

ИНДУКЦИЯ HCV-СПЕЦИФИЧЕСКОГО КЛЕТОЧНОГО ОТВЕТА *IN VITRO* ДЕНДРИТНЫМИ КЛЕТКАМИ, ГЕНЕРИРОВАННЫМИ В ПРИСУТСТВИИ ИНТЕРФЕРОНА- α

Е.Р. Черных, Е.А. Олейник, О.Ю. Леплина, М.А. Тихонова, Т.В. Тыринова, Н.М. Старостина, А.А. Останин

ФГБНУ НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия

Резюме. Индукция сильного мультиэпитопного Т-клеточного ответа против вируса гепатита С (HCV) играет важную роль в элиминации вируса, тогда как недостаточность адаптивного ответа способствует хронизации и быстрой прогрессии HCV-инфекции. Поскольку дендритные клетки (DC) способны примировать наивные Т-лимфоциты и индуцировать эффективный иммунный ответ, использование DC-вакцин для усиления HCV-специфического Т-клеточного ответа рассматривается в качестве нового подхода к лечению хронического гепатита С (ХГС). В работе исследована способность DC, генерированных из моноцитов в присутствии интерферона- α и нагруженных рекомбинантными HCV белками Core (1–120) и NS3 (1192–1457), индуцировать антигенспецифический клеточный ответ у здоровых доноров и больных ХГС. Иммунный ответ оценивался по пролиферативной активности и продукции Th1 (IFN γ)/Th2 (IL-4, IL-6) цитокинов в культурах мононуклеарных клеток (МНК), а также активации цитотоксических Т-лимфоцитов в тесте дегрануляции. Проведенные исследования показали, что первичный антиген-специфический ответ в культурах МНК серонегативных доноров детектировался лучше при стимуляции DC, нагруженными одновременно двумя антигенами (DC_{Core/NS3}), чем при нагрузке одним белком. DC_{Core/NS3} индуцировали пролиферативный ответ и дегрануляцию CD8⁺ Т-клеток у всех тестируемых доноров и в 50% (5/10) случаев индуцировали продукцию IFN γ . Аналогично DC доноров, DC_{Core/NS3} пациентов с ХГС индуцировали в большинстве случаев (86%) пролиферативный ответ и в 57% случаев — продукцию IFN γ . В то же время активация цитотоксических Т-клеток у пациентов выявлялась реже (в 57% vs 100% у доноров), что могло быть отчасти обусловлено повышенной спонтанной дегрануляцией CD8⁺ Т-клеток у отдельных пациентов. Полученные данные обосновывают возможность использования DC-вакцин на основе интерферона- α -индуцированных DC с целью профилактики и лечения хронической HCV-инфекции.

Ключевые слова: HCV-инфекция, Т-клеточный ответ, Core-антиген, NS3-антиген, дендритные клетки.

INDUCTION OF HCV-SPECIFIC CELL RESPONSE *IN VITRO* BY DENDRITIC CELLS GENERATED WITH INTERFERON- α

Chernykh E.R., Oleynik E.A., Leplina O.Yu., Tikhonova M.A., Tyrinova T.V., Starostina N.M., Ostanin A.A.

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

Abstract. The induction of a strong multi-epitope T-cell response against hepatitis C virus (HCV) plays an important role in eliminating the virus, whereas adoptive response deficiency contributes to chronic and rapid progression of HCV-

Адрес для переписки:

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

Contacts:

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

Библиографическое описание:

Черных Е.Р., Олейник Е.А., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Тыринова Т.В., Старостина Н.М., Останин А.А. Индукция HCV-специфического клеточного ответа *in vitro* дендритными клетками, генерированными в присутствии интерферона- α // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 1. С. 76–86. doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-76-86

© Черных Е.Р. и соавт., 2019

Citation:

Chernykh E.R., Oleynik E.A., Leplina O.Yu., Tikhonova M.A., Tyrinova T.V., Starostina N.M., Ostanin A.A. Induction of HCV-specific cell response *in vitro* by dendritic cells generated with interferon- α // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 1, pp. 76–86. doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-76-86

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-2019-1-76-86>

infection. Since dendritic cells (DCs) are capable of priming naive T lymphocytes and induce an effective immune response, the use of DC-based vaccines to enhance the HCV-specific T cell response is considered as a new approach to treatment of chronic hepatitis C (CHC). The ability of DCs generated from monocytes in the presence of interferon- α and loaded with recombinant HCV proteins Core (1–120) and NS3 (1192–1457) to induce an antigen-specific cellular response in healthy donors and patients with CHC was investigated. The immune response was assessed by proliferative activity and Th1 (IFN γ)/Th2 (IL-4, IL-6) production in mononuclear cells (MNC) cultures, and activation of cytotoxic T-lymphocytes in the degranulation test. We demonstrated that the primary antigen-specific response in MNC cultures of seronegative donors was detected better by stimulation of DCs, loaded with both antigens (DC_{Core/NS3}) than when loaded with a single protein. DC_{Core/NS3} induced the proliferative response and degranulation of CD8⁺ T cells in MNC cultures of all tested donors, and in 50% (5/10) cases — IFN γ production. Similarly to donor DCs, DC_{Core/NS3} of patients with CHC induced a proliferative response in most cases (86%) and IFN γ production in 57% cases. At the same time, the activation of cytotoxic T cells in patients was less frequent (patients vs donors 57 and 100%, respectively), which could be partly due to increased spontaneous degranulation of CD8⁺ T cells in some patients. The obtained data testify the possibility of using vaccines based on interferon- α -induced DCs for the prevention and treatment of chronic HCV infection.

Key words: chronic HCV infection, T cell response, Core-antigen, NS3-antigen, dendritic cells.

Введение

Инфекция, обусловленная вирусом гепатита С (HCV), остается важнейшей медико-социальной проблемой во всем мире в силу широкой распространенности и серьезных последствий. В большинстве случаев острая HCV-инфекция трансформируется в хроническую и является причиной цирроза печени, гепатоцеллюлярной карциномы и печеночной недостаточности [20, 23]. Наиболее эффективное лечение HCV-инфекции включает препараты интерферона- α (IFN α) в сочетании с рибавирином, однако и в этом случае ответ не превышает 40–50% у пациентов с генотипом 1, а развитие тяжелых побочных реакций часто вынуждает прекратить лечение [18]. Таргетная терапия ингибиторами протеаз, обещающая прорывом в лечении хронического вирусного гепатита С (ХГС), также имеет ряд ограничений [30].

Известно, что важную роль в элиминации вируса играет адаптивный Т-клеточный ответ. Несмотря на высокую вариабельность вирусного генома, вирус экспрессирует ряд высоко консервативных структурных и неструктурных белков [24], и сильный мультиспецифичный ответ Т-клеток к эпитопам консервативных белков ассоциирован с исходом острой HCV-инфекции в выздоровление. В то же время пациенты с ХГС характеризуются низким Т-клеточным ответом с узким репертуаром распознаваемых эпитопов [13]. Ведущую роль в уничтожении вируса играют CD8⁺ Т-клетки, цитотоксический эффект которых реализуется через продукцию IFN γ [29]. Не меньшая роль при HCV-инфекции отводится CD4⁺ Т-клеткам, которые обеспечивают костимуляторные сигналы для генерации цитотоксических Т-лимфоцитов. Выраженная пролиферация антигенспецифических CD4⁺ Т-клеток, а также продукция ими IFN γ сопряжены с эффективной элиминацией вируса при

острой инфекции [14, 28] и устойчивым вирусологическим ответом на терапию интерфероном и рибавирином при ХГС [9].

Недостаточность Т-клеточного ответа способствует не только хронизации, но и быстрой прогрессии HCV-инфекции [10] и во многом обусловлена нарушениями антигенной презентации и активации Т-клеток [21]. Наиболее эффективная презентация вирусных антигенов Т-лимфоцитам осуществляется дендритными клетками (DC) [5]. Подавление их функций вирусными белками является одним из механизмов, используемых вирусом для избегания иммунного ответа [26]. Поэтому применение DC, нагруженных вирусными антигенами, для стимуляции или усиления противовирусного иммунного ответа рассматривается в качестве новой терапевтической стратегии лечения HCV-инфекции [31]. Созданию такого подхода во многом способствовала разработка метода получения большого количества DC *in vitro* путем культивирования моноцитов с гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором (GM-CSF) и интерлейкином-4 (IL-4). Генерированные таким образом DC (IL4-DC) при трансфекции HCV-антигенов продемонстрировали способность индуцировать антигенспецифический ответ в культурах Т-лимфоцитов здоровых доноров [16], а также больных ХГС [4]. Однако будучи эффективными в индукции пролиферативного ответа Core-специфических Т-клеток, IL4-DC не индуцировали значимой пролиферации NS3-специфических Т-клеток [17]. Кроме того, продукция IFN γ при стимуляции IL4-DC наблюдалась только при дополнительной трансфекции костимуляторной молекулы [4].

Наряду с IL-4 важную роль в дифференцировке моноцитов в DC играет IFN α [22]. Генерируемые в присутствии интерферона- α DC (IFN-DC) сохраняют высокую захватыва-

ющую способность и характеризуются более высокой миграционной активностью; более эффективно индуцируют генерацию цитотоксических Т-клеток, распознающих вирусные антигены; обладают свойствами НК-клеток, а также характеризуются более высокой продукцией $IFN\alpha$ [6, 15]. Данный тип клеток может служить новой платформой для создания DC-вакцин, однако способность $IFN-DC$ индуцировать *in vitro* HCV-специфический ответ ранее не исследовалась. Учитывая, что полноразмерные HCV белки обладают иммуносупрессорной активностью [11], для нагрузки DC были выбраны усеченные фрагменты рекомбинантных HCV Core (1–120) и NS3 (1192–1457) антигенов. Нагрузка DC указанными белками согласно полученным ранее данным не оказывала ингибирующего действия на созревание и функции $IFN-DC$ [1].

Целью настоящего исследования стала оценка способности $IFN-DC$, нагруженных рекомбинантными Core- и NS3-антигенами, индуцировать антигенспецифический ответ в культурах мононуклеарных клеток здоровых доноров и больных ХГС.

Материалы и методы

В исследование были включены здоровые доноры, негативные по сывороточным маркерам вирусного гепатита С и больные ХГС (12 мужчин и 17 женщин) с генотипом 1b, умеренной вирусной нагрузкой ($RHK \geq 10^4$ МЕ/мл), минимальной или средней степенью активности гепатита по уровню трансаминаз крови, без трансформации в цирроз (фиброз 0–III по шкале METAVIR). Мононуклеарные клетки (МНК) получали центрифугированием гепаринизированной венозной крови в градиенте плотности фикола-верографина.

Генерация DC и нагрузка антигенами. Для генерации DC адгезивную к пластику фракцию МНК культивировали при 37°C в CO_2 -инкубаторе в течение 4 сут в 6-луночных планшетах (Nunclon, Дания) в среде RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 5 мМ HEPES-буфера, 100 мкг/мл гентамицина и 5% сыворотки плодов коровы (FCS, Биолот, Санкт-Петербург), в присутствии GM-CSF (40 нг/мл, Sigma-Aldrich) и $IFN\alpha$ (1000 Ед/мл, Роферон-А, Roche, Швейцария) с последующим дозреванием в течение 24 ч с липополисахаридом (10 мкг/мл, ЛПС, *E. coli* 0114:B4, Sigma-Aldrich). Для нагрузки $IFN-DC$ использовали рекомбинантные протеины, кодируемые фрагментами генов иммунодоминантных районов белков Core (1–120) и NS3 (1192–1457) HCV генотипа 1b, полученные в лаборатории рекомбинантных белков ЗАО

«Вектор-Бест» (Новосибирск). Генерированные в 4-суточных культурах $IFN-DC$ 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 созревание добавлением ЛПС (10 мкг/мл на 24 ч).

Индукция антигенспецифического ответа. Антигенспецифический ответ стимулировали либо при культивировании МНК ($0,2 \times 10^6$ /лунку) в течение 5 сут с рекомбинантными HCV белками Core и/или NS3 в дозе 5 мкг/мл, либо при культивировании МНК в течение 5 сут с аутологичными $IFN-DC$ (в соотношении 10:1), нагруженными указанными антигенами. В первом случае контролем служили культуры МНК в отсутствие антигенов, во втором — МНК культивированные с DC, ненагруженными антигенами. Об индукции HCV-специфического клеточного ответа судили по усилению пролиферации, продукции Th1 ($IFN\gamma$) и Th2 (IL-4, IL-6) цитокинов и дегрануляции $CD8^+$ Т-клеток в присутствии рекомбинантных HCV белков или DC, нагруженных вирусными антигенами, по сравнению с контролем. Индекс стимуляции HCV Core- и/или NS3-белков или DC, нагруженных антигенами, рассчитывали как отношение ответа по сравнению с контрольными культурами.

Интенсивность пролиферации оценивали на 5 сутки радиометрически по включению 3H -тимидина, вносимого в лунки за 18 ч до конца культивирования в дозе 1 мКи/лунку.

Производство цитокинов ($IFN\gamma$, IL-4, IL-6) в супернатантах 5-суточных культур МНК, стимулированных Core/NS3-нагруженными DC или растворимыми Core/NS3-антигенами определяли методом иммуноферментного анализа, используя соответствующие тест-системы (Вектор-Бест, Новосибирск).

Активацию цитотоксических Т-клеток оценивали по дегрануляции $CD8^+$ Т-клеток методом проточной цитофлюориметрии. Известно, что стимуляция $CD8^+$ Т-лимфоцитов через Т-клеточный рецептор вызывает перемещение литических гранул из цитоплазмы к мембране и экстернализацию молекулы $CD107a$ (компонент литических гранул). Поэтому определение доли $CD8^+CD107a^+$ Т-лимфоцитов позволяет идентифицировать активированные цитотоксические Т-клетки. Для оценки дегрануляции $CD8^+$ Т-лимфоцитов в ответ на рекомбинантные антигены МНК ($0,2 \times 10^6$ /лунку) культивировали в течение 6 ч с монензимом А (BD PharMingen, США) в присутствии HCV антигенов (5 мкг/мл). Негативным контролем служили культуры МНК в отсутствие антигенов, позитивным контролем — культуры МНК, стимулированные анти- $CD3$ моноклональными антителами (ООО «Биоспектр», 1 мкг/мл).

Для оценки дегрануляции CD8⁺ Т-лимфоцитов, индуцированной антиген-нагруженными DC, МНК с DC (в соотношении 10:1) культивировали 5 сут, и за 6 ч до окончания культивирования вносили монензим А. Негативным контролем служили МНК культивированные с интактными IFN-DC. По завершении культивирования клетки метили анти-CD107a(АРС) и анти-CD8(РЕ) антителами (BD PharMingen, США) и оценивали экспрессию CD107a в гейте CD3⁺CD8⁺-клеток на проточном цитофлуориметре (FACS Calibur, Becton Dickinson, США).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета программ Statistica 6.0. Данные представлены в виде среднего арифметического значения (m), медианных значений (Me), интерквартильного диапазона (IQR, 25–75% квартили) и минимальных (Min) и максимальных (Max) значений. Для выявления значимых различий сравниваемых показателей использовали непараметрический U-критерий Манна–Уитни (Pu). Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Влияние рекомбинантных HCV белков на МНК серонегативных доноров

Поскольку для нагрузки IFN-DC использовали рекомбинантные HCV антигены, для исключения их неспецифических эффектов в предварительной серии экспериментов исследовали влияния Core- и NS3-антигенов на пролиферацию, продукцию IFN γ и активацию цитотоксических Т-клеток в культурах МНК серонегативных доноров (табл. 1). МНК доноров эффективно пролиферировали в ответ на стимуляцию митогеном КонА. В то же время

интенсивность пролиферации при стимуляции NS3- или Core-антигенами в дозе 5 мкг/мл, которая также использовалась для нагрузки DC, оставалась на уровне спонтанной пролиферации в контрольных культурах. Core- и NS3-антигены также не влияли на продукцию IFN γ , тогда как при КонА-стимуляции секреция IFN γ возрастала в среднем с 20 до 2750 пг/мл ($p_U < 0,01$). Относительное количество CD8⁺CD107a⁺-клеток в контрольных культурах было менее 1%, что свидетельствует о низком уровне спонтанной дегрануляции в популяции цитотоксических Т-лимфоцитов. При стимуляции анти-CD3 антителами содержание CD8⁺CD107a⁺ Т-клеток увеличивалось практически в 10 раз ($p_U < 0,01$). При этом NS3 или Core антигены не оказывали значимого влияния на количество 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 рекомбинантные белки не обладают неспецифической стимулирующей активностью.

HCV-специфический ответ, индуцированный IFN-DC здоровых доноров

Убедившись в отсутствии неспецифической активности используемых вирусных белков, далее исследовали способность IFN-DC доноров, нагруженных HCV-антигенами, индуцировать *in vitro* антигенспецифический ответ. Для этого у здоровых серонегативных доноров генерировали IFN-DC, которые затем нагружали Core (DC_{Core}), NS3 (DC_{NS3}) или их комбинацией (DC_{Core/NS3}) и культивировали в течение 5 дней с аутологичными МНК. Об индукции ответа судили по усилению пролиферации, продукции цитокинов (IFN γ , IL-4, IL-6) и де-

Таблица 1. Влияние HCV Core- и NS3-антигенов на пролиферацию, продукцию IFN γ и дегрануляцию цитотоксических Т-клеток в культурах МНК серонегативных доноров (n = 8–12)

Table 1. Effect of HCV Core and NS3 antigens on proliferation, IFN γ production and degranulation of cytotoxic T cells in PBMC cultures of seronegative donors (n = 8–12)

МНК PBMC		Пролиферация (имп./мин) Proliferation (cpm)	Производство IFN γ (пг/мл) IFN γ production (pg/ml)	CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD107a ⁺ (%)
Контроль Control	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	19 980*	2750*	–
	IQR	16 490–23 990	2420–2860	–
анти-CD3 anti-CD3	Me	–	–	6,3*
	IQR	–	–	4,4–6,9

Примечание. * — $p < 0,01$, различия статистически значимы по сравнению с контролем.

Note. * — $p < 0.01$, differences are statistically significant vs control.

грануляции CD8⁺ Т-клеток в культурах МНК при стимуляции DC, нагруженными вирусными антигенами, по сравнению с ответом МНК в присутствии интактных DC (DC₀).

Способность DC_{Core} и DC_{NS3} индуцировать антигенспецифический пролиферативный ответ была исследована у 6 доноров. По сравнению с интактными клетками IFN-DC, нагруженные отдельными HCV-антигенами, незначительно усиливали пролиферацию МНК в среднем на 11%. Медианные значения индексов стимуляции составляли 1,11 и 1,12 расч. ед. для DC_{Core} и DC_{NS3} соответственно (рис. 1А). Поскольку низкий уровень ответа был, очевидно, обусловлен малым количеством антигенраспознающих Т-клеток, в следующей серии экспериментов (n = 12) оценили пролиферативный ответ МНК, индуцированный IFN-DC, нагруженными двумя антигенами (DC_{Core/NS3}). В этом случае статистически значимое (p_U = 0,002) усиление пролиферации МНК отмечалось у всех 12 те-

стируемых доноров (рис. 1Б). Индекс стимуляции DC_{Core/NS3} составил 1,55 расч.ед. (IQR 1,17–2,05) и был достоверно выше аналогичных значений DC_{Core} (p_U = 0,05) или DC_{NS3} (p_U = 0,018). Учитывая полученные результаты, дальнейшие исследования были сфокусированы на эффектах IFN-DC, нагруженных комбинацией HCV-антигенов.

Поскольку одним из важнейших медиаторов противовирусного Т-клеточного ответа является IFN γ , была также исследована способность DC_{Core/NS3} стимулировать продукцию IFN γ (рис. 1В). Сами DC, культивируемые в соответствующих количествах (без МНК), не секретировали IFN γ на детектируемом уровне (данные не представлены). По сравнению с интактными клетками IFN-DC, нагруженные двумя HCV-антигенами, у 5 из 10 доноров не оказывали заметного влияния на продукцию IFN γ , тогда как в оставшихся 50% случаях статистически значимо усиливали его секрецию (p_U = 0,04).

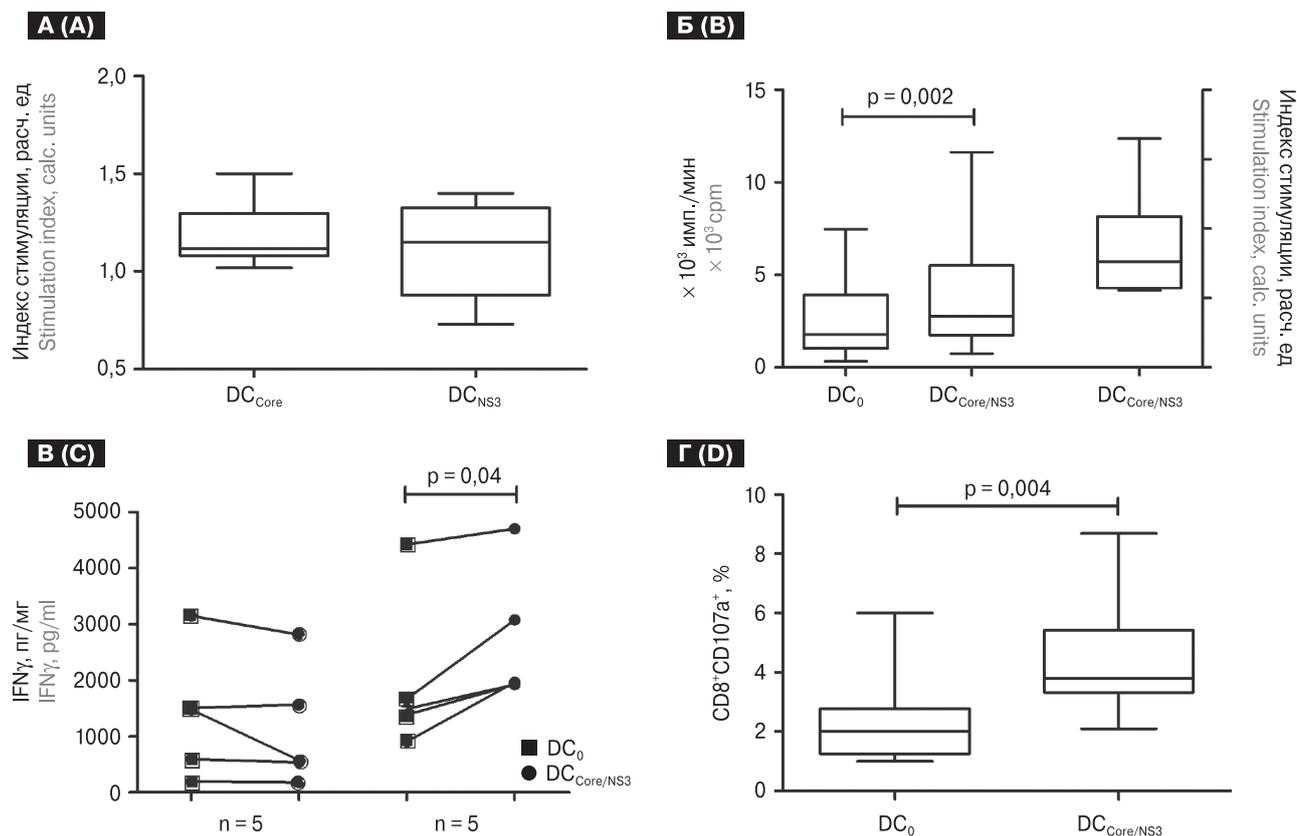


Рисунок 1. IFN-DC доноров, нагруженные вирусными антигенами, индуцируют антигенспецифический ответ

Figure 1. Donor IFN-DCs loaded with viral antigens induce an antigen-specific response *in vitro*

Примечания. DC₀ — интактные DC, DC_{Core} — DC, нагруженные Core-антигеном, DC_{NS3} — DC, нагруженные NS3-антигеном, DC_{Core/NS3} — DC, нагруженные Core- и NS3-антигенами. А, Б — пролиферация (n = 6, 12). В — продукция IFN γ (n = 10). Г — дегрануляция CD107a (n = 10). Данные представлены в виде среднего значения, интерквартильного диапазона, минимальных и максимальных значений.

Notes. DC₀ — intact DC, DC_{Core} — DC loaded with Core antigen, DC_{NS3} — DC loaded with NS3 antigen, DC_{Core/NS3} — DC loaded with Core and NS3 antigens. A, B — proliferation (n = 6, 12). C — IFN γ -production (n = 10). D — degranulation CD107a (n = 10). Data are presented as mean, interquartile and min-max ranges.

Индекс стимуляции DC_{Core/NS3} в этой подгруппе составил в среднем 1,4 расч.ед., варьируя от 1,1 до 2,16.

Наряду с оценкой продукции IFN γ , у части доноров (n = 4) было также исследовано влияние DC_{Core/NS3} на продукцию Th2 цитокинов (IL-6 и IL-4). Не было выявлено достоверных различий в уровне продукции IL-6/IL-4 в культурах МНК, стимулированных интактными IFN-DC и DC_{Core/NS3} ($p_U > 0,05$). Незначительное усиление секреции Th2 цитокинов регистрировалось только у одного из четырех тестируемых доноров.

Оценка способности IFN-DC индуцировать антигенспецифические цитотоксические Т-клетки показала (рис. 1Г), что по сравнению с интактными клетками DC_{Core/NS3} вызывали практически 2-кратное увеличение относительного содержания CD8⁺CD107a⁺ Т-клеток среди отвечающих аутологичных МНК (в среднем с 2 до 3,8%, $p_U = 0,004$). При этом индекс стимуляции DC_{Core/NS3} у всех 10 обследованных доноров превышал 1,3 расч.ед., что свидетельствует о способности IFN-DC, нагруженных HCV белками, примировать антигенспецифические цитотоксические Т-лимфоциты.

HCV-специфический ответ, индуцированный IFN-DC больных ХГС

Далее исследовали способность IFN-DC больных ХГС индуцировать HCV-специфический ответ в аутологичной смешанной куль-

туре лимфоцитов (ауто-СКЛ). Учитывая известные данные о снижении функциональной активности Т-лимфоцитов и возможной дефектности DC у пациентов с ХГС, предварительно была проведена сравнительная оценка митогенной реактивности Т-клеток и стимуляторной активности IFN-DC в ауто-СКЛ у здоровых доноров и больных ХГС. Из данных таблицы 2 видно, что по сравнению с донорами МНК больных отличались более низкой спонтанной пролиферацией ($p_U = 0,02-0,15$), а также сниженной митогенной реактивностью Т-клеток в КонА-стимулированных культурах ($p_U = 0,008$). Тем не менее, стимуляторная активность IFN-DC в ауто-СКЛ у больных ХГС сохранялась на уровне здоровых доноров (1980 vs 2050 имп./мин, $p_U = 0,52$).

Поскольку пролиферативный ответ в ауто-СКЛ отражает активацию Т-клеток в процессе распознавания HLA-DR антигенов на DC, можно заключить, что по своей антигенпрезентирующей активности IFN-DC больных ХГС были сопоставимы с DC доноров. Это позволило предположить, что DC больных, нагруженные рекомбинантными Core- и NS3-белками, также будут способны индуцировать *in vitro* клеточный ответ на вирусные антигены.

Для проверки высказанного предположения исследовали свойства DC_{Core/NS3} у 7 пациентов с ХГС (рис. 2). IFN-DC, нагруженные двумя HCV-антигенами, индуцировали пролиферативный ответ Т-лимфоцитов у 6 из 7 те-

Таблица 2. Сравнительная характеристика митогенной реактивности Т-клеток и стимуляторной активности IFN-DC доноров и больных ХГС

Table 2. Comparative characteristic of T cell mitogenic reactivity and IFN-DC stimulatory activity of healthy donors and patients with chronic hepatitis C

Параметры Characteristic	Доноры (n = 18) Donors	Больные (n = 29) Patients	P_U
Митогенная реактивность Т-клеток (имп./мин) T-cell mitogenic reactivity			
МНК PBMC	460 (320–550)	330 (250–420)	0,15
КонА ConA	21 800 (18 900–30 000)	12 400 (10 500–24 600)	0,008
ИСКонА (расч. ед) SIConA (calc. units)	63 (37–77)	41 (15–71)	0,09
Стимуляторная активность IFN-DC в ауто-СКЛ (имп./мин) IFNDC stimulatory activity in auto-MLC (cpm)			
МНК PBMC	480 (420–690)	240 (150–355)	0,02
МНК+DC PBMC +DC	2050 (1240–4060)	1980 (570–3960)	0,52
ИСDC (расч. ед) SIDC (calc. units)	4,5 (2,9–6,9)	8,1 (2,5–11,7)	0,16

Примечание. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона (в скобках), p_U — достоверность различий между донорами и пациентами (U-критерий Манна–Уитни).

Note. Data are presented as median and interquartile range (in brackets), p_U — the significance of the differences between donors and patients (Mann–Whitney U-test).

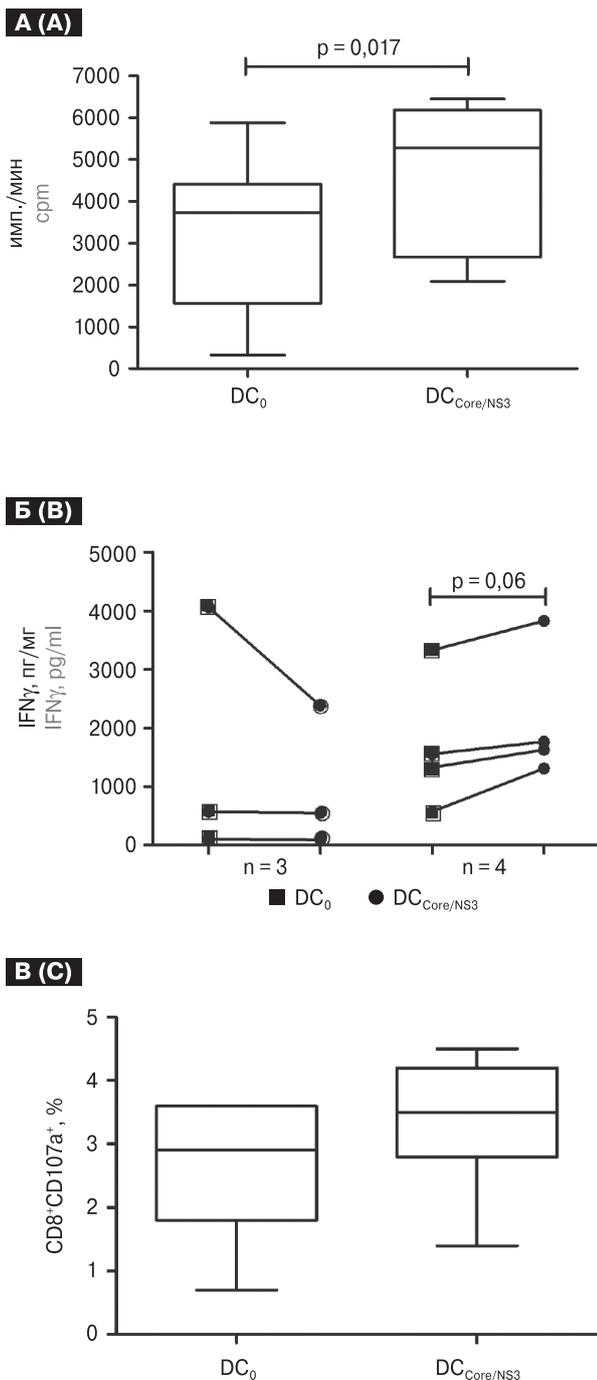


Рисунок 2. IFN-DC больных, нагруженные вирусными антигенами, индуцируют антигенспецифический ответ *in vitro*

Figure 2. Patient IFN-DCs loaded with viral antigens induce an antigen-specific response *in vitro*

Примечания. DC₀ — интактные DC, DC_{Core/NS3} — DC, нагруженные Core- и NS3-антигенами. А — пролиферация (n = 7); Б — продукция IFN γ (n = 7); В — дегрануляция CD107a (n = 7). Данные представлены в виде среднего значения, интерквартильного диапазона, минимальных и максимальных значений.

Notes. DC₀ — intact DC, DC_{Core/NS3} — DC loaded with Core and NS3 antigens. A — proliferation (n = 7); B — IFN γ -production (n = 7); C — degranulation CD107a (n = 7). Data are presented as mean, interquartile and min-max ranges.

стированных больных. Из данных рисунка 2А видно, что по сравнению с интактными клетками DC_{Core/NS3} статистически значимо усиливали пролиферацию в ауто-СКЛ ($p_U = 0,017$). При этом индекс стимуляции DC_{Core/NS3} составил в среднем 1,42 расч.ед. (IQR 1,37–1,72).

IFN-DC, нагруженные Core-/NS3-антигенами, стимулировали продукцию IFN γ у 4 из 7 тестируемых пациентов, но очевидно, из-за малой выборки данный эффект регистрировался в виде отчетливого тренда ($p_U = 0,06$). Индекс стимуляции DC_{Core/NS3} в этой подгруппе варьировал от 1,13 до 2,29 расч.ед. Так же как и у здоровых доноров DC_{Core/NS3} больных ХГС (n = 5) не влияли на уровень продукции Th2 цитокинов (IL-6, IL-4) в ауто-СКЛ. Индексы стимуляции DC_{Core/NS3} на секрецию IL-6 и IL-4 составили 1,08 и 0,93 расч.ед. соответственно.

В целом по группе DC_{Core/NS3} больных ХГС (n = 7) по сравнению с интактными DC₀ индуцировали незначительное возрастание относительного количества CD8⁺CD107a⁺ Т-клеток в ауто-СКЛ (рис. 2В). Тем не менее, на уровне индивидуальных значений значимая антигенспецифическая дегрануляция цитотоксических CD8⁺ Т-лимфоцитов выявлялась у 4 из 7 пациентов. Индекс стимуляции DC_{Core/NS3} в этой подгруппе варьировал от 1,3 до 6,0 расч.ед.

В таблице 3 представлены данные сравнительного анализа HCV-специфического клеточного ответа *in vitro* индуцированного, нагруженными вирусными Core- и NS3-антигенами, IFN-DC доноров и больных ХГС (табл. 3). Видно, по уровню пролиферативного ответа, а также по индексам стимуляции DC_{Core/NS3} пациентов и доноров значимо не различались. При этом DC больных индуцировали антигенспецифический пролиферативный ответ у большинства тестируемых пациентов (86%), то есть практически с такой же частотой, как и DC доноров. Активация Т-клеток к продукции IFN γ при стимуляции DC_{Core/NS3} больных ХГС регистрировалась с меньшей частотой, чем пролиферативный ответ (в 57% случаев). Однако такая же закономерность наблюдалась и для DC доноров. Поэтому частота IFN γ -секреторного ответа, индуцированного DC_{Core/NS3} в исследуемых группах, не различалась (57 vs 50%). Сравнение уровня продукции IFN γ и индексов стимуляции в группах «ответчиков» также не выявило значимых различий в стимуляторной активности DC_{Core/NS3} пациентов и доноров. При сравнении способности активировать антигенспецифические цитотоксические Т-клетки, DC пациентов стимулировали дегрануляцию CD8⁺ Т-клеток только в 57% случаев, тогда как DC доноров — в 100% случаев, что возможно объяснялось повышенной спонтанной дегрануляцией в культурах МНК ряда пациентов. Тем не менее,

индекс стимуляции DC_{Core/NS3} пациентов в группе «ответчиков» был сопоставим с донорскими значениями.

Обсуждение

Известно, что персистенция HCV-инфекции ассоциирована со слабым антигенспецифическим ответом CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов [29]. Поэтому разработка подходов к активации HCV-специфического Т-клеточного ответа остается актуальной задачей. Результаты настоящей работы продемонстрировали возможность индукции *in vitro* HCV-специфического ответа с помощью DC, генерированных с помощью интерферона- α и нагруженных рекомбинантными HCV Core (1–120) и NS3 (1192–1457) антигенами.

Исследования в культурах МНК серонегативных доноров (то есть в популяции, не содержащей HCV-примированных Т-клеток) показали, что антигенспецифический пролиферативный ответ индуцировался лучше при стимуляции DC доноров, нагруженных двумя антигенами (DC_{Core/NS3}), чем при нагрузке DC

одним белком (DC_{Core} или DC_{NS3}), что было очевидно связано с вовлечением большего количества антиген-распознающих Т-клеток. С другой стороны, этот факт свидетельствует, что используемые для нагрузки вирусные белки не оказывают взаимного ингибирующего действия на стимуляторную активность IFN-DC. Ингибирующий эффект HCV Core- и NS3-антигенов на DC является известным фактом, однако в большей степени характерен для полноразмерных белков (Core 2–191) или их фрагментов, расположенных ближе к 3'-концу РНК HVC (NS3 1450–1643) [3]. В то же время усеченный белок NS3 (1192–1457) не оказывал ингибирующего действия на аллостимуляторную активность IL4-DC, а супрессорный эффект Core 2–120 зависел от концентрации белка и зрелости DC [11, 27]. Проведенные нами ранее исследования в популяции IFN-DC, которые по сравнению с IL4-DC характеризуются промежуточной степенью зрелости и более стабильным фенотипом, показали, что нагрузка DC Core (1–120) и NS3 (1192–1457) антигенами не подавляла стимуляторной активности IFN-DC в алло-СКЛ [1].

Таблица 3. Сравнительная оценка антигенспецифического ответа МНК, индуцированного DC_{Core/NS3} доноров и больных ХГС

Table 3. Comparative assessment of the antigen-specific response of PBMCs induced by DC_{Core/NS3} of healthy donors and patients with chronic hepatitis C

Параметры Characteristic	Доноры Donors	Пациенты Patients
Пролиферация Proliferation		
– частота ответа (n/n) – frequency of response (n/n)	100% (12/12)	86% (6/7)
– имп./мин – cpm	2700 (1780–5360)	5290 (2670–6190)
– ИС (расч. ед.) – SI (calc. units)	1,55 (1,2–2,5)	1,42 (1,37–1,72)
Продукция IFNγ IFN γ production		
– частота ответа (n/n) – frequency of response (n/n)	50% (5/10)	57% (4/7)
– уровень IFN γ в группе «ответчиков» (пг/мл) – IFN γ level in the «responders» group (pg/ml)	1960 (1920–3080)	1690 (1470–2790)
– ИС в группе «ответчиков» (расч. ед.) – SI in the «responders» group (calc. units)	1,4 (1,31–1,84)	1,2 (1,14–1,75)
Дегрануляция CD8⁺ Т-клеток Degranulation CD8 ⁺ T-cells		
– частота ответа (n/n) – frequency of response (n/n)	100% (10/10)	57% (4/7)
– % CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD107a ⁺ Т-клеток – % CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD107a ⁺ T-cells	3,8 (3,5–4,9)	3,5 (2,8–4,2)
– ИС (расч. ед.) – SI (calc. units)	2,0 (1,6–2,3)	1,65 (1,33–3,97)

Примечание. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона (в скобках).
Note. Data are presented as median and interquartile range (in brackets).

Настоящая работа является еще одним подтверждением отсутствия супрессорного эффекта выбранных рекомбинантных белков на функциональную активность IFN-DC, поскольку нагрузка IFN-DC данными антигенами не подавляла пролиферативный ответ аутологичных клеток и стимулирующий эффект при нагрузке DC двумя пептидами был выше, чем при нагрузке одним Core- или NS3-антигеном. Характеризуя первичный клеточный ответ на стимуляцию DC_{Core/NS3} доноров, следует отметить, что пролиферация антиген-реактивных клеток и дегрануляция антиген-специфических цитотоксических CD8⁺ Т-лимфоцитов индуцировалась в культурах МНК всех тестируемых доноров. В то же время усиление продукции IFN γ отмечалось в половине (5/10) случаев.

Способность DC доноров индуцировать *in vitro* HCV-специфический Т-клеточный ответ была впервые продемонстрирована Li W. с соавт., которые использовали DC, генерируемые из моноцитов в присутствии GM-CSF и IL-4 и трансфицированные HCV Core- и NS3-генами [17]. На выборке трех репрезентативных доноров было показано, что незрелые IL4-DC, со встроенными Core и NS3 генами, индуцировали в антиген-реактивных Т-клетках экспрессию мРНК TNF α , IL-2 и IL-4, а зрелые DC активировали экспрессию IFN γ , TNF α , IL12-p40, IL-6, IL-10 и, в меньшей степени, IL-4. Авторы также оценили пролиферативный ответ, который отмечался у всех трех доноров и был выше на Core-антиген, а также продукцию IFN γ , которая усиливалась у 2 из 3 доноров при стимуляции DC, экспрессирующими как Core-, так и NS3-антигены [16]. Позже было показано, что IL4-DC, нагруженные иммуногенными HCV пептидами, также могут индуцировать наивные Т-клетки к иммунному распознаванию, активации Th1 ответа и генерации эпитоп-специфических цитотоксических Т-клеток [7, 19]. Полученные нами результаты согласуются с данными других авторов о способности DC индуцировать антигенспецифический ответ в культурах МНК серонегативных доноров, а также впервые демонстрируют возможность использования для этих целей DC, генерируемых с помощью IFN α и нагруженных усеченными рекомбинантными белками HCV Core и NS3. При этом нами получены новые данные о меньшей стимуляторной активности DC_{Core/NS3} на продукцию IL-4/IL-6 по сравнению со способностью активировать секрецию IFN γ и их высокой способности к индукции цитотоксических Т-клеток. Эффективность IFN-DC, нагруженных усеченными HCV Core- и NS3-антигенами, может быть обусловлена большей эффективностью IFN-DC в кросс-презентации

длинноразмержных пептидов, презентации вирусных белков и индукции вирусспецифических цитотоксических Т-клеток [2, 8, 12, 25].

Исследования в группе больных ХГС (генотип 1в) показали, что несмотря на сниженную митогенную реактивность Т-клеток, IFN-DC пациентов обладали сохранной стимуляторной активностью и индуцировали в ауто-СКЛ такой же уровень пролиферативного ответа Т-лимфоцитов, как и DC доноров. Сравнительная оценка свойств DC_{Core/NS3} показала, что DC больных ХГС были сопоставимы с DC доноров по способности индуцировать пролиферативный ответ, который выявлялся в 86% случаев (vs 100% у доноров), а также продукцию IFN γ , которая усиливалась в 57% случаев (vs 50% у доноров). В то же время ответ цитотоксических Т-клеток при стимуляции DC_{Core/NS3} больных ХГС индуцировался реже, чем у доноров (57% vs 100%), что могло быть отчасти связано с повышенной спонтанной дегрануляцией CD8 Т-клеток у отдельных пациентов.

Echeverria I. с соавт. в группе 4 репрезентативных больных ХГС показали, что IL4-DC, трансфицированные NS3-антигеном и адапторной молекулой CFh40L (экто-домен CD40L), стимулируют NS3-специфический ответ аутологичных Т-клеток, который оценивался по количеству IFN γ продуцирующих клеток в ELISPOT тесте. Однако в отсутствии адапторной молекулы DC пациентов не стимулировали антигенспецифический ответ, что было, по мнению авторов, связано со снижением стимуляторной активности DC при HCV-инфекции и ее восстановлением после трансфекции CFh40L. Чтобы исключить неспецифический ответ на антигены трансфицированного аденовируса, авторы также оценили продукцию IFN γ в ответ на стимуляцию NS3 пептидами во вторичных культурах Т-клеток, подверженных экспансии с помощью IL-2, и продемонстрировали возрастание IFN γ у 2 из 4 пациентов [4].

Полученные нами результаты подтверждают возможность индукции *in vitro* антигенспецифического Т-клеточного ответа у больных ХГС. При этом поскольку в настоящей работе исследовались DC, генерируемые с помощью IFN α , и они не отличались от IFN-DC доноров по способности стимулировать пролиферацию аутологичных Т-лимфоцитов, активация HCV-реактивных Т-клеток не требовала дополнительной костимуляции.

Проведенное 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 вирусные антигены в предварительном тестировании не показали прямого неспецифического стимулирующего действия на функции МНК серонегативных доноров, то возрастание пролиферации, продукции IFN γ и дегрануляции цитотоксических CD8⁺ Т-лимфоцитов в культурах МНК с DC_{Core/NS3}

по сравнению с ответом в присутствии интактных DC, свидетельствовало об антигенспецифическом характере ответа, что в итоге и позволило оценить *in vitro* HCV-специфический клеточный ответ.

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

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 (Russia)*, 2016, vol. 37, no. 5, pp. 239–245. doi: 10.18821/0206-4952-2016-37-5-239-245 (In Russ.)]
2. Carbonneil C., Aouba A., Burgard M., Cardinaud S., Rouzioux C., Langlade-Demoyen P., Weiss L. 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, vol. 17, no. 12, pp. 1731–1740. doi: 10.1097/01.aids.0000076306.76477.15
3. Dolganiuc A., Kodys K., Kopasz A., Marshall C., Do T., Romics L. Jr., Mandrekar P., Zapp M., Szabo G. Hepatitis C virus core and nonstructural protein 3 proteins induce proinflammatory cytokines and inhibit dendritic cell differentiation. *J. Immunol.*, 2003, vol. 170, no. 11, pp. 5615–5624. doi: 0.4049/jimmunol.170.11.5615
4. 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. doi: 10.1002/hep.24325
5. 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. doi: 10.1016/j.cell.2015.08.004
6. Gessani S., Conti L., Del Corno M., Belardelli F. Type I interferons as regulators of human antigen presenting cell functions. *Toxins (Basel)*, 2014, vol. 6, no. 6, pp. 1696–1723. doi: 10.3390/toxins6061696
7. Guo Z., Zhang H., Rao H., Jiang D., Cong X., Feng B., Wang J., Wei L., Chen H. 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, vol. 7, no. 6: e38390. doi: 10.1371/journal.pone.0038390
8. Jin Z., Fan J., Zhang Y., Yi Y., Wang L., Yin D., Deng T., Ye W. Comparison of morphology, phenotypes and function between cultured human IL4DC and IFNDC. *Mol. Med. Rep.*, 2017, vol. 16, no. 5, pp. 345–354. doi: 10.3892/mmr.2017.7581
9. 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. doi: 10.1053/gast.2002.36045
10. Koziel M.J. Cellular immune responses against hepatitis C virus. *Clin. Infect. Dis.*, 2005, vol. 41, no. 1, pp. 25–31. doi: 10.1086/429492
11. 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. doi: 10.1093/intimm/dxq033
12. 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. doi: 10.1002/eji.200535579
13. Lauer G.M., Barnes E., Lucas M., Timm J., Ouchi K., Kim A.Y., Day C.L., Robbins G.K., Casson D.R., Reiser M., Dusheiko G., Allen T.M., Chung R.T., Walker B.D., Klenerman P. High resolution analysis of cellular immune responses in resolved and persistent hepatitis C virus infection. *Gastroenterology*, 2004, vol. 127, no. 3, pp. 924–936. doi:10.1053/j.gastro.2004.06.015
14. Lechner F., Wong D.K., Dunbar P.R., Chapman R., Chung R.T., Dohrenwend P., Robbins G., Phillips R., Klenerman P., Walker B.D. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J. Exp. Med.*, 2000, vol. 191, no. 9, pp. 1499–1512. doi: 10.1084/jem.191.9.1499
15. Leplina O.Y., Tyrinova T.V., Tikhonova M.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Interferon alpha induces generation of semi-mature dendritic cells with high pro-inflammatory and cytotoxic potential. *Cytokine*, 2015, vol. 71, no. 1, pp. 1–7. doi: 10.1016/j.cyt.2014.07.258
16. 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. doi: 10.4049/jimmunol.176.10.6065
17. Li W., Li J., Tyrrell D.L., Agrawal B. Expression of hepatitis C virus (HCV) derived Core or NS3 antigens in human dendritic cells leads to induction in pro-inflammatory cytokines and normal T cell stimulation capabilities. *J. Gen. Virol.*, 2006, vol. 87, pp. 61–72. doi: 10.1099/vir.0.81364-0

18. 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. doi: 10.1136/gut.2005.076646
19. Mishra S., Losikoff P.T., Self A.A., Terry F., Ardito M.T., Tassone R., Martin W.D., De Groot A.S., Gregory S.H. Peptide-pulsed dendritic cells induce the hepatitis C viral epitope-specific responses of naive human T cells. *Vaccine*, 2014, vol. 32, no. 26, pp. 3285–3292. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.03.083
20. Mohd Hanafiah 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. doi: 10.1002/hep.26141
21. Neumann-Haefelin C., Blum H.E., Chisari F.V., Thimme R. T cell response in hepatitis C virus infection. *J. Clin. Virol.*, 2004, vol. 32, no. 2, pp. 75–85. doi: 10.1016/j.jcv.2004.05.008
22. Paquette R.L., Hsu N.C., Kiertscher S.M., Park A.N., Tran L., Roth M.D., Glaspy J.A. Interferon-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor differentiate peripheral blood monocytes into potent antigen-presenting cells. *J. Leukoc. Biol.*, 1998, vol. 64, no. 3, pp. 358–367. doi: 10.1002/jlb.64.3.358
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. doi: 10.3748/wjg.v22.i34.7824
24. Rispeter K., Lu M., Behrens S.E., Fumiko C., Yoshida T., Roggendorf M. Hepatitis C virus variability: sequence analysis of an isolate after 10 years of chronic infection. *Virus Genes*, 2000, vol. 21, no. 3, pp. 179–188.
25. Ruben J.M., Bontkes H.J., Westers T.M., Hooijberg E., Ossenkoppele G.J., de Gruijl T.D., van de Loosdrecht A.A. Differential capacity of human interleukin-4 and interferon- α monocyte-derived dendritic cells for cross-presentation of free versus cell-associated antigen. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2015, vol. 64, no. 11, pp. 1419–1427. doi: 10.1007/s00262-015-1741-1
26. 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. doi: 10.4254/wjh.v7.i19.2202
27. Saito K., Ait-Goughoulte M., Truscott S.M., Meyer K., Blazevic A., Abate G., Ray R.B., Hoft D.F., Ray R. Hepatitis C virus inhibits cell surface expression of HLA-DR, prevents dendritic cell maturation, and induces interleukin-10 production. *J. Virol.*, 2008, vol. 82, no. 7, pp. 3320–3328. doi: 10.1128/JVI.02547-07
28. Schulze zur Wiesch J., Lauer G.M., Day C.L., Kim A.Y., Ouchi K., Duncan J.E., Wurcel A.G., Timm J., Jones A.M., Mothe B., Allen T.M., McGovern B., Lewis-Ximenez L., Sidney J., Sette A., Chung R.T., Walker B.D. Broad repertoire of the CD4+ Th cell response in spontaneously controlled hepatitis C virus infection includes dominant and highly promiscuous epitopes. *J. Immunol.*, 2005, vol. 175, no. 6, pp. 3603–3613. doi: 10.4049/jimmunol.175.6.3603
29. 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. doi: 10.1073/pnas.202608299
30. Wilby K.J., Partovi N., Ford J.A., Greanya E., Yoshida E.M. Review of boceprevir and telaprevir for the treatment of chronic hepatitis C. *Can. J. Gastroenterol.*, 2012, vol. 26, no. 4, pp. 205–210. doi: 10.1155/2012/751057
31. 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. doi: 10.1111/j.1365-2567.2012.03590.x

Авторы:

Черных Е.Р., д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, зав. лабораторией клеточной иммунотерапии ФГБНУ НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия;

Олейник Е.А., аспирант лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия;

Леплина О.Ю., д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия;

Тихонова М.А., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия;

Тыринова Т.В., к.б.н., научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия;

Старостина Н.М., заслуженный врач РФ, к.м.н., зав. отделением иммунологии Клиники иммунопатологии ФГБНУ НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия;

Останин А.А., д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия.

Authors:

Chernykh E.R., RAS Corresponding Member, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the 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;

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

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

Tyrinova T.V., PhD (Biology), Researcher, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation;

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

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