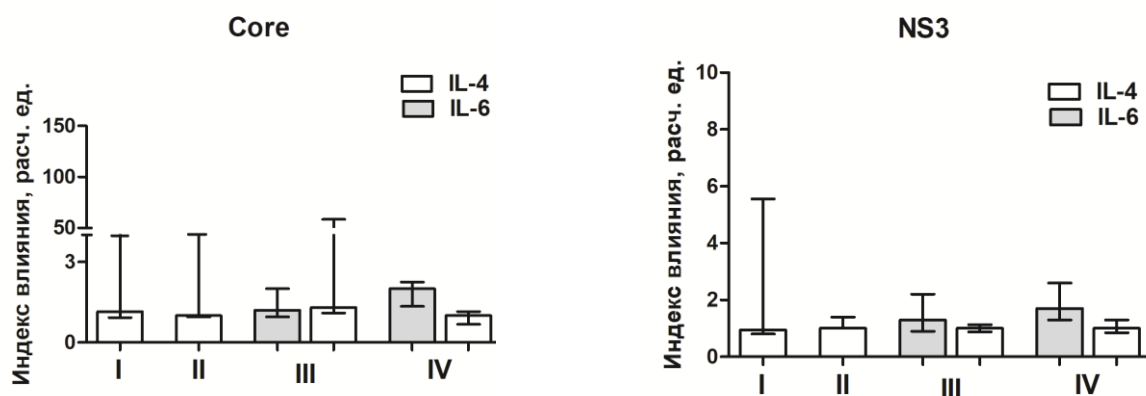
**Рисунок 13.** Продукция IFN-γ в культурах МНК, стимулированных Core и NS3 антигенами в динамике вакцинотерапии. Ответ считали позитивным при уровне продукции IFN-γ в Core-и NS3-стимулированных культурах >60 пг/мл.

Девять пациентов ответили на терапию появлением Core-позитивного ответа (продукция IFN- $\gamma$  >60 пг/мл), который был стабильным в 5 случаях (Рис.13 В).

Позитивный NS3-специфический ответ также отмечался у 9 пациентов. Из них у 6 пациентов с исходным отсутствием ответа отмечалось появление продукции IFN- $\gamma$  и у 3 пациентов с исходным позитивным ответом – усиление продукции IFN- $\gamma$ . При этом у 7 пациентов регистрировался стабильный ответ (Рис. 13 Г).

Таким образом, иммунотерапия ДК индуцировала Th1 ответ у большинства пациентов, но это ответ развивался позже по сравнению с антигенспецифическим пролиферативным ответом.

Чтобы оценить, индуцировался ли при проведении иммунотерапии Th2 ответ, также исследовали антигенспецифическую продукцию IL-4. Несмотря на способность ДК активировать Т-клетки к продукции IFN- $\gamma$ , иммунотерапия не усиливала способность МНК секретировать IL-4 при стимуляции Core/NS3 (Рис. 14). Учитывая низкий уровень IL-4 в культурах антиген-стимулированных МНК, мы также оценили секрецию IL-6, который продуцируется Th2 клетками на более высоком уровне. Уровень IL-6 измерялся в культурах МНК, полученных после второго курса вакцинаций и 6-месячного периода наблюдения, т.е. на временных точках, соответствующих наиболее выраженной продукции IFN- $\gamma$ . Исходно МНК пациентов характеризовались высоко детектируемым уровнем спонтанной продукции IL-6 (Me 369; IQR 201-533 пг/мл). Однако стимуляция Core и NS3 не усиливала продукции данного цитокина при обследовании пациентов на III и IV точках, соответственно (Рис. 14). Таким образом, вакциноотерапия ДК, нагруженными Core и NS3 антигенами не вызывала значимой активации антигенспецифических Th2-клеток.



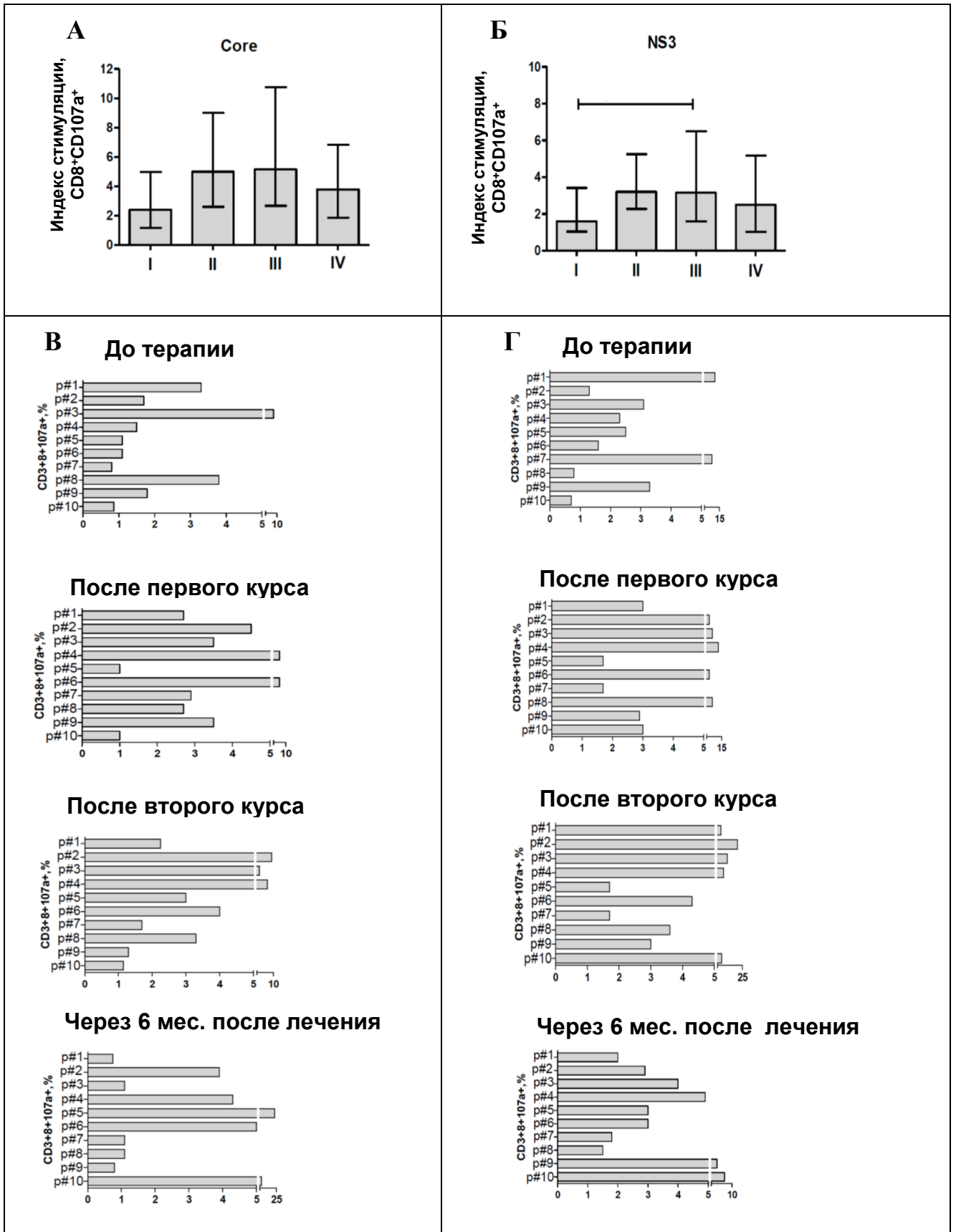
**Рисунок 14.** Продукция IL-4 и IL-6 в культурах МНК, стимулированных Core и NS3 антигенами, в динамике иммунотерапии ДК. Представлены данные (Me; UQ-LQ, n=10) по продукции IL-4, IL-6 в культурах МНК пациентов с ХГС (n=10) до начала иммунотерапии (I), после первого курса (II), после второго курса (III) и через 6 мес наблюдения (IV).

#### *Антигенстимулированная дегрануляция CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов*

Для мониторинга ответа цитотоксических Т-клеток исследовали антиген-индуцированную дегрануляцию CD8<sup>+</sup> Т-клеток, используя цитофлюориметрическую оценку мобилизации молекулы CD107a. Как было показано в главе 3.2.1. поверхностная экспрессия CD107a на CD8<sup>+</sup> Т-клетках HCV-серонегативных доноров в нестимулированных культурах МНК детектировалась на низком уровне и не возрастала при стимуляции Core и NS3 белками, хотя существенно увеличивалась при стимуляции anti-CD3 антителами, используемыми в качестве позитивного контроля. Уровень спонтанной дегрануляции CD8<sup>+</sup> Т-клеток у больных ХГС не отличался от такового у доноров. В то же время стимуляция Core- и NS3 антигенами приводила к существенному возрастанию CD8<sup>+</sup> CD107a лимфоцитов.

Относительное содержание Core- и NS3-индуцированных CD8<sup>+</sup>CD107a лимфоцитов было повышено исходно (перед терапией) и возрастало на фоне иммунотерапии, а к исходу 6-месячного наблюдения снижалось до исходного уровня (Рис. 15 А, Б). Характерно, что по силе ответа Core-специфическая дегрануляция CD8<sup>+</sup> Т клеток превышала NS3-индуцированный цитотоксический ответ. Эти различия были достоверны после первого ( $p_w=0,04$ ) и ( $p_w=0,02$ )

второго курса вакцинаций и регистрировались в виде тренда после 6-месячного наблюдения ( $p_w=0,07$ ).





**Рисунок 15.** Антигенстимулированная дегрануляция CD8<sup>+</sup>T-клеток в динамике вакцинотерапии. А, Б - представлены индексы стимуляции (Me; IQR); С, D- индивидуальные значения дегрануляции при стимуляции Core- и NS3 антигенами на различных точках обследования.

Анализ индивидуальных данных (Рис. 15 В, Г) показал, что количество респондеров, продемонстрировавших появление Core- специфического ответа цитотоксических Т-клеток, составило 6 человек, включая 4 пациентов со стабильным ответом. У 4 пациентов развитие позитивного ответа (ИССcore  $\geq 3.0$ ) наблюдалось после первого курса, у одного – после второго курса и еще одного – спустя 6-месячный период наблюдения. Количество респондеров при анализе NS3-специфического ответа составило 8 человек. Шесть пациентов продемонстрировали появление ответа (ИНС3  $\geq 3.0$ ), которое регистрировалось у 5-ти пациентов после 2-го курса терапии (III) и 1-го пациента к исходу 6-месячного наблюдения; у двух из четырех пациентов с исходным позитивным ответом наблюдалось возрастание ответа к моменту завершения иммунотерапии (III) (Рис.15 Г). NS3-специфический ответ цитотоксических Т-лимфоцитов был стабильным у 7 из 8 пациентов.

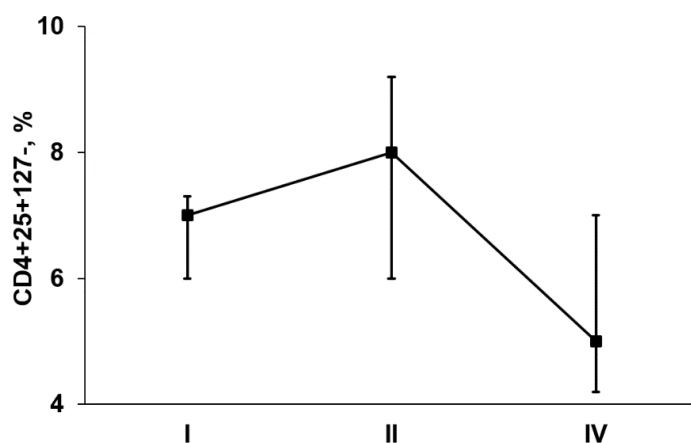
*Взаимосвязь между пролиферативной активностью антигенспецифических Т-клеток и их способностью к продукции IFN- $\gamma$  и дегрануляции*

Индивидуальный анализ всех трех типов ответов показал, что терапия ДК индуцировала Core и NS3-специфический иммунный ответ у всех пациентов, хотя наблюдались существенные индивидуальные различия в популяции антигенспецифических Т-клеток по способности к пролиферации, продукции IFN- $\gamma$  и дегрануляции. При анализе Core-специфического ответа, у 7 пациентов было отмечено появление или усиление всех трех типов ответа, хотя время их развития варьировало. При анализе NS3-специфических клеточных реакций, вакцинация индуцировала все три типа ответа (пролиферацию, продукцию IFN- $\gamma$  и дегрануляцию CD8<sup>+</sup> Т-клеток) у 5 пациентов.

Исследование взаимосвязи между пролиферативным ответом, продукцией IFN- $\gamma$  и дегрануляцией CD8<sup>+</sup> Т-клеток показало, что исходно Core-специфическая продукция IFN- $\gamma$  не коррелировала с пролиферативным ответом ( $R=0,28$ ;  $p=0,42$ ), а между уровнем NS3-специфической пролиферацией и секрецией IFN- $\gamma$  выявлялась обратная зависимость ( $R=-0,64$ ;  $p=0,046$ ). В то же время через 6 месяцев после завершения терапии (IV) антиген-индуцированная продукция IFN- $\gamma$  прямо коррелировала с пролиферативным ответом  $R_s=0,83$ ;  $p=0,04$  и  $R_s=0,78$ ;  $p=0,036$ , соответственно. Аналогичным образом, исходно Core-специфическая дегрануляция не коррелировала с продукцией IFN- $\gamma$  ( $R_s=0,28$ ;  $p=0,42$ ), а NS3-специфическая дегрануляция обратно коррелировала с продукцией IFN- $\gamma$  ( $R_s=-0,64$ ;  $p=0,04$ ). Однако спустя 6 мес после иммунотерапии относительное количество CD8<sup>+</sup> клеток, дегранулирующих в ответ на стимуляцию Core- и NS3, находилось в прямой взаимосвязи с продукцией IFN- $\gamma$  ( $R_s=0,94$ ;  $p=0,0001$  и  $R_s=0,82$ ;  $p=0,004$ , соответственно).

#### *Оценка регуляторных Т-клеток и вирусной нагрузки в динамике терапии*

Чтобы исследовать возможное влияние иммунотерапии на генерацию регуляторных Т-клеток (Treg), было оценено относительное содержание CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>Treg в периферической крови больных в динамике лечения.



**Рисунок 16.** Относительное содержание CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> Treg в динамике иммунотерапии ДК. Представлены данные Me и UQ-LQ. По оси ординат – точки обследования: I - до начала иммунотерапии, II - после первого курса и IV – спустя 6 мес наблюдения после завершения второго курса.

Как видно из данных рис. 16, относительное содержание Treg после проведения первого курса вакцинотерапии, а также к исходу 6 месячного наблюдения после завершения иммунотерапии значимо не увеличивалось. Следует также отметить, что исходно (перед началом иммунотерапии) и на момент завершения исследования между количеством Treg и антигенспецифическим ответом не выявлялось какой-либо взаимосвязи.

Далее было проанализировано влияние иммунотерапии ДК на вирусную нагрузку. Медианный уровень HCV РНК исходно составлял  $12,3 (3,5-94) \times 10^4$  ЕД/мл и значимо не изменялся после первого курса  $10,2 (4,1-35) \times 10^4$  ЕД/мл, второго курса  $12 (6,5-56) \times 10^4$  МЕ/мл и 6-месячного периода наблюдения  $20,5 (4,7-40) \times 10^4$  МЕ/мл. Анализ индивидуальных данных динамики вирусной нагрузки показал, что временное снижение HCV РНК (около 1 порядка) после первого курса терапии (через 1 месяц) отмечалось у 4 пациентов. Однако только у двух из них эффект сохранялся до конца наблюдения (IV), т.е. спустя 6 месяцев после завершения второго курса иммунотерапии. У шести пациентов изменений в уровне HCV РНК не наблюдалось, и у двух – к моменту завершения исследования отмечалось возрастание уровня HCV RNA (на 1 порядок).

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

Полученные данные свидетельствуют, что вакцинация аутологичными ИФН-ДК, нагруженными рекомбинантными HCV белками, в виде монотерапии вызывает развитие антигенспецифического ответа, который подтверждается возрастанием пролиферации, продукции IFN- $\gamma$  и дегрануляции CD8<sup>+</sup> Т-клеток при

стимуляции МНК Core (1–120) и NS3 (1192–1457) белками. Иммунный ответ индуцируется у всех пациентов, хотя характеризуется индивидуальной гетерогенностью по типу клеточных реакций, а также выраженности и продолжительности ответа. Core/NS3-специфический пролиферативный ответ и активация цитотоксических Т-клеток наблюдаются раньше - после первого курса вакцинаций. При этом ответ на Core более выражен, чем ответ на NS3. Появление антигенспецифических Т-клеток, продуцирующих IFN- $\gamma$ , происходит позже – после второго курса вакцинаций. Характерно, что иммунотерапия ДК не приводит к активации Th2 ответа и экспансии регуляторных Т-клеток.

Полученные данные об обратной корреляционной связи между индуцированным иммунным ответом (NS3-специфическая пролиферация и продукция IFN- $\gamma$ ) и вирусной нагрузкой после проведения иммунотерапии ДК свидетельствуют о способности Т-клеток контролировать репликацию вируса. Тем не менее, вакциноterapia ДК в режиме монотерапии не обладает достаточной эффективностью для полной элиминации вируса. Выраженное и стойкое снижение вирусной нагрузки зарегистрировано только у 20% пациентов.

### **3.5. Исследование HCV-специфического клеточного ответа у пациентов с хроническим гепатитом С на фоне иммунотерапии дендритными клетками в комбинации с противовирусной терапией интерфероном и рибавирином**

Полученные в предыдущем разделе данные показали, что иммунотерапия ИФН-ДК, нагруженными вирусными белками Core и NS3 индуцирует HCV-специфический ответ, выраженность которого находится в обратной корреляционной связи с вирусной нагрузкой. Тем не менее, индуцированный клеточный иммунный ответ является недостаточно сильным, чтобы полностью элиминировать вирус. С другой стороны известно, что стандартная

противовирусная терапия пегилированными интерферонами и рибавирином эффективна у пациентов с ХГС генотипом 1 лишь в 40-50% случаев, и успешность терапии выше у пациентов с наличием более выраженного антигенспецифического Т-клеточного ответа. Поэтому логично было предположить, что комбинация иммунотерапии ДК с противовирусной терапией может повысить эффективность последней. Однако в литературе имеются данные о негативном влиянии противовирусных препаратов на ДК. Поэтому в заключение работы представлялось важным выяснить – способны ли ИФН-ДК индуцировать антигенспецифический ответ при проведении ДК-вакцинаций на фоне противовирусной терапии, и позволяет ли такой подход повысить эффективность противовирусного ответа. Для этого в группе из 8 пациентов были исследованы показатели иммунного ответа МНК на стимуляцию Core и NS3 белками, а также вирусная нагрузка в динамике комбинированной терапии. Данный фрагмент работы был проведен в рамках научного поискового исследования в дизайне открытого нерандомизированного проспективного клинического испытания безопасности и эффективности комбинированной иммунотерапии.

### **3.5.1. Переносимость и безопасность иммунотерапии**

Вакциноterapia аутологичными ИФН-ДК, нагруженными Core и NS3 вирусными антигенами, характеризовалась удовлетворительной переносимостью. Ни у одного из пациентов иммунотерапия не была прекращена в связи с развитием серьезных нежелательных явлений, включая обострение хронических заболеваний и ситуаций, требующих госпитализации пациента. Введение ДК вакцин не влияло на показатели крови и не вызывало токсических реакций со стороны различных органов (Табл. 16).

Показатели крови пациентов с ХГС в динамике комбинированного лечения

	До терапии n=8	После 1 мес.терапии n=8	После 3 мес. терапии n=5	После 6 мес. терапии n=3
Биохимический анализ крови:				
Аланинамино трансфераза (ЕД/л)	1 (22-75)	28 (22-61)	43 (21-67)	55,3 (27-63)
Аспартатамино трансфераза (ЕД/л)	31,6(24-45)	25,5(24-44)	32 (26-45)	35 (26-36)
Гамма- глутамил- аминопептидаза (ЕД/л)	19(17-34)	21(16-27)	17 (15-27)	22 (15-78)
Билирубин Общий (мкМоль/л)	13,3 (12-20)	9,5 (6,7-13)	8,3 (5-13,1)	8,2 (4,7-11,7)
Билирубин прямой (мкМоль/л)	3,2 (2,9-5)	2,4 (1,6-3,6)	2,3 (1,6-3,3)	3 (1,2-3,8)
Общий анализ крови				
Лейкоциты [x10 <sup>9</sup> /л]	5,3 (4,9-5,5)	5,7 (5-6,1)	5 (4,8-5,4)	5 (4,8-5,3)
Эритроциты [x10 <sup>12</sup> / л]	5,1 (4,8-5,3)	4,4 (4,3-4,6)	4,2 (4-4,2)	4,2(4-5,2)
Гемоглобин [г/л]	143(131-152)	127(124-142)	137(121-143)	132(121-138)
Тромбоциты [x10 <sup>9</sup> / л]	198(151-242)	182(123-213)	173(136-183)	160(65-199)
Лимфоциты [ % ]	1,6(1,2-2)	1,7 (1,1-2,2)	1 (0,8-2,1)	1 (0,8-2,1)
Нейтрофилы [ % ]	2,2 (1,9-3,3)	1,1 (0,6-1,7)	1 (1,07-1,25)	2,2 (1-2,4)
СОЭ [мм/час]	6,5 (4-9)	12,5 (12-18)	13 (12-15)	12 (3-14)

**Примечание:** представлены данные (Me; IQR-в скобках; n=количество наблюдений) показателей крови в динамике терапии.

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

**Таблица 17**

Пост-вакцинальные реакции пациентов с ХГС в динамике иммунотерапии ДК

Тип реакций	Частота поствакцинальных реакций (n,%) в динамике первого курса	Частота поствакцинальных реакций (n,%) в динамике второго курса
Локальные:		
Покраснение	24/29 (83%)	10/24 (42%)
Зуд	21/29 (72%)	9/24 (38%)
Системные:		
Озноб	7/29 (24%)	1/24 (11,6%)
Субфебрилитет	6/29 (20%)	2/24 (11,6%)
Головная боль	3/29 (10%)	0/24 (0%)
Миалгии	3/29 (10%)	0/24 (0%)

**Примечание:** представлены данные в виде отношения случаев поствакцинальных реакций к общему числу вакцинаций (%) пациентов во время проведения первого и второго курса вакцинаций.

Местные поствакцинальные реакции в виде покраснения, припухлости, зуда и болезненности в месте введения вакцины регистрировались в 38–83 % случаев и были в первую очередь обусловлены подкожным введением ронколейкина в качестве адьюванта. Общие реакции в виде озноба, субфебрильной лихорадки, головной боли и недомогания отмечались в 11,6% случаев. Поствакцинальные реакции купировались самостоятельно в течение 24-48 часов (Табл. 17).

### **3.5.2. Оценка иммунного ответа на фоне комбинированного лечения пациентов с ХГС**

#### *Антигенспецифический пролиферативный ответ*

Оценка пролиферативного ответа *ex vivo* выявила 2-х фазный характер изменений Core-индуцированной пролиферации (Табл. 18). Через 1 мес от начала терапии Core-специфический ответ ( $IC_{Core}$ ) повышался, к исходу 3 месяцев лечения возвращался к исходному уровню, а спустя 6 мес вновь возрастал. Появление или усиление позитивного ответа на Core было зарегистрировано у 4 из 8 пациентов. NS3- специфический пролиферативный ответ до начала терапии практически не детектировался - наличие позитивного ответа ( $IC > 3,0$ ) выявлялось у 1-го из 8 пациентов. Через 1 мес терапии  $IC_{NS3}$  возрастал до 1,7; через 3 мес - достигал 19,0 и к исходу 6 мес снижался до 3,2, превышая исходный уровень. Число респондеров составило 5 человек. Таким образом, вакцинация пациентов ДК<sub>Core/NS3</sub> на фоне противовирусной терапии приводила к выраженному и достоверному возрастанию NS3-специфического пролиферативного ответа МНК и умеренному усилению Core-специфического ответа.



Таблица 18

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

Точки обследования	NS3		Core	
	Индекс стимуляции (расч.ед.)	Частота пациентов с ИС >3,0	Индекс стимуляции (расч.ед.)	Частота пациентов с ИС >3,0
До терапии n=8	1,1 (0,7-1,9)	1/8	2,8 (1,6-3,9)	3/8
Через 1 мес. терапии, n=6	1,7 (1,6-3,8)	2/6	4,3 (1,9-5,8)	4/6
Через 3 мес. терапии, n=5	19* (5-21)	4/5	2,7 (1,6-6,6)	2/5
Через 6 мес. терапии, n=4	3,2 (2,2-5,1)	3/4	4,0 (1,3-5,6)	1/4

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

#### *Митогенная реактивность МНК*

Анализ митогенной реактивности МНК больных ХГС в динамике терапии показал, что комбинированная ИТ сопровождалась снижением неспецифической Кона-стимулированной пролиферации МНК. Так, через 1 и 3 мес терапии интенсивность Кона-стимулированной пролиферации достоверно уменьшалась и к моменту завершения 6-месячного курса лечения оставалась сниженной (Табл. 19). Следует отметить, что на начальных этапах (до ИТ либо через 1 мес после начала терапии) уровень Кона-стимулированной пролиферации достоверно коррелировал с Core- специфическим ( $R_s = 0,73$ ,  $p = 0,03$ ) и NS3-специфическим ответом ( $R_s = 0,9$ ,  $p = 0,03$ ). В то же время после 3-6 месяцев лечения эта корреляционная связь нивелировалась. Таким образом снижение неспецифической митоген-стимулированной пролиферативной активности Т-

клеток в процессе комбинированной ИТ не влияло критическим образом на индукцию Core- и NS3-специфического пролиферативного ответа.

Таблица 19

Пролиферативная активность МНК стимулированных Конконавалином А

Контрольные точки	Пролиферативный ответ (имп/мин)
До терапии, n=8	27706 (24483-36401)
Через 1 мес. терапии, n=6	13866 (6776-22062)*
Через 3 мес. терапии, n=5	11728 (8769-12858)*
Через 6 мес. терапии, n=4	14652 (8671-41436)

**Примечание:** данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона (в скобках); n=количество наблюдений, индекс стимуляции рассчитывали как отношение ответа в КонА-стимулированных культурах к спонтанной пролиферации МНК; \* -  $p_U < 0,05$ ; достоверность различия показателей по сравнению со значениями до терапии. U- непараметрический критерий Манна-Уитни.

#### *Влияние комбинированной иммунотерапии на цитотоксические Т-лимфоциты*

Исследование влияния терапии на ЦТЛ показало, что проведение терапии сопровождалось возрастанием ответа  $CD8^+$  Т-клеток в тесте Core и NS3-индуцированной дегрануляции, что свидетельствовало о возрастании доли HCV-специфических ЦТЛ в динамике терапии (Табл. 20). До начала терапии относительное содержание  $CD8^+CD107a^+$  Т-клеток у больных в NS3- и Core-стимулированных культурах МНК на уровне медианных значений составляло 1,2% и 1,0%, соответственно. Через месяц лечения содержание Core-специфических  $CD8^+CD107a^+$  Т-клеток значимо возрастало и сохранялось на данном уровне через 3–6 мес. лечения. Увеличение доли NS3-специфических  $CD8^+CD107a^+$  Т-клеток было менее выраженным, проявлялось в виде выраженной тенденции и достигало максимума через 3–6 мес. лечения. Таким образом, вакцинация ДК на фоне противовирусной терапии индуцировала появление сенсibilизированных  $CD8^+$  Т-клеток, способных отвечать дегрануляцией на

стимуляцию вирусными белками, причем Core-специфический ответ характеризовался большей выраженностью.

**Таблица 20**

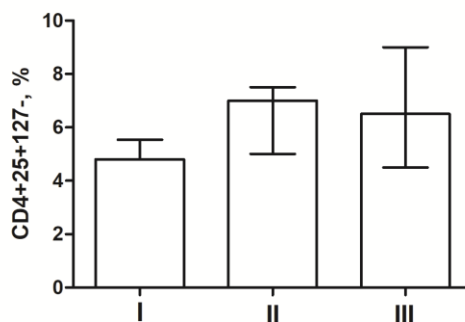
Относительное содержание CD8<sup>+</sup>CD107a<sup>+</sup> цитотоксических Т-лимфоцитов в динамике комбинированной терапии

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

**Примечание:** Данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона (в скобках) относительного количества антиген-стимулированных CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD107a<sup>+</sup> клеток, определяемых в виде разности между количеством дегранулирующих клеток в NS3-, Core- или anti-CD3 стимулированных культурах и уровнем спонтанной дегрануляции в контрольных культурах МНК; n=количество наблюдений. \*- достоверность различий по сравнению с показателями до терапии.

*Генерация регуляторных Т-клеток на фоне комбинированного лечения*

Оценка влияния комбинированной терапии на генерацию CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> Treg показала, что проведение лечения не сопровождалось возрастанием доли регуляторных Т-клеток через 1 и 3-6 месяцев (рис. 17). Также корреляционный анализ не выявил связи между уровнем регуляторных Т-клеток и пролиферативным ответом на NS3 и Core- на фоне терапии (общая выборка через 1 и 3 месяца, n=10) ( $R_s=0,3$ ,  $p=0,3$  и  $R_s=-0,3$ ,  $p=0,3$ ; соответственно), что свидетельствует об отсутствии стимулирующего действия терапии на генерацию Treg несмотря на снижение неспецифической реактивности Т-клеток.



**Рисунок 17.** Относительное содержание  $CD4^{+}25^{+}127^{-}$ - регуляторных Т-клеток в динамике терапии. Относительное содержание  $CD4^{+}25^{+}127^{-}$  регуляторных Т-клеток в динамике терапии. Приведено относительное содержание  $CD4^{+}25^{+}127^{-}$ -Т-клеток до начала терапии (I) - (n=6), II - после 1 мес. терапии (n=6). III - через 3 - 6 мес. терапии (n=6), Представлены данные Me и UQ-LQ.

*Влияния комбинированной иммунотерапии на вирусологические показатели больных хроническим вирусным гепатитом С в динамике лечения*

Для оценки вирусологического ответа был проведен сравнительный анализ вирусной нагрузки с помощью количественного ПЦР на РНК вируса гепатита С до терапии, через месяц лечения, через 3 и 6 месяцев лечения (Табл. 21).

Поскольку один пациент прекратил лечение через 1 мес, оценка быстрого вирусологического ответа (БВО; снижение или отсутствие РНК вируса в крови через 1 месяц терапии) была проанализирована у 7 пациентов. БВО был достигнут у 6 из 7 пациентов (86%). При анализе индивидуальных значений у двух пациентов уровень репликации РНК вируса гепатита С находился в диапазоне недетектируемых значений, у одного – снизился на 3 порядка, у двух – на 2 порядка, у одного пациента на один порядок и у одного остался без динамики (стабильная виремия). Через 6 мес терапии двое пациентов с недетектируемым уровнем РНК сохранили аналогичный показатель. Еще у двоих пациентов (со снижением вирусной нагрузки через месяц лечения) – на 2-ой и 3-ей контрольных точках наблюдалось снижение вирусной РНК до недетектируемого уровня. В итоге, у всех 4-х пациентов, прошедших 6-месячный курс лечения был достигнут устойчивый вирусологический ответ в виде отсутствия РНК HCV вируса в крови.

Характеристика вирусной нагрузки пациентов в динамике терапии

Пациент N п.п	До терапии, n=8	Через 1 мес. терапии, n=7	Через 3 мес. терапии, n=5	Через 6 мес. терапии, n=4
1.Больной А.	$8,8 \times 10^4$	выбыл	выбыл	выбыл
2.Больной Р.	$3,5 \times 10^5$	$6,5 \times 10^3$	выбыл	выбыл
3.Больной Л.	$3,5 \times 10^4$	$6,9 \times 10^4$	$9,4 \times 10^4$	выбыл
4.Больной Б.Б.	$2,4 \times 10^4$	$7,4 \times 10^2$	<60	<60
5.Больной Т.	$3,2 \times 10^5$	$5,8 \times 10^4$	выбыл	выбыл
6.Больной М.	$3,9 \times 10^5$	<60	<60	<60
7.Больной П.	$1,3 \times 10^6$	$1,5 \times 10^3$	<60	<60
8.Больной Б.	$3,4 \times 10^5$	<60	<60	<60

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

Полученные данные позволяют сделать несколько заключений. Во-первых, противовирусная терапия, хотя и оказывает ингибирующий эффект на митогенную реактивность Т-клеток, не подавляет индукции специфической пролиферации и дегрануляции CD8<sup>+</sup> Т-клеток при стимуляции МНК Core- и NS3 белками, в динамике терапии. При этом снижение митогенной реактивности не связано с экспансией CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup> Treg. Во-вторых, вакцинация пациентов ДК<sub>Core/NS3</sub> на фоне противовирусной терапии приводила к более выраженному NS3-специфическому пролиферативному ответу (по сравнению с ответом на Core-) к исходу через 3 мес. лечения. Наконец, быстрый вирусологический ответ наблюдался у 6 из 7 пациентов (86%), а у всех 4 пациентов, получивших 3-месячное лечение, регистрировалось полное прекращение репликации вируса, которое сохранялось к исходу 6-мес лечения, т.е. достигался устойчивый вирусологический ответ.

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Влияние HCV белков на ДК представляет интерес как с точки зрения выяснения механизмов иммунных дисфункций у пациентов с ХГС, так и разработки технологий получения лечебных ДК-вакцин. Действительно, согласно ряду исследований, генерируемые из моноцитов ДК у пациентов с ХГС обладают сниженной способностью активировать Т-лимфоциты и продуцировать IL-12, активирующий Th1-ответ [6]. Аналогичным образом, выделенные из периферической крови больных ХГС миелоидные и плазмацитоидные ДК отличаются сниженной продукцией IL-12 и IFN- $\alpha$ , соответственно, а также меньшей Th1-поляризующей активностью [71]. Нарушение функций ДК рассматривается как одна из возможных причин неэффективного Т-клеточного противовирусного ответа при ХГС и обосновывает разработку ДК-вакцин, как новую стратегию для восстановления иммунного ответа при ХГС. Вместе с тем, поскольку нарушение функций ДК во многом связывают с действием вирусных белков, выбор вирусных антигенов для нагрузки ДК и характеристика их супрессивных свойств становятся неременным этапом разработки ДК-вакцин.

В настоящей работе впервые изучено влияние комбинации рекомбинантных белков, кодируемых усеченными фрагментами генов Core (1-120) и NS3 (1192-1457) на созревание и функции ДК, генерируемых из моноцитов в присутствии GM-CSF и IFN- $\alpha$ . Выбор именно этих белков был обусловлен тем, что оба протеина содержат эпитопы, распознаваемые CD4<sup>+</sup> Т-хелперными клетками и CD8<sup>+</sup> цитотоксическими лимфоцитами. При этом Core белок имеет большое значение во взаимодействии с внутриклеточными сигнальными молекулами [74], а NS3 антиген – в регуляции репликации вируса [118]. Необходимость оценки совместного влияния вирусных белков была связана с планируемым использованием для нагрузки ИФН-ДК одновременно капсидного и

неструктурного HCV антигенов, которые в комбинации могли обладать аддитивным супрессивным эффектом.

Проведенные исследования показали, что 1-часовая преинкубация ИФН-ДК с вирусными белками Core и NS3 в дозе по 5 мкг/мл не оказывала цитотоксического действия на ДК и не подавляла уровень экспрессии антигенпрезентирующих, костимуляторных и активационных молекул (CD86, HLA-DR, CD25, CD83). Таким образом, исследуемые рекомбинантные белки не оказывали негативного влияния на созревание ИФН-ДК.

Нагрузка ДК вирусными белками Core и NS3 также не оказывала ингибирующего действия на аллостимуляторную активность ИФН-ДК и их способность активировать Т-клетки к продукции Th1 и Th2 цитокинов. Способность ДК стимулировать пролиферацию аллогенных Т-лимфоцитов и детерминировать Th1/Th2 во многом определяется степенью зрелости ДК. Поскольку исследуемые вирусные антигены не ингибировали созревания ДК, отсутствие эффекта рекомбинантных Core и NS3 белков на аллостимуляторную и Th1/Th2 стимулирующую активность ИФН-ДК представляется вполне объяснимым.

Имеющиеся в литературе данные о иммуносупрессивных свойствах вирусных белков на ДК неоднозначны и достаточно противоречивы. С одной стороны, показано, что структурные и неструктурные вирусные белки подавляют дифференцировку и функции ДК. Так, Dolganiuc A. et al. продемонстрировали, что Core и NS3 белки (но не оболочечный белок E2) активируют моноциты и подавляют их дифференцировку в ДК. Генерируемые в присутствии этих белков незрелые ДК отличаются повышенной продукцией IL-10, сниженной аллостимуляторной активностью и при контакте с аллогенными Т-клетками усиливают способность Т-лимфоцитов продуцировать IL-10, одновременно снижая способность секретировать IL-2 [35]. Waggoner S.N. et al. показали, что Core белок подавляет индуцированную ЛПС или poly(I:C) продукцию IL-12, не снижает аллостимуляторную активность ДК, однако угнетает Th1-стимулирующую и усиливает Th2-стимулирующую активность ДК в алло-СКЛ

[175]. Нарушение антигенпрезентирующей функции ДК было также продемонстрировано при трансфекции аденовируса, содержащего HCV Core и E1 антигены. ДК, экспрессирующие Core или Core и E1 кодируемые белки, обладали низкой аллостимуляторной активностью и индуцировали слабый пролиферативный ответ аутологичных Т-клеток вследствие низкой продукции Т-клетками IL-2 [149].

С другой стороны, Dolganiuc A. et al. отметили, что супрессивный эффект Core и NS3 белков проявляется на этапе дифференцировки ДК, но не выявляется на этапе созревания, т.е. в культурах ЛПС-стимулированных ДК [35]. Схожие данные получены Landi A. et al., которые показали, что трансфекция РНК Core и NS3 в незрелые ДК не оказывала ингибирующего влияния на созревание и аллостимуляторную активность ДК [86]. В исследованиях Li W. было показано, что ДК, экспрессирующие NS3 или Core белок, обладали обычным фенотипом, сохранной аллостимуляторной активностью и эффективно стимулировали антигенспецифический ответ Т-клеток на чужеродные антигены [100]. В свою очередь, при тестировании эффектов вирусных белков на миелоидные ДК, выделенные из периферической крови, было показано, что HCV Core белок умеренно усиливает экспрессию CD83, CD86, и CD40 на ДК, но при этом подавляет способность ДК активировать наивные Т-клетки к продукции IFN- $\gamma$  [96].

Разнонаправленные эффекты вирусных белков на созревание и функции ДК могут отчасти объясняться особенностями тестируемых ДК, связанными с источником получения, условиями генерации и способами индукции созревания ДК. В этом аспекте следует отметить, что интактные ИФН-ДК отличаются от ИЛ4-ДК более зрелым фенотипом [47], что может объяснять их резистентность к ингибирующему действию вирусных белков.

Кроме того, нами использовались рекомбинантные белки, представляющие аналоги усеченных форм Core и NS3 вирусных белков, которые отличались от рекомбинантных белков, используемых другими авторами. Согласно данным литературы, иммуносупрессивная активность свойственна в большей степени



полноразмерным белкам [82], тогда как усеченные фрагменты Core и/или NS3 белков или их пептиды не обладают выраженными иммуносупрессивными свойствами [4, 184].

В целом, полученные нами данные свидетельствуют, что нагрузка ИФН-ДК рекомбинантными белками, соответствующими фрагментам HCV белков Core (1-120) и NS3 (1192-1457), не влияет негативно на созревание и функциональную активность ДК, что обосновывает целесообразность дальнейших исследований ИФН-ДК, нагруженными данными белками, в индукции специфического противовирусного иммунного ответа у больных ХГС.

Известно, что персистенция HCV-инфекции ассоциирована со слабым антигенспецифическим ответом CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток [164]. Поэтому разработка подходов к активации HCV-специфического Т-клеточного ответа остается актуальной задачей. Результаты настоящей работы продемонстрировали возможность индукции *in vitro* HCV-специфического клеточного ответа с помощью IFN- $\alpha$  индуцированных ДК, нагруженных рекомбинантными HCV Core (1–120) и NS3 (1192–1457) антигенами.

Эксперименты с культурами МНК серонегативных доноров (т.е. в популяции, не содержащей HCV-примированных Т-клеток) позволили оценить первичный ответ и показали, что антигенспецифический пролиферативный ответ детектировался лучше при стимуляции ДК доноров, нагруженных одновременно обоими антигенами (ДК<sub>Core/NS3</sub>), чем при нагрузке ДК одним белком (ДК<sub>Core</sub> или ДК<sub>NS3</sub>), что очевидно связано с презентацией большего количества пептидов и вовлечением большего количества антиген-распознающих Т-клеток. С другой стороны, этот факт свидетельствует, что используемые для нагрузки белки не оказывают взаимного ингибирующего действия на стимуляторную активность ДК. Ингибирующий эффект HCV Core и NS3 антигенов на ДК является известным фактом однако в большей степени характерен для полноразмерных белков (Core 2-191) или их фрагментов, расположенных ближе к 3'-концу РНК ВГС (NS3 1450-1643) [34]. В то же время усеченный белок NS3 (1192–1457) не оказывал ингибирующего действия на аллостимуляторную активность ИЛ4-ДК, а

супрессорный эффект Core (2-120) зависел от концентрации белка и зрелости ДК [82].

Настоящая работа является еще одним подтверждением отсутствия супрессорного эффекта выбранных рекомбинантных белков на функциональную активность ИФН-ДК, поскольку нагрузка ИФН-ДК данными антигенами не подавляла пролиферативный ответ аутологичных Т-клеток и стимулирующий эффект при нагрузке ДК двумя белками был выше, чем при стимуляции одним белком. Характеризуя первичный клеточный ответ на стимуляцию ДК<sub>Core/NS3</sub> доноров, следует отметить, что пролиферация антиген-реактивных клеток и дегрануляция антигенспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов индуцировалась в культурах МНК всех тестируемых доноров. В то же время усиление продукции ИФН- $\gamma$  отмечалось в половине (5/10) случаев. Тестировании Th2 ответа у 4 из 10 доноров выявило усиление продукции ИЛ-4 и ИЛ-6 только у 1-го индивида, не ответившего усилением продукции ИФН- $\gamma$ .

Способность ДК доноров индуцировать *in vitro* HCV-специфический Т-клеточный ответ была впервые продемонстрирована Li W. с соавт. Авторы использовали ДК, генерируемые из моноцитов в присутствии GM-CSF и ИЛ-4 (ИЛ4-ДК) и трансфицированные HCV Core и NS3 генами [100]. На выборке трех репрезентативных доноров было показано, что незрелые Core- и NS3-экспрессирующие ДК индуцировали в антиген-реактивных Т-клетках экспрессию мРНК TNF- $\alpha$ , ИЛ-2 и ИЛ-4, а зрелые ДК активировали экспрессию ИФН- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , ИЛ12-p40, ИЛ-6, ИЛ-10 и в меньшей степени ИЛ-4. Авторы также оценили пролиферативный ответ, который отмечался у всех трех доноров и был выше на Core антиген, и продукцию ИФН- $\gamma$ , выявленную у 2 из 3 доноров при стимуляции ДК, экспрессирующими как Core-, так и NS3 антигены [99]. Позже было показано, что ИЛ4-ДК, нагруженные иммуногенными HCV пептидами также могут индуцировать наивные Т-клетки к иммунному распознаванию, активации Th1 ответа и генерации эпитоп-специфических цитотоксических Т-клеток [59, 108]. Полученные нами результаты согласуются с данными других авторов о способности ДК индуцировать антигенспецифический ответ в культурах МНК

серонегативных доноров, а с другой - впервые демонстрируют возможность использования для этих целей ДК, генерируемых в присутствии ИФН- $\alpha$ , и нагруженных усеченными рекомбинантными белками HCV Core и NS3. При этом нами получены новые данные о меньшей стимуляторной активности ИФН-ДК на продукцию IL-4 и IL-6 по сравнению со способностью активировать продукцию IFN- $\gamma$  и высокой способностью ИФН-ДК к индукции цитотоксических Т-клеток. Эффективность ИФН-ДК, нагруженных усеченными HCV Core и NS3 антигенами может быть обусловлена большей эффективностью ИФН-ДК в кросспрезентации длиннорамерных пептидов, презентации вирусных белков и индукции вирус-специфических цитотоксических Т-клеток [26, 66, 87, 139].

Исследования у пациентов с ХГС (генотип 1) показали, что несмотря на сниженный ответ МНК на Т-клеточный митоген КонА, ДК пациентов обладали сохранной стимуляторной активностью и индуцировали в ауто-СКЛ такой же уровень пролиферативного ответа Т-лимфоцитов, как и ДК доноров. Более того, ДК пациентов при нагрузке HCV Core и NS3 антигенами индуцировали специфический клеточный ответ в культурах аутологичных МНК. Пролиферативный ответ при изолированной нагрузке ДК Core либо NS3 антигеном регистрировался соответственно у 2 и 3 из 4 тестируемых пациентов, усиление Core- и NS3-специфической продукции IFN- $\gamma$  выявлялось у 3 из 4 пациентов. При этом все три пациента, ответившие на стимуляцию ДК<sub>Core</sub>, отвечали и на стимуляцию ДК<sub>NS3</sub>. При анализе стимуляторной активности ДК, нагруженных двумя антигенами, ДК пациентов были схожи с ДК доноров по способности индуцировать пролиферативный ответ (у 6 из 7 (85,7%) пациентов) и продукцию IFN- $\gamma$  (у 4 из 7 (57%) пациентов). В то же время ответ цитотоксических Т-клеток при стимуляции ДК пациентов индуцировался реже, чем у доноров (57% против 100%), что могло быть отчасти связано с повышенной дегрануляцией CD8<sup>+</sup> Т-клеток у ряда пациентов в контрольных культурах.

Полученные нами результаты подтверждают возможность индукции *in vitro* антигенспецифического Т-клеточного ответа у больных ХГС. При этом поскольку в настоящей работе исследовались ДК, генерируемые в присутствии ИФН- $\alpha$ , и эти

ДК не отличались от ДК доноров по способности стимулировать пролиферацию аутологичных Т-лимфоцитов, активация HCV-реактивных Т-клеток не требовала дополнительной костимуляции.

Представленное исследование имеет ряд ограничений. Так, пролиферативная активность и продукция цитокинов оценивалась нами в виде валовых показателей, а не на уровне одной клетки. Это не позволило оценить вклад отдельных субпопуляций ( $CD4^+$  и  $CD8^+$ ) HCV-реактивных клеток в иммунном ответе, а также охарактеризовать гетерогенность антиген-специфических клеток по их функциональной активности. Тем не менее, поскольку используемые рекомбинантные антигены в предварительном тестировании не показали прямого неспецифического стимулирующего действия на функции МНК серонегативных доноров, то возрастание пролиферации, продукции цитокинов и дегрануляции цитотоксических  $CD8^+$  Т-лимфоцитов в культурах МНК с ДК, нагруженными HCV-антигенами по сравнению с ответом в присутствии ненагруженных антигеном ДК, свидетельствовало об антигенспецифическом характере ответа и позволяло оценить *in vitro* HCV-специфический клеточный ответ.

В целом, данные о способности ИФН-ДК доноров и больных ХГС примировать и активировать Т-клетки, специфические к HCV антигенам, обосновывают перспективы использования ДК-вакцин для стимуляции иммунного ответа при хронической HCV-инфекции.

Данные о том, что выздоровление пациентов с вирусным гепатитом С ассоциировано с сильным противовирусным Т-клеточным ответом, в индукции которого ведущая роль отводится ДК, позволяет предполагать, что терапевтические ДК-вакцины могут быть использованы для индукции или усиления специфического иммунного ответа у больных с ХГС. В соответствии с этим предположением было изучено влияние иммунотерапии ДК на параметры Т-клеточного иммунного ответа у больных ХГС.

Полученные результаты показали, что вакциноterapia ДК, которые генерировали из моноцитов в присутствии интерферона- $\alpha$  и нагружали

рекомбинантными вирусными белками Core (1–120) и NS3 (1192–1457), характеризуется хорошей переносимостью и не вызывает тяжелых нежелательных явлений, выраженных местных или системных пост-вакцинальных реакций и усиления биохимических проявлений активности гепатита.

Исследования *ex vivo* иммунологических параметров в динамике лечения также продемонстрировали, что вакциноterapia приводила к индукции выраженного устойчивого иммунного ответа на Core и умеренного ответа на NS3. Специфический ответ на Core проявлялся усилением пролиферации МНК и продукции IFN- $\gamma$  при антигенспецифической стимуляции МНК. Возрастание реактивности к Core антигену регистрировалось после инициирующего курса, и было наиболее выраженным после поддерживающего курса и последующего 6-месячного наблюдения. В то же время NS3-специфический ответ проявлялся преимущественно усилением продукции IFN- $\gamma$  после поддерживающего курса и последующего 6 мес наблюдения. Усиление пролиферативной активности МНК на NS3 было слабо выраженным и недостоверным. Важно отметить, что вакциноterapia уже после инициирующего курса сопровождалась восстановлением митогенной реактивности Т-клеток у больных ХГС. При этом мы не наблюдали активации антигенспецифической продукции IL-4 и IL-6, т.е. индукции Th2-ответа. Кроме того, иммуноterapia ДК не сопровождалась возрастанием относительного содержания регуляторных ( $CD4^+CD25^+CD127^-$ ) Т-клеток.

Ранее Li W. с соавт продемонстрировал способность ДК здоровых доноров, экспрессирующих Core и NS3 белки, вызывать пролиферацию антигенспецифических Т-клеток и продукцию IFN- $\gamma$ , а также других цитокинов в культуре *in vitro* [99]. Позднее было показано, что ДК, трансфицированные аденовирусом, содержащим NS3 (AdNS3), способны активировать *in vitro* специфические IFN- $\gamma$  продуцирующие Т-клетки не только у здоровых доноров, но и больных ХГС. Причем в отличие от ДК доноров, активирующих специфический иммунный ответ при трансфекции только одного NS3, ДК больных индуцировали

NS3-специфический ответ только при совместной трансфекции AdNS3 и адапторной молекулы CFh40L, кодирующей CD40L [183].

Несмотря на стимулирующий эффект ДК *in vitro*, пилотные клинические исследования ДК у больных ХГС не выявили эффективной индукции Т-клеточного ответа. Так, трехкратная вакцинация ДК, трансфецированными AdNS3 и CFh40L, вызывала кратковременную активацию IFN $\gamma$ -продуцирующих Т-клеток в культурах NS3-стимулированных МНК только у 1-го из 5 пациентов [183]. В другом исследовании Gowans E.J. с соавт. исследовали иммуностимулирующий эффект ДК, которые нагружали вирусными антигенами, Core, NS3 и NS4, соединенными с липидным остатком, являющимся лигандом для Toll-подобных рецепторов 2 типа. Появление Core-специфических цитотоксических Т-лимфоцитов отмечалось только у 3 из 6 пациентов, а NS3-специфических CD8<sup>+</sup> Т-клеток у 1 из 6 пациентов, причем иммунный ответ был нестойким [54].

В качестве одной из причин несостоятельности антигенспецифического ответа у больных ХГС обсуждается повышенное содержание Treg и иммуносупрессивных цитокинов [107]. Так, низкую иммуностимулирующую активность ДК, трансфецированных AdNS3 и CFh40L, у больных ХГС авторы объяснили усилением продукции IL-10 дендритными клетками больных и генерацией Treg после трансдукции CFh40L [183]. В нашем исследовании иммунотерапии ДК не сопровождалась экспансией CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup> регуляторных Т-клеток, что, по-видимому, способствовало индукции антигенспецифического ответа.

Следует отметить, что в обоих клинических исследованиях [54, 183] авторы не выявили снижения вирусной нагрузки, что объяснялось недостаточной силой и устойчивостью иммунного ответа. В нашем исследовании в целом по группе значимого снижения виремии также не отмечалось. Тем не менее, при индивидуальном анализе у 4 пациентов наблюдалось преходящее, а у 2 - стойкое снижение виремии. В 6 из 10 случаев виремия на протяжении 13 мес исследования не нарастала, сохраняясь на исходно умеренном уровне. Более того,

на момент завершения исследования между уровнем виремии и антигенспецифическим ответом регистрировалась обратная корреляционная связь (статистически значимая в отношении NS3-стимулированной пролиферации МНК, на уровне выраженного тренда - в отношении NS3 и Core-стимулированной продукции IFN- $\gamma$ ).

Согласно данным литературы, неструктурный вирусный белок NS3, обладает протеазной и геликазной активностью и играет важную роль в размножении вирус [38]. Сильный и устойчивый Т-клеточный иммунный ответ к эпитопам этого белка сопряжен с более эффективным контролем за вирусом [22, 33]. Кроме того, высокая цитотоксическая активность NS3-специфических Т-клеток ассоциирована с ответом на терапию интерфероном- $\alpha$  [173]. Полученные нами данные об обратной взаимосвязи виремии с уровнем NS3 специфического ответа у больных ХГС являются еще одним аргументом в пользу важной роли NS3-специфических Т-клеток в контроле над репликацией вируса. Однако выявление наряду с этим обратной взаимосвязи между виремией и Core-индуцированной продукцией IFN- $\gamma$  позволяет предполагать, что Core-специфические Т-клетки также могут участвовать в элиминации вируса.

Действительно, известно, что противовирусный эффект Т-клеток опосредуется как за счет прямого цитолитического действия, так и продукции IFN- $\gamma$  [67]. В наших исследованиях вакцинотерапия сопровождалась значимым усилением продукции IFN- $\gamma$  при стимуляции как NS3, так и Core, причем усиление пролиферации МНК при стимуляции обоими антигенами коррелировало с продукцией IFN- $\gamma$ . Это позволяет полагать, что будучи, источником IFN- $\gamma$  Core-специфические клетки наряду с NS3-специфическими Т-лимфоцитами также могут участвовать в ограничении репликации вируса.

В целом, полученные данные свидетельствуют о безопасности иммунотерапии ИФН-ДК, нагруженными рекомбинантными вирусными антигенами, и позволяет рассматривать данный подход в качестве дополнения к терапии пегилированными интерферонами и рибавирином для улучшения результатов лечения.

Апробация иммунотерапии ДК в комплексном лечении, т.е. в комбинации с противовирусной терапией (интерфероном- $\alpha$  и рибавирином) также показала отсутствие тяжелых нежелательных явлений, хотя у больных отмечались побочные реакции, связанные с применением интерферона. Противовирусная терапия интерфероном- $\alpha$  и рибавирином не ингибировала развития антигенспецифического ответа. Вакциноterapia ДК приводила к умеренному повышению Core- и NS3-специфического пролиферативного ответа через 1 месяц терапии, при этом ответ на Core антиген был более выраженным. Однако к концу 3 месячного периода лечения регистрировалось выраженное и значимое усиление антигенспецифического ответа на NS3 антиген при снижении Core-специфического до исходного уровня. После завершения 6 мес. курса терапии антигенспецифические ответы снижались, но оставались на уровнях, превышающих значения до терапии, что свидетельствует об устойчивости индуцированного специфического иммунного ответа. Анализ динамики цитотоксической функции  $CD8^+$  Т-клеток (по способности экспрессировать CD107a при антиген-индуцированной дегрануляции цитотоксических Т-клеток), играющих ключевую роль в элиминации вируса, показал, что вакцинация ДК индуцировала появление антиген-специфических  $CD8^+$  Т-клеток. Максимальное количество таких Т-клеток регистрировалось уже по окончании первого курса вакцинаций (через 1 мес.) и сохранялось до конца лечения. При этом в отличие от NS3-специфических  $CD8^+$  Т-клеток, увеличение которых регистрировалось в виде тренда, 5-кратное возрастание Core-специфических  $CD8^+$  Т-клеток было статистически значимым и стабильным. Как и в случае монотерапии, вакцинация ДК в комплексном лечении не приводила к значимому возрастанию регуляторных Т-клеток, несмотря на снижение неспецифической реактивности Т-лимфоцитов на фоне терапии интерфероном- $\alpha$ . Быстрый вирусологический ответ (через 1 мес. лечения) на фоне иммунотерапии ДК в комплексном лечении ХГС был зарегистрирован у 86% пациентов. При этом все пациенты, завершившие на настоящий момент 6-месячный курс лечения, характеризовались полным угнетением репликации вируса. Поскольку терапия препаратами пегилированного



интерферона- $\alpha$  и рибавирином по данным литературы позволяет добиться устойчивого вирусологического ответа (неопределяемый уровень РНК HCV через 24 недели лечения) в 42–44% случаев у пациентов с генотипом 1 вируса гепатита С, полученные нами результаты свидетельствуют о большей эффективности противовирусной терапии в сочетании с ДК-вакцинами. В целом, результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что разработанный метод стимуляции иммунного ответа на основе вакцинации ДК, нагруженными вирусными антигенами, в комбинации с противовирусной терапией является перспективным эффективным методом лечения пациентов с ХГС. На основании полученных результатов разработана новая медицинская технология иммунотерапия с использованием аутологичных дендритно-клеточных вакцин в комплексном лечении больных с ХГС. Внедрение данной технологии в лечебную практику требует, однако, проверки эффективности на большей выборке пациентов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования позволяют заключить, что рекомбинантные белки, кодируемые усеченными фрагментами генов HCV Core (1-120) и NS3 (1192-1457), при использовании в качестве антигенов для нагрузки ДК не оказывают ингибирующего действия на созревание и функциональную активность генерируемых из моноцитов ИФН-ДК. Нагруженные указанными антигенами ДК (ДК<sub>Core/NS3</sub>) серонегативных доноров стимулируют *in vitro* антигенспецифические клеточные реакции, в частности, индуцируют пролиферативный ответ, продукцию IFN- $\gamma$  и дегрануляцию CD8<sup>+</sup> Т-клеток. ДК<sub>Core/NS3</sub> пациентов с ХГС также обладают способностью индуцировать *in vitro* антигенспецифические реакции в культурах аутологичных МНК, хотя с меньшей эффективностью в отношении активации цитотоксических Т-клеток. Клиническая апробация ДК<sub>Core/NS3</sub> в виде монотерапии показала отсутствие тяжелых нежелательных явлений и хорошую переносимость иммунотерапии. Курсовое введение ДК<sub>Core/NS3</sub> сопровождалось усилением пролиферативного ответа, продукции IFN- $\gamma$  и дегрануляции CD8<sup>+</sup> Т-клеток при стимуляции МНК Core и NS3 белками. Core/NS3-специфический пролиферативный ответ и активация цитотоксических Т-клеток наблюдались уже после первого курса вакцинаций, причем Core-индуцированный ответ был более выраженным, чем ответ на NS3. Усиление продукции IFN- $\gamma$  в ответ на стимуляцию Core и NS3 происходило позже – после второго курса вакцинаций. При этом иммунотерапия не приводит к активации Th2 ответа и экспансии CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> (регуляторных) Т-клеток. Следует отметить, что многократная вакцинация ДК<sub>Core/NS3</sub> вызывала развитие антигенспецифического иммунного ответа у всех пациентов, хотя параметры ответа (тип клеточных реакций, их выраженность и продолжительность ответа) характеризовались индивидуальной гетерогенностью. Монотерапия ДК<sub>Core/NS3</sub> не

приводила к элиминации вируса. Стойкое снижение вирусной нагрузки на 1 порядок регистрировалось только у 20% пациентов. Тем не менее, между вирусной нагрузкой и уровнем NS3-специфического ответа (пролиферация и продукция IFN- $\gamma$ ) регистрировалась обратная корреляционная зависимость, свидетельствующая о роли NS3-специфического клеточного ответа в ограничении репликации вируса. С другой стороны, недостаточная эффективность ДК-вакцины в виде монотерапии послужила обоснованием целесообразности комбинации вакцинотерапии с противовирусными препаратами.

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

высокой эффективности противовирусной терапии, проводимой на фоне вакцинации ДК<sub>Core/NS3</sub>.

## ВЫВОДЫ

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

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

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

4. Вакцинация ДК<sub>Core/NS3</sub>, в виде монотерапии сопровождается возрастанием пролиферации, продукции IFN- $\gamma$  и дегрануляции CD8<sup>+</sup> Т-клеток при стимуляции МНК пациентов Core и NS3 белками и восстановлением митогенной реактивности Т-клеток в отсутствие усиления продукции Th2 (IL-4, IL-6) цитокинов и экспансии CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> регуляторных Т-клеток, что свидетельствует о способности ИФН-ДК стимулировать HCV-специфический иммунный ответ у пациентов с ХГС.

5. Уровень NS3-специфической пролиферации и продукции IFN- $\gamma$  после проведения иммунотерапии ДК<sub>Core/NS3</sub>, обратно коррелирует с репликацией вируса, однако выраженное (на 1 порядок и более) и стойкое снижение вирусной нагрузки регистрируется только у 20% пациентов, что, с одной стороны, свидетельствует об участии NS3-специфических Т-клеток в контроле за репликацией вируса, а с другой - о недостаточной выраженности Т-клеточного ответа для полной элиминации вируса.

6. Вакцинация ДК<sub>Core/NS3</sub>, в сочетании с интерфероном и рибавирином приводит к усилению пролиферативного ответа и дегрануляции CD8<sup>+</sup>Т-клеток в ответ на стимуляцию МНК Core и NS3 белками (несмотря на подавление митогенной реактивности Т-клеток), что свидетельствует об отсутствии ингибирующего действия противовирусной терапии на способность ИФН-ДК индуцировать HCV-специфический иммунный ответ. При этом комбинированная терапия позволяет достичь быстрого вирусологического ответа у большинства (86%) пациентов.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

АГ	Антиген
АПК	Антиген презентирующие клетки
БВО	Быстрый вирусологический ответ
ДК	Дендритные клетки
ДК-вакцина	Дендритно-клеточная вакцина
ДК <sub>ЛПС</sub>	Дендритные клетки, стимулированные липополисахаридом
ДК <sub>0</sub>	Интактные ДК
ДК <sub>Core/NS3</sub>	ДК нагруженные Core и NS3 антигеном
ИФН-ДК	Интерферон-альфа-индуцированные дендритные клетки
Кона	Конканавалин А
ЛПС	Липополисахарид
МНК	Мононуклеарные клетки
мДК	Миелоидные дендритные клетки
моДК	Дендритные клетки моноцитарного происхождения
ПК	Периферическая кровь
пДК	Плазматоидные дендритные клетки
СКЛ	Смешанная культура лимфоцитов
УВО	Устойчивый вирусологический ответ
ФНО- $\alpha$	Фактор некроза опухоли- $\alpha$
ХГС	Хронический гепатит С
ЦТЛ	Цитотоксические Т-лимфоциты
CD	Кластер дифференцировки
CLRs	Лектины С типа
dsRNA	Двуцепочечная рибонуклеиновая кислота
FasL	Fas-лиганд
GM-CSF	Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

HLA-DR	МНС II класса
HCV	Вирус гепатита С
IDO	Индоламин 2,3-диоксигеназа
IFN- $\alpha$	Интерферон-альфа
ИФН- $\gamma$	Интерферон-гамма
IFN- $\lambda$	Интерферон-лямбда
IL-2, IL-4 и др.	Интерлейкин-2, интерлейкин-4 и др.
ИЛ4-ДК	Дендритные клетки генерированные в присутствии интерлейкина-4
Ig	Иммуноглобулин
МНС I, МНС II	Молекулы I и II класса главного комплекса гистосовместимости
NF $\kappa$ B	Ядерный фактор $\kappa$ B
NK-клетки	Натуральные киллерные клетки
NLRs	NOD-подобные рецепторы
PAMPs	Патоген-ассоциированные молекулярные паттерны
PI3K	Фосфатидилинозитол-3-киназный
PRRs	Паттерн-распознающие рецепторы
PD-1	Рецептор запрограммированной клеточной смерти-1
rIL-2	Рекомбинантный IL-2
RLRs	RIG-подобные рецепторы
ssRNA	Одноцепочечная рибонуклеиновая кислота
SN	Супернатант
TGF- $\beta$	Трансформирующий фактор роста-бета
Th0, Th1 и Th2	Субпопуляции Т-хелперных клеток 0,1,2 типа
TLR	Toll-подобные рецептор
TNF $\alpha$	Фактор некроза опухолей- $\alpha$
TRAIL	TNF-связанный апоптоз-индуцирующий лиганд
Treg	Регуляторные Т-клетки



**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Борисова А.Е., Старостина Н.М., Останин А.А., Черных Е.Р., Козлов В.А. Фенотип и Функции дендритных клеток у больных хроническими вирусными гепатитами // Медицинская Иммунология. - 2009. -Т. 11.- № 2-3, - С 191-196.
2. Леплина О.Ю. Характеристика интерферон-альфа-индуцированных дендритных клеток и их терапевтический потенциал в лечении онкологических и инфекционных заболеваний: автореф. дисс. докт. мед. наук: 14.03.09. -2011. -39 с.
3. Akira S., Uematsu S., Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity // Cell. -2006. - V. 124. - № 4, -P. 783-801.
4. Alvarez-Obregón J.C., Dueñas-Carrera S., Valenzuela C., Grillo J.M. A truncated HCV core protein elicits a potent immune response with a strong participation of cellular immunity components in mice // Vaccine. -2001. -V. 19. - P. 28-29.
5. Anthony D.D., Yonkers N.L., Post A.B., Asaad R., Heinzl F.P. et al. Selective impairments in dendritic cell-associated function distinguish hepatitis C virus and HIV infection // J Immunol. -2004, -V. 172, -№ 8, -P. 4907-4916.
6. Auffermann-Gretzinger S., Keeffe E.B., Levy S. Impaired dendritic cell maturation in patients with chronic, but not resolved, hepatitis C virus infection // Blood. -2001. -V. 97. - Suppl.10. - P. 3171-3176.
7. Bachem A., Guttler S., Hartung E., Ebstein F., Schaefer M., Tannert A., Salama A., Movassaghi K., Opitz C., Mages H.W., Henn V., Kloetzel P.M. et al. Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells // J Exp Med. - 2010. -V. 207. -№ 6. -P.1273-1281.
8. Badr G., Bédard N., Abdel-Hakeem M.S., Trautmann L., Willems B., Villeneuve J.P., Haddad E.K., Sékaly R.P., Bruneau J., Shoukry N.H. Early interferon therapy for hepatitis C virus infection rescues polyfunctional, long-lived CD8+ memory

T cells // *J. Virol.* -2008. -V. 82. -№ 20. -P. 10017-10031.

9. Bain C., Fatmi A., Zoulim F., Zarski J.P., Trepo C., Inchauspe G. Impaired allostimulatory function of dendritic cells in chronic hepatitis C infection // *Gastroenterology.* -2001. -V. 120.-№ 2.-P. 512-524.

10. Banchereau J., Briere F., Caux C., Davoust J., Lebecque S., Liu Y.J., Pulendran B., Palucka K. Immunobiology of dendritic cells // *Annu Rev Immunol.* - 2000. -V. 18. -P. 767-811.

11. Barnes E., Salio M., Cerundolo V., Francesco L., Pardoll D., Klenerman P., Cox A. Monocyte derived dendritic cells retain their functional capacity in patients following infection with hepatitis C virus // *J Viral Hepat.* - 2008. -V. 15. -№ 3. -P. 219-228.

12. Barnes E., Salio M., Cerundolo V., Medlin J., Murphy S. et al. Impact of interferon- $\alpha$  and ribavirin on the function of maturing dendritic cells // *Antimicrob. Agents Chemother.* - 2004. -V. 48. -№ 9. -P. 3382-3389.

13. Barth H., Ulsenheimer A., Pape G.R., Diepolder H.M., Hoffmann M. et al. Uptake and presentation of hepatitis C virus-like particles by human dendritic cells // *Blood.* - 2005. -V. 105. -№ 9. -P. 3605-3614.

14. Beaumont E., Roch E., Chopin L., Roingeard P. Hepatitis C Virus E1 and E2 Proteins Used as Separate Immunogens Induce Neutralizing Antibodies with Additive Properties // *PLoS One.* - 2016. - V. 11. -№ 3. - e0151626.

15. Behrens S., Tomei L., Francesco R. Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus // *EMBO J.* -1996. -V. 15. -№ 1, P. 12-22.

16. Bengsch B., Seigel B., Ruhl M., Timm J., Kuntz M. et al. Coexpression of PD-1, 2B4, CD160 and KLRG1 on exhausted HCV-specific CD81 T cells is linked to antigen recognition and T cell differentiation // *PLoS Pathog.* - 2010. - V. 6, -№ 6. - e1000947.

17. Boettler T., Spangenberg H.C., Neumann-Haefelin C., Panther E., Urbani S. et al. T cells with a CD4+CD25+ regulatory phenotype suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8+ T cells during chronic hepatitis C virus infection // *J. Virol.* -

2005. -V. 79. -№ 12. -P. 7860-7786.

18. Bolacchi F., Sinistro A., Ciaprini C., Demin F., Capozzi M et al. Hepatitis C virus (HCV)-specific CD41CD251 regulatory T lymphocytes and reduced HCVspecific CD41 T cell response in HCV-infected patients with normal versus abnormal alanine aminotransferase levels // Clin. Exp. Immunol. - 2006. -V. 144. -№ 2. -P. 188-196.

19. Boltjes Arjan, Wijk Femke van. Human Dendritic Cell Functional Specialization in Steady-State and Inflammation // Frontiers in Immunology. -2014. -V. 5. - P. 131.

20. Bowen D.G., Zen M., Holz L., Davis T., Geoffrey W. McCaughan, Bertolino P. The site of primary T cell activation is a determinant of the balance between intrahepatic tolerance and immunity // J. Clin. Invest. - 2004. -V. 114. -№. 5. - P. 701-712.

21. Brady M.T., MacDonald A.J., Rowan A.G., Mills K.H. Hepatitis C virus non-structural protein 4 suppresses Th1 responses by stimulating IL-10 production from monocytes // Eur J Immunol. - 2003. -V. 33, -№. 12. - P. 3448-3457.

22. Bronowicki J.P., Vetter D., Uhl G., Hudziak H., Uhrlacher A. et al. Lymphocyte reactivity to hepatitis C virus (HCV) antigens shows evidence for exposure to HCV in HCV-seronegative spouses of HCV-infected patients // J Infect Dis. - 1997. -V. 176, -№ 2, -P. 518-522.

23. Bukh J., Miller R.H., Purcell R.H. Sequence analysis of the core gene of 14 hepatitis C virus genotypes // Proc.Natl. Acad. Sci USA. - 1994. -V. 91, -№ 17. -P. 8239-8243.

24. Caetano J., Martinho A., Paiva A., Pais B., Valente C., Luxo C. Differences in hepatitis C virus (HCV)-specific CD8 T-cell phenotype during pegylated alpha interferon and ribavirin treatment are related to response to antiviral therapy in patients chronically infected with HCV // J Virol. -2008. -V. 82, -№ 15. -P. 7567-7577.

25. Canaday D.H., Burant C.J., Jones L., Aung H., Woc-Colburn L., Anthony D.D. Preserved MHC-II antigen processing and presentation function in chronic HCV infection // Cell Immunol. - 2011. -V. 266. -№ 2. -P. 187-191.

26. Carbonneil C., Aouba A., Burgard M., Cardinaud S., Rouzioux C et al. Dendritic cells generated in the presence of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IFN-alpha are potent inducers of HIV-specific CD8 T cells // *Aids*. - 2003. - V. 17. -№ 12. -P.1731-1740.
27. Cheent K., Khakoo S.I. Natural killer cells and hepatitis C: action and reaction. // *Gut*. -2011. -V.60. -№ 2. -P. 268-278.
28. Cheng P., Corzo C.A., Luetsteke N., Yu B., Nagaraj S. et al. Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein // *J Exp Med*. -2008. -V. 205. -№ 10. -P. 2235-2249.
29. Collin M., McGovern N., Haniffa M. Human dendritic cell subsets // *Immunology*. -2013. -V. 140. - № 1. -P. 22-30.
30. Crosignani A., Riva A., Bella S. Della Analysis of peripheral blood dendritic cells as a non-invasive tool in the follow-up of patients with chronic hepatitis C. // *World journal of gastroenterology*. -2016. -V. 22. -№ 4. - 44. -P. 1393-404.
31. Della Bella S., Crosignani A., Riva A., Presicce P., Benetti A. et al. Decrease and dysfunction of dendritic cells correlate with impaired hepatitis C virus-specific CD4+ T-cell proliferation in patients with hepatitis C virus infection // *Immunology*. -2007. -V. 121. -№ 2. P. 283-292.
32. Della Bella S., Nikola S., Riva A., Biasin M., Clerici M., Villa M. Functional repertoire of dendritic cells generated in granulocyte macrophage colony stimulating factor and interferon- $\alpha$  // *J.of Leukocyte Biology*. -2004. - V. 75. -№1. -P. 106-116.
33. Diepolder H.M., Gerlach J.T., Zachoval R., Hoffmann R.M., Jung M.C., et al. Immunodominant CD4 T-cell epitope within nonstructural protein 3 in acute hepatitis C virus infection // *J Virol*. - 1997. -V. 71, -№ 8. - P. 6011-6019.
34. Dolganiuc A., Kodys K., Kopasz A., Marshall C., Do T. et al. Hepatitis C virus core and nonstructural protein 3 proteins induce pro- and anti-inflammatory cytokines and inhibit dendritic cell differentiation. *J Immunol* // - 2003. -V. 170. - № 11. - P. 5615-5624.

35. Dolganiuc A., Oak S., Kodys K., Golenbock D.T., Finberg R.W., Kurt-Jones E., Szabo G. Hepatitis C core and nonstructural 3 proteins trigger toll-like receptor 2-mediated pathways and inflammatory activation // *Gastroenterology*. - 2004. -V. 127. - № 5. - P. 1513-1524.
36. Dolganiuc A., Paek E., Kodys K., Thomas J., Szabo G. Myeloid dendritic cells of patients with chronic HCV infection induce proliferation of regulatory T lymphocytes // *Gastroenterology*. -2008. -V. 135, - № 6. -P. 2119-2127.
37. Dolganiuc A., Szabo G. Dendritic cells in hepatitis C infection: can they (help) win the battle? // *J Gastroenterol*. - 2011. -V. 46, - № 4. -P. 432-447.
38. Dubuisson J. Hepatitis C virus proteins // *World J Gastroenterol*. - 2007. - V. 13, - №17. - P. 2406-2415.
39. Dustin L.B., Rice C.M. Flying under the radar: the immunobiology of hepatitis C // *Annu Rev. Immunol*. -2007. -V. 25. - P. 71-99.
40. Dustin LB, Bartolini B, Capobianchi MR, Pistello M. Hepatitis C virus: life cycle in cells, infection and host response, and analysis of molecular markers influencing the outcome of infection and response to therapy // *Clin Microbiol Infect*. - 2016. -V. 10. - №22. - P.826-832.
41. Echeverria I., Pereboev A., Silva L., Zabaleta A., Riezu-Boj J.I. et al. P. Enhanced T cell responses against hepatitis C virus by ex vivo targeting of adenoviral particles to dendritic cells // *Hepatology*. -2011. -V. 54, - №. 1. -P. 28-37.
42. Eickhoff S., Brewitz A., Gerner M., Klauschen F., Komander K et al. Robust anti-viral immunity requires multiple distinct T-cell dendritic cell interaction // *Cell*. - 2015. -V 162. -№ 6. - P. 1322-1337.
43. Fallarino F., Grohmann U., Vacca C., Bianchi R., Orabona C. et al. T cell apoptosis by tryptophan catabolism // *Cell Death Differ*. - 2002. -V. 9. -№ 10. -P. 1069-1077.
44. Fan Z., Huang X.L., Kalinski P., Young S., Rinaldo C.R. Jr Dendritic cell function during chronic hepatitis C virus and human immunodeficiency virus type 1 infection // *Clin Vaccine Immunol*. - 2007. -V. 14. -№ 9. -P. 1127-1137.
45. Farci P., Alter H.J., Shimoda A., Govindarajan S., Cheung L.C. et al.

Hepatitis C virus-associated fulminant hepatic failure // *N. Engl. J. Med.* - 1996. -V. 335. -№ 9. -P. 631-634.

46. Farkas Á., Kemény L. Interferon-conditioned Dendritic Cells for Melanoma Immunotherapy // *Journal of Immunotherapy.* -2011. - V. 34. - № 8. - P. 606–607.

47. Farkas A., Kemény L. Interferon- $\alpha$  in the generation of monocyte-derived dendritic cells: recent advances and implications for dermatology // *Br J Dermatol.* - 2011; - V. 165. - № 2. - P. 247-254.

48. Farkas A., Tonel G., Nestle F.O. Interferon- $\alpha$  and viral triggers promote functional maturation of human monocyte-derived dendritic cells // *Br J Dermatol.* - 2008. - V. 158. - № 5. - P. 921-929.

49. Flynn J.K., Dore G.J., Hellard M., Yeung B., Rawlinson W.D. et al. Early IL-10 predominant responses are associated with progression to chronic hepatitis C virus infection in injecting drug users // *J. Viral Hepat.* - 2011. -V. 18. - № 8. -P. 549-561.

50. Freeman G.J., Long A.J., Iwai Y., Bourque K., Chernova T. et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation // *J Exp Med.* - 2000. -V. 192. - № 7. -P. 1027-1034.

51. Friedman S.L. Liver fibrosis – from bench to bedside // *J. Hepatol.* -2003. - V. 38. - Suppl. 1. -P. 38-53.

52. Golden-Mason L., Palmer B., Klarquist J., Mengshol J.A., Castelblanco N., Rosen H.R. Upregulation of PD-1 expression on circulating and intrahepatic hepatitis C virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells associated with reversible immune dysfunction // *J. Virol.* - 2007. -V. 81. - №17. - P. 9249-9258.

53. Golden-Mason L, Palmer BE, Kassam N, Townshend-Bulson L, Livingston S et al. Negative immune regulator Tim-3 is overexpressed on T cells in hepatitis C virus infection and its blockade rescues dysfunctional CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. // *Journal of virology.* -2009. -V. 83. - № 18. - P. 9122-9130.

54. Gowans E.J., Roberts S., Jones K., Dinatale I., La tour P.A. et al. A phase I clinical trial of dendritic cell immunotherapy in HCV-infected individuals // *J Hepatol.* - 2010. -V. 53. - №. 4. - P. 599-607.
55. Grakoui A., Shoukry N.H., Woollard D.J., Han J.H., Hanson H.L., Ghayeb J., Murthy K.K., Rice C.M., Walker C.M. HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help // *Science.* - 2003. - V. 302, - № 5645. - P. 659-662.
56. Gelderblom H.C., Nijhuis L.E., de Jong E.C., te Velde A.A., Packrat D. et al. Monocyte-derived dendritic cells from chronic HCV patients are not infected but show an immature phenotype and aberrant cytokine profile // *Liver Int.* -2007. -V. 27. - № 7. - P. 944-953.
57. Gessani S., Conti L., Del Cornò M., Belardelli F. Type I interferons as regulators of human antigen presenting cell functions // *Toxins (Basel).* -2014. -V. 6, - № 6. -P. 1696-1723.
58. Gruber A., Lundberg L.G., Bjorkholm M. Reactivation of chronic hepatitis C after withdrawal of immunosuppressive therapy // *J. Intern. Med.* - 1993. -V. 234. - № 2. - P. 223-225.
59. Guo Z., Zhang H., Rao H., Jiang D., Cong X. et al. DCs pulsed with novel HLA-A2-restricted CTL epitopes against hepatitis C virus induced a broadly reactive anti-HCV-specific T lymphocyte response // *PLoS One.* - 2012. -V. 7, - № 6: e38390.
60. Hancharou A.Y., Titov L.P., DuBuske L.M. Altered phenotype and function of monocyte-derived dendritic cells in acute hepatitis C and chronic hepatitis C // *J Allergy Clin Immunol.* - 2009. - V. 123. - № 2. - P. 221.
61. Hashempoor T., Bamdad T., Merat S., Janzamin E., Nemati L. et al. Expansion of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells in chronic hepatitis C virus infection // *Iran J. Immunol.* - 2010. -V. 7, - № 3. - P. 177-185.
62. Holz L., Rehermann B. T cell responses in hepatitis C virus infection: historical overview and goals for future research // *Antiviral research.* -2015. -V. 114. - P. 96-105.
63. Houghton M. Prospects for prophylactic and therapeutic vaccines against the hepatitis C viruses // *Immunol Rev.* - 2011. -V.1. - № 239. -P. 99-108.

64. Imran M., Waheed Y., Manzoor S., Bilal M., Ashraf W. et al. Interaction of hepatitis C virus proteins with pattern recognition receptors // *Virology*. - 2012. -V. 9. - P.126.
65. Jinushi M., Takehara T., Kanto T., Tatsumi T., Groh V. et al. Critical role of MHC class I-related chain A and B expression on IFN- $\gamma$ -stimulated dendritic cells in NK cell activation: impairment in chronic hepatitis C virus infection // *J Immunol.* - 2003. -V. 170. -№ 3. -P. 1249-1256.
66. Jin Z., Fan J., Zhang Y., Yi Y., Wang L. et al. Comparison of morphology, phenotypes and function between cultured human IL 4 DC and IFN DC // *Mol Med Rep.* - 2017. -V.16. -№ 5. -P. 345-7354.
67. Jo J., Aichele U., Kersting N., Klein R., Aichele P. et al. Analysis of CD8+ T-cell-mediated inhibition of hepatitis C virus replication using a novel immunological mode // *Gastroenterology.* -2009. -V. 136. -№ 4. -P. 1391-1401.
68. Joffre O.P. Segura E., Savina A., Amigorena S. Cross-presentation by dendritic cells // *Nat Rev Immunol.* -2012. -V. 12. - № 8. - P. 557-569.
69. Kadowaki N., Ho S., Antonenko S., Malefyt R.W., Kastelein R.A. et al. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens // *J Exp Med.* - 2001. -V.194. - № 6. -P. 863-869.
70. Kanto T., Hayashi N., Takehara T., Tatsumi T., Kuzushita N. et al. Impaired allostimulatory capacity of peripheral blood dendritic cells recovered from hepatitis C virus-infected individuals // *J Immunol.* -1999. -V. 162. - № 9. -P. 5584-5591.
71. Kanto T., Inoue M., Miyatake H., Sato A., Sakakibara M. et al. Reduced numbers and impaired ability of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to polarize T helper cells in chronic hepatitis C virus infection // *J Infect Dis.* - 2004. -V. 190. -№ 11. - P. 1919-1926.
72. Kanto T., Inoue M., Miyazaki M., Itose I., Miyatake H. et al. Impaired function of dendritic cells circulating in patients infected with hepatitis C virus who have persistently normal alanine aminotransferase levels // *Intervirology.* -2006. -V. 49,



-№ 1-2. -P. 58-63.

73. Kared H., Fabre T., Bedard N., Bruneau J., Shoukry N.H. Galectin-9 and IL-21 mediate cross-regulation between Th17 and Treg cells during acute hepatitis C // *PLoS Pathog.* -2013. - V. 9. - e1003422.

74. Kato N., Yoshida H., Ono-Nita S.K., Kato J., Goto T. et al. Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C viruses: C-viral core is the most potent signal inducer // *Hepatology.* -2000. - V. 32. -№ 2. -P. 405-412.

75. Kim A.Y., Kuntzen T., Timm J., Nolan B.E., Baca M.A. et al. Spontaneous control of HCV is associated with expression of HLA-B\*57 and preservation of targeted epitopes // *Gastroenterology.* - 2011. -V. 140. - № 2. - P. 686-696.

76. Kittlesen D.J., Chianese-Bullock K.A., Yao Z.Q., Braciale T.J., Hahn Y.S. Interaction between complement receptor gC1qR and hepatitis C virus core protein inhibits T-lymphocyte proliferation // *J. Clin. Invest.* - 2000. -V. 106. -№ 10. -P. 1239-1249.

77. Klechevsky E., Flamar A.L., Cao Y., Blanck J.P., Liu M. et al. Cross-priming CD8+ T cells by targeting antigens to human dendritic cells through DCIR // *Blood.* - 2011. -V. 116. - № 10. - P. 1685-1697.

78. Klenerman P, Thimme R. T cell responses in hepatitis C: the good, the bad and the unconventional // *Gut.* -2012. -V. 61. - № 8. -P. 1226-1234.

79. Komatsu H., Lauer G., Pybus O.G., Ouchi K., Wong D. et al. Do antiviral CD8+ T cells select hepatitis C virus escape mutants? Analysis in diverse epitopes targeted by human intrahepatic CD8+ T lymphocytes // *J. Viral Hepat.* - 2006. -V. 13, - № 2. -P. 121-130.

80. Korthals M, Safaian N, Kronenwett R, Maihöfer D, Schott M et al. Monocyte derived dendritic cells generated by IFN-alpha acquire mature dendritic and natural killer cell properties as shown by gene expression analysis. // *Journal of translational medicine.* - 2007. -V. 5. - № 1. - P. 46.

81. Krebs D.L., Hilton D.J. SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling // *Stem Cells.* - 2001. -V. 19. - № 5. -P. 378-387.

82. Krishnadas D.K., Ahn J.S., Han J., Kumar R., Agrawal B.

Immunomodulation by hepatitis C virus-derived proteins: targeting human dendritic cells by multiple mechanisms // *Int Immunol.* - 2010. -V. 22. -№ 6. - P. 491-502.

83. Kuiken C., Mizokami M., Deleage G., Yusim K., Penin F. et al. Hepatitis C databases, principles and utility to researchers // *Hepatology.* - 2006. - V. 43. -№ 5. - P. 1157-1165.

84. Kunitani H., Shimizu Y., Murata H., Higuchi K., Watanabe A. Phenotypic analysis of circulating and intrahepatic dendritic cell subsets in patients with chronic liver diseases // *J Hepatol.* - 2002. -V. 36. -№ 6. - P. 734-741.

85. Landi A., Babiuk L.A., Drunen Littel-van den Hurk S. van Dendritic cells matured by a prostaglandin E2-containing cocktail can produce high levels of IL-12p70 and are more mature and Th1-biased than dendritic cells treated with TNF- $\alpha$  or LPS // *Immunobiology.* - 2011. -V. 216. - № 6. -P. 649-662.

86. Landi A., Yu H., Babiuk L.A., van Drunen Littel-van den Hurk S. Human dendritic cells expressing hepatitis C virus core protein display transcriptional and functional changes consistent with maturation // *J Viral Hepat.*- 2011. -V. 10. - № 18. - P. 700-713.

87. Lapenta C., Santini S.M., Spada M., Donati S., Urbani F. et al. IFN- $\alpha$ -conditioned dendritic cells are highly efficient in inducing cross-priming CD8<sup>+</sup> T cells against exogenous viral antigens// *European journal of immunology.* - 2006. - V. 36. - P. 2046-2060.

88. Larrubia J.R., Calvino M., Benito S., Sanz-de-Villalobos E., Perna C. et al. The role of CCR5/CXCR3 expressing CD8<sup>+</sup> cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis C virus infection // *J. Hepatol.* - 2007. - V. 47. - № 5. - P. 632-641.

89. Larrubia J.R., Lokhande M.U., García-Garzón S., Miquel J., González-Praetorius A., Parra-Cid T., Sanz-deVillalobos E. Persistent hepatitis C virus (HCV) infection impairs HCV-specific cytotoxic T cell reactivity through Mcl-1/Bim imbalance due to CD127 down-regulation // *J. Viral Hepat.* - 2013. - V. 20. - № 2. - P. 85-94.

90. Larrubia J.R., Lokhande M.U., García-Garzón S., Miquel J., Subirá D. et

al. Role of T cell death in maintaining immune tolerance during persistent viral hepatitis // *World J. Gastroenterol.* - 2013. -V. 19. - № 12. -P. 1877-1889.

91. Laskarin G, Redzović A, Rubesa Z, Mantovani A, Allavena P, Haller H et al. Decidual Natural Killer Cell Tuning by Autologous Dendritic Cells // *American Journal of Reproductive Immunology.* -2008. -V. 59. - № 5. - P. 433-445.

92. Lauer GM, Barnes E, Lucas M, Timm J, Ouchi K et al. High resolution analysis of cellular immune responses in resolved and persistent hepatitis C virus infection // *Gastroenterology.* -2004. - V. 127. -№ 3. - P. 924-936.

93. Lechner F., Wong D.K., Dunbar P.R., Chapman R., Chung R.T. et al. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus // *J. Exp. Med.* - 2000. - V. 191. -№ 9. - P. 1499-1512.

94. Leplina O.Yu., Starostina N.M., Blinova D.D., Zheltova O.I., Oleinik E.A et al. Results of a pilot clinical trial of dendritic cell based vaccines for treatment of recurrent herpesvirus infection // *Medical Immunology (Russia).* - 2016. -V. 18. -№ 5. - P. 425-436.

95. Lester S.N., Li K. Toll-Like Receptors in Antiviral Innate Immunity // *Journal of Molecular Biology.* - 2014. - V. 426. - № 6. - P. 1246-1264.

96. Liang H., Russell R.S., Yonkers N.L., McDonald D., Rodrigues B. et al. Differential effects of hepatitis C virus JFH1 on human myeloid and plasmacytoid dendritic cells // *J Virol.* - 2009. - V. 11. - № 83. - P. 5693-5707.

97. Liaw Y.F., Lee C.S., Tsai S.L., Liaw B.W., Chen T.C. et al. T-cell-mediated autologous hepatocytotoxicity in patients with chronic hepatitis C virus infection // *Hepatology.* - 1995. - V. 22. - № 5. - P. 1368-1373.

98. Liu S., Yang W., Shen L., Turner J.R., Coyne CB., Wang T. Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection // *J. Virol.* - 2009. - V. 83, - № 4. - P. 2011-2014.

99. Li W., Krishnadas D.K., Li J., Tyrrell D.L., Agrawal B. Induction of primary human T cell responses against hepatitis C virus-derived antigens NS3 or core by autologous dendritic cells expressing hepatitis C virus antigens: potential for vaccine

and immunotherapy // *J Immunol.* - 2006. - V.176. - № 10. -P. 6065-6075.

100. Li W., Li J., Tyrrell D.L., Agrawal B. Expression of hepatitis C virus-derived core or NS3 antigens in human dendritic cells leads to induction of pro-inflammatory cytokines and normal T-cell stimulation capabilities // *J Gen Virol.* - 2006. - V. 1. - № 87. - P. 61-72.

101. Li Y., Chu N., Rostami A., Zhang G.X. Dendritic cells transduced with SOCS-3 exhibit a tolerogenic/DC2 phenotype that directs type 2 Th cell differentiation in vitro and in vivo // *J Immunol.* -2006. -V. 177. - № 3. - P. 1679-1688.

102. Longman R.S., Talal A.H., Jacobson I.M., Albert M.L., Rice C.M. Presence of functional dendritic cells in patients chronically infected with hepatitis C virus // *Blood.* - 2004. - V.103. - № 3. - P. 1026-1029.

103. Longman R.S., Talal A.H., Jacobson I.M., Rice C.M., Albert M.L. Normal functional capacity in circulating myeloid and plasmacytoid dendritic cells in patients with chronic hepatitis C // *J Infect Dis.* - 2005. -V. 192. - № 3. - P. 497-503.

104. Ludwig I.S., Lekkerkerker A.N., Depla E., Bosman F., Musters R.J.P. et al. Hepatitis C virus targets DC-SIGN and L-SIGN to escape lysosomal degradation // *J Virol.* - 2004. -V. 78. - № 15. - P. 8322-8332.

105. Manns M.P., Wedemeyer H., Cornberg M. Treating viral hepatitis C: efficacy, side effects, and complications // *Gut.* - 2006. -V. 55. - № 9. -P. 1350–1359.

106. Markowicz S., Engleman E.G. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes differentiation and survival of human peripheral blood dendritic cells in vitro // *The Journal of clinical investigation.* -1990. - V. 85. - № 3. -P. 955-961.

107. Miroux C., Vausselin T., Delhem N. Regulatory T cells in HBV and HCV liver diseases: implication of regulatory T lymphocytes in the control of immune response // *Expert Opin. Biol. Ther.* - 2010. - V. 10. - № 11. - P. 1563-1572.

108. Mishra S., Losikoff P.T., Self A.A., Terry F., Ardito M.T. et al. Peptide-pulsed dendritic cells induce the hepatitis C viral epitope-specific responses of naive human T cells // *Vaccine.* - 2014. -V. 32. - № 26. - P. 3285-3292.

109. Miyazaki M., Kanto T., Inoue M., Itose I., Miyatake H. et al. Impaired

cytokine response in myeloid dendritic cells in chronic hepatitis C virus infection regardless of enhanced expression of Toll-like receptors and retinoic acid inducible gene-I // *J Med Virol.* - 2008. -V. 80. - № 6. - P. 980-988.

110. Mogensen K.E., Lewerenz M., Reboul J., Lutfalla G., Uze G. The type I Interferon receptor: structure, function and evolution of a family business // *J. Interferon Cytokine Res.* - 1999. - V.19. - P.1069-1098.

111. Mohty M., Vialle-Castellano A., Nunes J.A., Isnardon D., Olive D. et al. IFN- $\alpha$  Skews Monocyte Differentiation into Toll-Like Receptor7-Expressing Dendritic Cells with Potent Functional Activities // *Journal of Immunology* - 2003. - V.71. - P. 3385-3393.

112. Moser M., Murphy K.M. Dendritic cell regulation of Th1-Th2 development // *Nat. Immunol.* - 2000. - V 1. - P. 199-205.

113. Murakami H., Akbar S.M., Matsui H., Horiike N., Onji M. Decreased interferon-alpha production and impaired T helper 1 polarization by dendritic cells from patients with chronic hepatitis C // *Clin Exp Immunol.* - 2004. -V. 137. - № 3. -P. 559-565.

114. Nakamoto N., Cho H., Shaked A., Olthoff K., Valiga M.E. et al. Synergistic Reversal of Intrahepatic HCV-Specific CD8 T Cell Exhaustion by Combined PD-1/CTLA-4 Blockade // *PLoS Pathog.* -2009. -V. 5. - № 2. - e1000313.

115. Neumann-Haefelin C., Thimme R. Success and failure of virus-specific T cell responses in hepatitis C virus infection // *Dig Dis.* - 2011. -V. 29. - № 4. - P. 416-422.

116. Nierkens S., Tel J., Janssen E., Adema G.J. Antigen cross-presentation by dendritic cell subsets: one general or all sergeants? // *Trends Immunol.* - 2013. -V. 34. - № 8. - P. 361-370.

117. Ooka K., Lim J.K. Treatment of Hepatitis C in Patients Undergoing Immunosuppressive Drug Therapy // *Journal of clinical and translational hepatology.* - 2016. -V. 4. - № 3. - P. 206–227.

118. Pape G.R., Gerlach T.J., Diepolder H.M., Grüner N., Jung M. et al. Role of the specific T-cell response for clearance and control of hepatitis C virus // *J Viral*

Hepat. -1999. -V. 6. -Suppl. 1. -P. 36-40.

119. Papewalis C., Jacobs B., Wuttke M., Ullrich E., Baehring T. et al. IFN- $\alpha$  Skews Monocytes into CD59+-Expressing Dendritic Cells with Potent Functional Activities In Vitro and In Vivo // *J. of Immunology.* - 2008. -V.180. - P. 1462-1470.

120. Paquette R.L, Hsu N., Said J., Mohammed M., Rao N.P. et al. Interferon- $\alpha$  induces dendritic cell differentiation of CML mononuclear cells in vitro and in vivo // *Leukemia.* - 2002. - V. 16. - P. 1484-1489.

121. Park S.-H., Veerapu N.S., Shin E.-C., Biancotto A., McCoy J.P et al. Sub infectious hepatitis C virus exposures suppress T cell responses against subsequent acute infectio // *Nat. Med.* -2013. -V. 19. - № 12. - P. 1638-1642.

122. Parlato S., Santini S., Lapenta C., Di Pucchio T., Logozzi M. 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.

123. Pelletier S., Bédard N., Said E., Ancuta P., Bruneau J. et al. Sustained hyperresponsiveness of dendritic cells is associated with spontaneous resolution of acute hepatitis C // *J. Virol.* - 2013. -V. 87, - № 12. -P. 6769-6781.

124. Perrella A., Atripaldi L., Bellopede P., Patarino T., Sbreglia C. et al. Flow cytometry assay of myeloid dendritic cells (mDCs) in peripheral blood during acute hepatitis C: possible pathogenetic mechanisms // *World J Gastroenterol.* -2006. -V. 12. - № 7. -P. 1105-1109.

125. Perrin-Cocon L, Agaugué S, Diaz O, Vanbervliet B, Dollet S, Guironnet-Paquet A et al. Th1 Disabled Function in Response to TLR4 Stimulation of Monocyte-Derived DC from Patients Chronically-Infected by Hepatitis C Virus // *PLoS ONE.* - 2008. -V. 3. - № 5. -P. e2260.

126. Petruzzello, Marigliano S, Loquercio G, Cozzolino A, Cacciapuoti C. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: An up-date of the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes // *World journal of gastroenterology.* -2016. - V. 22. - № 34. - P. 7824-7840.

127. Piccioli D., Tavarini S., Nuti S., Colombatto P., Brunetto M. Comparable

functions of plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells in chronic hepatitis C patients and healthy donors // *J Hepatol.* -2005. -V. 42. - № 1. - P. 61-67.

128. Posch W., Lass-Flörl C., Wilflingseder D. Generation of Human Monocyte-derived Dendritic Cells from Whole Blood // *Journal of Visualized Experiments.* 2016. -№ 118.

129. Racanelli V., Manigold T. Presentation of HCV antigens to naive CD8+T cells: why the where, when, what and how are important for virus control and infection outcome // *Clinical immunology (Orlando, Fla).* -2007. -V. 124. -№ 1 - P. 5-12.

130. Rana D., Chawla Y.K., Duseja A., Dhiman R.K., Arora S.K. Viral proteins mediate upregulation of negative regulatory factors causing down-modulated dendritic cell functions in chronic hepatitis C virus infection // *EMJ Hepatology.* - 2013. -V.1. - № 1. -P. 68-76.

131. Randolph G.J., Beaulieu S., Lebecque S., Steinman R.M. Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking // *Science.* - 1998. -V. 282. -№ 5388. -P. 480-483.

132. Reis e Sousa C. Dendritic cells in a mature age // *Nat Rev Immunol.* -2006. V. 6, -№ 6. - P. 476-483.

133. Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F et al. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation // *Science (New York, N.Y.).* -1999. -V. 283. - № 5405. -P. 1183-1186.

134. Rodrigue-Gervais I.G., Rigsby H., Jouan L., Sauv e D., S kaly R.P. et al. Dendritic cell inhibition is connected to exhaustion of CD8+ T cell polyfunctionality during chronic hepatitis C virus infection // *J Immunol.* - 2010. -V.184. - № 6. -P. 3134-3144.

135. Romani N, Gruner S, Brang D, K mpgen E, Lenz A, Trockenbacher B. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood // *The Journal of experimental medicine.* -1994. -V. 180. - № 1. -P. 83-93.

136. Romani N, Reider D, Heuer M, Ebner S, K mpgen E et al. Generation of mature dendritic cells from human blood An improved method with special regard to clinical applicability // *Journal of Immunological Methods.* -1996. -V. 196. - № 2. - P.

137-151.

137. Roohvand F., Kossari N. Advances in hepatitis C virus vaccines, part two: advances in hepatitis C virus vaccine formulations and modalities // *Expert Opin. Ther. Pat.* -2012. -V. 22. - № 4. -P. 391-415.

138. Rosen H.R. Emerging concepts in immunity to hepatitis C virus infection // *Journal of Clinical Investigation.* - 2013. -V.123. - № 10. - P. 4121-4130.

139. Ruben J.M., Bontkes H.J., Westers T.M., Hooijberg E., Ossenkoppele G.J. et al. Differential capacity of human interleukin-4 and interferon- $\alpha$  monocyte-derived dendritic cells for cross-presentation of free versus cell-associated antigen // *Cancer Immunol Immunother.* -2015. -V. 64. - № 11. -P.1419-1427.

140. Ryan E.J., O'Farrelly C. The affect of chronic hepatitis C infection on dendritic cell function: a summary of the experimental evidence // *J Viral Hepat.* - 2011. -V. 18. - № 9. - P. 601-607.

141. Sachdeva M. Dendritic cells: The warriors upfront-turned defunct in chronic hepatitis C infection // *World Journal of Hepatology.* -2015. -V. 7. - № 19. -P. 2202.

142. Saha B., Szabo G. Innate immune cell networking in hepatitis C virus infection. // *Journal of leukocyte biology.* -2014. -V. 96. - № 5. - P. 757-766.

143. Saito K., Ait-Goughoulte M., Truscott S.M., Meyer K., Blazevic A. et al. Hepatitis C virus inhibits cell surface expression of HLA-DR, prevents dendritic cell maturation, and induces interleukin-10 production // *J Virol.*, -2008. -V. 82. - № 7. - P.3320-3328.

144. Santantonio T., Wiegand J., Gerlach J.T. Acute hepatitis C: current status and remaining challenges // *J Hepatol.* -2008. -V. 49, - № 4. - P. 625-633.

145. 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.

146. Santini S., Di Pucchini T., Lapenta C. The natural alliance between type I IFN and dendritic cells and its role in linking innate and adaptive immunity // *J.Interferon Cytokine Res.* - 2002.- V.22. - P. 1071-1080.



147. Santini S., Lapenta C., Logozzi M., Parlato S., Spada M. et al. Type I Interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cells development and activity in vitro and in HU-PBL-SCID mice // *J. Exp. Med.* -2000. -V.191. - P.1777-1788.
148. Santini S., Pucchini T., Lapenta C., Parlato S., Logozzi M., Belardelli F. A new type 1 IFN-mediated pathway for the rapid differentiation of monocytes into highly active dendritic cells // *Stem cells.* - 2003. - V. 21. - P. 357-362.
149. Sarobe P., Lasarte J.J., Casares N., López-Díaz de Cerio A. et al. Abnormal priming of CD4<sup>+</sup> T cells by dendritic cells expressing hepatitis C virus core and E1 proteins // *J Virol.* -2002. -V.76. - № 10. - P. 5062-5070.
150. Schulz S., Landi A., Garg R., Wilson J.A., van Drunen Littel-van den Hurk S. Indolamine 2,3-dioxygenase expression by monocytes and dendritic cell populations in hepatitis C patients // *Clin Exp Immunol.* - 2015. -V. 180, - № 3. -P. 484-498.
151. Schulze Zur Wiesch J., Ciuffreda D., Lewis-Ximenez L., Kasprovicz V., Nolan B.E. et al. Broadly directed virus-specific CD4<sup>+</sup>T cell responses are primed during acute hepatitis C infection, but rapidly disappear from human blood with viral persistence // *J. Exp. Med.* -2012. - V. 209. - № 1. - P. 61-75.
152. Semmo N., Day C.L., Ward S.M., Lucas M., Harcourt G. et al. Preferential loss of IL-2-secreting CD4<sup>+</sup> T helper cells in chronic HCV infection // *Hepatology.* - 2005. -V. 41. - № 5. - P. 1019-1028.
153. Semmo N., Klenerman P. CD4<sup>+</sup> T cell responses in hepatitis C virus infection // *World journal of gastroenterology.* -2007. -V. 13. - № 36. - P. 4831-4838.
154. Shen T., Chen X., Chen Y., Xu Q., Lu F., Liu S. Increased PD-L1 expression and PD-L1/CD86 ratio on dendritic cells were associated with impaired dendritic cells function in HCV infection // *J Med Virol.* -2010. -V. 82. -№ 7. -P. 1152-1159.
155. Smith DB, Bukh J, Kuiken C, Muerhoff AS, Rice CM et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource // *Hepatology.* -2014. -V. 59. -P. 318-327.
156. Stelekati E., Shin H., Doering T.A., Dolfi D.V., Ziegler C.G. et al.

Bystander chronic infection negatively impacts development of CD8(+) T cell memory // *Immunity*. - 2014. -V. 40. - № 5. - P. 801-813.

157. Szabo G., Dolganiuc A. Subversion of plasmacytoid and myeloid dendritic cell functions in chronic HCV infection // *Immunobiology*. - 2005. -V. 210. - № 2-4. -P. 237-247.

158. Szabo G., Dolganiuc A. Hepatitis C and innate immunity: recent advances // *Clin Liver Dis*. -2008. -V. 12. -№ 3. -P. 675-692.

159. Tacke R.S., Tosello-Tramont A., Nguyen V., Mullins D.W., Hahn Y.S. Extracellular hepatitis C virus core protein activates STAT3 in human monocytes/macrophages/dendritic cells via an IL-6 autocrine pathway // *J Biol Chem*. - 2011. -V. 286. -№12, -P. 0847-10855.

160. Takahashi K., Asabe S., Wieland S., Garaigorta U., Gastaminza P. et al. Plasmacytoid dendritic cells sense hepatitis C virus-infected cells, produce interferon, and inhibit infection // *Proc Natl Acad Sci USA*. -2010. -V.107. -№ 16. -P. 7431-7436.

161. Takaki A., Wiese M., Maertens G., Depla E., Seifert U. et al. Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C // *Nat. Med*. -2000. -V.6. -№ 5. -P. 578-582.

162. Tester I., Smyk-Pearson S., Wang P., Wertheimer A., Yao E., Lewinsohn D.M., Tavis J.E., Rosen H.R. Immune evasion versus recovery after acute hepatitis C virus infection from a shared source // *J. Exp. Med*. -2005. -V. 201. -№ 11. -P. 1725-1731.

163. Thimme R., Binder M., Bartenschlager R. Failure of innate and adaptive immune responses in controlling hepatitis C virus infection // *FEMS Microbiol. Rev*. - 2012. -V. 36. -№ 3. - P. 663-683.

164. Thimme R., Bukh J., Spangenberg H.C., Wieland S., Pemberton J. et al. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease // *Proc Natl Acad Sci USA*. - 2002. -V.99. -№ 24. -P. 15661-15668.

165. Thimme R., Oldach D., Chang K.M., Steiger C., Ray S.C., Chisari F.V. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection

// J. Exp. Med. - 2001 -V. 194. -№ 10. -P. 1395-1406.

166. Thurner B, Röder C, Dieckmann D, Heuer M, Kruse M et al. Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application // Journal of immunological methods. -1999. -V. 223. -№ 1. -P. 1–15.

167. Thurnher M, Zelle-Rieser C, Ramoner R, Bartsch G, Hörtl L. The disabled dendritic cell // FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.- 2001. -V. 15. -№ 6. - P. 1054–1061.

168. Tu Z., Hamalainen-Laanaya H.K., Nishitani C., Kuroki Y., Crispe I.N., Orloff M.S. HCV core and NS3 proteins manipulate human blood-derived dendritic cell development and promote Th 17 differentiation // Int Immunol. -2012. -V. 24. -№ 2. -P. 97-106.

169. Ulsenheimer A., Gerlach J.T., Jung M.C., Gruener N., Wachtler M. et al. Plasmacytoid dendritic cells in acute and chronic hepatitis C virus infection // Hepatology. - 2005. -V. 41. -№ 3. -P. 643-651.

170. Urbani S., Amadei B., Fisicaro P., Tola D., Orlandini A. Outcome of acute hepatitis C is related to virus-specific CD4 function and maturation of antiviral memory CD8 responses // Hepatology. -2006. -V. 44. -№1. -P. 126-139.

171. Urbani S, Amadei B, Tola D, Pedrazzi G, Sacchelli L et al. Restoration of HCV-specific T cell functions by PD-1/PD-L1 blockade in HCV infection: Effect of viremia levels and antiviral treatment // Journal of Hepatology. -2008. -V. 48. - № 4. -P. 548-558.

172. Vermehren J, Park JS, Jacobson IM, Zeuzem S. Challenges and perspectives of direct antivirals for the treatment of hepatitis C virus infection // Journal of Hepatology. -2018.

173. Vertuani S., Bazzaro M., Gualandi G., Micheletti F., Marastoni M., et al. Effect of interferon-alpha therapy on epitope-specific cytotoxic T lymphocyte responses in hepatitis C virus-infected individuals // Eur J Immunol. - 2002. -V. 32. - № 1. -P. 144-154.

174. Vivier E., Raulet D.H., Moretta A., Caligiuri M.A. et al. Innate or adaptive

immunity? The example of natural killer cells // *Science*. -2011. -V. 331. - № 6013. - P. 44–49.

175. Waggoner S.N., Hall C.H., Hahn Y.S. HCV core protein interaction with gC1q receptor inhibits Th1 differentiation of CD4+ T cells via suppression of dendritic cell IL-12 production // *J Leukoc Biol*. -2007. -V. 82. - № 6. -P. 1407-1419.

176. Wedemeyer H., He X.S., Nascimbeni M., Davis A.R., Greenberg H.B. et al. Impaired effector function of hepatitis C virus specific CD8+ T cells in chronic hepatitis C virus infection // *J. Immunol*. - 2002. -V. 169. - № 6. - P. 3447-3458.

177. Wertheimer A.M., Bakke A., Rosen H.R. Direct enumeration and functional assessment of circulating dendritic cells in patients with liver disease // *Hepatology*. - 2004. -V. 40. - № 2. -P. 335-345.

178. Wilby KJ, Partovi N, Ford JA, Greanya E, Yoshida EM. Review of boceprevir and telaprevir for the treatment of chronic hepatitis C // *Canadian journal of gastroenterology = Journal canadien de gastroenterologie*. -2012. -V. 26. -№ 4. -P. 205–210.

179. Wilkinson P.C., Liew F.Y. Chemoattraction of human blood T lymphocytes by interleukin-15 // *The Journal of experimental medicine*. -1995. -V. 181. -№ 3. -P. 1255- 1259.

180. Yonkers N.L., Rodriguez B., Milkovich K.A., Asaad R., Lederman M.M. et al. TLR ligand-dependent activation of naive CD4 T cells by plasmacytoid dendritic cells is impaired in hepatitis C virus infection // *J Immunol*. - 2007. -V. 178. -№ 7. -P. 4436-4444.

181. Yoshio S., Kanto T., Kuroda S., Matsubara T., Higashitani K., Kakita N. Human blood dendritic cell antigen 3 (BDCA3)(+) dendritic cells are a potent producer of interferon-lambda in response to hepatitis C virus // *Hepatology*. - 2013. -V. 57. -№ 5. -P. 1705-1715.

182. You Q., Cheng L., Kedl R.M., Ju C. Mechanism of T cell tolerance induction by murine hepatic Kupffer cells // *Hepatology*. - 2008. -V. 48. -№ 3. -P. 978-990.

183. Zabaleta A., D'Avola D., Echeverria I., Llopiz D., Silva L. et al. Clinical

testing of a dendritic cell targeted therapeutic vaccine in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Mol Ther Methods Clin Dev.*, 2015, vol. 2: 15006.

184. Zeng R., Li G., Ling S., Zhang H., Yao Z., Xiu B. et al. A novel combined vaccine candidate containing epitopes of HCV NS3, core and E1 proteins induces multi-specific immune responses in BALB/c mice // *Antiviral Res.* - 2009. -V. 1. -№ 84. -P. 23-30.

185. Zhai N., Chi X., Li T., Song H., Li H et al. Hepatitis C virus core protein triggers expansion and activation of CD4(+) CD25(+) regulatory T cells in chronic hepatitis C patients // *Cell Mol. Immunol.* - 2015. -V. 12. -№ 6. - P. 743-749.

186. Zhang S., Kodys K., Li K., Szabo G. Human type 2 myeloid dendritic cells produce interferon- $\lambda$  and amplify interferon- $\gamma$  in response to hepatitis C virus infection // *Gastroenterology.* - 2013. -V. 144. - № 2. -P. 414–425.

187. Zhang Z., Wang F.S. Plasmacytoid dendritic cells act as the most competent cell type in linking antiviral innate and adaptive immune responses // *Cell Mol Immunol.* - 2005. -V. 2. -№ 6,. -P. 411–417.

188. Zhou Y, Zhang Y, Yao Z, Moorman JP, Jia Z. Dendritic cell-based immunity and vaccination against hepatitis C virus infection // *Immunology.* -2012. -V. 136. -№ 4. -P. 385-396.

189. Zhu W., Chang Y., Wu C., Han Q., Pei R. et al. The wild-type hepatitis C virus core inhibits initiation of antigen-specific T- and B-cell immune responses in BALB/c mice // *Clin Vaccine Immunol.* -2010. -V. 17. - № 7. - P. 1139-1147.

190. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood // *Blood.* -2010. -V. 116. -№ 16. -P. e74–e80.

191. Zoulim F., Chevallier M., Maynard M., Trepo C. Clinical consequences of hepatitis C virus infection // *Rev.Med. Virol.* - 2003. -V. 13. - № 1. -P. 57-68.