

ИНДУКЦИЯ Т-КЛЕТОЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ С НА ФОНЕ ИММУНОТЕРАПИИ ДЕНДРИТНЫМИ КЛЕТКАМИ

**Черных Е.Р., Олейник Е.А., Леплина О.Ю., Тихонова М.А.,
Курочкина Ю.Д., Старостина Н.М., Останин А.А.**

*ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»,
г. Новосибирск, Россия*

Резюме. Ключевая роль Т-клеток в элиминации вируса и отсутствие сильного Т-клеточного ответа у больных хроническим гепатитом С (ХГС) позволяет рассматривать активацию антиген-специфических Т-клеток в качестве перспективного подхода к повышению эффективности лечения. Учитывая центральную роль дендритных клеток (ДК) в индукции Т-клеточного ответа, целью исследования явилась оценка влияния иммунотерапии ДК на показатели иммунитета у больных ХГС. Десять пациентов с хронической HCV-инфекцией (генотип 1) были вакцинированы ДК, генерируемыми из моноцитов в присутствии интерферона- α (IFN-ДК) и нагруженными рекомбинантными белками Core (1–120) и NS3 (1192–1457). Вакциноterapia включала иницирующий (4 вакцинации с недельным интервалом) и поддерживающий (6 вакцинаций с месячным интервалом) курс с последующим периодом 6-месячного наблюдения. Проведение иммунотерапии ДК не сопровождалось развитием тяжелых нежелательных явлений, выраженных поствакцинальных реакций или возрастанием биохимических проявлений активности гепатита. Исследования *ex vivo* показали, что иммунотерапия ДК приводила к индукции выраженного устойчивого иммунного ответа на Core и умеренного ответа на NS3, что проявлялось значимым возрастанием пролиферации и продукции IFN γ при стимуляции МНК Core и усилением продукции IFN γ (при отсутствии достоверного возрастания пролиферативного ответа) при стимуляции МНК NS3. Иммунотерапия ДК также приводила к возрастанию до нормативных значений Кона-индуцированной пролиферации МНК, свидетельствуя о восстановлении митогенной реактивности Т-клеток. В то же время активация Т-клеточного ответа не сопровождалась индукцией антиген-специфических Th2-клеток и не приводила к генерации регуляторных CD4⁺CD25⁺CD127⁻Т-клеток. Несмотря на индукцию иммунного ответа, иммунотерапия ДК не сопровождалась значимым снижением вирусемии. Тем не менее преходящее уменьшение вирусной нагрузки у 4 пациентов и стойкое снижение вирусемии у двух, а также наличие обратной взаимосвязи между NS3-специфическим пролиферативным ответом и уровнем вирусной нагрузки ($R_s = 0,62$; $p < 0,05$) (на момент завершения 6-месячного наблюдения) указывает на способность антиген-специфических Т-клеток ограничивать репликацию вируса.

Ключевые слова: хронический вирусный гепатит С, антиген-специфический Т-клеточный ответ, Core, NS3, иммунотерапия, дендритные клетки

Адрес для переписки:

Черных Елена Рэмовна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (383) 236-03-29.
Факс: 8 (383) 222-70-28.
E-mail: ct_lab@mail.ru

Address for correspondence:

Chernykh Elena R.
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
630099, Russian Federation, Novosibirsk,
Yadrintsevskaya str., 14.
Phone: 7 (383) 236-03-29.
Fax: 7 (383) 222-70-28.
E-mail: ct_lab@mail.ru

Образец цитирования:

Е.Р. Черных, Е.А. Олейник, О.Ю. Леплина,
М.А. Тихонова, Ю.Д. Курочкина, Н.М. Старостина,
А.А. Останин «Индукция Т-клеточного иммунного ответа
у пациентов с хроническим гепатитом С
на фоне иммунотерапии дендритными клетками»
// Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 4. С. 387-400.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-4-387-400

© Черных Е.Р. и соавт., 2017

For citation:

E.R. Chernykh, E.A. Oleynik, O.Yu. Leplina, M.A. Tikhonova,
Yu.D. Kurochkina, N.M. Starostina, A.A. Ostanin "Induction of
T-cell immune response in chronic HCV-infected patients with
underlying dendritic cell immunotherapy", *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2017, Vol. 19, no. 4,
pp. 387-400. doi: 10.15789/1563-0625-2017-4-387-400

DOI: 10.15789/1563-0625-2017-4-387-400

INDUCTION OF T-CELL IMMUNE RESPONSE IN CHRONIC HCV-INFECTED PATIENTS WITH UNDERLYING DENDRITIC CELL IMMUNOTHERAPY

Chernykh E.R., Oleynik E.A., Leplina O.Yu., Tikhonova M.A., Kurochkina Yu.D., Starostina N.M., Ostanin A.A.

Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. A key role of T cells in viral elimination and absence of strong T cell responses in patients with chronic hepatitis C virus (HCV) infection presumes that activation of antigen-specific T cells may be a promising approach to enhance treatment efficacy. Given the central role of dendritic cells (DCs) in the induction of T cell response, the aim of our study was to evaluate effects of DC immunotherapy upon immunological parameters in chronic HCV infection. Ten patients with chronic hepatitis C (genotype 1) were vaccinated with monocyte-derived DCs, generated in presence of IFN α (IFN-DCs) and pulsed with recombinant HCV Core (1–120) and NS3 (1192–1457) proteins. The vaccination protocol included as initiating procedure (one injection per week, ns = 4) and maintaining treatment (one monthly injection, ns = 6), with subsequent follow up for 6 months. The immunotherapy was not associated with serious adverse events, significant post-vaccination reactions, or increased hepatitis C activity, according to biochemical tests. *Ex vivo* studies have shown that immunotherapy elicited strong and stable immune response to Core and moderate response to NS3 protein, which manifested as a significant increase of MNC proliferation and IFN γ production in response to Core and enhancement of IFN γ production (without higher proliferation rates), in response to NS3. DC immunotherapy also led to increase of ConA-induced MNC proliferation up to normal levels indicating a recovery of mitogenic T cell reactivity. Meanwhile, T cell activation did not elicit antigen-specific Th2 response and expansion of CD4⁺CD25⁺CD127⁻ regulatory T cells. Despite induced immune response, the immunotherapy with DCs was not accompanied by decreased viremia levels. Nevertheless, a transitory decrease of viral load in four patients and stable decrease of viremia in two patients as well as an inverse correlation between NS3-specific proliferation and viremia (Rss = 0.62; p < 0.05) by the end of 6-month follow-up indicated that the antigen-specific T cells may have a potential to control viral replication.

Keywords: chronic HCV infection, antigen-specific T cell response, core antigen, NS3 antigen, immunotherapy, dendritic cells

Введение

Хронический вирусный гепатит С (ХГС) представляет большую проблему для здравоохранения во всем мире, поскольку характеризуется широкой распространенностью, существенно повышает риск развития цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы и является одной из ведущих причин трансплантации печени [20, 23]. Современная терапия ХГС, включающая препараты пэгилированного интерферона-альфа и рибавирина [11], является дорогостоящей, неспецифичной, сопровождается частым развитием серьезных осложнений и эффективна только у 50% пациентов с генотипом 1 вируса гепатита С (HCV) [21]. Прорыв в лечении ХГС связывают с разработкой и внедрением таргетных противовирусных препаратов, однако и этот подход ограничен генотипом вируса и высокой стоимостью [29].

Известно, что элиминация вируса требует активации сильного кросс-реактивного иммунно-

го ответа вирус-специфических CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитов. Выраженный и устойчивый ответ CD4⁺ и CD8⁺Т-клеток на вирусные белки способствует спонтанному выздоровлению при острой инфекции, тогда как исход в хронизацию и хроническое течение гепатита С сопряжены со слабым проходящим ответом CD4⁺ и CD8⁺Т-клеток, характеризующимся узкой антигенной специфичностью [14, 26, 30]. Кроме того, сильный Т-клеточный ответ повышает эффективность противовирусной терапии интерферонами с рибавирином [4, 15]. Поэтому, наряду с таргетной противовирусной терапией, повышение эффективности лечения ХГС связывают с разработкой подходов, направленных на активацию противовирусного Т-клеточного ответа.

Ведущая роль в запуске противовирусного Т-клеточного ответа отводится дендритным клеткам (ДК), способным эффективно презентировать антигены, активировать наивные Т-клетки и индуцировать эффекторные Т-клетки [7].

Многочисленные исследования выявили нарушения ДК при ХГС, проявляющиеся задержкой созревания, изменением продукции цитокинов и снижением аллостимуляторной активности ДК [2, 28]. С этой точки зрения индукция сильного иммунного ответа с помощью генерированных *ex vivo* ДК рассматривается в качестве новой стратегии создания лечебных вакцин при ХГС [35].

Учитывая низкое содержание ДК в периферической крови, достаточное для клинических исследований количество ДК обычно получают путем генерации ДК из моноцитов [31]. *In vitro* дифференцировка моноцитов в ДК отражает физиологические процессы развития ДК из моноцитарных предшественников *in vivo* [25]. Кроме того, дифференцированные из моноцитарных предшественников ДК могут быть в меньшей степени иммунокомпрометированы вирусом.

Учитывая вышесказанное, в рамках научного поискового исследования было изучено влияние иммунотерапии ДК, генерируемыми из моноцитов и нагруженными вирусными антигенами, на показатели иммунитета у пациентов с хронической HCV-инфекцией.

Клеточной платформой ДК-вакцин служили ДК, генерированные из моноцитов в присутствии гранулоцитарно-макрофагального колоние-стимулирующего фактора (GM-CSF) и интерферона- α (IFN-ДК). По сравнению с традиционно генерируемыми ДК, которые получают в присутствии GM-CSF и интерлейкина-4 [31], IFN-ДК характеризуются более высокой миграционной активностью; более эффективно индуцируют генерацию цитотоксических Т-клеток, распознающих вирусные антигены; обладают свойствами NK-клеток, а также характеризуются более высокой продукцией IFN α [9, 16, 19, 27].

В качестве вирусных антигенов предполагалось использование структурных (Core) и неструктурных (NS3) рекомбинантных белков, которые содержат высокоиммуногенные пептиды и индуцируют Т-клеточный иммунный ответ, включая активацию Th1-клеток и генерацию цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) [12, 24]. Учитывая, что полноразмерные HCV белки обладают иммуносупрессивной активностью [17, 34], для нагрузки ДК использовались усеченные фрагменты Core (1–120) и NS3 (1192–1457) пептидов. Указанные рекомбинантные белки, согласно полученным нами ранее данным, не оказывали супрессорного эффекта на экспрессию поверхностных маркеров, продукцию цитокинов, а также аллостимуляторную активность IFN-ДК, и их способность стимулировать продукцию Th1- и Th2-цитокинов при нагрузке ДК [1].

Материалы и методы

Рекрутирование пациентов с ХГС 1-го генотипа проводили из числа пациентов, находившихся на обследовании и лечении в клинике иммунопатологии НИИФКИ в период с мая 2015 г. по ноябрь 2016 г. Клиническое исследование проводили в дизайне открытого проспективного пилотного исследования с контролем «до-после» согласно протоколу, утвержденному решением Ученого Совета и одобренному локальным этическим комитетом. 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).

К критериям невключения относили несоответствие критериям включения; наличие выраженной иммунокомпрометации, 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.

Для получения ДК из периферической крови выделяли мононуклеарные клетки (МНК) методом центрифугирования в градиенте плотности фикола-верографина. Фракцию прилипающих к пластику МНК культивировали в пластиковых флаконах (BD Biosciences Falcon, UK) в течение 3 сут. в среде RPMI-1640 (Sigma) в присутствии GM-CSF (Sigma) 40 нг/мл и IFN α 1000 ЕД/мл (Роферон-А, Roche, Швейцария). Нагрузку антигенами осуществляли путем инкубации ДК в течение 1 часа с рекомбинантными протеинами, кодируемыми фрагментами генов иммунодоминантных районов белков Core (1–120) и NS3 (1192–1457) HCV генотипа 1b, полученных в ла-

боратории рекомбинантных белков ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск) в дозе 5 мкг/мл. Нагруженные антигеном ДК индуцировали к созреванию путем 24-часового культивирования с азоксимер бромидом (Полиоксидоний, Петровакс Фарм, Москва) в дозе 2 нг/мл. После дозревания клетки отмывали, аликвотировали по 5×10^6 /пробирку, криоконсервировали и хранили в морозильной камере (Sanyo Ultra Low) при -80°C до последующего использования.

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

Обследование пациентов проводили до начала лечения (I); через 1 месяц после иницирующего курса (II); через 1 месяц после поддерживающего курса (III) иммунотерапии, а также после 6-месячного наблюдения (IV). Оценка безопасности включала анализ тяжелых нежелательных явлений, а также местных и системных поствакцинальных реакций и основывалась на клинических и лабораторных методах обследования.

Антиген-специфический Т-клеточный ответ оценивали по уровню пролиферации МНК в ответ на стимуляцию Core и NS3 антигенами (5 мг/мл) в 7-суточных культурах. Неспецифический ответ оценивали в 3-суточных культурах по уровню пролиферации МНК в ответ на стимуляцию конканавалином А (КонаА, 15 мкг/мл; Sigma). Пролиферативный ответ оценивали радиометрически по включению H3-тимидина, вносимого в лунки за 18 ч до конца культивирования в дозе 1 мккю/лунку. Th1-/Th2-ответ оценивали по продукции цитокинов (IFN γ , IL-4, IL-6) в 48-час. супернатантах МНК, стимулированных Core или NS3 антигенами (5 мкг/мл) методом иммуоферментного анализа с использованием коммерческих тест-систем («Вектор-Бест», г. Новосибирск). Содержание регуляторных Т-клеток определяли методом проточной цитометрии по количеству CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Т-клеток в гейте CD4⁺ лимфоцитов, исполь-

зуя коммерческий коктейль моноклональных анти-CD4 (FITC), анти-CD25 (PE-Cy7), анти-CD127 (Alexa Fluor 647) антител, в соответствии с инструкцией производителя (BD Biosciences, США). Исследование проводили по общепринятой методике с использованием параметров прямого и бокового светорассеяния и флуоресценции по каналам FL-1 (FITC), FL-3(PE-Cy7), FL-4 (Alexa Fluor 647) (BD FACSCalibur, США). В тексте относительное содержание анализируемых субпопуляций представлено в виде процента от CD4⁺Т-клеток.

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета прикладных программ Statistica 6.0 для Windows. Для оценки статистической значимости различий сравниваемых выборок использовали непараметрические критерии Манна–Уитни. Различия считали значимыми при уровне $p < 0,05$. Корреляционный анализ проводили методом ранговой корреляции Спирмена (Rs).

Результаты

В исследование были включены 10 пациентов (8 женщин и 2 мужчин) в возрасте от 30 до 59 лет (табл. 1). 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 вирусного гепатита по показателям трансаминаз варьировала от минимальной до умеренной, степень фиброза – от 0 до III по шкале METAVIR.

Вакцинация аутологичными IFN-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 биохимических проявлений активности гепатита (табл. 2).

Местные поствакцинальные реакции в виде покраснения, припухлости, зуда и болезненности в месте введения вакцины регистрировались в 37,5-80% случаев (табл. 3) и были в первую очередь обусловлены подкожным введением Ронколейкина в качестве адьюванта. Системные реакции в виде озноба, субфебрильной лихорадки, головной боли и миалгии отмечались в 6,6-32,5% случаев. Поствакцинальные реакции купировались самостоятельно в течение 24-48 ч.

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ ХГС
TABLE 1. CHARACTERISTIC OF THE PATIENTS WITH HCV INFECTION

| Пациент Patient | Пол Sex | Возраст Age | АСТ (ЕД/л) ASAT (U/L) | АЛТ (ЕД/л) ALAT (U/L) | Вирусная нагрузка (МЕ/мл) Viral load (IU/mL) | Степень фиброза печени по шкале METAVIR Liver fibrosis (METAVIR Score) |
|----------------------------------|---------------|----------------|--------------------------------|--------------------------------|--|--|
| 1. Пациент М.А. Patient M.A. | жен. fem. | 31 | 42 | 31 | $5,6 \times 10^4$ | II |
| 2. Пациент Ю.Е. Patient Yu.E. | жен. fem. | 30 | 40 | 32 | $3,2 \times 10^4$ | I |
| 3. Пациент Ш.Н. Patient Sh.N. | жен. fem. | 59 | 65 | 69 | $4,8 \times 10^4$ | II |
| 4. Пациент М.Н. Patient M.N. | жен. fem. | 35 | 21 | 25 | $3,5 \times 10^4$ | 0 |
| 5. Пациент М.Е. Patient M.E. | жен. fem. | 45 | 75 | 37 | $9,9 \times 10^5$ | I-II |
| 6. Пациент Н.А. Patient N.A. | муж. masc. | 32 | 118 | 68 | $9,4 \times 10^5$ | II-III |
| 7. Пациент Б.О. Patient B.O. | жен. fem. | 57 | 22 | 24 | $1,8 \times 10^6$ | 0-I |
| 8. Пациент Ш.И. Patient Sh.I. | жен. fem.. | 31 | 90 | 45 | $1,9 \times 10^5$ | I |
| 9. Пациент Ш.О. Patient Sh.O. | жен. fem. | 37 | 22 | 22 | $2,2 \times 10^5$ | 0-I |
| 10. Пациент М.Д. Patient M.D. | муж. masc. | 36 | 20 | 24 | $1,3 \times 10^4$ | I |

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

Перед началом терапии МНК HCV-позитивных пациентов слабо отвечали пролиферацией на стимуляцию вирусными антигенами (табл. 4). Медианное значение индекса влияния Core (ИВ_{CORE}) составляло 1,4 расч. ед. Наличие антиген-специфического ответа (ИВ > 2,0) выявлялось у 4 из 10 (40%) пациентов.

После иницирующего курса регистрировалось значимое усиление пролиферативного ответа на Core и возрастание ИВ_{CORE} до 5,2 расч. ед. К этому моменту наличие Core-специфического ответа (ИВ > 2,0) выявлялось у 8 из 10 пациентов. После завершения поддерживающего курса вакцинотерапии ИВ_{CORE} достигал 7,8 расч. ед. и наличие Core-специфического ответа реги-

стрировалось у всех 10 пациентов. Спустя период последующего 6-месячного наблюдения пролиферативный ответ на Core продолжал нарастать, тогда как ИВ_{CORE} в силу более высокой спонтанной пролиферации незначительно снижался. Тем не менее и в этом случае ИВ_{CORE} 3-кратно превышал исходные значения.

Медиана индекса влияния NS3 МНК (ИВ_{NS3}) перед началом вакцинотерапии составляла 2,5 расч. ед., и наличие NS3-специфического ответа (ИВ_{NS3} > 2,0) выявлялось у 5 из 10 пациентов. После иницирующего курса вакцинотерапии отмечалось умеренное возрастание ИВ_{NS3} до 3,3 расч. ед., которое сохранялось после поддерживающего курса и 6-месячного периода наблюдения. Тем не менее возрастание пролиферативного ответа на NS3 было умеренно выраженным и статистически незначимым. При индивидуальном анализе усиление NS3-индуцированной пролиферации МНК после иницирующего курса отмечалось у 7 из 10 пациентов, было нестойким и сохранялось при последующих обследованиях только у 2 пациентов. У трех из 10 пациентов возрастания NS3-специфического ответа после иницирующего курса не наблюдалось. Индукция NS3-специфического ответа у этих больных

ТАБЛИЦА 2. ВЛИЯНИЕ ИММУНОТЕРАПИИ ДК НА ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ БОЛЬНЫХ ХГС

TABLE 2. THE EFFECT OF DC IMMUNOTHERAPY ON THE BLOOD TESTS OF PATIENTS WITH HCV INFECTION

| | До вакцино- терапии Before vaccination | После иницирующего курса After initiating course | После поддерживающего курса After maintenance course | Через 6 месяцев наблюдения After 6 months of follow up |
|--|---|--|--|--|
| АЛТ ALT (U/L) | 41 (22-75) | 28 (22-61) | 43 (21-67) | 32,5 (18,4-63) |
| АСТ AST (U/L) | 31 (24-45) | 26 (24-44) | 32 (26-45) | 30,2 (23-38) |
| ГГТП GGT (U/L) | 19 (17-34) | 21 (16-27) | 17 (15-27) | 21 (15-50) |
| Билирубин общий Total bilirubin ($\mu\text{mol/L}$) | 13,3 (12-20) | 9,5 (6,7-13) | 8,3 (5-13,1) | 8,8 (6-11,7) |
| Билирубин прямой Conjugated bilirubin ($\mu\text{mol/L}$) | 3,2 (2,9-5) | 2,4 (1,6-3,6) | 2,3 (1,6-3,3) | 3,2 (2,4-3,8) |
| Лейкоциты Leukocytes ($\times 10^9/\text{L}$) | 5,3 (4,9-5,5) | 5,7 (5-6,1) | 5,0 (4,8-5,4) | 5,2 (4,8-6,1) |
| Эритроциты Erythrocytes ($\times 10^{12}/\text{L}$) | 4,8 (4,6-5) | 4,5 (4,3-4,7) | 4,8 (4,7-5) | 4,7 (4,6-5,2) |
| Гемоглобин Hemoglobin (g/L) | 143 (131-152) | 127 (124-142) | 137 (121-143) | 135 (121-150) |
| Тромбоциты Platelets ($\times 10^9/\text{L}$) | 232 (211-278) | 239 (217-263) | 215 (189-250) | 230 (188-265) |
| Лимфоциты Lymphocytes (%) | 37,5 (34-40) | 37 (36-40) | 37,5 (35-39) | 38,5 (37-40) |
| СОЭ ESR (mm/h) | 7,5 (5-25) | 14 (6-21) | 8 (6-16) | 8,5 (5-12) |

Примечание. Данные представлены в виде медианы и интерквартильных диапазонов (в скобках).

Note. The data are presented as median and interquartile range (in brackets).

регистировалась позже – после поддерживающего курса (2 пациента) или через 6 месяцев после завершения терапии (1 пациент). Таким образом, вакцинотерапия приводила к индукции выраженного и стойкого пролиферативного ответа МНК на Core и умеренному, преходящему усилению пролиферативного ответа на NS3.

Анализ митогенной реактивности МНК больных ХГС показал (табл. 5), что до начала иммунотерапии пролиферативный ответ МНК больных на Кон-А был в 2 раза ниже, чем ответ МНК здоровых доноров – 10699 (2577-15200) против 24151 (8345-28073) имп/мин соответственно ($p_U < 0,05$).

После иницирующего курса иммунотерапии интенсивность КонА-стимулированной пролиферации и индекс влияния КонА достоверно возрастали и достигали нормативных значений и сохранялись в пределах нормативного диапазона на момент завершения поддерживающего курса, а также через 6 месяцев после окончания лечения.

Причем интенсивность КонА-стимулированной пролиферации через 6 месяцев после завершения терапии превосходила уровень ответа после иницирующего ($p_{Us} = 0,019$) и поддерживающего ($p_{Us} = 0,034$) курса. Следует отметить, что до начала иммунотерапии (на фоне низкой митогенной реактивности) ответ на КонА значимо коррелировал с уровнем NS3- ($R_{ss} = 0,73$; $p_s = 0,02$; $ns = 10$) и Core-специфической ($R_{ss} = 0,88$, $p_s = 0,001$; $ns = 10$) пролиферации. В то же время после завершения поддерживающего курса вакцинации эта зависимость существенно ослабевала ($R_{ss} = 0,44$; $p_s = 0,2$ и $R_{ss} = 0,51$, $p_s = 0,13$; $ns = 10$). 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 антигена и КонА указывало на то, что усиление

ТАБЛИЦА 3. ПОСТВАКЦИНАЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ В ДИНАМИКЕ ИММУНОТЕРАПИИ ДК

TABLE 3. POSTVACCINAL REACTIONS IN DYNAMICS OF DC IMMUNOTHERAPY

| Тип реакций Type of reactions | Частота реакций (n, %) в динамике иницирующего курса Frequency of reactions (n, %) during the initiating course | Частота реакций (n, %) в динамике поддерживающего курса The frequency of reactions (n, %) during the maintenance course |
|--|--|--|
| Локальные реакции Local reactions | | |
| Покраснение Redness | 24/40 (60%) | 43/60 (71,6%) |
| Болезненность Painfulness | 32/40 (80%) | 42/60 (70%) |
| Зуд Itch | 15/40 (37,5%) | 24/60 (40%) |
| Системные реакции Systemic reactions | | |
| Озноб Chills | 9/40 (22,5%) | 7/60 (11,6%) |
| Субфебрилитет Low grade fever | 13/40 (32,5%) | 7/60 (11,6%) |
| Головная боль Headache | 10/40 (25%) | 4/60 (6,6%) |
| Миалгия Myalgia | 10/40 (25%) | 9/60 (15%) |

Примечание. Данные представлены в виде отношения случаев поствакцинальных реакций к общему числу вакцинаций в динамике иницирующего и поддерживающего курса.

Note. The data are presented as the numbers of postvaccinal reactions to the total vaccination numbers in the course of initiating and maintainance courses.

антиген-специфического ответа не было связано исключительно с неспецифической активацией Т-клеток.

Чтобы проанализировать, какой тип антиген-специфических Т-хелперных клеток активировался в процессе вакциноотерапии, оценивали продукцию $IFN\gamma$ и IL-4/IL-6 в культурах МНК, стимулированных Core или NS3 антигенами. Как видно из данных рисунка 1 (А, Б), исходно (до терапии) стимуляция МНК Core или NS3 антигеном слабо индуцировала продукцию $IFN\gamma$. Медианные значения IB_{CORE} и IB_{NS3} составляли, соответственно, 1,6 и 2,1 расч. ед. На фоне вакциноотерапии наблюдалось умеренное усиление Core-индуцированной продукции $IFN\gamma$ и IB_{CORE} (на уровне тренда) после иницирующего курса и выраженное достоверное возрастание этих показателей после поддерживающего курса и последующего 6-месячного наблюдения. Таким образом, вакциноотерапия ДК, нагруженными Core и NS3 антигенами индуцировала антиген-специфический Th1-ответ, который четко проявлялся после поддерживающего курса вакцинаций и сохранялся через 6 месяцев наблюдения.

Исследование антиген-специфической продукции IL-4 показало, что исходно МНК больных не отвечали продукцией IL-4 в ответ на стимуляцию вирусными антигенами. Вакциноотерапия не сопровождалась усилением продукции IL-4 в ответ на стимуляции Core или NS3 после иницирующего и поддерживающего курсов вакцинаций, а также 6-месячного периода наблюдения (рис. 1В, Г). Таким образом, вакцинация ДК нагруженными Core и NS3 антигенами не индуцировала антиген-специфический Th2-ответ. Поскольку IL-4 продуцировался в культурах МНК в достаточно низких концентрациях, параллельно была исследована антиген-специфическая продукция IL-6 (рис. 1В, Г), который секретируется Th2-клетками в значительно более высоких концентрациях. Продукцию IL-6 оценивали в период наибольшей выраженности антиген-специфической пролиферации и продукции $IFN\gamma$, т.е. после поддерживающего курса вакцинаций и последующего 6-месячного наблюдения. МНК больных спонтанно продуцировали достаточно высокие концентрации IL-6 – 369 (201-533) пг/мл после поддерживающего курса иммунотерапии и 279 (200-387) пг/мл через 6 месяцев последую-

ТАБЛИЦА 4. ПРОЛИФЕРАТИВНЫЙ ОТВЕТ МНК БОЛЬНЫХ ХГС НА CORE И NS3 АНТИГЕНЫ В ДИНАМИКЕ ИММУНОТЕРАПИИ ДК

TABLE 4. PROLIFERATIVE RESPONSE OF MNC FROM HCV-INFECTED PATIENTS TO CORE AND NS3 ANTIGENS IN THE COURSE OF DC IMMUNOTHERAPY

| | | До вакцино-терапии Before vaccination | После иницирующего курса After initiating course | После поддерживающего курса After maintenance course | Через 6 месяцев наблюдения After 6 months of follow up |
|------|--|--|---|---|---|
| Core | Пролиферация (имп/мин) Proliferation (cpm) | 566 (285-1090) | 2065 (605-2519) P _U S = 0,034 | 3875 (2504-7263) P _U S = 0,0005 | 5359 (1515-5576) P _U S = 0,0019 |
| | Индекс влияния (ИБ, расч. ед) Influence index (estim. units) | 1,4 (1-4,9) | 5,2 (2,3-11,5) P _U S = 0,019 | 7,8 (5,4-10,6) P _U S = 0,002 | 5,0 (1,8-25,2) P _U S = 0,004 |
| | Количество пациентов с ИВ > 2,0 Number of patients showing effect index > 2,0 | 4/10 | 8/10 | 10/10 | 7/10 |
| NS3 | Пролиферация (имп/мин) Proliferation (cpm) | 1316 (589-1794) | 1575 (677-2345) | 1646 (1329-3824) | 1618 (1147-2351) |
| | Индекс влияния (ИБ, расч. ед) Influence index (estim. units) | 2,5 (1,8-5,2) | 3,3 (1,9-5,9) | 3,0 (1,8-5,6) | 3,0 (1,6-7,6) |
| | Количество пациентов с ИВ > 2,0 Number of patients showing effect index > 2,0 | 5/10 | 6/10 | 7/10 | 6/10 |

Примечание. Здесь и в таблице 5 данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона (в скобках); p – значимость различий показателей по сравнению со значениями до вакцинации. U-критерий Манна–Уитни.

Note. Here and in table 5, the data are presented as median and interquartile range (in brackets). *, a significant difference compared with data before vaccination. P, Mann–Whitney U-test.

ТАБЛИЦА 5. МИТОГЕННАЯ РЕАКТИВНОСТЬ МНК БОЛЬНЫХ ХГС (ns = 10) В ДИНАМИКЕ ИММУНОТЕРАПИИ ДК

TABLE 5. MITOGENIC REACTIVITY OF MNC FROM THE PATIENTS WITH HCV INFECTION (ns = 10) IN THE COURSE OF DC IMMUNOTHERAPY

| | КонА-индуцированная пролиферация (имп/мин) ConA-induced proliferation (cpm) | Индекс влияния (расч. ед) Influence index (estim. units) |
|---|--|---|
| До вакцинотерапии Before vaccination | 10699 (2577-15200) | 15 (10-60) |
| После иницирующего курса After initiating course | 20585 (17167-24833)** | 83 (68-117)** |
| После поддерживающего курса After maintenance course | 22997 (19826-29587)** | 104 (1-145)** |
| Через 6 месяцев наблюдения After 6 months of follow up | 35015 (26286-37388)** | 81 (66-154)** |

Примечание. ** – p < 0,001; U-критерий Манна–Уитни.

Note. **, p < 0.001; Mann–Whitney U-test.

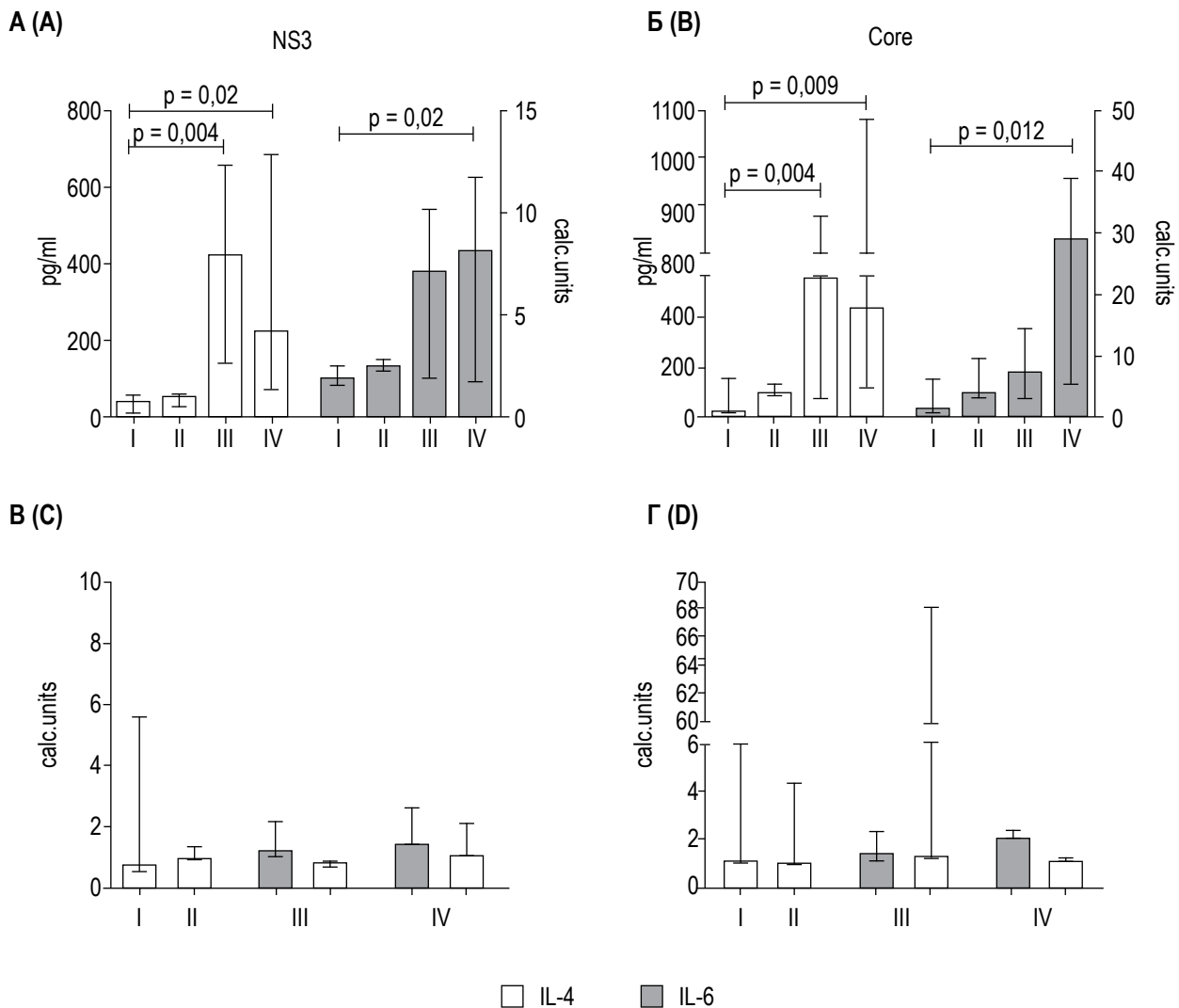


Рисунок 1. Продукция IFN γ , IL-4 и IL-6 в культурах МНК, стимулированных Core и NS3 антигенами, в динамике иммунотерапии ДК

Примечание. Представлены данные (Me; Q_{0,25}-Q_{0,75}) по продукции IFN γ (А, Б) и IL-4, IL-6 (В, Г) в культурах МНК пациентов с ХГС (ns = 10) до начала иммунотерапии (I), после иницирующего курса (II), после поддерживающего курса (III) и через 6 месяцев наблюдения (IV). По левой оси ординат – продукция IFN γ (пг/мл), по правой – индекс влияния вирусных антигенов (расч. ед.). p – достоверность различия по сравнению с исходными значениями (U-критерий Манна-Уитни).

Figure 1. Production of IFN γ , IL-4 and IL-6 by MNC stimulated by NS3 and Core antigens in the dynamics of DC immunotherapy. Note. IFN γ (A, B) and IL-4, IL-6 (C, D) production by MNCs of patients with HCV infection (ns = 10) before DC immunotherapy (I), after an initiating course (II), upon maintenance course (III) and after 6 months of follow up (IV) are presented as median and inter-quartile ranges. On the left-hand, y-axis – IFN γ production (pg/ml); right side, the influence index of viral antigens (estim. units). * p, significance of changes as compared to baseline values (Mann-Whitney U-test).

шего наблюдения. После проведения поддерживающего курса иммунотерапии стимуляция МНК Core и NS3 антигенами практически не усиливала продукцию IL-6. При обследовании пациентов спустя 6-месячный период наблюдения вирусные антигены обладали слабовыраженным стимулирующим эффектом на продукцию IL-6, однако и в этом случае стимулирующий эффект антигенов в отношении IL-6 был существенно ниже, чем в отношении IFN γ .

Анализ взаимосвязей между антиген-специфической пролиферацией и продукцией цитокинов показал, что через 6 месяцев после завершения вакцинотерапии пролиферация МНК на вирусные антигены находилась в прямой взаимосвязи с продукцией IFN γ . На это указывало наличие значимой корреляционной связи между продукцией IFN γ и уровнем пролиферации в NS3-стимулированных культурах МНК (R_{ss} = 0,83; ps = 0,04) и между продукцией IFN γ

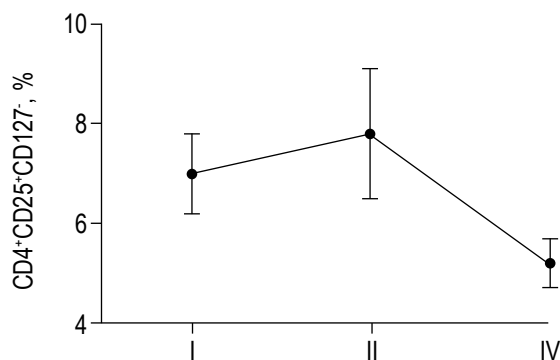


Рисунок 2. Относительное содержание CD4⁺CD25⁺CD127⁻Treg в динамике иммунотерапии ДК

Примечание. Данные представлены в виде M±S.E. I – до начала иммунотерапии, II – после иницирующего курса и IV – через 6 месяцев наблюдения.

Figure 2. The relative content of CD4⁺CD25⁺CD127⁻Treg in the dynamics of DC immunotherapy

Note. Data are presented as M±S.E. I, before DC immunotherapy; II, after initiating course, and IV, at 6 months of follow up.

и ИВ_{CORE} в Core-стимулированных культурах (Rss = 0,78; ps = 0,036). Какой-либо взаимосвязи антиген-специфического пролиферативного ответа МНК с продукцией ИЛ-4 или ИЛ-6 не выявлялось. Таким образом, вакцинотерапия ДК, нагруженными Core и NS3 антигенами, не вызвала значимой активации антиген-специфических Th2-клеток.

Чтобы исследовать возможное влияние иммунотерапии на генерацию регуляторных Т-клеток (Treg), было оценено относительное содержание CD4⁺CD25⁺CD127⁻Treg в периферической крови больных в динамике лечения. Как видно из данных рисунка 2, относительное содержание Treg после проведения иницирующего курса вакцинотерапии, а также к исходу 6-месячного наблюдения после завершения иммунотерапии значительно не увеличивалось. Следует также отметить, что исходно (перед началом иммунотерапии) и на момент завершения исследования между количеством Treg и антиген-специфическим ответом не выявлялось какой-либо взаимосвязи. Однако после иницирующего курса иммунотерапии содержание CD4⁺CD25⁺CD127⁻ клеток прямо коррелировало с NS3-специфическим пролиферативным ответом (Rss = 0,83; ps = 0,002).

Анализ вирусной нагрузки с помощью количественного ПЦР на РНК вируса гепатита С показал, что индукция иммунного ответа к Core и в меньшей степени NS3 антигенам не сопровождалась значимым изменением вирусности после иницирующего, поддерживающего курса и последующего 6-месячного наблюдения. При анализе

индивидуальных значений снижение вирусной нагрузки после иницирующего курса регистрировалось у 4 из 10 пациентов, однако к завершению 6-месячного наблюдения этот эффект сохранялся только у двух пациентов. В 6 из 10 случаев уровень вирусности к исходу 6-месячного наблюдения не отличался от такового перед началом иммунотерапии, и у 2 пациентов наблюдалось возрастание вирусной нагрузки на один порядок.

Несмотря на отсутствие значимого вирусологического ответа на фоне вакцинотерапии, важно отметить, что через 6 месяцев после завершения вакцинотерапии между уровнем вирусной нагрузки и пролиферативным ответом на NS3 антигены выявлялась обратная корреляционная связь (Rss = -0,62; ps = 0,05). Кроме того, показатели вирусной нагрузки на уровне тренда обратно коррелировали с NS3-специфической продукцией IFN γ (Rss = -0,71; ps = 0,1). Обратная взаимосвязь вирусности с уровнем Core-специфической продукции IFN γ регистрировалась на уровне тренда уже после иницирующего курса и сохранялась к моменту завершения 6-месячного наблюдения (Rss = -0,64; ps = 0,1).

Обсуждение

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 вакцинотерапия ДК, которые генерировали из моноцитов в присутствии интерферона-альфа и нагружали рекомбинантными вирусными белками Core (ак 1–120) и NS3 (ак 1192–1457), характеризуется хорошей переносимостью и не вызывает тяжелых нежелательных явлений, выраженных местных или системных поствакцинальных реакций и усиления биохимических проявлений активности гепатита.

Исследования *ex vivo* иммунологических параметров в динамике лечения также продемонстрировали, что вакцинотерапия 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 γ при антиген-специфической стимуляции МНК. Возрастание

реактивности к Core антигену регистрировалось после иницирующего 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-месячного наблюдения. Усиление пролиферативной активности МНК на NS3 было слабо выраженным и недостоверным. Важно отметить, что вакцинация уже после иницирующего курса сопровождалась восстановлением митогенной реактивности Т-клеток у больных ХГС. При этом мы не наблюдали активации антиген-специфической продукции IL-4 и IL-6, т.е. индукции Th2-ответа. Кроме того, иммунотерапия ДК не сопровождалась возрастанием относительного содержания регуляторных ($CD4^+CD25^+CD127^-$) Т-клеток.

Ранее Li W. и соавт. продемонстрировали способность ДК здоровых доноров, экспрессирующих Core и NS3 белки, вызывать пролиферацию антиген-специфических Т-клеток и продукцию $IFN\gamma$, а также других цитокинов в культуре *in vitro* [18]. 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 [8].

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, трансфицированными AdNS3 и CFh40L, вызывала кратковременную активацию $IFN\gamma$ -продуцирующих Т-клеток в культурах NS3-стимулированных МНК только у 1 из 5 пациентов [33]. В другом исследовании Gowans E.J. и 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 Т-клеток у 1 из 6 пациентов, причем иммунный ответ был нестойким [10].

В качестве одной из причин несостоятельности антиген-специфического ответа у больных ХГС обсуждается повышенное содержание Treg и иммуносупрессивных цитокинов [22]. Так, низкую иммуностимулирующую активность ДК, трансфицированных AdNS3 и CFh40L, у больных ХГС авторы объяснили усилением продукции IL-10 дендритными клетками больных и генерацией Treg после трансдукции CFh40L [33]. В нашем исследовании иммунотерапия ДК не сопровождалась экспансией $CD4^+CD25^+CD127^-$ регуляторных Т-клеток, что, по-видимому, способствовало индукции антиген-специфического ответа.

Следует отметить, что в обоих клинических исследованиях [10, 33] авторы не выявили снижения вирусной нагрузки, что объяснялось недостаточной силой и устойчивостью иммунного ответа. В нашем исследовании в целом по группе значимого снижения вирусемии также не отмечалось. Тем не менее при индивидуальном анализе у 4 пациентов наблюдалось преходящее, а у 2 – стойкое снижение вирусемии. В 6 из 10 случаев вирусемия на протяжении 13 месяцев исследования не нарастала, сохраняясь на исходно умеренном уровне. Более того, на момент завершения исследования между уровнем вирусемии и антиген-специфическим 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 вируса [6]. Сильный и устойчивый Т-клеточный иммунный ответ к эпитопам этого белка сопряжен с более эффективным контролем за вирусом [3, 5]. Кроме того, высокая цитотоксическая активность NS3-специфических Т-клеток ассоциирована с ответом на терапию интерфероном- α [32]. Полученные нами данные об обратной взаимосвязи вирусемии 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 вирусемией 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 про-

дукции IFN γ [13]. В наших исследованиях вакцинация сопровождалась значимым усилением продукции IFN γ при стимуляции как NS3, так и Core, причем усиление пролиферации МНК при стимуляции обоими антигенами коррелировало с продукцией IFN γ . Это позволяет полагать, что, будучи источником, IFN γ Core-специфические клетки, наряду с NS3-специфическими Т-лим-

фоцитами, также могут участвовать в ограничении репликации вируса.

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

Список литературы / References

1. Олейник Е.А., Леплина О.Ю., Тыринова Т.В., Тихонова М.А., Пыринова Г.Б., Останин А.А., Старостина Н.М., Черных Е.Р. Влияние рекомбинантных белков Core и NS3 вируса гепатита С на созревание и функции дендритных клеток, генерируемых *in vitro* в присутствии интерферона-альфа // Иммунология, 2016. Т. 37, № 5. С. 239-245. [Oleynik E.A., Leplina O.Yu., Tyrinova T.V., Tikhonova M.A., Pyrinova G.B., Ostanin A.A., Starostina N.M., Chernykh E.R. The influence of recombinant HCV proteins Core and NS3 on maturation and functions of dendritic cells generated *in vitro* with interferon-alpha. *Immunologiya = Immunology*, 2016, Vol. 37, no. 5, pp. 239-245. (In Russ.)]
2. 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, Vol. 97, no. 10, pp. 3171-3176.
3. Bronowicki J.P., Vetter D., Uhl G., Hudziak H., Uhrmacher A., Vetter J.M., Doffoel M. 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, Vol. 176, no. 2, pp. 518-522.
4. 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, Vol. 82, no. 15, pp. 7567-7577.
5. Diepolder H.M., Gerlach J.T., Zachoval R., Hoffmann R.M., Jung M.C., Wierenga E.A., Scholz S., Santantonio T., Houghton M., Southwood S., Sette A., Pape G.R. Immunodominant CD4 T-cell epitope within nonstructural protein 3 in acute hepatitis C virus infection. *J. Virol.*, 1997, Vol. 71, no. 8, pp. 6011-6019.
6. Dubuisson J. Hepatitis C virus proteins. *World J. Gastroenterol.*, 2007, Vol. 13, no. 17, pp. 2406-2415.
7. Eickhoff S., Brewitz A., Gerner M.Y., Klauschen F., Komander K., Hemmi H., Garbi N., Kaisho T., Germain R.N., Kastentmüller W. Robust anti-viral immunity requires multiple distinct T cell-dendritic cell interactions. *Cell*, 2015, Vol. 162, no. 6, pp. 1322-1337.
8. Echeverria I., Pereboev A., Silva L., Zabaleta A., Riezu-Boj J.I., Bes M., Cubero M., Borrás-Cuesta F., Lasarte J.J., Esteban J.I., Prieto J., Sarobe P. Enhanced T cell responses against hepatitis C virus by *ex vivo* targeting of adenoviral particles to dendritic cells. *Hepatology*, 2011, Vol. 54, no. 1, pp. 28-37.
9. Farkas A., Kemény L. Interferon- α in the generation of monocyte-derived dendritic cells: recent advances and implications for dermatology. *Br. J. Dermatol.*, 2011, Vol. 165, no. 2, pp. 247-254.
10. Gowans E.J., Roberts S., Jones K., Dinatale I., Latour P.A., Chua B., Eriksson E.M., Chin R., Li S., Wall D.M., Sparrow R.L., Moloney J., Loudovaris M., Ffrench R., Prince H.M., Hart D., Zeng W., Torresi J., Brown L.E., Jackson D.C. A phase I clinical trial of dendritic cell immunotherapy in HCV-infected individuals. *J. Hepatol.*, 2010, Vol. 53, no. 4, pp. 599-607.
11. Ghany M.G., Strader D.B., Thomas D.L., Seeff L.B. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology*, 2009, Vol. 49, no. 4, pp. 1335-1374.
12. Houghton M. Prospects for prophylactic and therapeutic vaccines against the hepatitis C viruses. *Immunol. Rev.*, 2011, Vol. 239, no. 1, pp. 99-108.
13. Jo J., Aichele U., Kersting N., Klein R., Aichele P., Bisse E., Sewell A.K., Blum H.E., Bartenschlager R., Lohmann V., Thimme R. Analysis of CD8⁺ T-cell-mediated inhibition of hepatitis C virus replication using a novel immunological model. *Gastroenterology*, 2009, Vol. 136, no. 4, pp. 1391-1401.
14. Klenerman P., Thimme R. T cell responses in hepatitis C: the good, the bad and the unconventional. *Gut*, 2012, Vol. 61, no. 8, pp. 1226-1234.

15. Kamal S.M., Fehr J., Roesler B., Peters T., Rasenack J.W. Peginterferon alone or with ribavirin enhances HCV-specific CD4 T-helper 1 responses in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology*, 2002, Vol. 123, no. 4, pp. 1070-1083.
16. Korthals M., Safaian N., Kronenwett R., Maihofer D., Schott M., Papewalis C., Diaz Blanco E., Winter M., Czibere A., Haas R., Kobbe G., Fenk R. Monocyte derived dendritic cells generated by IFN-alpha acquire mature dendritic and natural killer cell properties as shown by gene expression analysis. *J. Transl. Med.*, 2007, Vol. 5, no. 1, pp. 46-57.
17. 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, Vol. 22, no. 6, pp. 491-502.
18. 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, Vol. 176, no. 10, pp. 6065-6075.
19. Lapenta C., Santini S.M., Spada M., Donati S., Urbani F., Accapezzato D., Franceschini D., Andreotti M., Barnaba V., Belardelli F. IFN-alpha-conditioned dendritic cells are highly efficient in inducing cross-priming CD8(+) T cells against exogenous viral antigens. *Eur. J. Immunol.*, 2006, Vol. 36, no. 8, pp. 2046-2060.
20. MohdHanafiah K., Groeger J., Flaxman A.D., Wiersma S.T. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: New estimates of age specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology*, 2013, Vol. 57, no. 4, pp. 1333-1334.
21. Manns M.P., Wedemeyer H., Cornberg M. Treating viral hepatitis C: efficacy, side effects, and complications. *Gut*, 2006, Vol. 55, no. 9, pp. 1350-1359.
22. 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, Vol. 10, no. 11, pp. 1563-1572.
23. Petruzzello A., 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 J. Gastroenterol.*, 2016, Vol. 22, no. 34, pp. 7824-7840.
24. 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, Vol. 22, no. 4, pp. 391-415.
25. Randolph G.J., Beaulieu S., Lebecque S., Steinman R.M., Muller W.A. Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science*, 1998, Vol. 282, no. 5388, pp. 480-483
26. Rosen H.R. Emerging concepts in immunity to hepatitis C virus infection. *J. Clin. Invest.*, 2013, Vol. 123, no. 10, pp. 4121-4130.
27. Santini S.M., Lapenta C., Logozzi M., Parlato S., Spada M., Di Pucchio T., Belardelli F. Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity *in vitro* and in hu-pbl-scid mice. *J. Exp. Med.*, 2000, Vol. 191, no. 10, pp. 1777-1788.
28. Sachdeva M., Chawla Y.R., Arora S.R. Dendritic cells: The warriors upfront-turned defunct in chronic hepatitis C infection. *World J. Hepatol.*, 2015, Vol. 7, no. 19, pp. 2202-2208.
29. Thompson A.J., Holmes J.A. Treating hepatitis C – what's new? *Aust. Prescr.*, 2015, Vol. 38, no. 6, pp. 191-197.
30. Thimme R., Bukh J., Spangenberg H.C., Wieland S., Pemberton J., Steiger C., Govindarajan S., Purcell R.H., Chisari F.V. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 2002, Vol. 99, no. 24, pp. 15661-15668.
31. Thurner B., Roder C., Dieckmann D., Heuer M., Kruse M., Glaser A., Keikavoussi P., Kampgen E., Bender A., Schuler G. Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical applications. *J. Immunol. Meth.*, 1999, Vol. 224, no. 1-2, p. 211.
32. Vertuani S., Bazzaro M., Gualandi G., Micheletti F., Marastoni M., Fortini C., Canella A., Marino M., Tomatis R., Traniello S., Gavioli R. Effect of interferon-alpha therapy on epitope-specific cytotoxic T lymphocyte responses in hepatitis C virus-infected individuals. *Eur. J. Immunol.*, 2002, Vol. 32, no. 1, pp. 144-154.
33. Zabaleta A., D'Avola D., Echeverria I., Llopiz D., Silva L., Villanueva L., Riezu-Boj J.I., Larrea E., Pereboev A., Lasarte J.J., Rodriguez-Lago I., Icarrairegui M., Sangro B., Prieto J., Sarobe P. Clinical testing of a dendritic cell targeted therapeutic vaccine in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.*, 2015, Vol. 11, no. 2, p. 15006.

34. Zhu W., Chang Y., Wu C., Han Q., Pei R., Lu M., Chen X. 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, Vol. 17, no. 7, pp. 1139-1147.

35. Zhou Y., Zhang Y., Yao Z., Moorman J.P., Jia Z. Dendritic cell-based immunity and vaccination against hepatitis C virus infection. *Immunology.*, 2012, Vol. 136, no. 4, pp. 385-396.

Авторы:

Черных Е.Р. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, заведующая лабораторией клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Олейник Е.А. — аспирант лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Леплина О.Ю. — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Тихонова М.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Курочкина Ю.Д. — аспирант лаборатории клеточной иммунотерапии, врач-ревматолог клиники иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Старостина Н.М. — к.м.н., заслуженный врач РФ, заведующая отделением иммунологии Клиники иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Останин А.А. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Chernykh E.R., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Oleynik E.A., Postgraduate Student, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Lepina O. Yu., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Tikhonova M.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Kurochkina Yu.D., Postgraduate Student, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Physician (Rheumatology), Clinics of Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Starostina N.M., PhD (Medicine), Honored Doctor of Russian Federation, Head, Immunology Department, Clinics of Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Ostanin A.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Main Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 25.01.2017
Принята к печати 09.02.2017

Received 25.01.2017
Accepted 09.02.2017