

федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Научно-исследовательский институт гриппа»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Цветков Валерий Владимирович

Функциональная активность дендритных клеток у больных клинически  
различными формами хронического гепатита С

14.01.09 – инфекционные болезни

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:  
Заслуженный врач России  
доктор медицинских наук,  
профессор Сологуб Т.В.

Санкт-Петербург – 2016

## Оглавление

Введение .....	4
Глава 1. Современные представления о роли дендритных клеток в патогенезе хронического гепатита С (обзор литературы) .....	11
1.1 Клиническая эпидемиология хронического гепатита С .....	11
1.2 Иммунопатогенез хронического гепатита С .....	14
1.3 Общая характеристика дендритных клеток человека .....	19
1.4 Роль дендритных клеток в регуляции иммунного ответа при вирусной инфекции .....	22
1.5 Функциональная активность дендритных клеток у больных хроническим гепатитом С .....	29
Глава 2. Материалы и методы исследования .....	33
2.1 Характеристика обследуемого контингента и методы исследования .....	33
Глава 3. Результаты исследования. Клинико-иммунологическая характеристика больных с различными вариантами течения хронического гепатита С .....	40
3.1 Клинико-эпидемиологическая характеристика больных хроническим гепатитом С .....	40
3.2 Оценка функциональной активности дендритных клеток у больных хроническим гепатитом С .....	51
3.2.1 Морфологические особенности дендритных клеток .....	52
3.2.2 Оценка способности дендритных клеток к презентации антигенов в составе молекул главного комплекса гистосовместимости 1 и 2 классов .....	55
3.2.3 Оценка способности дендритных клеток к миграции в очаг воспаления .....	58

3.2.4 Оценка способности дендритных клеток к передаче ко- стимулирующих молекулярных сигналов .....	62
3.2.5 Оценка способности дендритных клеток к передаче ко- ингибирующих молекулярных сигналов .....	73
3.2.6 Использование интерферона гамма в качестве молекулярного агента, нормализующего функциональную активность дендритных клеток .....	83
3.3 Включение препарата на основе рекомбинантного интерферона гамма в схему противовирусной терапии больных хроническим гепатитом С	85
Заключение .....	96
Выводы .....	108
Рекомендации для внедрения в медицинскую науку и практику .....	110
Список сокращений и условных обозначений .....	111
Список литературы .....	114

## **Введение**

### **Актуальность исследования**

В начале ХХI века хронический гепатит С (ХГС) продолжает оставаться глобальной медицинской и социальной проблемой, актуальность которой обусловлена повсеместным распространением и высокой экономической значимостью, а также тенденцией к росту числа осложненных и терминальных форм болезни. Сегодня в мире вирусом гепатита С (ВГС) инфицировано около 170-200 миллионов человек [Chen, 2006; Ющук, 2010]. В 60-85% случаев после перенесенного острого гепатита С (ОГС) развивается хроническая инфекция [Westbrook, 2014]. Больные ХГС входят в группу риска развития таких угрожающих жизни осложнений, как цирроз печени (ЦП) и гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК) [Chen, 2006]. Только в течение ближайших 20 лет вследствие увеличения в популяции доли длительно болеющих пациентов с выраженным фиброзом печени смертность от ХГС может возрасти в 2-4 раза [Deuffic-Burban, 2007]. По данным Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека в России, ХГС занимает лидирующее место в структуре заболеваемости хроническими вирусными гепатитами (ХВГ). Наряду с такими инфекционными заболеваниями как острые респираторные вирусные инфекции, грипп, туберкулез, ветряная оспа, инфекционный мононуклеоз, острые кишечные инфекции различной этиологии, ВИЧ-инфекция и педикулез, ХГС в 2014 г. представлял наибольшую экономическую значимость с суммой экономического ущерба в 1,7 млрд. рублей [О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2014 году: Государственный доклад, 2015].

Несмотря на все успехи современной терапии ХГС с использованием препаратов, обладающих прямым противовирусным действием, патогенез этой хронической инфекции остается плохо изученным. Наибольший интерес для научного сообщества традиционно представляет изучение механизмов

взаимодействия ВГС с различными факторами иммунной защиты человека. Открытие новых «механизмов ускользания» ВГС от иммунного ответа хозяина, а также изучение спектра иммунологических нарушений у больных ХГС, поможет не только установить особенности иммунопатогенеза ХГС, но и позволит оптимизировать действующие стандарты лечения и разработать новые методы иммунотерапии и вакцинопрофилактики этого заболевания.

Ключевая роль в развитии и регуляции иммунного ответа нашего организма на чужеродный агент принадлежит антигенпрезентирующему клеткам (АПК). Дендритные клетки (ДК) являются наиболее профессиональными АПК, от функциональной активности которых зависит характер течения и исход инфекционного заболевания [Hart, 1997]. Главной функцией ДК является обеспечение взаимосвязи факторов врожденного и приобретенного иммунитета. При проникновении чужеродного агента в организм ДК одними из первых распознают патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMP) и молекулярные продукты повреждения собственных клеток организма (DAMP), что способствует формированию специфического фенотипа зрелых ДК и предопределяет дальнейшее развитие иммунного ответа [Medzhitov, 2002]. Для возбудителей инфекционных заболеваний, в первую очередь вирусов, ДК представляют собой привлекательную мишень. Известно, что вирусы гепатитов способны инфицировать ДК человека [Tsubouchi, 2004], тем самым вмешиваясь в процесс их дифференцировки и созревания [Takaki, 2010; Stranska, 2012]. В этой связи изучение функциональной активности ДК у больных ХГС является необходимым для более глубокого понимания иммунопатогенетических механизмов формирования и прогрессирования заболевания.

В зарубежной и отечественной литературе имеются единичные работы, посвященные оценке показателей функциональной активности ДК у больных ХВГ. Данные, полученные разными авторами, весьма противоречивы. Так в большинстве публикаций приводятся убедительные доказательства снижения функциональной активности ДК у больных ХГС, что по мнению авторов может способствовать длительной персистенции ВГС [Takaki, 2010; Stranska, 2012;

Murakami, 2004; Averill, 2007; Леплина, 2009; Szabo, 2005; Ryan, 2011]. Однако некоторые исследователи, напротив, утверждают об отсутствии существенных различий в показателях функциональной активности ДК у больных ХГС и здоровых добровольцев [Velazquez, 2012; Longman, 2005]. Наиболее информативным и точным методом оценки функциональной активности ДК является изучение их фенотипа по уровню экспрессии на поверхности клеток те или иных функциональных молекул. В большинстве отечественных и зарубежных исследований оценка показателей функциональной активности ДК ограничивается изучением уровня экспрессии лишь нескольких наиболее изученных клеточных маркеров, таких как CD80, CD86, CD83 и CD40. Однако спектр известных на сегодняшний день функциональных молекул на поверхности ДК гораздо шире и включает в себя молекулы главного комплекса гистосовместимости (МНС) 1 и 2 классов, хемокиновые рецепторы, ко-стимуляторные и ко-ингибирующие молекулы. Межклеточные взаимодействия ДК с другими иммунокомпетентными клетками являются сложными и многокомпонентными молекулярными взаимодействиями, позволяющими тонко регулировать высокоспецифические иммунные реакции. В этой связи изучения набора клеточных маркеров является необходимыми для более полной характеристики функциональной активности ДК у больных ХГС, а, следовательно, и для понимания патогенетических механизмов формирования иммунного ответа при этой инфекции.

### **Цель исследования**

На основании оценки функциональной активности дендритных клеток определить степень выраженности иммунологических нарушений у больных клинически различными формами ХГС и наметить возможные методы коррекции.

### **Задачи исследования:**

1. Дать оценку характера клинического течения заболевания у больных ХГС, включенных в исследование, с учетом активности патологического процесса и стадии фиброза печени.
2. Оценить способность дендритных клеток, выделенных от больных ХГС, к

презентации антигенных эпитопов в составе молекул главного комплекса гистосовместимости 1 и 2 классов, к миграции в очаг воспаления, а также к передаче ко-стимуляторных и ко-ингибирующих молекулярных сигналов.

3. У больных ХГС выявить наличие статистически значимых связей между основными клинико-bioхимическими параметрами и показателями функциональной активности дендритных клеток.

4. У больных ХГС определить возможность использования интерферона гамма в качестве молекулярного агента, индуцирующего созревание и нормализующего функциональную активность дендритных клеток.

### **Научная новизна**

Впервые изучен широкий спектр показателей функциональной активности дендритных клеток у больных различными вариантами течения ХГС. Впервые выявлены фенотипические и функциональные особенности как незрелых, так и зрелых дендритных клеток, полученных из моноцитов периферической крови больных ХГС. Определены уровни экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости 1 и 2 классов, хемокинового рецептора CD195, ко-стимуляторных молекул CD40, CD70, CD252 (OX40-L) и ко-ингибирующих молекул CD274 (PD-L1 / B7-H1), CD273 (PD-L2 / B7-DC). Впервые представлены данные о наличии достоверной корреляционной связи между уровнем экспрессии CD40 на поверхности зрелых дендритных клеток и уровнем вирусной нагрузки. Установлена корреляционная зависимость между процентным содержанием CD80+, CD40+, CD273+ и CD274+ зрелых дендритных клеток, полученных из моноцитов периферической крови больных ХГС, и уровнем амилазы. Выявлена корреляционная связь между уровнем экспрессии CD274 на поверхности зрелых дендритных клеток и уровнем тромбоцитов сыворотки крови больных ХГС. Впервые приведены данные о важной роли интерферона гамма в регуляции дифференцировки и созревания ДК у больных ХГС.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Теоретическая значимость выполненного исследования заключается в том, что установлены новые молекулярно-иммунологические механизмы

формирования иммунной толерантности, способствующей длительной персистенции ВГС. Показано, что зрелые дендритные клетки, полученные из моноцитов периферической крови больных ХГС, характеризуются сниженной способностью к миграции из очага воспаления в регионарные лимфатические узлы, что препятствует формированию эффективного Т-клеточного иммунного ответа. Можно предположить, что длительное пребывание дендритных клеток в ткани печени является фактором развития хронической воспалительной реакции с последующим формированием фиброза печени. Установлено, что дендритные клетки у больных ХГС характеризуются высокой способностью к поляризации иммунного ответа по Th 2 типу и ингибированию активации и пролиферации Т-лимфоцитов, что способствует длительной персистенции ВГС в организме человека. Работа имеет большое практическое значение. Продемонстрирована потенциальная эффективность включения препаратов на основе рекомбинантного интерферона гамма в схемы лечения больных ХГС. Обоснована целесообразность применения активированных аутологичных дендритных клеток в качестве иммунокорригирующих агентов для лечения больных ХГС. Фенотипическая характеристика дендритных клеток может быть использована в качестве нового метода прогнозирования эффективности противовирусной терапии больных ХГС.

### **Методология и методы исследования**

Для достижения цели диссертационного исследования использовались общенаучные и специальные методы научного познания. В качестве эмпирических методов исследования использовались общепринятые в клинической практике методы: устный опрос / беседа (сбор жалоб и данных анамнеза), физикальный осмотр (пальпация, перкуссия, аускультация), клинико-лабораторное и инструментальное обследование. Методологической основой для оценки функциональной активности ДК, полученных из моноцитов периферической крови человека, стали научные труды отечественных и зарубежных авторов [Sallusto, 1994; Romani, 1994; Thomas, 1994; Sozzani, 1997; Bamchereau, 1998; Thurner, 1999; Ito, 1999; Medzhitov, 2002]. В качестве теоретических методов научного исследования использовались такие методы как

сравнение, анализ, обобщение и формализация полученных данных.

### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Клиническая картина заболевания у больных, включенных в исследование, соответствует общепринятым представлениям о характере течения патологического процесса при ХГС. Степень выраженности холестаза у больных ХГС находится в прямой корреляционной зависимости от уровня сывороточного железа, а показатели свертывающей системы крови находятся в обратной корреляционной зависимости от стадии фиброза печени.
2. Нарушение функциональной активности дендритных клеток у больных ХГС является одним из факторов развития дисбаланса иммунного ответа с поляризацией по Th 2 типу, что в конечном итоге приводит к длительной персистенции вируса, а также к прогрессированию фиброза печени и развитию аутоиммунных реакций. У больных ХГС с начальной стадией фиброза печени и высоким уровнем виремии имеют место более выраженные нарушения функциональной активности дендритных клеток.
3. Интерферон гамма является важным иммунокорригирующим агентом необходимым для нормализации функциональной активности дендритных клеток у больных ХГС. В присутствии интерферона гамма (*ex vivo*) ускоряется процесс дифференцировки и созревания, а также снижается ко-ингибирующая активность дендритных клеток, полученных от больных ХГС.

### **Личный вклад автора**

В рамках данной работы лично автором проведены: анализ данных литературы по теме диссертации, подбор и курация больных ХГС и здоровых добровольцев, участвующих в исследовании, статистический анализ полученных данных, написание и оформление диссертации. Автор совместно с сотрудниками лаборатории клеточных культур и клинико-диагностической лаборатории ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России осуществлял выделение ДК из моноцитов периферической крови с определением показателей их функциональной активности, что нашло отражение в совместных публикациях.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность и обоснованность результатов и выводов исследования подтверждается применением комплекса методов теоретического и эмпирического исследования, адекватных поставленным целям и задачам, а также репрезентативностью выборки и использованием общепринятых статистических методов обработки и анализа полученных данных.

Результаты работы были представлены на научно-практических конференциях международного, российского и регионального уровня: научно-практическая конференция – биеннале «Грипп: вирусология, эпидемиология, профилактика и лечение» (Санкт-Петербург, 2014), VI Ежегодный Всероссийский Конгресс по инфекционным болезням (Москва, 2015).

По теме диссертации опубликовано 5 научных работ в журналах, рекомендованных перечнем Минобрнауки РФ.

### **Объем и структура диссертационной работы**

Диссертационная работа изложена на 140 страницах машинописного текста и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты собственного исследования, заключение, выводы, рекомендации для внедрения в медицинскую науку и практику, список сокращений и условных обозначений и список литературы, включающий 233 источника, из них 42 отечественных и 191 зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 18 таблицами и 33 рисунками.

## **Глава 1. Современные представления о роли дендритных клеток в патогенезе хронического гепатита С (обзор литературы)**

### **1.1 Клиническая эпидемиология хронического гепатита С**

Сегодня в мире ВГС инфицировано около 170-200 миллионов человек, что составляет более 3% населения Земли [Chen, 2006; Ющук, 2010; Малеев, 2010]. В Российской Федерации (РФ) официальная регистрация ОГС началась в 1994 г. [Пацук, 2010], а уже к 2012 г., согласно оценкам ФБУН Центрального НИИ эпидемиологии, было зарегистрировано около 5 миллионов инфицированных ВГС. По тем же оценкам, реальные показатели годовой заболеваемости гепатитом С в России могут достигать 90 на 100 000 человек [Пименов и др., 2012; Нагоев, 2010]. Распространенность ХГС в РФ можно определить на основании данных выборочных исследований. Так по результатам обследования на маркеры хронических вирусных инфекций, проведенного в рамках приоритетного национального проекта «Здоровье», среди 16,3 миллионов человек 3,6% оказались инфицированными ВГС [Алексеева, 2010]. По данным Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека в 2014 г. более 77% всех впервые зарегистрированных в России случаев заболевания ХВГ пришлось именно на ХГС. Несмотря на существенное снижение заболеваемости ОГС, в последние годы в РФ продолжает отмечаться тенденция к росту заболеваемости впервые выявленным ХГС. Так в 2014 г. показатель заболеваемости ХГС составил 39,38 на 100 тыс. населения, в то время как в 2005 г. - лишь 31,8 на 100 тыс. населения [О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2014 году: Государственный доклад, 2015].

Известно, что ВГС имеет 6 генотипов и большое число подтипов. На территории РФ и Дальнего Востока преобладают 1b и 3a генотипы вируса [Поздеева, 2010]. По данным Центрального НИИ эпидемиологии

Роспотребнадзора на территории РФ циркулируют 1а (2,1%), 1б (52,8%), 2 (8,1%) и 3а (36,3%) подтипы ВГС [Пименов и др, 2012].

Больные ХГС входят в группу риска развития таких угрожающих жизни осложнений, как ЦП и ГЦК [Chen, 2006]. Ежегодно от ЦП различной этиологии умирает более 300 тыс. человек и наблюдается рост заболеваемости ГЦК [Арямкина, 2006; Ющук, 2012; Ивашкин, 2009]. Известно, что 3-х, 5-и и 10-и летняя выживаемость больных ХГС с компенсированным ЦП составляет 96%, 91% и 79%, соответственно, а 5-и летняя выживаемость больных ХГС с впервые выявленным декомпенсированным ЦП составляет 50% [Fattovich, 1997]. Высокий риск наступления смерти у больных ХГС с ЦП, ассоциирован с более старшим возрастом, наличием варикозного расширения вен пищевода, низким уровнем тромбоцитов и альбумина в крови. Развитие ГЦК у больных ХГС ассоциировано со старшим возрастом, мужским полом, наличием варикозного расширения вен пищевода, снижением уровня тромбоцитов и высоким уровнем общего билирубина в крови [Degos, 2000].

Клинические проявления ХГС часто наблюдаются только на поздних стадия заболевания, в то время как при отсутствии жалоб и изменений уровней «печеночных проб» случайное обнаружение антител к белкам ВГС является самым распространенным способом диагностики болезни [Богомолов, 2012; Громова, 2011; Ющук, 2010; Краснова, 2013]. Степень выраженности фиброза печени у больных ХГС часто коррелирует с активностью воспалительных изменений в печени [Алексеенко, 2010; Сафиуллина, 2004; Das, 2008], однако установить степень активности гепатита С только по уровням аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ) не всегда удается [Громова, 2011]. По мнению некоторых авторов зависимостей между уровнем вирусной нагрузки, степенью фиброза печени и уровнями АЛТ и АСТ не прослеживается [Нагоев, 2009; Щекотова, 2012; Краснова, 2013].

Подходы к лечению ХГС за последние 15 лет существенно изменились. В 1998 г. Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных препаратов США (FDA) впервые одобрило комбинированную терапию больных

ХГС интерфероном а-2б и рибавирином. Эта схема стала стандартом лечения пациентов данной категории на многие последующие годы. Устойчивый вирусологический ответ (УВО) при применении данной схемы лечения достигался в 38-43% случаев, с существенной разницей в результатах, обусловленной генотипом: 66% — при генотипах 2-3, 29% — при генотипе 1 [Keeffe, 2003]. В 2001-2002 гг. на фармакологическом рынке появились две новые формы пегилированного интерферона: пегилированный интерферон а-2b (торговое название ПегИнtron) от «Шеринг-Плау» («Schering-Plough») и пегилированный интерферон а-2а (торговое название «Пегасис») от Рош («Roche»). Использование пегилированных форм интерферона в комбинированной терапии больных ХГС стало новым «золотым стандартом» лечения и позволило не только сократить число инъекций интерферона до одного раза в неделю, но и существенно повысить эффективность терапии по УВО до 42-51% при генотипах 1 и 4 и 78%-88% при генотипах 2 и 3 [Manns, 2001; Fried, 2002; Hadziyannis, 2002]. Предикторами эффективности стандартного лечения больных ХГС являются генотип вируса и уровень вирусной нагрузки [Manns, 2001; Fried, 2002; Hadziyannis, 2002], генетический полиморфизм IL28B и стадия фиброза печени. Также немаловажное значение имеют пол и вес пациента, наличие резистентности к инсулину и сочетанной инфекции (хронический гепатит В (ХГВ), ВИЧ-инфекция), уровень АЛТ и гамма-глутамилтранпептидазы (ГГТП) [Manns 2006; European Association for the Study of the Liver 2011].

В 2011 году FDA одобрила применение сразу двух новых противовирусных препаратов для лечения ХГС: боцпревир и телапревир (торговое название Incivek, ИНСИВО). В конце 2012 года в России для лечения больных ХГС, инфицированных 1 генотипом вируса, был зарегистрирован препарат телапревир (ИНСИВО). Новая схема лечения подразумевала под собой тройную терапию пегилированными интерферонами и рибавирином с добавлением в первые 12 недель лечения препарата из класса ингибиторов протеазы. [Ющук, 2013; Ивашкин, 2012; Игнатова, 2012]. В 2013-2014 гг. в России для лечения больных ХГС были зарегистрированы еще два новых противовирусных препарата:

отечественный пегилированный интерферон - цепэгинтерферон альфа2б (Альгерона) и ингибитор протеазы второй волны - симепревир (Совриад) [Ивашкин, 2014; Маевская, 2014]. Включение в схему лечения больных ХГС, инфицированных 1 генотипом вируса, симепревира позволило повысить частоту достижения УВО до 80,4% для наивных пациентов, 79,2 - 85% - для пациентов с предшествующим рецидивом, 75% - для пациентов с предшествующим частичным ответом и 51% - при отсутствии какого-либо ответа в процессе предшествующего лечения [EASL Clinical Practice Guidelines: Recommendations on treatment of hepatitis C, 2015]. Современные схемы лечения больных ХГС также включают в себя ингибиторы РНК-полимеразы (софосбувир и дасабувир), пангенотипический ингибитор комплекса репликации NS5A (даклатаасвир), ингибиторы NS5A (ледипасвир, омбитасвир), NS3/4А ингибитор протеазы (paritaprevir) и CYP3A игибитор (ritonavir) [EASL Clinical Practice Guidelines: Recommendations on treatment of hepatitis C, 2015]. Особое внимание уделяется разработке таблетированных и безинтерфероновых схем терапии ХГС, что позволит сделать современный курс противовирусной терапии (ПВТ) максимально удобным, эффективным и безопасным для больного.

## **1.2 Иммунопатогенез хронического гепатита С**

При вирусном гепатите С имеет место высокий уровень взаимоадаптации вируса и организма хозяина, обуславливающий неизбежность персистенции за счет иммуноопосредованных механизмов [Иванова, 2009; Ивашкин, 2009; Скляр, 2006]. Течение и исходы заболевания определяются эффективностью иммунного ответа, обусловленного иммуно-генетическими особенностями макроорганизма [Лобзин, 2006; Малый, 2012; Понежева, 2010; Алексеенко, 2010]. Иммунная система играет ключевую роль в патогенезе различных инфекционных заболеваний и их осложнений, в том числе ХГС с формированием фиброза печени

[Павлов, 2010; Фрейдлин, 2011; Понежева, 2010; Шмелева, 2009]. Активация факторов иммунного ответа с последующей элиминацией инфекционного агента сопровождается повреждением собственных тканей макроорганизма [Жебрун, 2011; Малеев, 2010]. Так апоптоз клеток, инфицированных ВГС, может быть вызван как прямым цитопатическим действием вируса, так и иммуноопосредованными механизмами [Фрейдлин, 2011; Хайтов, 2010].

Для объяснения иммунопатогенетических механизмов формирования персистенции ВГС в зарубежной и отечественной литературе часто рассматриваются концепции «регуляции», «истощения» и иммунного «ускользания» [Klenerman, 2008; Ивашкин, 2009; Ющук, 2012]. ВГС - это гепатотропный вирус, принадлежащий к семейству Flaviviridae. Геном ВГС представляет собой (+)-цепь РНК длиной около 9600 нуклеотидов [Fukushi, 1994]. Как структурные, так и неструктурные белки ВГС: Сор, Е1, Е2, р7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B – являются ключевыми молекулярными факторами патогенеза заболевания, позволяющими вирусу оставаться незамеченным после проникновения в макроорганизм, осуществлять эффективную репликацию РНК, сборку новых вирусных частиц и подавлять высокоспецифические защитные реакции клеточного и гуморального иммунитета. Задачами, которые стоят перед иммунной системой человека на раннем этапе инфекции, являются: во-первых, распознавание PAMP и DAMP, как сигналов опасности, во-вторых, ограничение очага инфекции и массивного распространения возбудителя и, наконец, в-третьих, запуск и регуляция высокоспецифичных механизмов иммунного ответа. Несмотря на быструю активацию факторов врожденного иммунитета в течение нескольких суток после инфицирования происходит распространение ВГС и повышение его сывороточной концентрации [Wieland, 2005]. Концепция «регуляции» основана на экспериментальных данных, свидетельствующих о наличии механизмов тонкой регуляции ВГС факторов иммунной защиты человека. В основе иммунопатогенеза гепатита С на ранних этапах болезни лежит способность белков ВГС к нарушению механизмов неспецифического иммунного ответа [Saito, 2008]. Вирус может оставаться незамеченным за счет ингибирующего действия продукта

неструктурного гена NS3/4A на сигнальные пути от рецепторов, распознающих PAMP: Toll-подобный рецептор (TLR) типа 3 и RIG-подобный рецептор (RLR) типа 1 (RIG-1). Через взаимодействие Сор и NS3 белков ВГС с TLR-2 возможна «маскировка» вируса под инфекционный агент совершенно иного вида (бактерия или паразит) с последующим запуском иммунного ответа по Th2 типу [Szabo, 2005]. ВГС успешно противостоит системе интерферона за счет подавления продукции интерферонов в инфицированной клетке, а также за счет ингибирования Сор белком сигнального каскада JAK-STAT, передающего молекулярный сигнал от рецептора интерферона на поверхности клетки в клеточное ядро и необходимого для активации экспрессии интерферон регулируемых генов. Сор белок ВГС ингибирует димеризацию и фосфорилирование регуляторного фактора интерферонов (IRF) типа 3, что сопровождает снижением уровня экспрессии генов, кодирующих интерферон бета (IFN- $\beta$ ) [Kohara, 2012]. Кроме того известно, что белки NS5A и E2 способны напрямую ингибировать протеинкиназу R и 2'-5' олигоаденилатсинтетазу [Taylor, 1999; Saito, 2008]. Клеточные факторы врожденного иммунного ответа также являются патогенетической мишенью для ВГС. Интересно, что в течение первых 4-6 недель у шимпанзе, инфицированных ВГС, не наблюдается существенных воспалительных изменений в ткани печени, в то время как идет интенсивная репликация вируса и быстро растет уровень вирусной нагрузки [Major, 1999; Shimizu, 1990]. Эти данные свидетельствуют не столько о слабом цитолитическом действии вируса, сколько о сниженной функциональной активности клеток врожденного иммунитета. В экспериментах *in vitro* показано, что взаимодействие E2 белка ВГС с CD81 на поверхности натуральный киллеров (NK-клетка) приводит к снижению их функциональной активности, пролиферации и продукции цитокинов [Crotta, 2002; Tseng, 2002]. Установлено, что экспрессия Сор белка ВГС в NK-клетках линии YTS сопровождается увеличением доли клеток, вступивших в апоптоз. Выжившие NK-клетки характеризуются сниженной цитотоксической активностью за счет снижения экспрессии перфорина и гранзима B. Кроме того NK-клетки, экспрессирующие Сор белок ВГС, продуцируют

меньшее количество интерферона гамма (IFN- $\gamma$ ) [Dominguez-Villar, 2012]. Нарушения функциональной активности ДК обеспечивает не только сохранность и массивное распространение вируса, но и подавление высокоспецифических иммунных реакций, а, следовательно, и длительную персистенцию вируса. Роль ДК в регуляции иммунного ответа при вирусной инфекции, а также известные нарушения функциональной активности ДК у больных ХГС подробно обсуждаются в разделах 1.4 и 1.5.

Запуск защитных механизмов адаптивного иммунного ответа (клеточного и гуморального) является необходимым условием для сдерживания вирусной инфекции и полной элиминации вируса из организма [Bertoletti, 2003]. Однако при развитии инфекции, вызванной ВГС, у большинства больных наблюдается ярко выраженный дисбаланс механизмов адаптивной иммунной защиты, что проявляется подавлением дифференцировки и созревания антигенспецифических CD4+ и CD8+ лимфоцитов с преобладанием Т-клеточного иммунного ответа по Th2 типу [Kalams, 1998; Ciurea, 2001; Wieland, 2005]. Интересно, что преобладание Т-клеточного иммунного ответа по Th 1 типу у больных ОГС ассоциировано с более выраженным воспалительным ответом и благоприятным исходом заболевания, в то время как преобладание Т-клеточного иммунного ответа по Th 2 типу, напротив, ассоциировано с более низкой активностью воспаления в печени и формированием вирусной персистенции [Missale, 1996]. Кроме того установлено, что индукция антигенспецифических Т-лимфоцитов происходит спустя продолжительный период времени после инфицирования ВГС. Кроме того антигенспецифические CD8-клетки с момента их выявления характеризуются снижением эффекторных функций, что проявляется в недостаточной продукции IFN- $\gamma$  и IL-2 [Wieland, 2005]. В исследованиях *in vitro* показано, что Т-лимфоциты, трансдуцированные Cor белком ВГС, характеризуются низкой пролиферативной активностью [Dominguez-Villar, 2007], высоким уровнем экспрессии forkhead box P3 / scurfin (FOXP3) и cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 / CD152 (CTLA-4) [Dominguez-Villar, 2012]. Мембранные белки запрограммированной клеточной смерти (PD-1) (Programmed

cell death-1 / CD279) и SOCS-1 (Suppressor of cytokine signaling-1) участвуют в регуляции активации и пролиферации Т-лимфоцитов и могут играть ключевую роль в подавлении антигенспецифического Т-клеточного иммунного ответа в патогенезе ХГС. In vitro в культуре Т-лимфоцитов, полученных от здоровых доноров, экспрессия PD-1 и SOCS-1 существенно повышается под действием Сор белка ВГС. Кроме того, Т-лимфоциты, полученные от больных ХГС, также характеризуются высоким уровнем экспрессии PD-1 и SOCS-1, причем ингибирование PD-1 сигнального пути сопровождается снижением уровня экспрессии SOCS-1. Регуляция уровня экспрессии PD-1 и SOCS-1 в патогенезе ХГС может осуществляться путем взаимодействия Сор белка ВГС с рецептором комплемента gC1qR на поверхности Т-лимфоцита [Frazier, 2010; Nakamoto, 2008].

Концепция «истощения» основана на данных, свидетельствующих о нарушении функциональной активности как клеточных, так и гуморальных факторов адаптивного иммунного ответа. Главными причинами иммунного «истощения» у больных ХГС являются прямое ингибирующее действие белков ВГС на Т-лимфоцитов, гиперактивность регуляторных Т-клеток и высокая мутационная активностью ВГС [Ивашкин, 2009]. «Ускользание» ВГС от клеточного или гуморального иммунного ответа хозяина происходит за счет быстрого изменения антигенной структуры с формированием множества антигенных вариантов - «quasi-species» [Малеев, 2010, Тихонова, 2011]. Длительной персистенции ВГС также может способствовать наличие внепеченочных резервуаров инфекции, в которых происходит репликация вируса и реализация его патогенных свойств [Игнатьева, 2005; Крель, 2009; Байкова, 2013].

Таким образом, ключевыми этапами иммунопатогенеза ХГС являются: 1) скрытое проникновение и массивное распространение ВГС за счет преодоления защитных механизмов врожденного иммунитета; 2) формирование хронизации инфекционного процесса с длительной персистенцией вируса за счет подавления факторов высокоспецифического иммунного ответа и антигенного «ускользания». В этой связи процессы, обеспечивающие связь факторов врожденного и

приобретенного иммунных ответов, заслуживают особого внимания, а изучение функциональной активности ДК у больных ХГС является необходимым условием для более глубокого понимания иммунопатогенетических механизмов формирования и прогрессирования заболевания.

### **1.3 Общая характеристика дендритных клеток человека**

ДК впервые были описаны Паулем Лангергансом в 1868 году как особая популяция отростчатых клеток кожи человека [Langerhans, 1868]. Спустя столетие в 1973 году Штайнман и Кон обнаружили клетки с характерной морфологией в селезенке мыши и впервые применили термин «дендритная клетка» [Steinman, 1973]. В последующем были получены первые доказательства того, что именно ДК играют важнейшую роль в реакциях отторжения трансплантата и в регуляции механизмов как врожденного, так и приобретенного иммунных ответов.

ДК человека являются лейкоцитами и имеют костномозговое происхождение из общей гемопоэтической стволовой клетки [Katz, 1979]. На различных стадиях дифференцировки и созревания характерные фенотипы ДК могут быть обнаружены: в периферической крови (менее 1% мононуклеарных клеток периферической крови), в эпидермисе (клетки Лангерганса), в дерме (дермальные ДК), в большинстве внутренних органов, например, в интерстициальной ткани печени, почек, сердца (интерстициальные ДК), в слизистых оболочках, выстилающих ротовую полость, кишечный тракт и дыхательные пути, в лимфоидной ткани периферических лимфатических узлов, селезенки, вилочковой железы [Katsuaki, 2007]. Фенотипическая гетерогенность популяции ДК человека ассоциирована с множеством физиологических и патофизиологических процессов, в которых принимают участие эти клетки. Функциональные способности той или иной субпопуляции ДК напрямую зависят от того, в каких условиях и под действием каких сигналов микроокружения

происходило развитие этой субпопуляции, ее дифференцировка и созревание. Выделяют как минимум три субпопуляции ДК, имеющих различные фенотипы и функциональные особенности [Katsuaki, 2007; O'Doherty, 1994; Takamizawa, 1997; Thomas, 1994; Siegal, 1999; Cella, 1999; Rissoan, 1999; Dzionek, 2000; Narbutt, 2004].

Миелоидные ДК имеют миелоидное происхождение и типичную клеточную морфологию с многочисленными, вуалеподобными цитоплазматическими выступами. В диаметре эти клетки достигают 15-20 мкм, в цитоплазме содержат эндосомы и лизосомы, крупные митохондрии, сильно развитый аппарат Гольджи [Katsuaki, 2007]. Для клеток Лангерганса характерно присутствие в цитоплазме гранул Бирбека [Ito, 1999]. Миелоидные ДК экспрессируют на своей поверхности миелоидные маркеры CD13 и CD33 и являются «наиболее профессиональными» АПК организма. На своей поверхности эти клетки несут интегрин альфа-X (CD11c), большое количество молекул межклеточной адгезии (CD54 / ICAM-1), молекулы главного комплекса гистосовместимости 1 и 2 классов (MHC-1, MHC-2), ко-стимуляторные (CD80, CD86, CD40, CD70, CD252 / OX40L) и ко-ингибирующие молекулы (CD273, CD274) [Robinson, 1999; Thomas, 1994;], Fc рецепторы (Fc $\gamma$ R1 / CD64, Fc $\gamma$ RIIb / CD32) [Fanger, 1997; Grouard, 1997] и хемокиновые рецепторы (CXCR4, CCR1, CCR5, CCR7, PAF receptor) [Sozzani, 1997]. В арсенале ДК имеется полный набор рецепторов для связывания PAMP: Nod-like рецепторы (NLR), RIG-like рецепторы (RLR), Toll-like рецепторы (TLR 1-6 / CD281-286 и TLR8 / CD288) [Jartossay, 2001], рецепторы лектинов С-типа, макрофагальный маннозосвязывающий рецептор (MMR: CD206), DEC-205 / CD205, DC-SIGN / CD209), dectin-1 [Ebner, 2004]. Предшественником миелоидной ДК при соответствующих условиях *in vitro* может стать как CD34+ гемопоэтическая стволовая клетка, выделенная из периферической крови, пуповиной крови или вещества костного мозга [Caux, 1992; Reid, 1992; Santiago-Schwarz, 1992], так и моноцит периферической крови [Sallusto, 1994; Romani, 1994; Thurner, 1999].

Плазмациоидные ДК в свою очередь имеют лимфоидное происхождение и

по своей морфологии очень похожи на секреторные лимфоциты и плазматические клетки. Эту субпопуляцию ДК часто еще называют «натуральными продуцентами интерферона» за их уникальную способность к секреции большого количества интерферонов первого типа в ответ на присутствие в среде вирусов [Liu, 2005; Barchet, 2005; Reizis, 2011]. Фенотипически плазматоидные ДК характеризуются отсутствием экспрессии миелоидных маркеров CD13, CD33 и CD11c. В свою очередь на клеточной поверхности они содержат BDCA-2 / CD303, BDCA-4 / CD304, CD45RA и большое количество рецепторов к IL-3 (CD123) [Takamizawa, 1997; Thomas, 1994; Robinson, 1999; Dzionaek, 2000; Narbutt, 2004]. В отличие от миелоидных ДК, плазматоидные ДК характеризуются низким уровнем экспрессии рецепторов Fc $\gamma$ RIIb / CD32 и практически неопределенным уровнем экспрессии Fc $\gamma$ R1 / CD64. Из всех известных субпопуляций ДК только плазматоидные ДК содержат внутриклеточные TLR 7 и 9 типа [Jarrossay, 2001]. In vitro плазматоидные ДК могут быть получены из CD34+ гемопоэтических стволовых клеток под действием fms-like tyrosine kinase 3 ligand (Flt3-L) в сочетании с тромбопоэтином [Maraskovsky, 2000; Blom, 2000].

Фолликулярные ДК имеют мезенхимальное происхождение и составляют основу первичных и вторичных лимфоидных фолликулов [Liu, 1996]. Главной функцией фолликулярных ДК является организация герминативных центров, в которых происходит стимуляция роста и дифференцировки активированных В-лимфоцитов [Liu, 1996; van Nierop, 2002]. Продукция фолликулярными ДК больших количеств хемокина CXCL13 способствует привлечению в герминативные центры активированных В-лимфоцитов. Фактор Mfge8, производимый в лимфатической ткани преимущественно фолликулярными ДК ускоряет поглощение апоптотических телец макрофагами [Kranich, 2008]. Фенотипически фолликулярные ДК характеризуются наличием на их поверхности большого количества молекул межклеточной адгезии (CD54 / ICAM-1 и VCAM), рецепторов комплемента (CR1 / CD35, CR2 / CD21), Fc $\gamma$ RIIb / CD32 [Liu, 1996; van Nierop, 2002; Aguzzi, 2010]. Фолликулярные ДК не несут на своей поверхности молекулы гистосовместимости тканей 2 класса и практически не

содержат рецепторов для связывания РАМР. Эти клетки не способны самостоятельно распознавать и презентовать антиген, до тех пор, пока он не опсонизирован антителами или молекулами комплемента.

Жизненный цикл ДК сопровождается изменением их фенотипа и функциональной активности под действием сигналов микроокружения. Ввиду своего биологического разнообразия, очевидно, что далеко не все субпопуляции ДК проходят свой жизненный цикл как АПК, участвующие в развитии иммунного ответа при каком-либо инфекционном заболевании. Так, например, известно, что в лимфатических узлах (около 50%) и в селезенке (почти 100%) можно обнаружить большое количество ДК фенотипически незрелых [Villadangos, 2005], которые, по-видимому, представляют собой резидентные клетки лимфоидных органов и выполняют ряд важных функций: контроль отсутствия патогенов в крови, установление периферической толерантности и также презентация антигенов.

#### **1.4 Роль дендритных клеток в регуляции иммунного ответа при вирусной инфекции**

ДК являются наиболее профессиональными АПК, от функциональной активности которых зависит характер течения и исход инфекционного заболевания [Hart, 1997]. Главной функцией ДК является обеспечение взаимосвязи факторов врожденного и приобретенного иммунитета. При проникновении чужеродного агента в организм ДК одними из первых распознают патоген-ассоциированные молекулярные паттерны и различные сигналы опасности, что способствует формированию специфического фенотипа зрелых ДК и предопределяет дальнейшее развитие иммунного ответа [Medzhitov, 2002]. Предшественники ДК мигрируют из периферической крови в нелимфоидные ткани в поисках чужеродных агентов. На своей поверхности, так называемые, незрелые ДК несут хемокиновый receptor CCR5, что обеспечивает миграцию

этих клеток в очаг воспаления, в ответ на формилированные пептиды (fMLP), липиды (тромбоцит активирующий фактор, PAF), продукты каскада комплемента (C5a) и ряд хемокинов: МР-1 $\alpha$ , МР-1 $\beta$ , МР-5, МР-3 и SDF-1 [Sozzani, 1995; Sozzani, 1997; Power, 1997; Godiska, 1997]. Важную роль в миграции клеток Лангерганса играет также остеопонтин, фосфопротеин паракортикальной Т-клеточной зоны лимфатических узлов, за счет взаимодействия с CD44 и интегрином на поверхности ДК [Weiss, 2001]. В периферических тканях незрелые ДК способны эффективно захватывать антигены посредством фагоцитоза и макропиноцитоза [Trombetta, 2005]. С помощью фагоцитоза ДК поглощают крупные частицы (более 1 мкм): микроорганизмы, апоптотические и некротические клетки. Фагоцитоз запускается после активации соответствующих рецепторов на поверхности и внутри ДК: 1) Fc $\gamma$ R1 и Fc $\gamma$ RIIb, связывающие иммунные комплексы или опсонизированные частицы [Jurgens, 1995]; 2) семейство лектинов С-типа (включая маннозный рецептор) [Jiang, 1995; Engering, 1997]; 3) рецепторы белков теплового шока CD91 [Basu, 2001]; 4) рецепторов для связывания PAMP, включая TLR [Blander, 2004]; 5) рецепторы комплемента CR3/CR4 [Reis e Sousa, 1993]. Клетки Лангерганса экспрессируют на своей поверхности также лектин С-типа - лангерин (CD207), который специфичен к маннозе, N-ацетилглюкозамину, фукозе и ряду гликопротеинов [Reis e Sousa, 1993]. Сигнальный каскад опосредуется Rho-семейством GTP-аз [Hall, 2000]. Макропиноцитоз, в отличие от фагоцитоза, протекает постоянно и позволяет ДК неспецифически захватывать большое количество окружающей жидкости, что сопровождается колебаниями цитоплазматической мембранны под действием ростовых факторов. Активация ДК запускает долговременную макропиноцитическую активность, позволяющую клеткам собирать большой объем внеклеточной жидкости и, таким образом, участвовать в иммунологическом надзоре. Как только ДК встречается с вероятным возбудителем, запускается процесс созревания, который сопровождается изменением ее фенотипа и функциональной активности: 1) происходит потеря адгезивных структур и реорганизация цитоскелета; 2) увеличивается мобильность ДК; 3) повышаются

уровни экспрессии ко-стимулирующих молекул и МНС 1-2 классов; 4) происходит смена хемокиновых рецепторов с CCR1 и CCR5 на CCR7; 5) ДК теряют способность к эндоцитозу. Созревание ДК *in vivo* является результатом: 1) контакта с PAMP [Medzhitov, 2002]; 2) контакта с провоспалительными цитокинами [Jonuleit, 1997]; 3) CD40/CD40L взаимодействия [Cella, 1996]; 4) активации сигнального пути от Fc-рецепторов [Regnault, 1999]; 5) контакта с компонентами разрушенных клеток [Sauter, 2000]: нуклеотидами [Guermonprez, 2002], белками теплового шока (gp96, Hsp90, Hsp70) [Singh-Jasuja, 2000]. Распознавание «молекулярных сигналов опасности» – ключевой этап в регуляции развития последующего адаптивного иммунного ответа. Можно сказать, что на этом этапе иммунная система получает первые сведения о типе возбудителя и масштабах разрушения, что позволяет «выбрать» тот или иной путь развития последующего специфического иммунного ответа [Medzhitov, 2007]. В отношении вирусов особого внимания заслуживают рецепторы PAMP, расположенные внутри клетки, такие как RLR (распознают чужеродные одноцепочечные и двухцепочечные РНК в цитоплазме клетки), TLR 3, 7, 8 и 9 (распознают нуклеиновые кислоты), а также цитозольные ДНК рецепторы [Kawai, 2009]. Получив сигнал к созреванию, все еще незрелые ДК, но уже имеющие на своей поверхности хемокиновый receptor CCR7, по афферентным лимфатическим путям или через кровь мигрируют в регионарные лимфатические узлы или селезенку, по направлению к хемокинам MIP-3 $\beta$ , CCL21/SLC и CCL19/ELC [Sozzani, 1998]. В процессе миграции происходит окончательное созревание ДК и формируется их способность представлять антигенные участки другим иммунокомпетентным клеткам. ДК способны к более «аккуратной» переработке крупных антигенных структур в короткие пептиды, и более эффективной их презентации в составе МНС как 1, так и 2 классов. Презентация коротких антигенных структур (8-1 аминокислот) в составе МНС 1 класса является ключевой в регулировании клеточного иммунного ответа, опосредованного активацией специфических цитотоксических Т-лимфоцитов. Как правило, источником антигенных структур для такого типа презентации служат белки,

синтезируемые непосредственно самой ДК. Это могут быть как дефектные рибосомные продукты и продукты альтернативной транскрипции, так и вирусные белки, находящиеся в цитозоле [Trombetta, 2005]. Процессингу подвергаются также и нативные белки, синтезируемые в ДК, после их посттранляционной модификации: N-гликозилированные и дезаминированные пептиды [Mosse, 1998], фосфопептиды [Zarling, 2000], пептиды с модифицированными цистеиновыми остатками [Chen, 1999] или пептиды, не подвергшиеся сворачиванию [Ostankovitch, 2005]. В литературе описаны два способа кросс-презентации экзогенных антигенов ДК в составе молекул МНС 1 класса: ТАР-зависимый путь «из фагосомы в цитозоль» [Kovacsovics-Bankowski, 1995] и ТАР-независимый путь, согласно которому антиген гидролизуется и взаимодействует с молекулой МНС 1 класса непосредственно в эндосомах [Pfeifer, 1993]. Презентация коротких антигенных структур (20-24 аминокислот) в составе МНС 2 класса является ключевой в активации наивных CD4+ Т-лимфоцитов и в их дальнейшей дифференцировке в Т-хелперы 1 или 2 типа, индуцирующие, клеточный или гуморальный иммунный ответ, соответственно. Источником антигенных структур для такого типа презентации служат экзогенные белки, захваченные ДК извне. Загрузка иммуногенных пептидов в МНС 2 класса происходит в поздних эндосомальных и лизосомальных компартментах лишь тогда, когда ДК получает сигнал к созреванию [Inaba, 2000]. Липидные и гликолипид-содержащие антигены микроорганизмов могут быть презентированы в составе молекул семейства CD1 (CD1a, b, c, d, e). Молекулы CD1a, b, c связываются с гликолипидами эндогенного и экзогенного происхождения и стимулируют CD8+ Т-лимфоциты [Matsuda, 2001]. Различные типы CD1 связаны с различными компонентами клетки. Так CD1a ассоциирован с ранними и рециркулирующими эндосомами, CD1b с лизосомами, а CD1c, вероятно, ассоциирован со всеми компартментами [Sugita, 1999; Sugita, 2000]. Связывание молекулы CD1d с синтетическими липидами и альфа-галактозил-церамидом сопровождается активацией, как Т-лимфоцитов, так и натуральных Т-лимфоцитов-киллеров (NKT-клетки) [Park, 2001].

Развитие адаптивного иммунного ответа (клеточного и гуморального)

возможно лишь после активации факторов врожденного иммунного ответа и прямого межклеточного взаимодействия АПК с другими иммунокомпетентными клетками. Результат такого взаимодействия будет зависеть от спектра молекул, осуществляющих контакт клеток, а также условий микроокружения. Среди ко-стимулирующих молекул на поверхности ДК в первую очередь стоит выделить B7-1 (CD80) и B7-2 (CD86), лигандом которых на поверхности лимфоцита является CD28, либо CTLA-4 (CD152). Если взаимодействие с CD28 рассматривается как стимулирующий сигнал, то взаимодействие с CTLA-4 носит ингибирующий характер. Взаимодействие CD40 и CD40L приводит к еще большему увеличению числа ко-стимулирующих молекул на поверхности ДК, а также к продукции ДК ряда цитокинов (IL-1, IL-12, TNF- $\alpha$ ) и хемокинов [Banchereau, 2000]. Кроме того известен целый ряд менее изученных ко-стимулирующих молекул, вероятно, необходимых для тонкой регуляции последующего Т-клеточного ответа. К ним относятся CD70 [Coquet, 2012], OX40-L (CD252) [Jenkins, 2007], 4-1BB-L [Lee, 2002], GITR-L [van der Werf, 2011], LIGHT (CD258) [Ware and Sedy, 2011], а также молекулы клеточной адгезии ICAM-1 (CD54), LFA-3 (CD58) [Scholer, 2008]. ДК, экспрессирующие OX40L, индуцируют дифференцировку наивных Т-хелперов в Т-хелперы, производящие IL-4, IL-5, IL-13, TNF- $\alpha$ , но не IL-10 [Ito, 2005].

Среди ко-ингибирующих молекул на поверхности ДК в первую очередь стоит выделить PD-L1/B7-H1 (CD274) и PD-L2/B7-DC (CD273), лигандом которых на поверхности лимфоцита является PD-1 (CD279) [Patsoukis, 2012; Lesterhuis, 2011; Zitvogel and Kroemer, 2012]. По всей видимости, ко-ингибирующие взаимодействия необходимы прежде всего для регуляции иммунологической толерантности, а также могут быть использованы вирусами, как возможный механизм избегания специфического иммунного ответа.

Известно, что зрелые ДК клетки могут вступать в межклеточные взаимодействия, как с Т-лимфоцитами, так и с В-лимфоцитами, NK-клетками, NKT-клетками. *In vitro* было показано, что ДК могут стимулировать также пролиферацию аллогенных CD8+ Т-лимфоцитов в отсутствие Т-хелперов

[Banchereau, 2000].

Для развития эффективного клеточного иммунного ответа при вирусной инфекции, ключевую роль играет межклеточное взаимодействие АПК с Т-лимфоцитами. Зрелые ДК обладают уникальной способностью активировать наивные Т-лимфоциты, что, вероятно, обусловлено наличием многочисленных поверхностных структур, вовлекаемых во взаимодействие. Для активации наивного Т-лимфоцита достаточно передачи трех основных сигналов: 1) взаимодействие Т-клеточного рецептора (TCR) с комплексом МНС-пептид на поверхности ДК; 2) взаимодействие ко-стимулирующих молекул с их лигандами на поверхности Т-лимфоцита в том числе и взаимодействие CD40/CD40L; 3) продукция ДК цитокинов (IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ ) и хемокинов [Banchereau, 2000; Guermonprez, 2002]. Поляризация иммунного ответа и баланс между Т-хелперами 1, 2, 17 типов и регуляторными Т-лимфоцитами зависит от: 1) уровней экспрессии комплекса МНС-пептид и различных ко-стимулирующих и ко-ингибирующих молекул на поверхности ДК; 2) цитокинового окружения, в том числе и спектра цитокинов, продуцируемых в данный момент непосредственно ДК [Pulendran, 1999; Liu, 2001; Schuhbauer, 2000]. В ряде работ показано участие ДК тимуса в негативной селекции тимоцитов [Anderson, 1998; Brocker, 1997; Gallegos, 2004; Millet, 2008]. Предполагается, что ДК, попавшие в тимус с периферии, могут участвовать во вторичной позитивной селекции Т-лимфоцитов и образовании регуляторных Т-лимфоцитов [Goldschneider, 2003]. ДК, человека, активированные стромальным лимфопоэтином тимуса (TSLP), способствуют дифференцировке тимоцитов CD4+ CD8- CD25- в фенотип CD4+ CD25+ Foxp3+ [Watanabe, 2005]. В экспериментах на мышной модели было продемонстрировано, что зрелые миелоидные ДК при взаимодействии с Т-лимфоцитами могут стимулировать как цитотоксические, так и регуляторные Т-лимфоциты [Tarbell, 2004]. При этом стоит отметить, что иммуносупрессорная активность регуляторных Т-лимфоцитов при культивировании их с ДК увеличивается в 10-100 раз [Lin, 2003]. В тоже время ДК в условиях подобной смешанной культуры даже в присутствии провоспалительных цитокинов не подвергаются полному созреванию и не

способны стимулировать наивные Т-лимфоциты [Fallarino, 2004]. Более того имеются сведения, подтверждающие тот факт, что регуляторные Т-лимфоциты могут изменить спектр продуцируемых дендритными клетками цитокинов, а также уровень экспрессии костимулирующих молекул на поверхности зрелых ДК [Lange, 2007].

Известно, что ДК могут играть важную роль в дифференцировке В-лимфоцитов. Так интердигитальные ДК в паракортикальных областях лимфатических узлов могут непосредственно взаимодействовать с CD40-активированными В-лимфоцитами и вызывать их пролиферацию [Bjorck, 1997; Dubois, 1999]. В ряде исследований большое внимание уделяется роли ДК клеток в переносе практически неизмененных антигенов или захваченных иммунных комплексов в лимфатические узлы для дальнейшего их контакта с рецепторами на поверхности В-клеток [Colino, 2002; Balazs, 2002; Bergtold, 2005].

Взаимодействие ДК с клетками врожденного иммунитета также является необходимым для полной элиминации вирусного агента. *In vitro* было показано, что непосредственное взаимодействие ДК и NK-клеток приводит к стимуляции активности последних и продукции ими IFN- $\gamma$  [Fernandez, 1999]. Причем ДК моноцитарного происхождение и интерстициальные ДК, полученные из CD34 предшественников, способны непосредственно стимулировать пролиферацию NK-клеток. Клеткам Лангерганса же для индукции пролиферации NK-клеток требуется присутствие экзогенных IL-2 или IL-12 [Münz, 2005]. В свою очередь активированные NK-клетки способны вызывать созревание как плазматоидных, так и миелоидных ДК [Gerosa, 2005].

NKT-клетки, экспрессируют на своей поверхности инвариантный Т-клеточный receptor, который может распознавать гликолипиды, презентированные в составе CD1d молекул на поверхности ДК [Fujii, 2007]. Причем для ответа необходимо взаимодействие CD40/CD40L и присутствие IL-12 [Fujii, 2007], что в совокупности с действием IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  вызывает созревание взаимодействующих с NKT-клетками ДК [Fujii, 2004]. Т-лимфоциты, несущие Т-клеточный receptor, состоящий из гамма и бета цепей, и активированные

аминобифосфонатами, при прямом клеточном взаимодействии также способствуют созреванию ДК [Conti, 2005; Leslie, 2002].

### **1.5 Функциональная активность дендритных клеток у больных хроническим гепатитом С**

ВГС инфицирует ДК человека, что сопровождается нарушением их дифференцировки и созревания [Tsubouchi, 2004; Pachiadakis, 2005]. Известно, что белки оболочки ВГС E1 и E2 способны к взаимодействию с рецепторами DC-SIGN и L-SIGN на поверхности ДК, что может способствовать проникновению вирусной частицы внутрь клетки или диссеминации вируса [Kaimori, 2004; Cormier, 2004; Lozach, 2003; Ludwig, 2004]. Кроме того в исследованиях *in vitro* установлено, что скавенджер-рецептор класса В типа I (SR-BI) играет ключевую роль в захвате вирусных частиц ДК с последующей кросс-презентацией антигенных структур вируса [Barth, 2008]. Доказано, что ДК, полученные из моноцитов периферической крови больных ХГС, могут быть инфицированы ВГС [Garcia, 2000; Bain, 2001; Navas, 2002]. Существуют убедительные данные, свидетельствующие о том, что ВГС внутри ДК способен к репликации [Navas, 2002; Goutagny, 2003; Pham, 2004; Rodrigue-Gervais, 2007; Pham, 2008]. В этой связи некоторыми отечественными и зарубежными авторами уделено заслуженное внимание изучению функциональной активности ДК у больных ХГС. Так в экспериментах *in vitro* показано, что введение в ДК человека методом трансфекции белков ВГС или вектора, кодирующего его гены, сопровождается нарушением способности ДК к полному созреванию под действием TNF- $\alpha$  или CD40L и снижению их аллостимуляторной активности в смешанных лейкоцитарных культурах [Sarobe, 2002; Sarobe, 2003]. Способность ДК к индукции пролиферации наивных Т-лимфоцитов является одним из наиболее часто используемых лабораторных методов оценки их функциональной

активности. Данные, полученные в большинстве подобных исследований, свидетельствуют о снижении аллостимуляторной активности ДК у больных ХГС [Bain, 2001; Rollier, 2003; Kanto, 2004; Леплина, 2009]. Однако в некоторых научных работах представлены данные, свидетельствующие об обратном, на основании которых авторы делают вывод об отсутствии существенных различий в показателях функциональной активности ДК у больных ХГС и у здоровых добровольцев [Velazquez, 2012; Longman, 2005].

Фенотипирование субпопуляций ДК человека методом проточной цитометрии является еще одним наиболее часто распространенным способом оценки функциональной активности клеток с возможностью более тонкой дифференцировки степени иммунологических нарушений. Так при количественной оценке субпопуляционного состава ДК периферической крови больных ХГС выявлено существенное снижение доли как плазматоидных, так и миелоидных ДК [Murakami, 2004; Ulzenheimer, 2005]. Установлено, что миелоидные ДК, выделенные из периферической крови больных ХГС, экспрессируют на своей поверхности меньшее количество молекул HLA-DR и CD86, CD80 чем ДК здоровых [Auffermann-Gretzinger, 2001; Averill, 2007; Zimmermann, 2008]. В экспериментах *in vitro* показано, что миелоидные ДК, подвергшиеся воздействию Сор белка ВГС, характеризуются низким уровнем экспрессии МНС 1 / 2 классов, ко-стимулирующих молекул CD80, CD86 и высоким уровнем экспрессии ко-ингибирующей молекулы CD274 [Zimmermann, 2008]. Зрелые ДК больных ХГС характеризуются низким уровнем экспрессии хемокинового рецептора CCR7, что свидетельствует о нарушенной способности этих клеток к миграции в регионарные лимфатические узлы [Ulzenheimer, 2005]. Кроме того в ряде исследований показано, что миелоидные ДК, полученные из периферической крови больных ХГС, характеризуются низкой продукцией IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-12p70 и высокой продукцией IL-10 [Kanto, 2004; Rodrigue-Gervais, 2007; Lynn, 2007; Леплина, 2009], а плазматоидные ДК — низким уровнем продукции IFN- $\alpha$  [Murakami, 2004; Ulzenheimer, 2005]. Отмечено, что исходно сниженная функциональная активность циркулирующих ДК у больных ХГС

восстанавливается после проведения противовирусной терапии, в частности, с использованием интерферона-альфа и рибавирина [Tsubouchi, 2004].

Особого внимания заслуживают исследования, направленные на изучение молекулярных механизмов нарушений функциональной активности ДК и роли структурных и неструктурных белков ВГС в этих процессах. Показано, что экзогенные белки вируса гепатита С через receptor комплемента снижают продукцию клеткой IL-12, а также взаимодействуют с TLR-2, повышая продукцию IL-10, и ингибируют дифференцировку ДК [Szabo, 2005]. Кроме того известно, что Cor белок вируса гепатита С блокирует действие интерферона за счет взаимодействия с SH2 доменом STAT1 [Lin, 2006], E2 белок может ингибировать интерферон-индуцируемую протеин киназу PKR [Taylor, 1999], а NS4 нарушает созревание ДК и снижает их способность к стимуляции антигенспецифических Т-лимфоцитов [Takaki, 2010]. Взаимодействие Cor белка ВГС с receptorом комплемента gC1qR на поверхности моноцитов или макрофагов сопровождается повышением уровня экспрессии PD-1 и SOCS-1, что в свою очередь приводит к снижению продукции IL-12 этими клетками за счет ингибирования Jak/STAT сигнальных путей [Zhang, 2011]. Мембранные белки PD-1 и SOCS-1 также участвуют в регуляции активации и пролиферации Т-лимфоцитов и могут играть ключевую роль в подавлении антигенспецифического Т-клеточного иммунного ответа в патогенезе ХГС. In vitro в культуре Т-лимфоцитов, полученных от здоровых доноров, экспрессия PD-1 и SOCS-1 существенно повышается под действием Cor белка ВГС. Кроме того, Т-лимфоциты, полученные от больных ХГС, также характеризуются высоким уровнем экспрессии PD-1 и SOCS-1, причем ингибирование PD-1 сигнального пути сопровождается снижением уровня экспрессии SOCS-1. Регуляция уровня экспрессии PD-1 и SOCS-1 в патогенезе ХГС может осуществляться путем взаимодействия Cor белка ВГС с receptorом комплемента gC1qR на поверхности Т-лимфоцита [Frazier, 2010]. Гепатоциты и АПК, экспрессирующие Cor и NS5A белки ВГС, характеризуются низким уровнем экспрессии катепсина С (Cathepsin S / CTSS) за счет ингибирования регуляторного фактора интерферона 1 (IRF-1) и USF-1 (Upstream stimulatory factor 1) [Mazumdar,

2012]. Катепсин С - лизосомальная цистеин протеаза, регулирующая презентацию комплекса HLA-DR-пептид путем деградации инвариантной цепи CD74. Установлено, что ингибирующее действие NS5A белка ВГС реализуется за счет блокирования MyD88-зависимого сигнального пути от рецепторов PAMP's, что также сопровождается нарушением продукции макрофагами IL-6 [Abe, 2007].

## **Глава 2. Материалы и методы исследования**

### **2.1 Характеристика обследуемого контингента и методы исследования**

Настоящее исследование выполнено в 2013 – 2015 гг. на базе отделения экспериментальной терапии вирусных гепатитов, лаборатории клеточных культур и клинико-диагностической лаборатории ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России.

Под наблюдением в ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России находились 125 мужчин, страдающих ХГС 1b генотипа, средний возраст  $36,35 \pm 6,4$  лет, средний индекс массы тела  $27,3 \pm 3,6$  кг / м<sup>2</sup>. Диагноз ХГС был установлен на основании эпидемиологических, клинико-лабораторных и инструментальных данных и подтвержден выявлением в сыворотке крови антител к антигенам ВГС и РНК ВГС. При лабораторном обследовании ни у одного пациента, включенного в исследование, не были обнаружены признаки инфицирования ВГВ, ВГА, ВГД и ВИЧ.

Критериями включения больных ХГС в настоящее исследование были:

- 1) Наличие подписанного информированного согласия на участие в настоящем исследовании;
- 2) Пациенты и здоровые добровольцы мужского пола в возрасте от 18 до 60 лет включительно;
- 3) Больные ХГС, инфицированные 1b генотипом вируса, ранее не получавшие ПВТ с использованием рибавирина и препаратов интерферонового ряда;
- 4) Больные ХГС с компенсированным циррозом или без него, у которых диагностирован хронический вирусный гепатит С, подтвержденный при помощи положительного результата анализа на РНК вируса гепатита С и антител к вирусу гепатита С на скрининге. Диагноз ХГС по результатам анализа на РНК вируса гепатита С или антител к вирусу гепатита С должен быть поставлен не ранее, чем

за 6 месяцев до скрининга;

Критериями невключение больных ХГС и здоровых добровольцев в настоящее исследование были:

- 1) Положительный результат анализа на HBsAg, HAV IgM / IgG, anti-HDV и anti-HIV-1 / anti-HIV-2 на скрининге;
- 2) Документированное медицинское состояние, связанное с развитием хронического заболевания печени иной этиологии (например, цитомегаловирусная и ВЭБ инфекция, гемохроматоз, аутоиммунный гепатит, метаболическая болезнь печени, алкогольная болезнь печени, заболевание желчных путей, неалкогольный стеатоз печени и воздействие токсинов, список не является исчерпывающим);
- 3) Почечный диализ, включая гемодиализ или перitoneальный диализ, в настоящее время или в анамнезе;
- 4) Трансплантация костного мозга или органов в анамнезе, или терапия иммуномодуляторами, цитотоксическими препаратами или системными кортикостероидами в течение 2 месяцев до скрининга;
- 5) Злокачественные опухоли в настоящее время или в анамнезе, т.е., в течение 5 лет до скрининга (за исключением базальноклеточного или плоскоклеточного рака кожи после адекватного излечения);
- 6) Злоупотребления какими-либо веществами, например, алкоголем, инъекционными препаратами или препаратами, употребляемыми путем вдыхания в течение 6 месяцев до скрининга;
- 7) Клинически значимая гемоглобинопатия или гемолитическая анемия в настоящее время или в анамнезе;
- 8) Тяжелая хроническая обструктивная болезнь легких, интерстициальное заболевание легких или саркоидоз в настоящее время или в анамнезе;
- 9) Наличие в анамнезе заболеваний, опосредованных иммунными механизмами (включая, в том числе, ревматоидный артрит, воспалительное заболевание кишечника, умеренный или тяжелый псориаз и системную красную волчанку);

10) Признаки декомпенсированного цирроза на основании радиологических критериев или результатов биопсии и клинических критериев;

11) Получение препаратов крови в течение 30 дней до включения в исследование;

12) Использование гематологических факторов роста в течение 90 дней до включения в исследование;

13) Использование системных антибиотиков, противогрибковых и противовирусных препаратов для лечения активных инфекций в течение 14 дней до включения в исследование.

Дополнительными критериями невключения в настоящее исследование больных ХГС служили следующие отклонения лабораторных показателей, регистрируемых на этапе скрининга:

- Снижение уровня гемоглобина  $\leq 13$  г / дл (130 г / л);
- Снижение уровня тромбоцитов  $< 30000$  /  $\text{мм}^3$
- Снижение клиренса креатинина (по формуле Cockcroft и Gault)  $\leq 50$  мл / мин;
- Повышение уровня общего билирубина в сыворотке крови  $\geq 2$  мг / дл ( $\geq 34$  мкмоль / л);
- Снижение уровня альбумина сыворотки крови  $\leq 3,5$  г / дл (35 г / л);
- Повышение уровня АЛТ более чем в десять раз от верхней границы нормы;
- Снижение абсолютного количества нейтрофилов  $\leq 1,5 \times 10^9$  клеток / л;
- Повышение уровня тиреотропного гормона более чем в 1,2 раза от верхней границы нормы.

В течение 6 месяцев до настоящего исследования ни один больной не злоупотреблял алкоголем, инъекционными наркотическими препаратами или препаратами, употребляемыми путем вдыхания. Критерием невключения в настоящее исследование здоровых добровольцев также служило отклонение любого контролируемого параметра от референсных значений.

У 28 из 125 включенных в исследование пациентов проведена оценка

функциональной активности ДК. С целью минимизации / исключения субъективности подбор пациентов проводился методом случайной выборки с учетом групп стратификации по уровню АЛТ ( $< 80$  Ед / л или  $> 80$  Ед / л), вирусной нагрузки ( $\geq 800000$  МЕ / мл или  $< 800000$  МЕ / мл) и степени фиброза печени (F0 – 2 или F3 – 4). В культуру незрелых ДК, полученных от 14 пациентов с ХГС, кроме липополисахарида добавлялся рекомбинантный IFN- $\gamma$  отечественного производства (препарат Ингарон).

Определение терапевтической эффективности с оценкой целесообразности включения препарата на основе рекомбинантного IFN- $\gamma$  в схему ПВТ проводилось у 20 больных ХГС 1b генотипа. Все больные были лицами мужского пола с продвинутой стадией фиброза печени (F 3 – 4), низкой и умеренной активностью патологического процесса. Ни один из пациентов не имел тяжелых сопутствующих заболеваний в стадии декомпенсации, все больные с циррозом печени имели стадию A по шкале Child-Pugh-Turcotte. Методом случайной выборки пациенты были разделены на 2 группы по 10 человек в каждой: основная группа и группа сравнения. Пациентам обеих групп были назначены препараты: цепэгинтерферон альфа – 2b (Альгерон № ЛП-002017 от 28.02.2013) в дозировке 1,5 мкг на 1 кг в неделю и рибавирин (№ ЛСР-002180/07 от 15.08.2007) в дозировке 15 мг на 1 кг в сутки. Группу сравнения составили больные ХГС 1b генотипа (средний возраст  $53,60 \pm 6,29$  лет, средний индекс массы тела  $25,74 \pm 2,70$  кг /  $m^2$ ). В основную группу вошли также 10 больных ХГС 1b генотипа (средний возраст  $48,10 \pm 8,15$  лет, средний индекс массы тела  $27,32 \pm 2,95$  кг /  $m^2$ ), в стандартную схему терапии которых был добавлен отечественный препарат на основе рекомбинантного IFN- $\gamma$  (Ингарон № ЛС-000924 от 18.11.2005) в дозе 500000 МЕ подкожно через день в течение 12 недель.

Все больные, включенные в исследование, обследовались по общепринятой в гепатологической практике методике. При оценке состояния больного обращалось внимание на наличие жалоб, клинических проявлений заболевания с определением размеров печени и селезенки. Все лабораторно-инструментальные исследования проводились на базе лицензированных лабораторий ФГБУ «НИИ

гриппа» Минздрава России. Клинический анализ крови с определением уровня гемоглобина, количества эритроцитов, тромбоцитов, лейкоцитов и содержания абсолютного числа нейтрофилов и лимфоцитов, а также с определением скорости оседания эритроцитов проводился с использованием гематологический анализатор РСЕ-90 фирмы «ERMA» (Япония). Биохимический анализ крови с определением уровней аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), гамма-глутамилтрансептидазы (ГГТП), общего билирубина, глюкозы, креатинина, железа, общего белка, альбумина проводился с использованием биохимического анализатор Conelab (Финляндия) и тест-системы Thermo Fisher Scientific (Финляндия). Определение уровня протромбинового индекса (ПТИ) проводилось с использованием коагулометра Sysmex-CA50 (Япония). Диагностика гепатита С проводилась методом полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР в режиме реального времени) с определением генотипа вируса и «вирусной нагрузки» на базе лаборатории молекулярной вирусологии и генной инженерии ФГБУ НИИ гриппа Минздрава России. Экстракцию нуклеиновых кислот (НК) возбудителей проводили с применением набора «Рибо-преп». Для выявления НК вирусов гепатита использовали тест-систему «АмплиСенс HCV-Монитор-FL» (производства ЦНИИЭ, Москва), для определения генотипа вируса гепатита С - тест-систему «АмплиСенс® HCV-1/2/3-FL», основанные на методе ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени на приборах «Rotor-Gene» 6000 («Corbett Research», Австралия) и «Rotor Gene Q» (QIAGEN, Германия). Исключение наличия HBsAg и anti-HIV-1,2 проводилось серологическим методом с использованием тест-системы ImmunoComb (Израиль). Определение степени фиброза печени проводилось методом транзиторной эластографии «Фиброскан» на аппарате FibroScan 502 фирмы ECHOSENS S.A. (Франция).

Выделение и определение показателей функциональной активности ДК проводилось по стандартной лабораторной методике. ДК получали из моноцитов периферической крови. Для этого после забора крови на ступенчатом градиенте

фиковлерографина (плотность раствора 1,077 г/мл) выделялся пул мононуклеарных клеток. С помощью аспирации слоя между плазмой и фиковлерографином, мононуклеарные клетки помещались в среду для культивирования (RPMI-1640). Индукция дифференцировки моноцитов в ДК достигалась добавлением в среду гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF до концентрации 800 Ед/мл) и интерлейкина 4 (IL-4 до концентрации 1000 Ед/мл) с последующей инкубацией при 37 градусах Цельсия, 5% CO<sub>2</sub> в течение 5-6 дней. Для индукции полного созревания ДК инкубировались при 37 градусах Цельсия, 5% CO<sub>2</sub> в течение 1 суток с добавлением в среду для культивирования фактора созревания (липополисахарид, IFN- $\gamma$ ). Методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител, меченых флуоресцентной меткой, проводилось фенотипирование как незрелых (на 5-6 день культивации), так и зрелых (на 6-7 день культивации) ДК. По значению средней интенсивности флуоресценции определялись уровни экспрессии на поверхности ДК следующих функциональных молекул: молекул гистосовместимости тканей 1 и 2 классов (HLA-A,B,C и HLA-DR), хемокинового рецептора CD195, ко-стимуляторных молекул (CD80, CD86, CD40, CD70, CD252) и ко-ингибирующих молекул (CD274, CD273).

Математическая и статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием программной среды статистического анализа R. В качестве мер центральной тенденции рассчитывались значения среднего арифметического и медианы. В качестве мер изменчивости данных рассчитывались значения дисперсии, среднего квадратического отклонения и квартилей. Нормальность распределения количественных признаков в выборке оценивалась с помощью W-критерия Шапиро-Уилка. Для оценки достоверности межгрупповых различий по количественным (метрическим) и порядковым (балльным или полуметрическим) признакам использовались параметрические (t-критерий Стьюдента) и непараметрические (критерий Колмогорова-Смирнова, Манна-Уитни, Уилкоксона) методы. Корреляционный анализ признаков выполнен параметрическим методом Пирсона и непараметрическим методом Спирмена. В

настоящей работе количественные значения приведены в виде  $M \pm S$ , где  $M$  – это среднее значение, а  $S$  – это стандартное отклонение, а также в виде  $Me$  (медиана с указанием интерквартильного размаха). Уровень значимости был принят  $\alpha \leq 0,05$ .

### **Глава 3. Результаты исследования. Клинико-иммунологическая характеристика больных с различными вариантами течения хронического гепатита С**

#### **3.1 Клинико-эпидемиологическая характеристика больных хроническим гепатитом С**

Под наблюдением находилось 125 больных ХГС 1b генотипа. Все обследованные были лицами мужского пола (средний возраст  $36,35 \pm 6,40$  лет, средний индекс массы тела  $27,30 \pm 3,60$  кг / м<sup>2</sup>). У большинства больных (68 %, n = 85) ХГС впервые был диагностирован в течение последних 5 лет. У 20,8 % (n = 26) – диагноз был поставлен более 10 лет тому назад. Абсолютное большинство (92,8 %, n = 116) пациентов было занято в сфере производства и только 7,2 % (n = 9) не имели постоянного места работы, официально считаясь безработными. Более половины (64 %, n = 80) из числа наблюдавшихся больных имели высшее профессиональное образование, 12,8 % (n = 16) являлись студентами высших или средних учебных заведений, 7,2 % (n = 9) – пенсионерами и 19,2 % (n = 24) – рабочими. Данные эпидемиологического анамнеза позволили установить, что контакт в семье с больным хроническим гепатитом имели 12,8 % пациентов (n = 16), 32,8 % больных (n = 41) указали на наличие оперативных вмешательств, а у 7,2 % (n = 9) в анамнезе имелись указания на проведение гемотрансфузий. Абсолютное большинство больных, включенных в исследование, указывали на наличие в течение последних лет многочисленных инъекций по медицинским показаниям (84,8 %, n=106), а почти каждый второй из наблюдавшихся пациентов (44,8 %, n = 56) обращался к услугам стоматолога. Наркотики в инъекционной форме употребляли 26,4 % (n = 33) больных со стажем наркологической зависимости от 1 до 5 лет. В момент обследования никто из пациентов не употреблял психотропных лекарственных средств и не страдал хронической алкогольной зависимостью.

Ни у одного больного ХГС, включенного в исследование, в анамнезе жизни и не было выявлено тяжелых сопутствующих заболеваний (в том числе признаков декомпенсации функции печени), хронических заболеваний печени другой этиологии, а также состояний, требующих проведения иммунокорригирующей терапии. Данные о частоте встречаемости сопутствующих заболеваний у обследованных нами пациентов представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Сопутствующие заболевания у больных ХГС (n = 125)

Заболевание	абс.	%
Аллергические реакции	26	20,8
Хронический гастрит, вне обострения	24	19,2
Гипертоническая болезнь 1-2 степени	22	17,6
Дегенеративные изменения поясничного отдела позвоночника	14	11,2
Мочекаменная болезнь почек	14	11,2
Хронический бронхит, вне обострения	9	7,2
Сахарный диабет 2 типа, компенсированный	9	7,2
Хронический панкреатит, вне обострения	8	6,4
Язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки	8	6,4
Острый недифференцированный лейкоз в ремиссии	5	4,0
Инфаркт миокарда	5	4,0
Хронический простатит	5	4,0
Хронический гайморит, вне обострения	3	2,4

Среди наиболее часто встречающихся сопутствующих заболеваний выявлены: хронический гастрит, вне обострения (19,2 %, n = 24), гипертоническая болезнь 1-2 степени (17,6 %, n = 24), остеохондроз поясничного отдела позвоночника с грыжей поясничного отдела позвоночника (11,2 %, n = 14) и мочекаменная болезнь почек (11,2 %, n = 14). Реже у больных регистрировались хронический бронхит, вне обострения (7,2 %, n = 9), компенсированный сахарный диабет 2 типа (7,2 %, n = 9), хронический панкреатит (6,4 %, n = 8) и язвенная

болезнь желудка (4 %, n = 5) или двенадцатиперстной кишки (4 %, n = 5). У одного больного выявлен острый недифференцированный лейкоз в ремиссии с 1997 года. 1 пациент в 2001 году перенес инфаркт миокарда. Абсолютное большинство пациентов исследуемой группы были некурящими (71,2 %, n = 89), у нескольких больных имелись указания на наличие аллергических реакций (20,8 %, n = 26).

Больные чаще всего предъявляли жалобы на общую слабость, быструю утомляемость (32 %, n = 40), снижение аппетита (19,2 %, n = 24) и дискомфорт / боли в правом подреберье (19,2 %, n = 24). Большинство пациентов, имеющих признаки хронического гастрита или язвенной болезни желудка, предъявляли жалобы на тяжесть / дискомфорт в эпигастральной области (15,2 %, n = 19). Пациент с субкомпенсированным циррозом печени на момент осмотра предъявлял жалобы на кожный зуд, кровоточивость десен, судороги в икроножных мышцах и одышку при незначительных физических нагрузках. Данные о частоте встречаемости субъективных признаков заболевания у обследованных пациентов представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Субъективные признаки заболевания у больных ХГС (n = 125)

Симптомы	абс.	%
Общая слабость / утомляемость	40	32
Дискомфорт / боли в правом подреберье	24	19,2
Снижение аппетита	24	19,2
Тяжесть / дискомфорт в эпигастральной области	19	15,2
Периодические головные боли	14	11,2
Чувство тошноты по утрам	13	10,4
Горечь во рту	9	7,2
Кожный зуд	8	6,4
Кровоточивость десен	7	5,6
Судороги в икроножных мышцах	5	4,0
Одышка	5	4,0

При объективном осмотре у абсолютного большинства пациентов (88,8 %, n = 111) выявлена гепатомегалия, у четверти – спленомегалия (25,6 %, n = 32). У 43,2 % больных (n = 54) на коже определялись телеангиектазии, у 20,8 % (n = 26) – пальмарная эритема. Реже у пациентов исследуемой группы отмечалось наличие иктеричности склер (19,2 %, n = 24), у 13,6 % больных (n = 17) при пальпации имели место боли в правом подреберье.

У одного больного в области локтевых сгибов обнаружены папулезные высыпания с зоной шелушения в центре. Еще у одного пациента с субкомпенсированным циррозом печени при объективном осмотре были выявлены желтушность кожи, кровоточивость десен, умеренная отечность нижних конечностей, при аусcultации легких – жесткое дыхание, ослабленное в нижних отделах. Данные о частоте встречаемости объективных признаков заболевания у обследованных нами пациентов представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Объективные признаки заболевания у больных ХГС (n = 125)

Симптомы	абс.	%
Гепатомегалия	111	88,8
Телеангиектазии	54	43,2
Сplenомегалия	32	25,6
Пальмарная эритема	26	20,8
Иктеричность склер	24	19,2
Наличие налета на языке	19	15,2
Болезненность в правом подреберье при пальпации	17	13,6
Следы расчесов на коже	9	7,2
Желтушность кожных покровов	5	4,0
Отечность нижних конечностей	5	4,0
Папулезные высыпания с зоной шелушения в области локтевых сгибов	1	0,8

Ни у одного из пациентов исследуемой группы не было отмечено повышения температуры тела. Частота сердечных сокращений и число

дыхательных движений в минуту у всех больных соответствовали референсным значениям. У абсолютного большинства больных (86,4 %, n = 108) показатели артериального давления находились в пределах нормальных значений, однако у 10 больных было отмечено умеренное повышение как систолического, так и диастолического артериального давления.

Всем больным для определения стадии фиброза печени проводилась транзиторная эластография. Исследования показали, что более чем у половины пациентов имела место начальная стадия фиброза печени (64 %, n = 80), а у 36 % больных (n = 45) была диагностирована продвинутая стадия фиброза печени (F 3 – 4). Любопытными, на наш взгляд, представляются данные о наличии прямой корреляционной связи между стадией фиброза печени и возрастом пациентов ( $r_{xy} = 0,66$ ,  $p < 0,01$ ). Так средний возраст в подгруппе больных с F 3 – 4 составил  $48,10 \pm 8,12$  лет, в то время как среди пациентов, имеющих начальную стадию фиброза печени –  $36,78 \pm 6,97$  лет (рисунок 1).

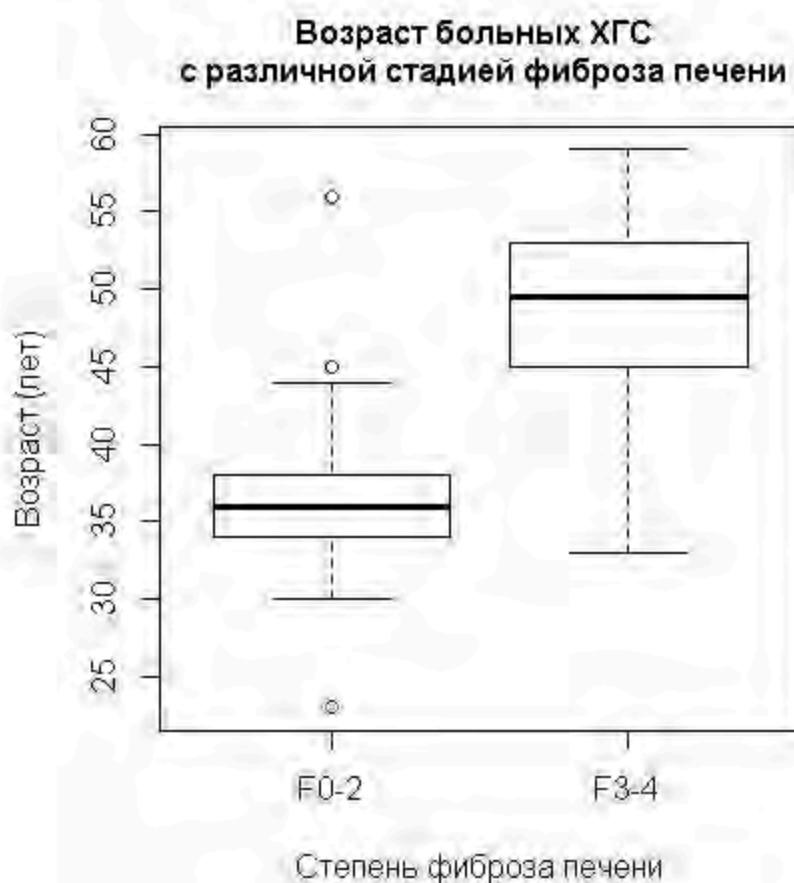


Рисунок 1

Полученные данные могут косвенно указывать на большую продолжительность заболевания у лиц старшей возрастной группы, а диагностика первого эпизода заболевания может не соответствовать истинной продолжительности болезни. Известно, что ХГС является малосимптомным заболеванием, которое часто клинически проявляется лишь в стадии сформировавшегося фиброза / цирроза печени. Это лишний раз подтверждает необходимость своевременного выявления ХГС на ранних стадиях болезни.

Корреляционный анализ позволил установить, что уровень виремии и степень выраженность цитолитического синдрома у больных ХГС, включенных в исследование, не зависели от степени фиброза печени. Так у пациентов без признаков фиброза печени уровень виремии колебался от 100000 МЕ/мл до 1500000 МЕ/мл. Такая же закономерность наблюдалась и у пациентов с продвинутыми стадиями фиброза печени (F 3 – 4). Исключение составила лишь группа пациентов с 2 стадией фиброза печени, у абсолютного большинства которых наблюдался высокий уровень виремии. Средние показатели вирусной нагрузки и АЛТ у больных с различной стадией фиброза печени представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Средние показатели вирусной нагрузки и АЛТ у больных ХГС (n = 125) с различной стадией фиброза печени

Число больных, абс. / %	Показатели		
	Стадия фиброза печени по шкале Metavir	Средний уровень виремии, Ме (LQ – HQ), МЕ/мл	Средний уровень АЛТ, Ме (LQ – HQ), Ед/л
30 / 24,0	F 0	610000 (100000 – 1500000)	64,50 (54,25 – 76,07)
24 / 19,2	F 1	123275 (89507 – 2852413)	75,45 (72,30 – 97,75)
26 / 20,8	F 2	1860000 (1720000 – 2000000)	105,20 (74,25 – 136,13)
22 / 17,6	F 3	261558 (180579 – 3230779)	128,00 (73,30 – 223,02)
23 / 18,4	F 4	750000 (419450 – 1150000)	100,60 (77,04 – 106,54)

При клинико-лабораторном обследовании было установлено, что у большинства обследованных нами пациентов значения показателей клинического анализа крови находились в пределах нормы. Средние значения представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Результаты клинического анализа крови у больных ХГС (n = 125)

Показатели	Средние значения, $M \pm S$	Диапазон нормальных значений
Гемоглобин, г / л	$150,82 \pm 12,42$	130 – 160
Эритроциты, $10^{12}$ / л	$4,90 \pm 0,46$	4,0 – 5,0
Цветовой показатель	$1,00 \pm 0,02$	0,85 – 1,05
Тромбоциты, $10^9$ / л	$190,68 \pm 79,07$	180 – 320
Лейкоциты, $10^9$ / л	$5,43 \pm 1,52$	4,0 – 9,0
Нейтрофилы, $10^9$ / л	$2,82 \pm 0,97$	2,04 – 5,8
Лимфоциты, $10^9$ / л	$2,04 \pm 0,76$	1,2 – 3,0
Моноциты, $10^9$ / л	$0,47 \pm 0,19$	0,09 – 0,60
Эозинофилы, $10^9$ / л	$0,12 \pm 0,11$	0,02 – 0,30
СОЭ, мм / ч	$6,57 \pm 5,43$	1 – 15

У абсолютного большинства больных с фиброзом печени 3 – 4 стадии (82,2 %, n = 37) было отмечено снижение уровня тромбоцитов. Выявлена обратная средняя достоверная корреляционная связь между количеством тромбоцитов и степенью фиброза печени ( $r_{xy} = -0,61$ ,  $p < 0,01$ ). Среди больных с начальными признаками фиброза печени (n = 47) средний уровень тромбоцитов составил  $225,61 \pm 68,32 \times 10^9$  / л, а среди пациентов с выраженным фиброзом / циррозом печени (n = 28) –  $127,80 \pm 55,71 \times 10^9$  / л (рисунок 2). Менее чем у четверти больных отмечалось снижение уровня лейкоцитов и абсолютного содержания нейтрофилов. У одного больного с циррозом печени наряду с выраженным снижением уровня тромбоцитов выявлено снижение абсолютного содержания лимфоцитов. У 18,4 % пациентов (n = 23) исследуемой группы наблюдалось умеренное повышение скорости оседания эритроцитов.

**Уровень тромбоцитов  
в зависимости от степени фиброза печени**

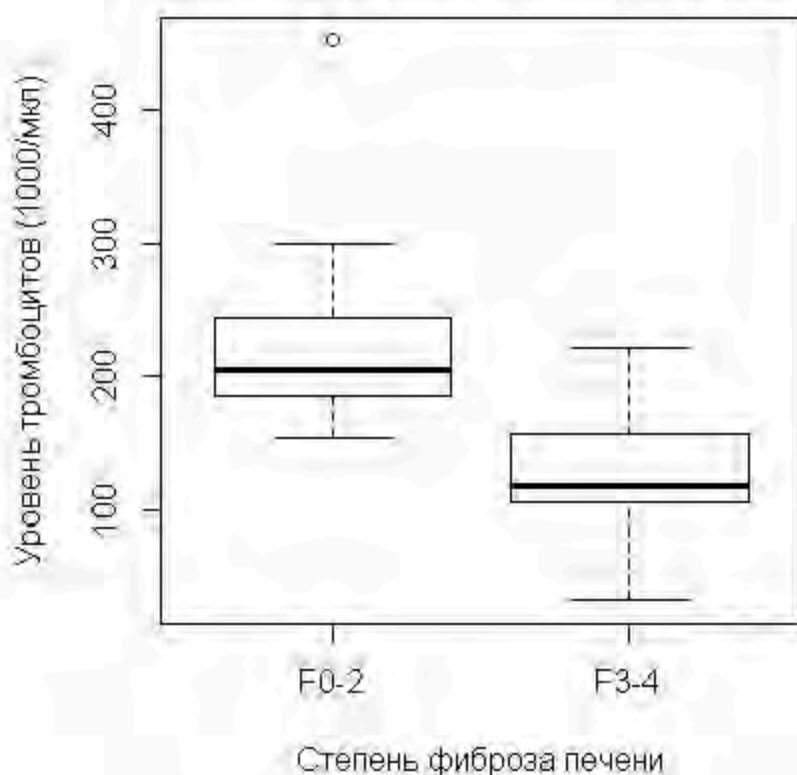


Рисунок 2

У абсолютного большинства пациентов исследуемой группы (84 %,  $n = 105$ ) отмечено повышение активности трансаминаз, причем у 38,4 % больных ( $n = 48$ ) наблюдалось повышение уровня АЛТ более чем в два раза от верхней границы нормы. Средний уровень АЛТ по медиане составил 75,50 Ед / л (интерквартильная широта от 54,00 до 104,75 Ед / л). Умеренное повышение уровня АСТ наблюдалось у 70,4 % больных ( $n = 88$ ), а повышение общего билирубина у 28,8 % пациентов ( $n = 36$ ). Средние значения изучаемых нами биохимических показателей представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Результаты биохимического анализа крови у больных ХГС (n = 125)

Показатели	Средние значения, M±S	Диапазон нормальных значений
АЛТ, Ед / л	88,86 ± 59,59	< 40
АСТ, Ед / л	55,13 ± 28,32	< 35
Общий билирубин, мкмоль / л	18,17 ± 7,98	< 20
Общий белок, г / л	73,20 ± 4,52	64 – 83
Альбумин, г / л	42,51 ± 3,47	35 – 52
Креатинин, мкмоль / л	78,70 ± 10,31	59 – 104
Амилаза, Ед / л	64,35 ± 20,59	< 100
Триглицериды, моль / л	0,97 ± 0,48	< 1,7
Щелочная фосфатаза, Ед / л	93,04 ± 37,03	< 128
Глюкоза, моль / л	5,59 ± 0,82	4,1 – 5,9
Железо, мкмоль / л	24,06 ± 7,67	11,6 – 31,3
ГГТП, Ед / л	67,85 ± 46,43	< 55
Протромбиновый индекс, %	88,89 ± 11,86	93 – 108
Холестерин, моль / л	3,95 ± 0,75	< 5,2
ЛПВП, моль / л	1,31 ± 0,39	0,16 – 2,80
ЛПНП, моль / л	2,46 ± 0,56	< 3,37

Выявлена прямая сильная достоверная корреляционная связь между уровнем железа в сыворотке крови и уровнем билирубина ( $r_{xy} = 0,69$ ,  $p < 0,01$ ). Так в подгруппе больных с уровнем железа выше референсных значений ( $> 31,3$  мкмоль / л) средний уровень общего билирубина составил  $30,88 \pm 10,14$  мкмоль / л, в то время как в подгруппе больных с нормальным уровнем железа в сыворотке крови –  $16,05 \pm 5,35$  мкмоль / л (рисунок 3).

У 37 из 45 пациентов с фиброзом печени 3 – 4 степени отмечено снижение уровня тромбоцитов, у 35 – снижение ПТИ, у 20 – умеренное повышение уровня прямого билирубина, а у одного пациента с отечностью нижних конечностей выраженное снижение уровня альбумина до 29 г / л. Выявлена обратная средняя достоверная корреляционная связь между уровнем ПТИ и стадией фиброза печени

( $r_{xy} = -0,47$ ,  $p < 0,05$ ). Так среди больных с начальными признаками фиброза печени среднее значение ПТИ составило  $92,61 \pm 7,2\%$ , а среди пациентов с выраженным фиброзом / циррозом печени –  $82,20 \pm 15,7\%$  (рисунок 3). У нескольких больных выявлены биохимические признаки холестаза. Так умеренное повышение уровня ГТТП отмечено у 50,4 % пациентов ( $n = 63$ ), причем у 12 из них наблюдалось повышение уровней ЩФ и триглицеридов. Выявлена прямая средняя достоверная корреляционная связь между уровнями триглицеридов и ГТТП ( $r_{xy} = 0,50$ ,  $p < 0,01$ ).

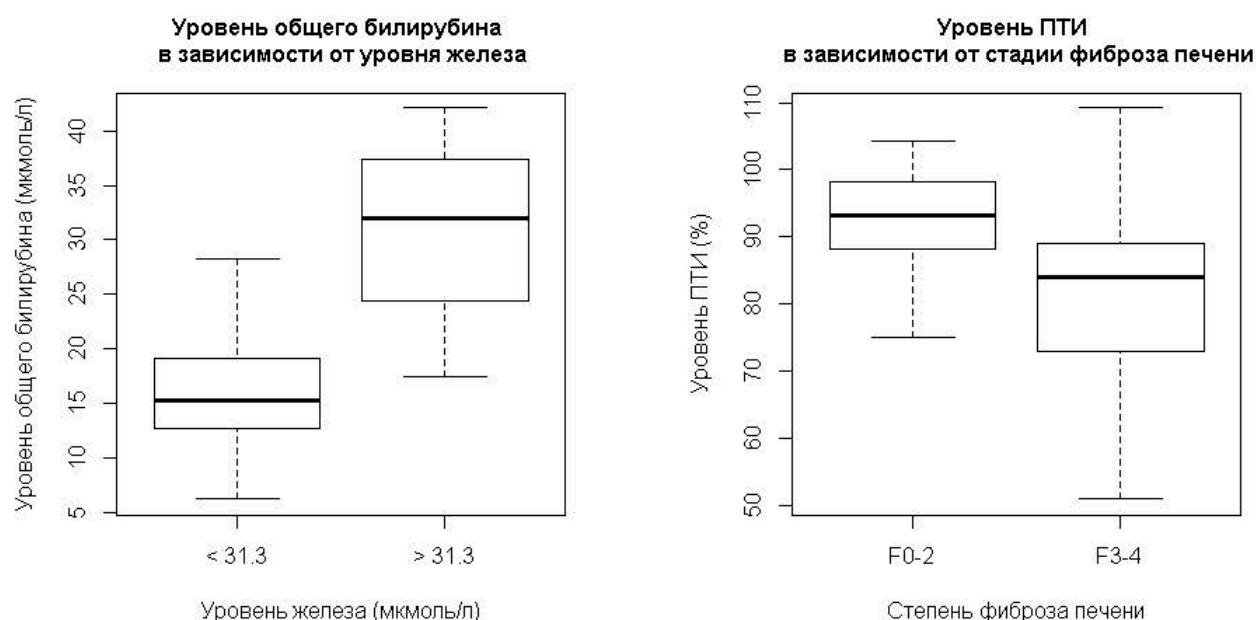


Рисунок 3

У большинства пациентов исследуемой группы (54,4 %,  $n = 68$ ) наблюдалась низкая «вирусная нагрузка» ( $< 800000$  МЕ / мл). Средний уровень РНК HCV среди больных с низкой «вирусной нагрузкой» по медиане составил 155275 МЕ / мл (интерквартильная широта от 99700 до 256168 МЕ / мл), в то время как в подгруппе больных с высокой «вирусной нагрузкой» – 2140000 МЕ / мл (интерквартильная широта от 1500000 до 4820000 МЕ / мл). У всех больных выявлен 1b генотип ВГС, у одного пациента выявлен также минорный субтип 3a. Достоверной корреляции между уровнями «вирусной нагрузки» и различными

показателями клинического или биохимического анализов крови выявлено не было.

### **Клинический пример**

Больной К., 59 лет (амб. карта № 5264).

**Основной диагноз:** Хронический вирусный гепатит С (РНК HCV +, 1b генотип) с умеренной цитолитической активностью, репликативная фаза. Цирроз печени класс А по Child-Pugh-Turcotte.

**Сопутствующий диагноз:** Хронический гастродуоденит.

При осмотре предъявлял жалобы на общую слабость, утомляемость, кожный зуд, кровоточивость десен, судороги в икроножных мышцах и одышку при незначительных физических нагрузках. Из анамнеза известно, что впервые узнал о наличии у него ХГС 2 года назад, когда при обследовании были обнаружены anti-HCV. Наблюдался в поликлинике, ранее противовирусную терапию не получал. При выяснении эпидемиологического анамнеза было установлено, что больной часто обращался к услугам стоматолога, жена и дети не страдали ХГС. Объективно: состояние удовлетворительное, на коже в области груди многочисленные телеангиэкзазии, кожа желтушная, склеры субicterичны. Периферические лимфоузлы мелкие, безболезненные. Пульс 78 уд / мин., ритмичный. АД 120 / 75 мм. рт. ст. Тоны сердца несколько приглушенны, ритмичные. Печень увеличена, выступает из-под края реберной дуги на 4 см., пальпируется край селезенки. Асцита нет, при осмотре нижних конечностей выявлена пастозность голеней и стоп, при аусcultации легких – жесткое дыхание, ослабленное в нижних отделах. При обследовании: эритроциты  $3,97 \times 10^{12} / \text{л}$ , гемоглобин 121 г / л, лейкоциты  $2,3 \times 10^9 / \text{л}$ , тромбоциты  $33 \times 10^9 / \text{л}$ , СОЭ 6 мм / ч, АЛТ 103 ед / л, АСТ 109 ед / л, билирубин 28,2 мкмоль / л, общий белок 70 г / л, альбумин 29 г / л. При проведении генотипирования выявлен 1b генотип ВГС. Вирусная нагрузка 174000 МЕ / мл, F 4 по шкале Metavir.

### 3.2 Оценка функциональной активности дендритных клеток у больных хроническим гепатитом С

Оценка показателей функциональной активности ДК проводилась у 28 из 125 включенных в исследование больных ХГС. Все пациенты были мужчины (средний возраст  $40,82 \pm 9,11$  лет, средний индекс массы тела  $26,66 \pm 3,32$  кг / м<sup>2</sup>), инфицированные 1b генотипом вируса. Ни один больной ранее не получал противовирусной терапии с использованием препаратов интерферона и рибавирина. У большинства пациентов методом транзиторной эластографии была диагностирована низкая степень фиброза печени F 0 – 2 (64 %, n = 18), однако у 36% больных наблюдался выраженный фиброз / цирроз печени F 3 – 4 (n = 10). Низкая вирусная нагрузка (< 800000 МЕ / мл) диагностирована у 61 % пациентов (n = 17). У большинства больных уровень АЛТ не превышал 80 Ед / мл (60,5 %, n = 17) (таблица 7).

Таблица 7 – Распределение больных ХГС (n=28) по группам в зависимости от стадии фиброза печени, уровня вирусной нагрузки и уровня АЛТ (указаны абсолютные значения и процент больных)

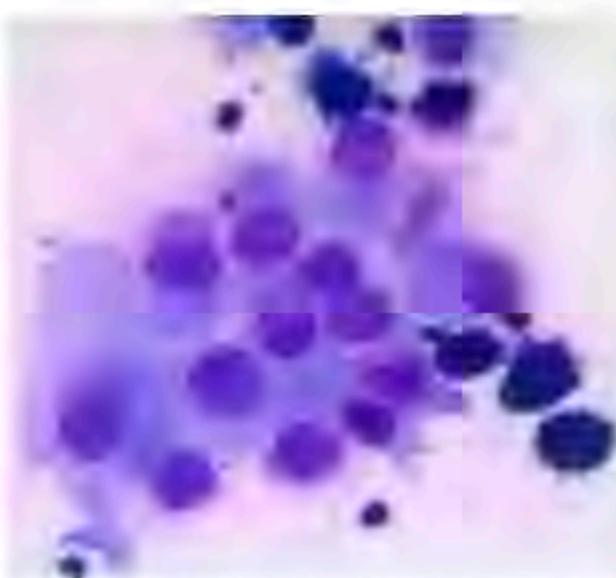
Стадия фиброза печени	RNA HCV < 800000 МЕ / мл	RNA HCV $\geq 800000$ МЕ / мл	АЛТ < 80 ЕД / л	АЛТ $> 80$ ЕД / л
F 0 – 2 (18 / 64)	11 / 39	7 / 25	14 / 50	4 / 14
F 3 – 4 (10 / 36)	6 / 22	4 / 14	6 / 22	4 / 14

Группу сравнения составили 15 здоровых добровольцев мужского пола, средний возраст  $38,41 \pm 5,45$  лет, средний индекс массы тела  $25,56 \pm 2,71$  кг / м<sup>2</sup>. Здоровые добровольцы не имели сопутствующих хронических заболеваний, не злоупотребляли алкоголем и не употребляли наркотических веществ. На момент забора крови для анализа функциональной активности ДК все больные ХГС и

здоровые добровольцы находились в удовлетворительном состоянии и не получали нестероидных противовоспалительных препаратов, антигистаминных препаратов, системных антибиотиков, противогрибковых и противовирусных препаратов, а также гематологических факторов роста и препаратов крови. Иммунологические особенности течения ХГС изучались с учетом клинических проявлений и стадии заболевания путем выявления дефектов функциональной активности ДК, играющих центральную роль в запуске и регуляции иммунных реакций.

### 3.2.1 Морфологические особенности дендритных клеток

Клеточная культура, полученная из моноцитов периферической крови здоровых добровольцев, состояла из двух типов клеток. Более крупные клетки, овальной формы с хорошо визуализируемым ядром и многочисленными включениями в цитоплазме по всем морфологическим признакам соответствовали макрофагам (рисунок 4). Второй тип клеток был представлен более сильно окрашенными клетками, различного диаметра (от 10 до 20 мкм), круглой, овальной или полигональной формы с эксцентрически расположенным ядром.



Увеличение ×400, окраска гематоксилин-эозин

ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, 2014 год

Рисунок 4 – Микроскопия культуры макрофагов и ДК, полученных из периферической крови здорового добровольца на 5 сутки

Клетки с большим диаметром имели многочисленные разветвлённые (вулеподобные) отростки мембранны и образовывали межклеточные контакты между собой, с макрофагами, а также с остатками клеточной среды. Полиморфная популяция более мелких и более сильно окрашенных клеток по всем морфологическим признакам соответствовала ДК, находящимися на различных стадиях дифференцировки и созревания. В клеточной культуре, полученной из моноцитов периферической крови здоровых добровольцев на 6 – 7 сутки, ДК клетки были представлены преимущественно зрелыми формами, которые имели более крупные размеры (15 – 20 мкм) и хорошо визуализируемые разветвлённые отростки мембранны. Зрелые ДК образовывали крупные клеточные агломераты, что косвенно свидетельствовало об их высокой способности к образованию многочисленных межклеточных контактов (рисунок 5).

Клеточные культуры, полученные из моноцитов периферической крови больных ХГС, также были представлены двумя типами клеток: макрофагами и ДК, которые по своим морфологическим признакам соответствовали клеткам

здоровых добровольцев. ДК, полученные из моноцитов периферической крови больных ХГС, в диаметре достигали 10 – 20 мкм и имели округлую или овальную форму с характерными разветвлёнными отростками цитоплазмы. При созревании ДК, полученные от больных ХГС, также как и ДК, полученные от здоровых добровольцев, увеличивались в размерах и приобретали способность к образованию крупных клеточных агломератов.

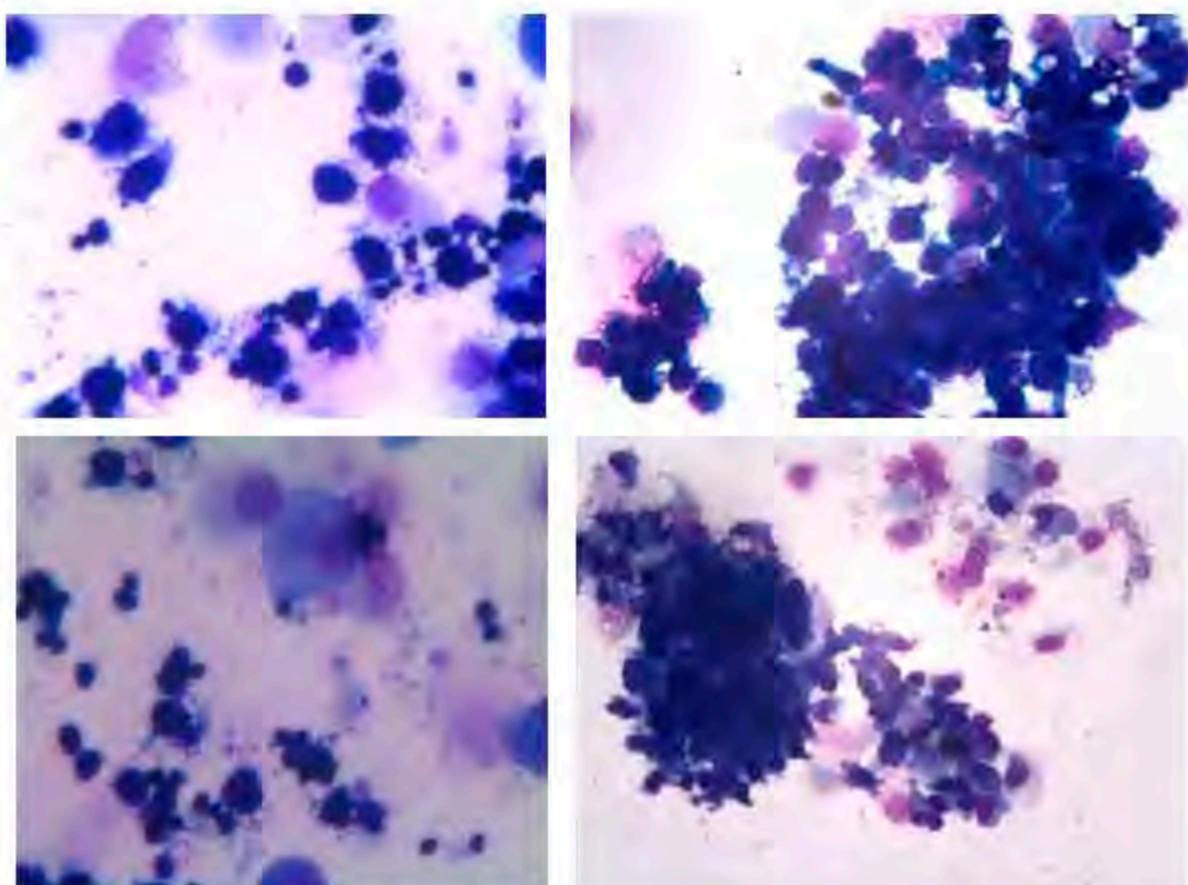


Рисунок 5 – Микроскопия культуры макрофагов и ДК, полученных из периферической крови здорового добровольца (сверху) и больного ХГС (снизу).

Слева – незрелые ДК, справа – зрелые ДК. Увеличение  $\times 400$ , окраска гематоксилин-эозин. ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, 2014 год

### 3.2.2 Оценка способности дендритных клеток к презентации антигенов в составе молекул главного комплекса гистосовместимости 1 и 2 классов

ДК являются наиболее профессиональными АПК организма. Презентация антигенных эпигенов в составе молекул главного комплекса гистосовместимости 1 и 2 классов необходима для запуска высокоспецифических иммунных реакций. Способность ДК к презентации антигенных эпигенов может быть оценена путем определения уровней экспрессии на поверхности клеток молекул HLA-A,B,C и HLA-DR.

Установлено, что ДК, полученные от здоровых добровольцев, экспрессировали на своей поверхности большое количество молекул главного комплекса гистосовместимости 1 и 2 классов, однако показатели средней интенсивности флуоресценции HLA-A,B,C и HLA-DR существенно отличались в зависимости от стадии дифференцировки (рисунок 6).

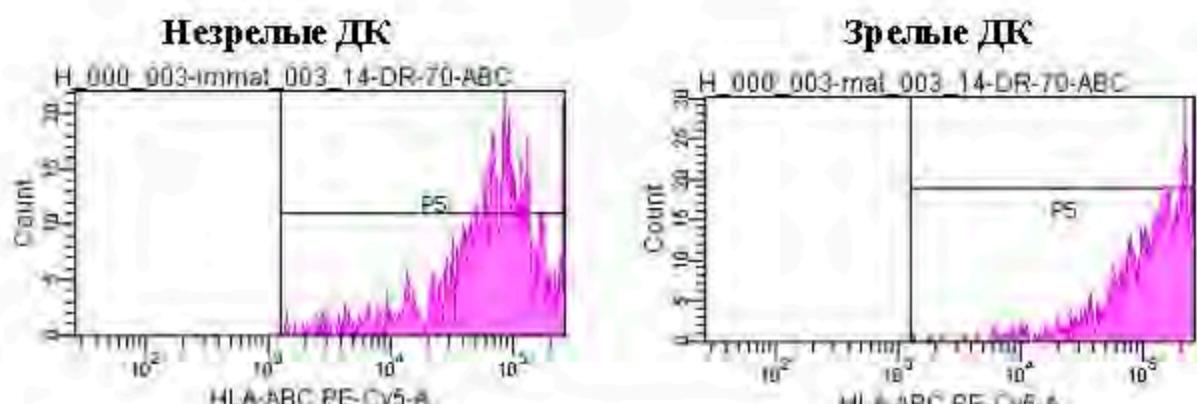


Рисунок 6 – Интенсивность флуоресценции HLA-A,B,C на поверхности ДК здорового добровольца

Средние уровни экспрессии HLA-A,B,C и HLA-DR, а также средние значения доли HLA-A,B,C+ и HLA-DR+ ДК приведены в таблице 8.

Таблица 8 – Фенотипическая характеристика ДК. Молекулы главного комплекса гистосовместимости 1 и 2 классов

Средние показатели	Здоровые добровольцы		Больные ХГС	
	Незрелые ДК	Зрелые ДК	Незрелые ДК	Зрелые ДК
HLA-A,B,C, Me (LQ – HQ), MFI	3014,50 (1708,50 – 3535,00)	4141,00 (3542,00 – 6552,50)	2939,50 (2381,25 – 4269,75)	5694,50 (4297,75 – 7099,50)
HLA-DR, Me (LQ – HQ), MFI	433,00 (110,75 – 1779,00)	1102,50 (277,75 – 2802,00)	263,00 (160,25 – 1204,00)	1877,00 (689,50 – 9832,00)

Примечание: MFI (*mean fluorescence intensity*) – средняя интенсивность флуоресценции.

Средняя интенсивность флуоресценции HLA-A,B,C и HLA-DR на поверхности незрелых ДК по медиане составила 3014,50 и 433,00, соответственно. Созревание ДК, полученных от здоровых добровольцев, сопровождалось существенным увеличением уровней экспрессии этих маркеров – средние значения по медиане составили 4142,00 ( $p < 0,05$ ) и 1102,50, соответственно (рисунок 7).

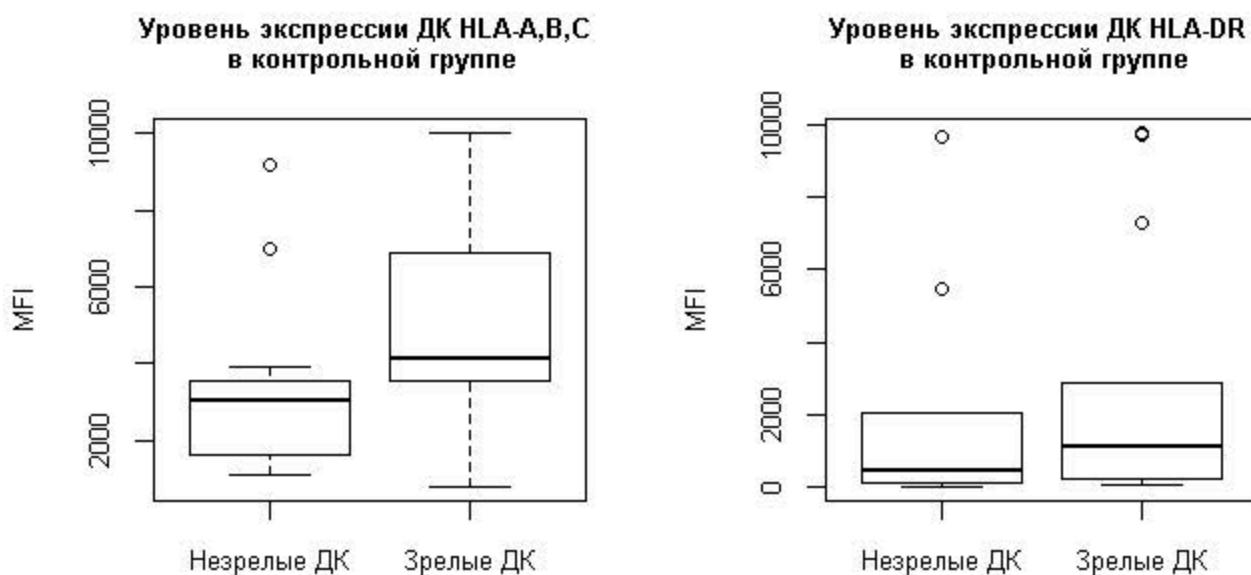


Рисунок 7

Значения средней интенсивности флуоресценции HLA-A,B,C и HLA-DR на поверхности незрелых ДК, полученных от больных ХГС, были сопоставимы со значениями в контрольной группе и составили 2939,50 и 263,00, соответственно. Созревание ДК, полученных от больных ХГС, также сопровождалось увеличением уровней экспрессии HLA-A,B,C ( $p < 0,01$ ) и HLA-DR ( $p < 0,01$ ). Значения средней интенсивности флуоресценции HLA-A,B,C и HLA-DR на поверхности зрелых ДК по медиане составили 5694,50 и 1877,00, соответственно (рисунок 8). Статистически значимых различий между уровнями экспрессии HLA-A,B,C и HLA-DR на поверхности ДК, полученных от здоровых добровольцев и больных ХГС, выявлено не было.

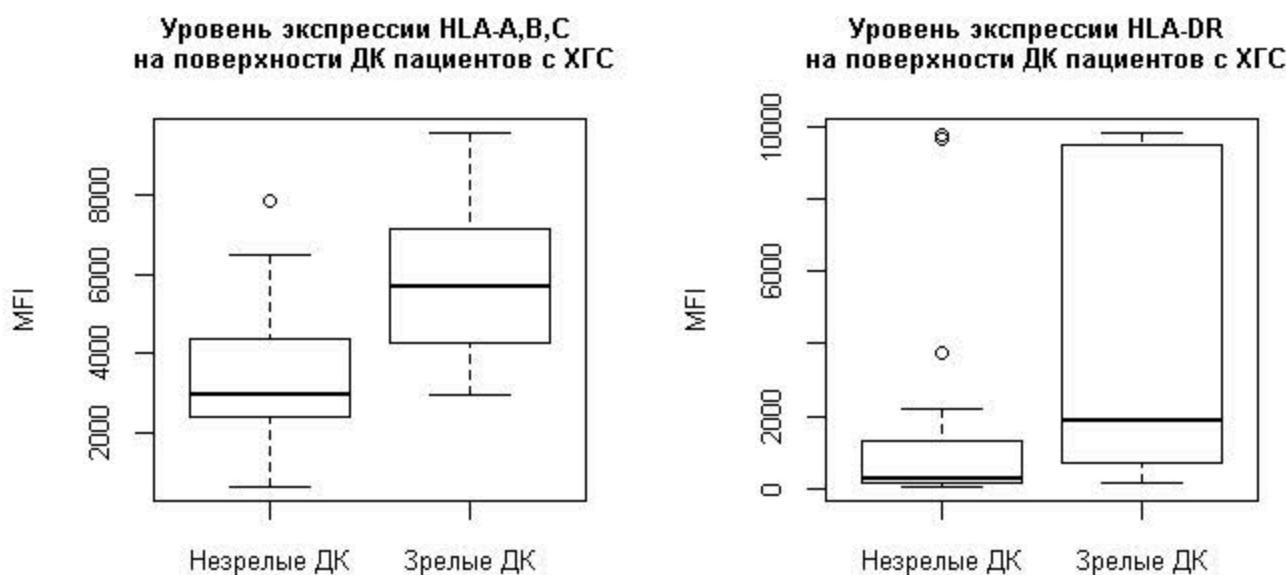


Рисунок 8

Дисперсионный анализ полученных данных в группе больных ХГС позволил выявить влияние стадии фиброза печени на уровень экспрессии HLA-DR на поверхности незрелых ДК ( $p < 0,05$ ). Так в подгруппе больных с начальной стадией фиброза печени значения средней интенсивности флуоресценции HLA-DR был существенно ниже, чем среди пациентов с выраженным фиброзом /

циррозом печени, и составил 206,00 (интерквартильная широта от 138,75 до 583,00) против 653,50 (интерквартильная широта от 288,50 до 2050,00), соответственно.

Вне зависимости от стадии фиброза печени, уровня АЛТ или уровня вирусной нагрузки зрелые ДК, полученные от больных ХГС, сохраняли способность к презентации антигенных структур в составе молекул главного комплекса гистосовместимости 1 и 2 классов, что было обусловлено высоким уровнем экспрессии на их поверхности HLA-A,B,C и HLA-DR.

### 3.2.3 Оценка способности дендритных клеток к миграции в очаг воспаления

Развитие адекватного адаптивного иммунного ответа зависит от миграционной активности ДК. Эффективная презентация антигенных структур возможна только лишь после захвата антигенов в очаге воспаления и последующей миграции ДК в регионарные лимфатические узлы. Иммунологические дефекты, имеющие место у больных ХГС, могут быть обусловлены нарушениями миграционной активности ДК. Способность ДК к миграции в очаг воспаления и из него может быть оценена путем изучения фенотипа ДК с определением уровня экспрессии хемокинового рецептора CD195 (CCR5).

Средние значения доли CD195+ ДК и средней интенсивности флуоресценции CD195 на поверхности ДК, полученных от здоровых добровольцев и больных ХГС, приведены в таблице 9.

Таблица 9 – Средние значения доли CD195+ ДК и средней интенсивности флуоресценции CD195 на поверхности незрелых и зрелых ДК

Показатели	Здоровые добровольцы		Больные ХГС	
	Незрелые ДК	Зрелые ДК	Незрелые ДК	Зрелые ДК
Доля CD195+ клеток, $M \pm S$ , %	$81,44 \pm 6,73$	$81,41 \pm 6,10$	$79,56 \pm 15,85$	$82,68 \pm 6,71$
CD195, Me (LQ – HQ), MFI	67,50 (59,25 – 72,50)	66,50 (60,50 – 74,75)	90,00 (81,50 – 102,00)	94,00 (81,75 – 101,50)

Примечание: MFI (*mean fluorescence intensity*) – средняя интенсивность флуоресценции

Установлено, что 83,85 % незрелых ДК, полученных от здоровых добровольцев, экспрессировали на своей поверхности хемокиновый рецептор CD195. При созревании доля CD195+ ДК существенно не менялась, составив 80,55 %. Значения средней интенсивности флуоресценции CD195 на поверхности незрелых и зрелых ДК, полученных от здоровых добровольцев, также существенно не отличались и составили по медиане 67,5 и 66,5, соответственно.

Абсолютное большинство незрелых ДК (83,3 %), полученных от больных ХГС, также экспрессировали на своей поверхности хемокиновый рецептор CD195. При созревании доля CD195+ ДК также существенно не менялась, составив 83,2 %. Однако значения средней интенсивности флуоресценции CD195 на поверхности незрелых и зрелых ДК у больных ХГС были статистически значимо выше, чем в контрольной группе, и составили по медиане 90 против 67,5 ( $p < 0,01$ ) и 94 против 66,5 ( $p < 0,01$ ), соответственно (рисунок 9).

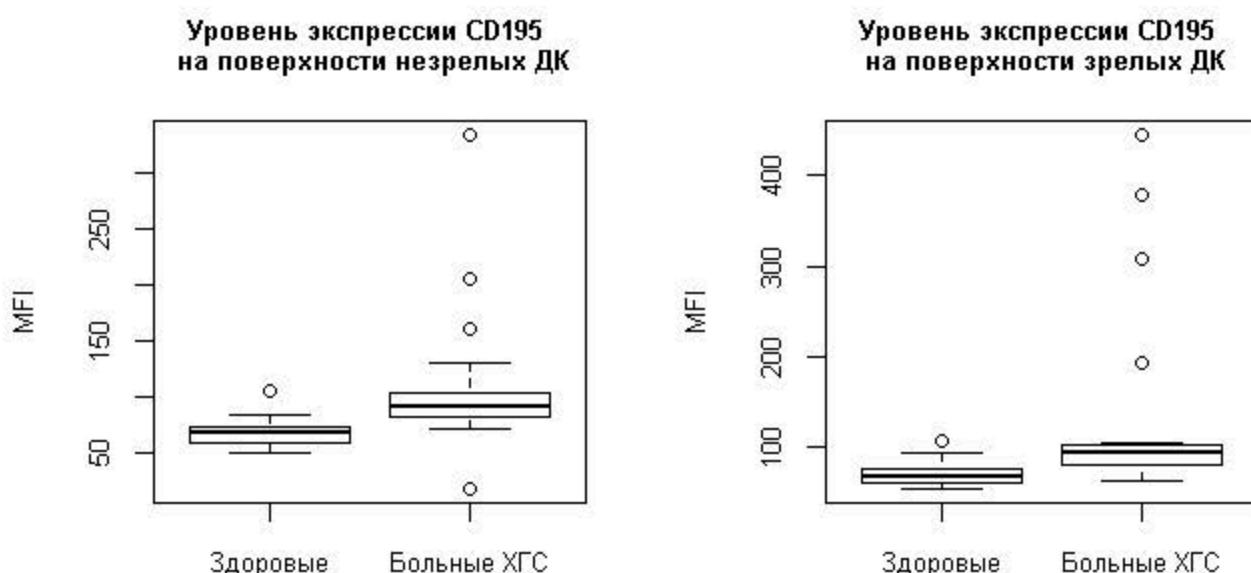


Рисунок 9

Уровень экспрессии CD195 на поверхности незрелых и зрелых ДК, полученных от больных ХГС, не зависел от степени фиброза печени, уровня АЛТ и уровня вирусной нагрузки, а также от уровней других изучаемых показателей клинического и биохимического анализов крови.

Таким образом, установлено, что ДК у больных ХГС характеризуются более высоким уровнем экспрессии хемокинового рецептора CD195 (рисунок 10), что свидетельствует о высокой способности этих клеток к миграции в очаг воспаления. Зрелые ДК, полученные от больных ХГС, обладают функциональным дефектом, который проявляется в неспособности эффективно покинуть очаг воспаления и мигрировать в регионарные лимфатические узлы. Изменение фенотипа зрелых ДК, связанное с увеличением уровня экспрессии CD195, можно рассматривать в качестве нового молекулярного механизма, обуславливающего массивную и длительную инфильтрацию печени различными АПК, участвующими в поддержании воспалительной реакции и формировании фиброза печени.

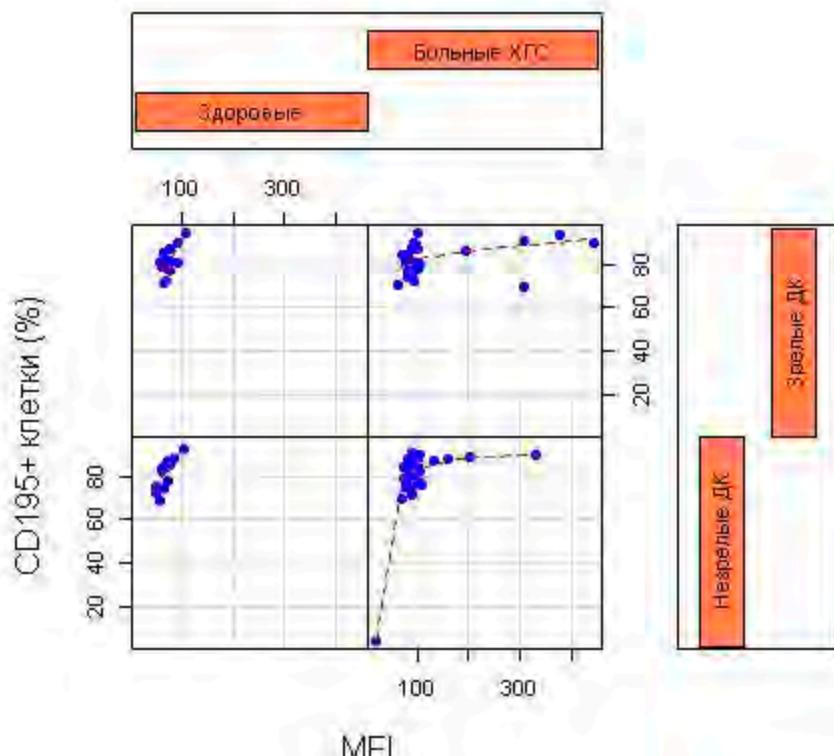


Рисунок 10 – Средняя интенсивность флуоресценции хемокинового рецептора CD195 на поверхности ДК

### Клинический пример

Больной К., 45 лет (амб. карта № 5293).

**Основной диагноз:** Хронический гепатит С (РНК HCV+, 1b генотип) с низкой цитолитической активностью в фазе репликации.

**Сопутствующий диагноз:** Хронический гастродуоденит. Грыжа поясничного отдела позвоночника.

При осмотре предъявлял жалобы на общую слабость и быструю утомляемость. Из анамнеза известно, что впервые узнал о наличии ХГС 2 года тому назад, когда при обследовании были обнаружены anti-HCV. Наблюдался в поликлинике, ранее противовирусную терапию не получал. При выяснении эпидемиологического анамнеза установлено, что ранее эпизодически употреблял внутривенно наркотические препараты, в течение 3-х лет наркотики

не употребляет. Объективно: состояние удовлетворительное, кожа чистая, обычной окраски. Периферические лимфоузлы мелкие, безболезненные. Пульс 72 уд / мин., ритмичный. АД 110 / 70 мм. рт. ст. Тоны сердца ясны, ритмичные. Печень увеличена, выступает из-под края реберной дуги на 2 см., пальпируется край селезенки. При обследовании: эритроциты  $5,9 \times 10^{12}$  / л, гемоглобин 167 г / л, лейкоциты  $5,3 \times 10^9$  / л, тромбоциты  $220 \times 10^9$  / л, СОЭ 10 мм / ч, АЛТ 43 ед / л, АСТ 34 ед / л, билирубин 10,7 мкмоль / л, общий белок 70 г / л, альбумин 39 г / л. При проведении генотипирования выявлен 1b генотип ВГС. Вирусная нагрузка 2 140000 МЕ / мл, F 2 по шкале Metavir. При оценке способности ДК к миграции в очаг воспаления установлено, что зрелые ДК, полученные от больного, были не способны эффективно покинуть очаг воспаления и мигрировать в регионарные лимфатические узлы. Нарушение миграционной активности зрелых ДК у данного больного было обусловлено высоким уровнем экспрессии на поверхности зрелых ДК хемокинового рецептора CD195 (MFI 444 против 160 на поверхности незрелых ДК).

### 3.2.4 Оценка способности дендритных клеток к передаче ко-стимулирующих молекулярных сигналов

В региональных лимфатических узлах зрелые ДК участвуют в многочисленных межклеточных взаимодействиях с другими иммунокомpetентными клетками. Межклеточный контакт осуществляется с помощью молекул межклеточной адгезии, а также с помощью ко-стимулирующих и ко-ингибирующих молекул, экспрессированных на поверхности клеток. Известно, что поляризация иммунного ответа в первую очередь зависит от спектра ко-стимулирующих молекул, участвующих в межклеточном взаимодействии между ДК и Т-лимфоцитом.

Определение уровней экспрессии ко-стимулирующих молекул позволило

установить, что ДК несут на своей поверхности большое количество не только хорошо изученных маркеров, таких как CD80, CD86 и CD40, но и ко-стимулирующие молекулы CD70 и CD252. Средние значения, характеризующие ко-стимулирующую активность незрелых и зрелых ДК, полученных от здоровых добровольцев и больных ХГС, приведены в таблице 10.

Таблица 10 – Средние значения доли CD80+, CD86+, CD40+, CD70+ и CD252+ ДК и средней интенсивности флуоресценции ко-стимулирующих молекул

Показатели	Здоровые добровольцы		Больные ХГС	
	Незрелые ДК	Зрелые ДК	Незрелые ДК	Зрелые ДК
CD80+, M ± S, %	49,07 ± 12,78	52,69 ± 13,30	57,32 ± 9,90	63,35 ± 10,33
CD80, Me (LQ – HQ), MFI	94,50 (85,00 – 108,00)	86,25 (103,00 – 109,00)	96,00 (89,00 – 118,25)	113,50 (102,50 – 128,50)
CD86+, M ± S, %	68,40 ± 12,84	75,34 ± 9,71	74,76 ± 12,27	82,7 ± 7,83
CD86, Me (LQ – HQ), MFI	134,00 (112,75 – 176,25)	168,00 (134,75 – 227,50)	144,50 (130,25 – 174,00)	203,50 (174,50 – 278,75)
CD40+, M ± S, %	65,64 ± 9,6	68,94 ± 10,36	67,65 ± 9,48	72,18 ± 10,55
CD40, Me (LQ – HQ), MFI	46,00 (41,25 – 51,75)	50,50 (42,25 – 58,75)	53,00 (44,00 – 68,00)	58,50 (50,75 – 80,25)
CD70+, M ± S, %	78,96 ± 8,52	86,53 ± 5,88	81,31 ± 9,32	88,49 ± 6,77
CD70, Me (LQ – HQ), MFI	22,50 (21,00 – 26,00)	26,50 (23,75 – 34,00)	28,00 (25,00 – 32,00)	34,00 (30,25 – 37,00)
CD252+, M ± S, %	49,19 ± 9,33	48,15 ± 10,41	40,34 ± 4,43	41,49 ± 7,41
CD252, Me (LQ – HQ), MFI	132,50 (97,50 – 234,00)	135,50 (100,75 – 239,75)	326,50 (279,25 – 564,00)	309,00 (236,50 – 554,00)

Примечание: MFI (mean fluorescence intensity) – средняя интенсивность флуоресценции.

На поверхности незрелых ДК, полученных от здоровых добровольцев,

маркеры CD80, CD86 и CD40 были обнаружены в  $49,07 \pm 12,78\%$ ,  $68,40 \pm 12,84\%$  и  $65,64 \pm 9,60\%$  случаев, соответственно. Доля CD70+ клеток была несколько выше, составив  $78,96 \pm 8,52\%$ , а CD252+ клеток –  $49,19 \pm 9,33\%$ . Созревание ДК, полученных от здоровых добровольцев, сопровождалось увеличением доли клеток, экспрессирующих CD80, CD86 и CD40, до  $52,69 \pm 13,3\%$  ( $p < 0,05$ ),  $75,34 \pm 9,71\%$  ( $p < 0,01$ ) и  $68,94 \pm 10,36\%$  ( $p < 0,05$ ), соответственно (рисунок 11). Доля зрелых CD70+ также существенно увеличилась до  $86,53 \pm 5,88\%$  ( $p < 0,01$ ), а доля CD252+ клеток существенно не изменилась, составив  $48,15 \pm 10,41\%$ . Значения средней интенсивности флуоресценции ко-стимуляторных молекул также существенно изменились в процессе дифференцировки и созревания ДК. Так средние уровни экспрессии CD80, CD86 и CD40 на поверхности незрелых и зрелых ДК составили 94,50, 134,00 и 46,00 против 86,25, 168,00 ( $p < 0,01$ ) и 50,50, соответственно. Значения средней интенсивности флуоресценции CD70 и CD252 составили 22,50 и 132,50 против 26,50 ( $p < 0,05$ ) и 135,50 соответственно.

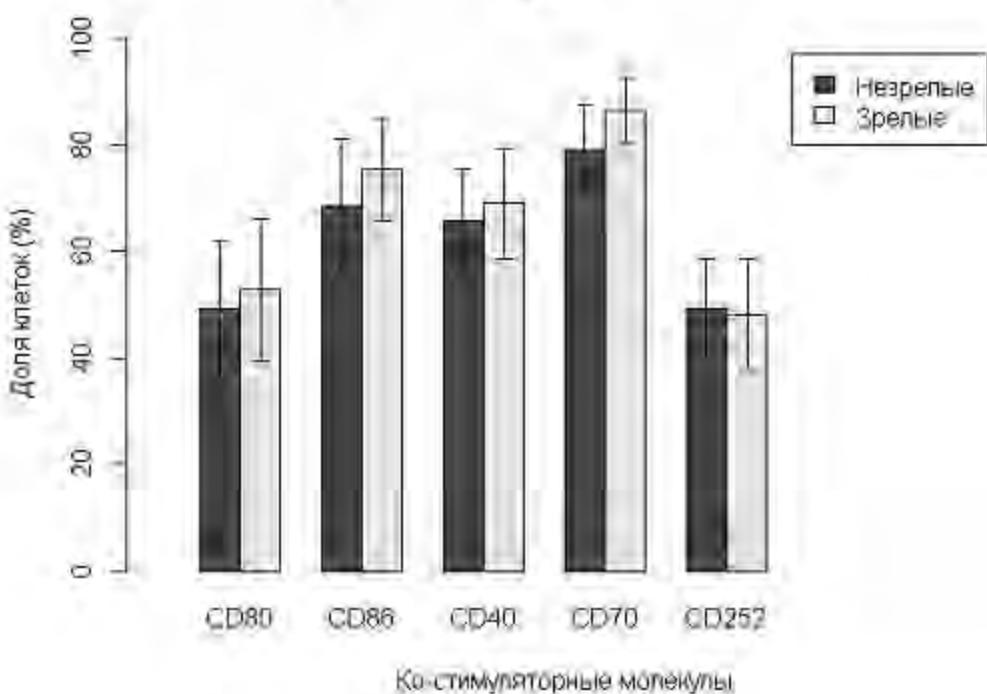


Рисунок 11 – Фенотипическая характеристика ДК здоровых добровольцев ( $M \pm S$ )

Созревание ДК сопровождалось существенным увеличением уровней экспрессии CD86 ( $p < 0,01$ ) и CD70 ( $p < 0,05$ ) (рисунки 12 – 13).

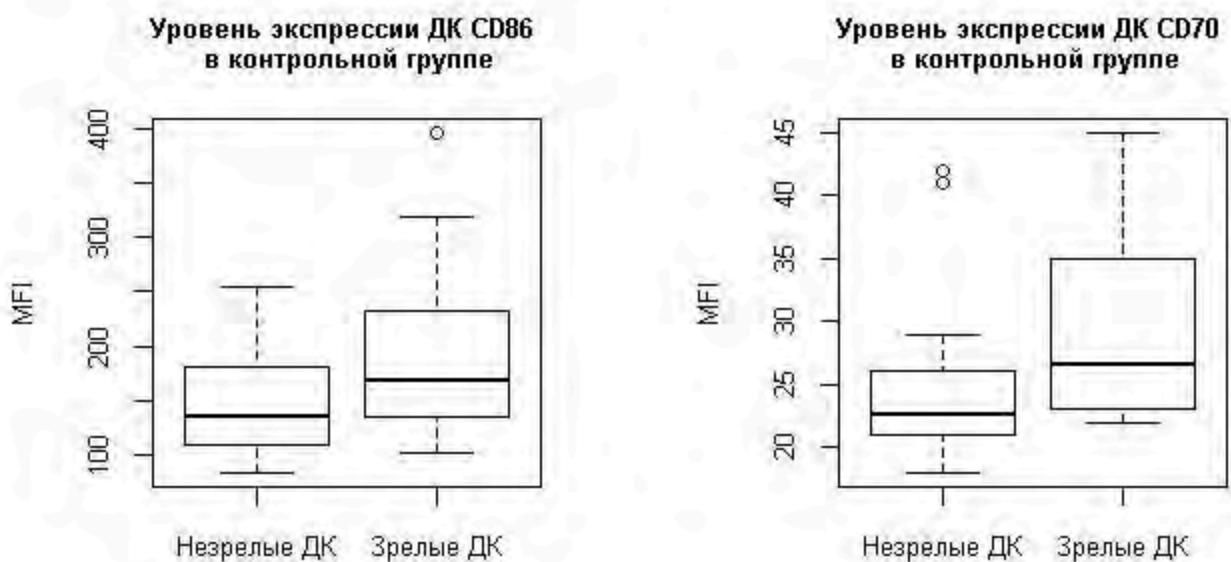


Рисунок 12

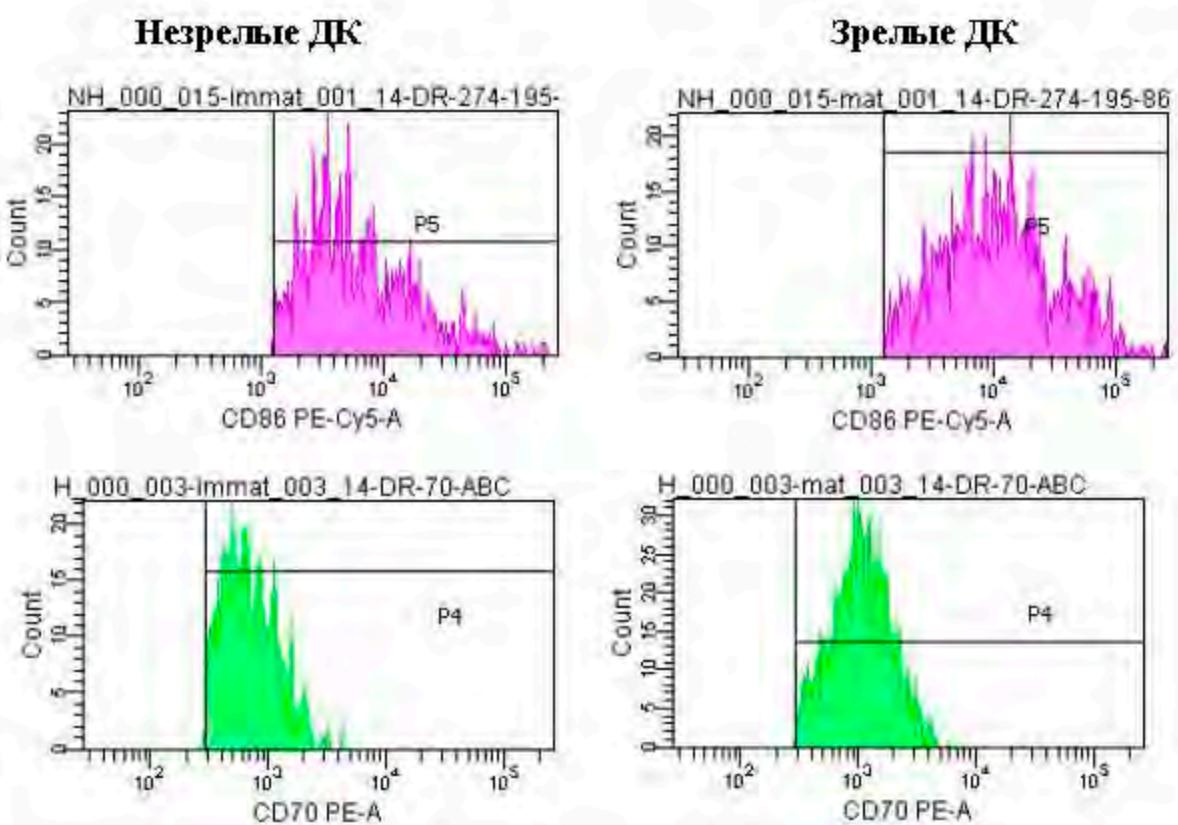


Рисунок 13 – Интенсивность флуоресценции CD86 (сверху) и CD70 (снизу) на поверхности ДК здорового добровольца

ДК, полученные от больных ХГС, также экспрессировали на своей поверхности большое количество ко-стимуляторных молекул. Так при фенотипировании незрелых ДК установлено, что маркеры CD80, CD86 и CD40 присутствовали на поверхности  $57,32 \pm 9,91\%$ ,  $74,76 \pm 12,27\%$  и  $67,65 \pm 9,48\%$  клеток, соответственно. Доля незрелых ДК, экспрессирующих на своей поверхности ко-стимуляторные молекулы CD70 и CD252 составила  $81,31 \pm 9,32\%$  и  $40,34 \pm 4,43\%$ . Интересно, что в группе больных ХГС доля CD80+ незрелых ДК была статистически значимо выше, чем в контрольной группе ( $57,32 \pm 9,91\%$  против  $49,07 \pm 12,78\%$ ,  $p < 0,05$ ), в то время как доля CD252+ незрелых ДК, напротив – ниже, чем в контрольной группе ( $40,34 \pm 4,43\%$  против  $49,19 \pm 9,33\%$ ,  $p < 0,01$ ) (рисунок 14).

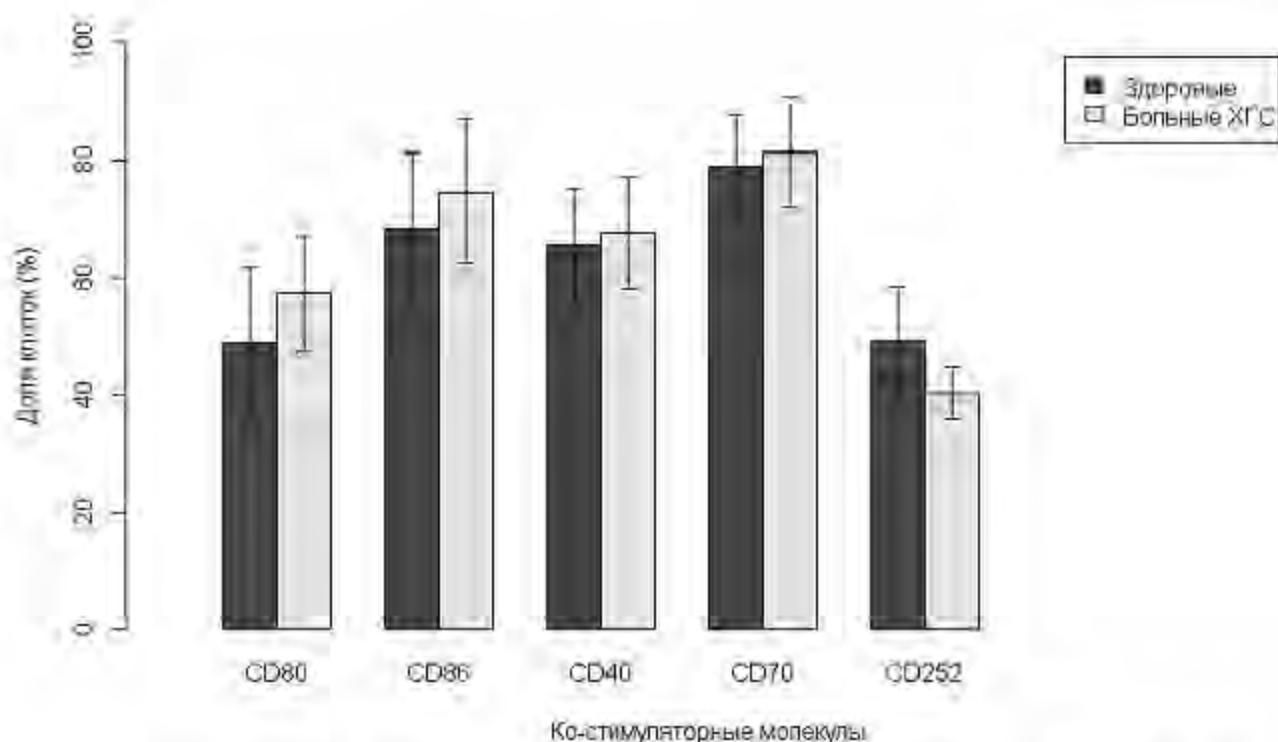


Рисунок 14 – Фенотипическая характеристика незрелых ДК ( $M \pm S$ )

Созревание ДК, полученных от больных ХГС, также сопровождалось характерными фенотипическими изменениями. Так доля зрелых ДК, экспрессирующих CD80 увеличилась до  $63,35 \pm 10,33\%$  ( $p < 0,01$ ), CD86 увеличилась до  $82,7 \pm 7,83\%$  ( $p < 0,01$ ), а CD40 до  $72,18 \pm 10,55\%$  ( $p < 0,01$ ).

Средние значения доли зрелых CD70+ и CD252+ ДК также выросли до  $88,49 \pm 6,77\%$  ( $p < 0,01$ ) и  $41,49 \pm 7,41\%$ , соответственно (рисунок 15).

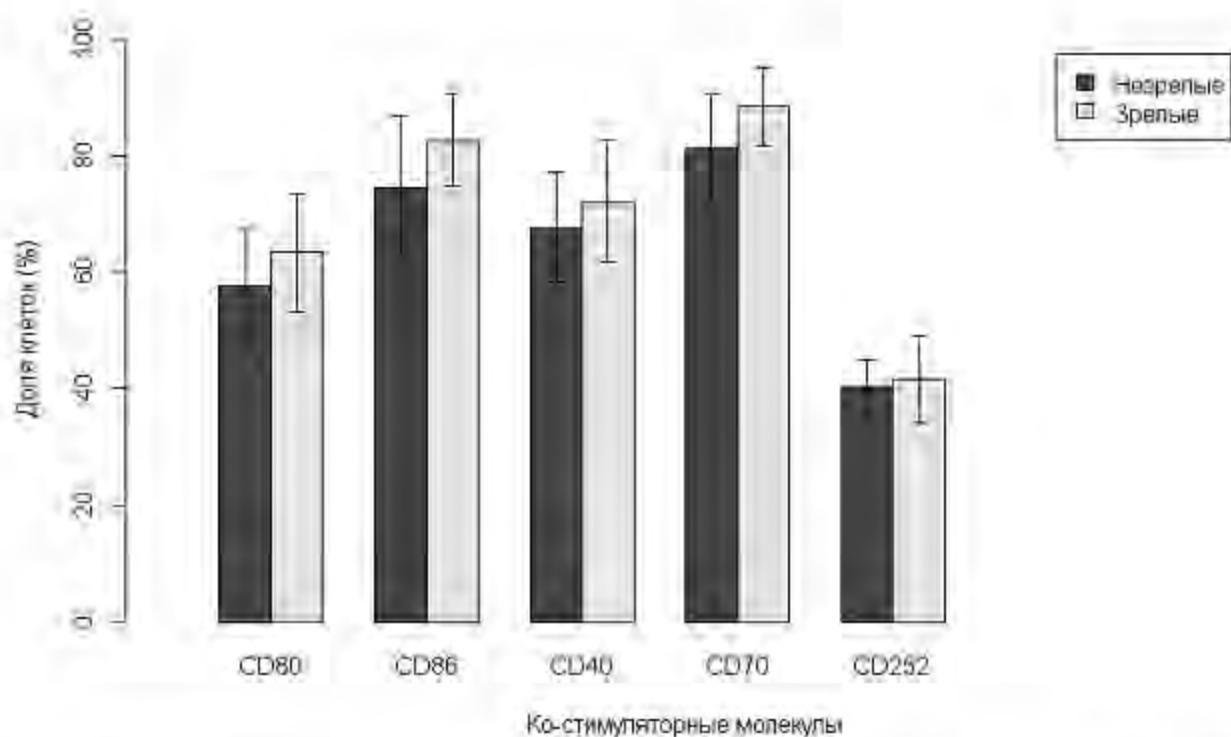


Рисунок 15 – Фенотипическая характеристика ДК пациентов с ХГС ( $M \pm S$ )

Установлено, что в группе больных ХГС доли CD80+ и CD86+ зрелых ДК были статистически значимо выше, чем в контрольной группе, составив  $63,35 \pm 10,33\%$  против  $52,69 \pm 13,30\%$  ( $p < 0,05$ ) и  $82,70 \pm 7,83\%$  против  $75,34 \pm 9,71\%$  ( $p < 0,05$ ), соответственно. В то же время доля CD252+ зрелых ДК, напротив – была существенно ниже, чем в контрольной группе, составив  $41,49 \pm 7,41\%$  против  $48,15 \pm 10,41\%$  ( $p < 0,05$ ) (рисунок 16).

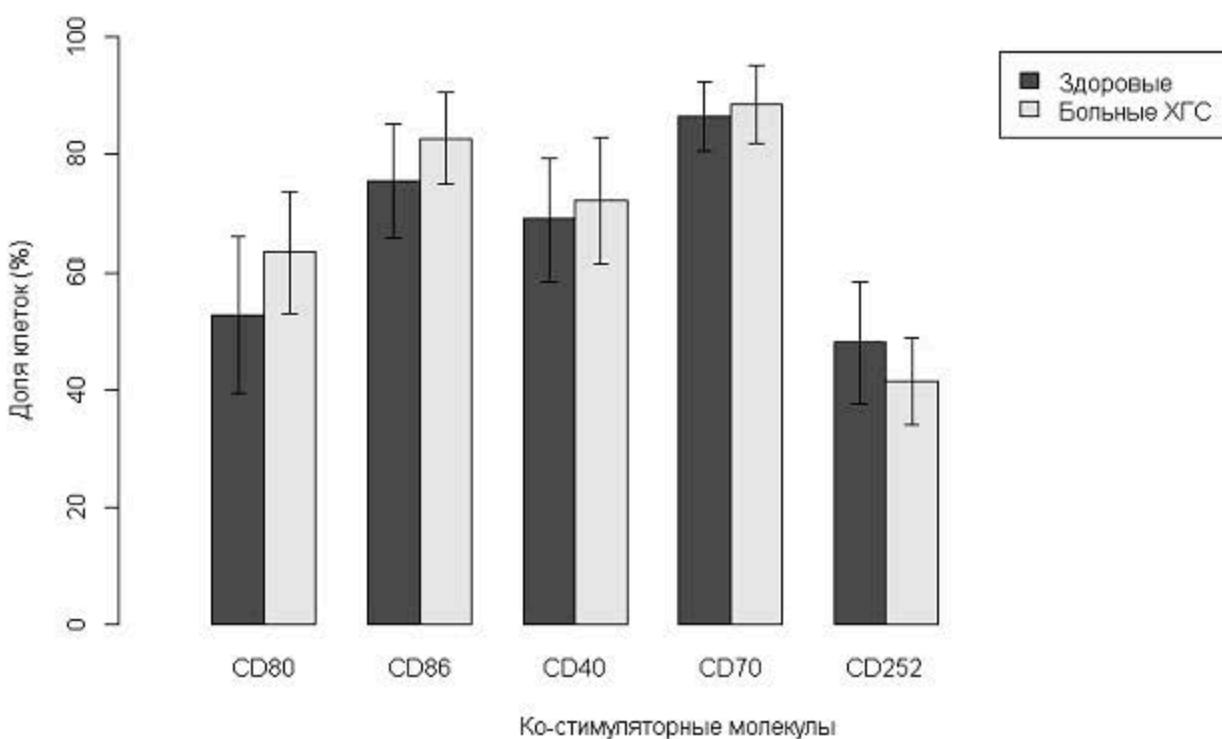


Рисунок 16 – Фенотипическая характеристика зрелых ДК ( $M \pm S$ )

Созревание ДК, полученных от больных ХГС, также как в контрольной группе, сопровождалось увеличением уровней экспрессии CD80 ( $p < 0,05$ ), CD86 ( $p < 0,01$ ) и CD70 ( $p < 0,01$ ) (рисунок 17).

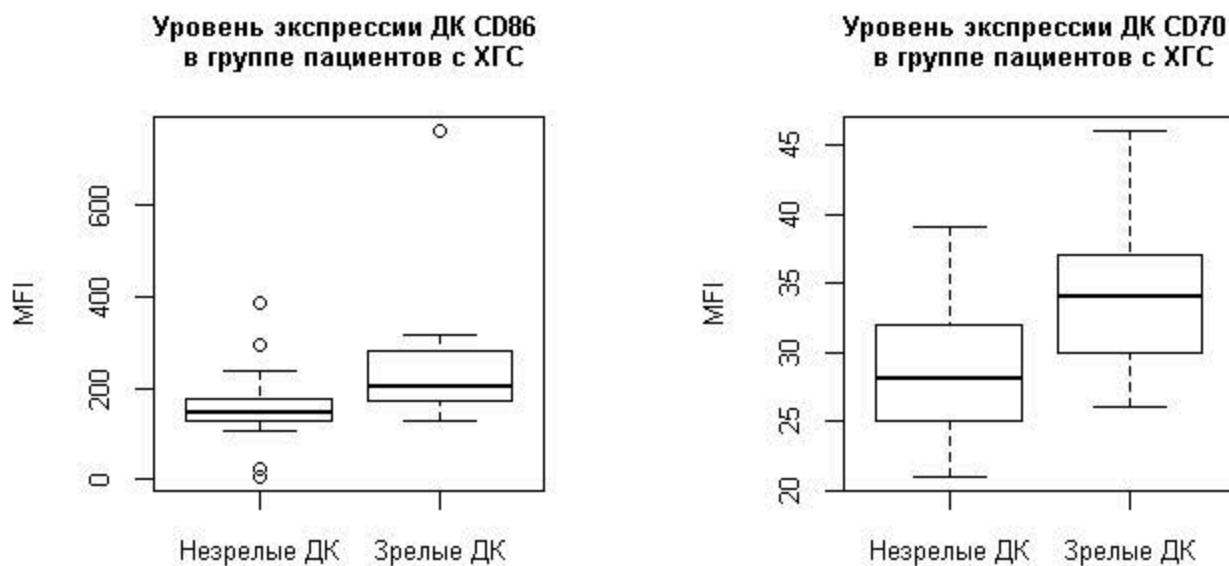


Рисунок 17

Интересно, что статистически значимые отличия уровней экспрессии ко-  
стимуляторных молекул на поверхности ДК, выделенных от здоровых  
добровольцев и больных ХГС, были получены лишь для CD70 и CD252.  
Установлено, что значения средней интенсивности флуоресценции CD70 и CD252  
на поверхности незрелых ДК были статистически значимо выше, чем в  
контрольной группе, составив 28,00 против 22,50 ( $p < 0,05$ ) и 326,50 против 132,50  
( $p < 0,01$ ), соответственно (рисунок 18).

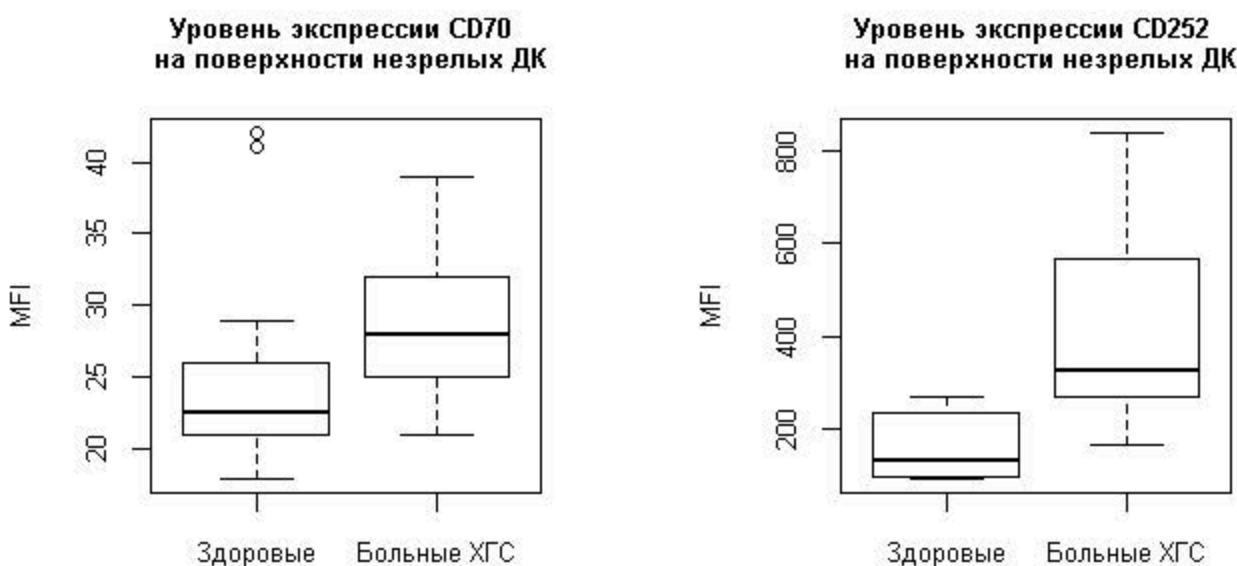


Рисунок 18

Зрелые ДК также характеризовались более высокими, чем в контрольной группе, уровнями экспрессии CD70 (34,00 против 26,50,  $p < 0,05$ ) и CD252 (309,00 против 135,50,  $p < 0,01$ ), а также более высоким уровнем экспрессии CD86 (203,50 против 168,00,  $p < 0,05$ ) (Рисунок 19).

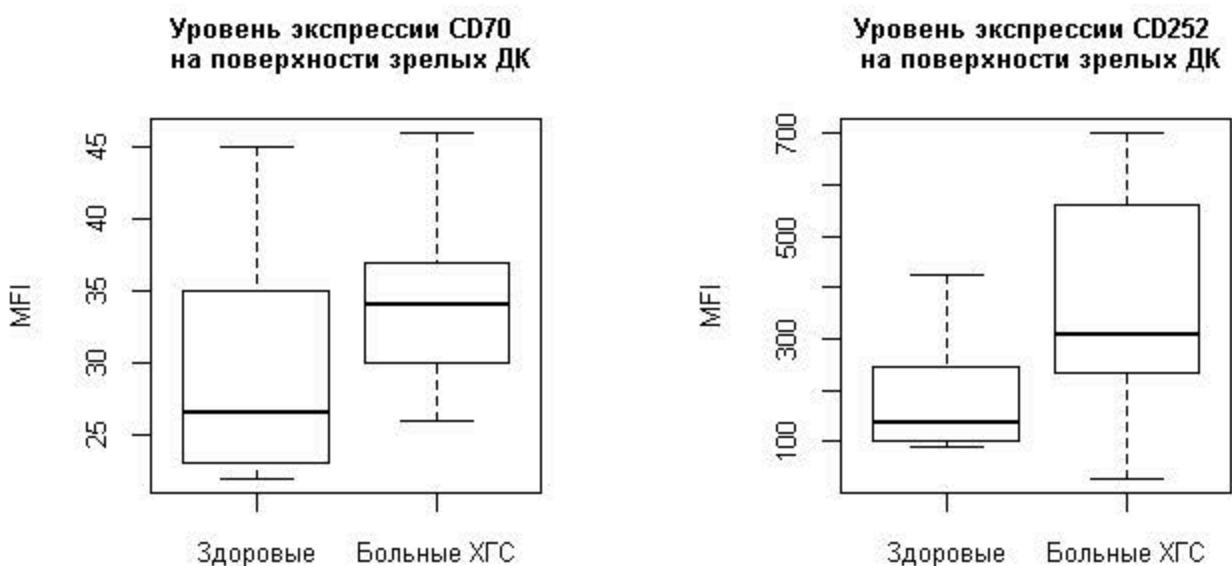


Рисунок 19

Корреляционный анализ полученных данных позволил установить обратную среднюю достоверную корреляционную связь между уровнем экспрессии CD86 на поверхности незрелых ДК и уровнем альбумина в сыворотке крови больных ХГС ( $r_{xy} = -0,42$ ,  $p < 0,05$ ), а также уровнем холестерина ( $r_{xy} = -0,42$ ,  $p < 0,05$ ) и уровнем ЛПНП ( $r_{xy} = -0,39$ ,  $p < 0,05$ ). Кроме того выявлена обратная средняя достоверная корреляционная связь между уровнем ГТГП в сыворотке крови больных ХГС и уровнями экспрессии на поверхности незрелых ДК CD80 ( $r_{xy} = -0,47$ ,  $p < 0,05$ ) и CD40 ( $r_{xy} = -0,51$ ,  $p < 0,05$ ).

Анализ данных, полученных в результате фенотипирования зрелых ДК, позволил установить обратную среднюю достоверную корреляционную связь между уровнем экспрессии CD40 на поверхности зрелых ДК и уровнем «вирусной нагрузки» у больных ХГС ( $r_{xy} = -0,49$ ,  $p < 0,05$ ). Интересно, что уровень амилазы в сыворотке крови больных ХГС обратно коррелировал с такими фенотипическими показателями, как доля CD80+ зрелых ДК ( $r_{xy} = -0,56$ ,  $p < 0,01$ ) и доля CD40+ зрелых ДК ( $r_{xy} = -0,53$ ,  $p < 0,01$ ) (рисунок 20).

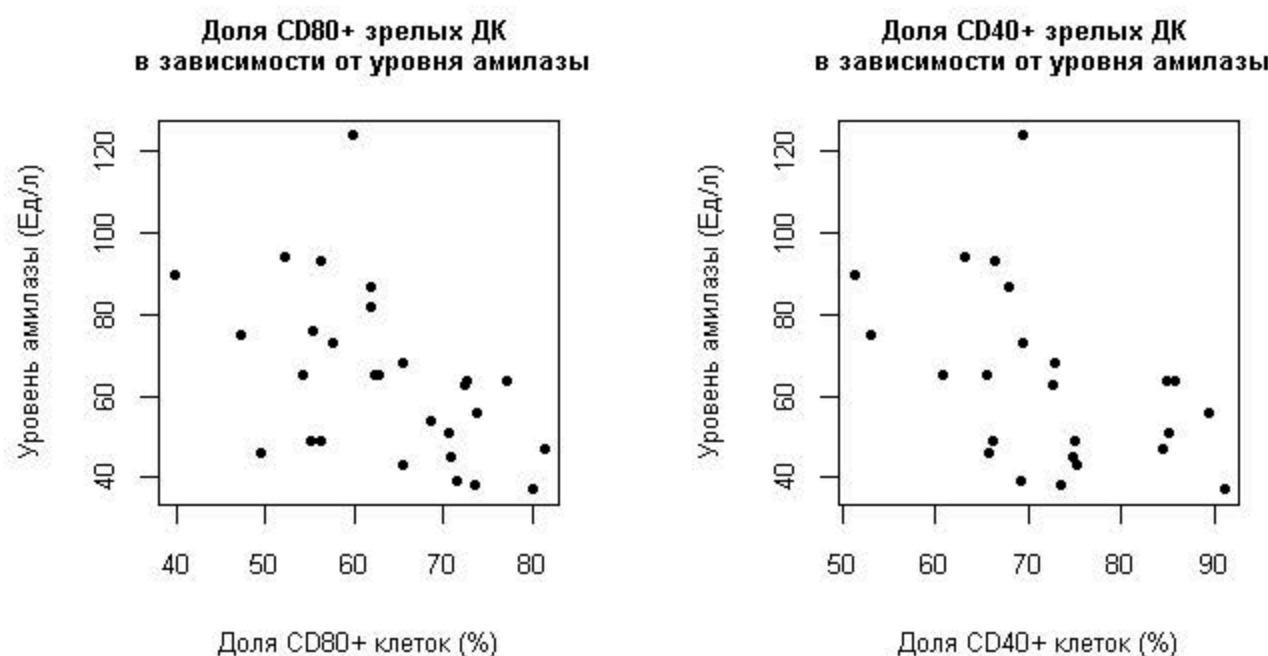


Рисунок 20

Дисперсионных анализ полученных данных позволил выявить влияние таких факторов как степень фиброза печени и уровень «вирусной нагрузки» на некоторые показатели ко-стимуляторной активности ДК, полученных от больных ХГС. Так среди больных с минимальной степенью фиброза печени доля CD80+ зрелых ДК составила  $66,60 \pm 8,71\%$ , в то время как среди пациентов с выраженным фиброзом / циррозом печени среднее значение этого показателя было существенно ниже и составило  $57,50 \pm 10,85$  ( $p < 0,05$ ) (рисунок 21). Кроме того установлено, что в подгруппе больных с низкой «вирусной нагрузкой» средний уровень экспрессии CD40 на поверхности зрелых ДК был существенной выше ( $p < 0,05$ ), чем среди пациентов с высокой «вирусной нагрузкой», составив по медиане 66,00 (интерквартильная широта от 57,00 до 85,50) против 51,00 (интерквартильная широта от 46,00 до 54,00), соответственно.

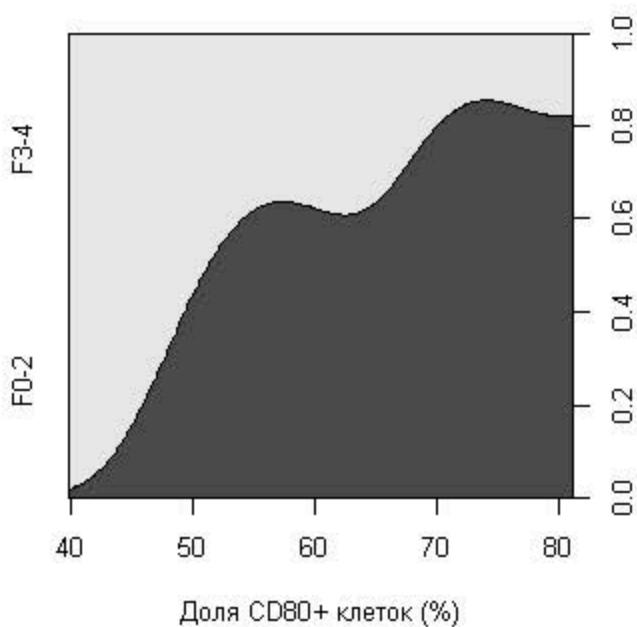


Рисунок 21 – Вероятность наблюдения F 0 – 2 и F 3 – 4 у больных ХГС при различных показателях доли CD80+ зрелых ДК

Таким образом, в результате оценки способности ДК к передаче ко-стимуляторных сигналов установлено, что по уровню экспрессии наиболее хорошо изученных ко-стимуляторных молекул CD80 CD86 и CD40 незрелые ДК, полученные от больных ХГС, не отличались от ДК, полученным от здоровых добровольцев. Созревание ДК как в контрольной, так и в исследуемой группе, сопровождалось увеличением доли клеток, экспрессирующих эти маркеры, и увеличением средней интенсивности флуоресценции CD80 и CD86. Незрелые ДК больных ХГС по экспрессии ко-стимуляторных молекул CD80, CD86, CD 40 и CD70 соответствовали зрелым ДК контрольной группы, что может свидетельствовать о более ранней активации созревания этих клеток, обусловленной наличием ВГС. Зрелые ДК, полученные от больных ХГС, характеризовались более высоким содержанием CD80+ и CD86+ клеток, чем соответствующие показатели в контрольной группе. Изучение уровней экспрессии дополнительных ко-стимуляторных молекул CD70 и CD252 позволило выявить вероятные функциональные дефекты ко-стимуляторной активности ДК у больных ХГС. Установлено, что ДК у больных ХГС характеризуются существенно более высоким уровнем экспрессии на своей поверхности CD70 и CD252, чем ДК,

полученные от здоровых добровольцев. Так средний уровень экспрессии CD252 на поверхности ДК у больных ХГС более чем в 2 раза превышал соответствующий показатель у здоровых добровольцев, что, вероятно, характеризует способность этих клеток к поляризации иммунного ответа по Th 2 типу.

Фенотипические показатели ко-стимуляторной активности ДК у больных ХГС наиболее часто обратно коррелировали с такими показателями биохимического анализа крови, как уровень ГГТП, амилазы, альбумина, холестерина и ЛПНП. Кроме того показано, что главными клиническими факторами влияющими на уровень экспрессии ко-стимуляторных молекул на поверхности ДК у больных ХГС являются степень фиброза печени и уровень «вирусной нагрузки».

### 3.2.5 Оценка способности дендритных клеток к передаче ко-ингибирующих молекулярных сигналов

Развитие иммунной толерантности к антигенным структурам белков ВГС играет ключевую роль в иммунопатогенезе ХГС и обуславливает хроническое малосимптомное течение болезни и длительную персистенцию вируса. Изучение механизмов формирования иммунной толерантности у больных ХГС в первую очередь требует оценки функциональной активности ДК с определением уровней экспрессии на их поверхности ко-ингибирующих молекул CD273 и CD274. Такие ингибирующие молекулярные сигналы приводят к подавлению активности и пролиферации антигенспецифических клонов Т-лимфоцитов (Т-хелперов и ЦТЛ), а также к дифференцировке наивных Т-лимфоцитов в индуцибелльные Т-регуляторные клетки с последующим развитием иммунной толерантности.

Средние значения, характеризующие ко-ингибирующую активность ДК, полученных от здоровых добровольцев и больных ХГС, приведены в таблице 11.

Таблица 11 – Фенотипическая характеристика ДК. Ко-ингибирующие молекулы

Показатели	Здоровые добровольцы		Больные ХГС	
	Незрелые ДК	Зрелые ДК	Незрелые ДК	Зрелые ДК
CD273+, M ± S, %	68,84 ± 8,87	66,74 ± 8,41	77,79 ± 8,38	78,25 ± 6,99
CD273, Me (LQ – HQ), MFI	22,00 (21,00 – 23,75)	21,50 (19,25 – 23,75)	31,00 (28,00 – 33,00)	31,00 (27,75 – 32,25)
CD274+, M ± S, %	70,85 ± 9,63	76,75 ± 8,98	75,43 ± 13,63	82,41 ± 8,56
CD274, Me (LQ – HQ), MFI	23,00 (21,25 – 24,75)	25,50 (22,75 – 28,50)	30,00 (28,00 – 33,00)	33,00 (29,00 – 40,25)

Примечание: MFI (*mean fluorescence intensity*) – средняя интенсивность флуоресценции

Установлено, что ко-ингибирующие молекулы CD273 и CD274 на своей поверхности экспрессировали подавляющее большинство как незрелых, так и зрелых ДК, полученных от здоровых добровольцев. Средние значения доли CD273+ и CD274+ незрелых ДК в контрольной группе составили 68,84 ± 8,87 % и 70,85 ± 9,63 %, соответственно. При созревании доля CD273+ клеток существенно не менялась и составляла 66,74 ± 8,41 %, в то время как доля CD274+ клеток выросла до 76,75 ± 8,98 % (p < 0,01) (рисунок 22).

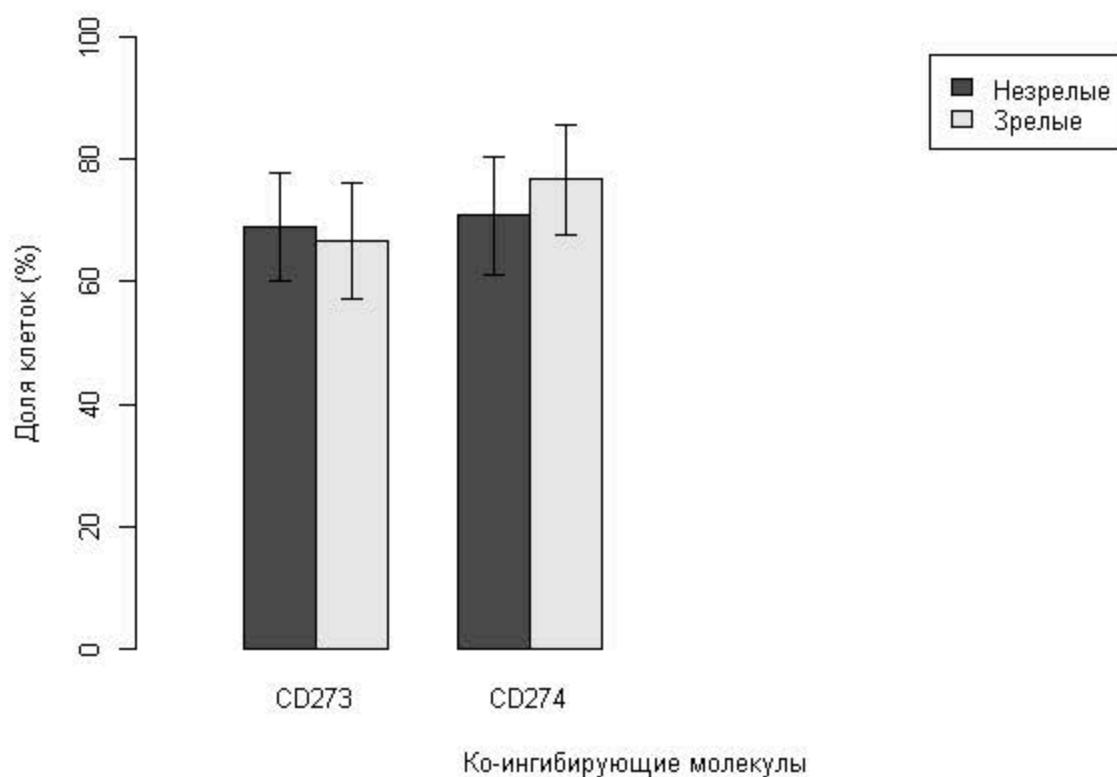


Рисунок 22 – Фенотипическая характеристика ДК здоровых добровольцев ( $M \pm S$ )

Значения средней интенсивности флуоресценции CD273 и CD274 на поверхности незрелых ДК в контрольной группе были низкими и составили 22,00 и 23,00, соответственно. При созревании ДК значения средней интенсивности флуоресценции CD273 и CD274 существенно не менялись и составляли 21,50 и 25,50, соответственно.

Подавляющее большинство незрелых и зрелых ДК, полученных от больных ХГС, также экспрессировали на своей поверхности ко-ингибирующие молекулы CD273 и CD274 (Рисунок 23).

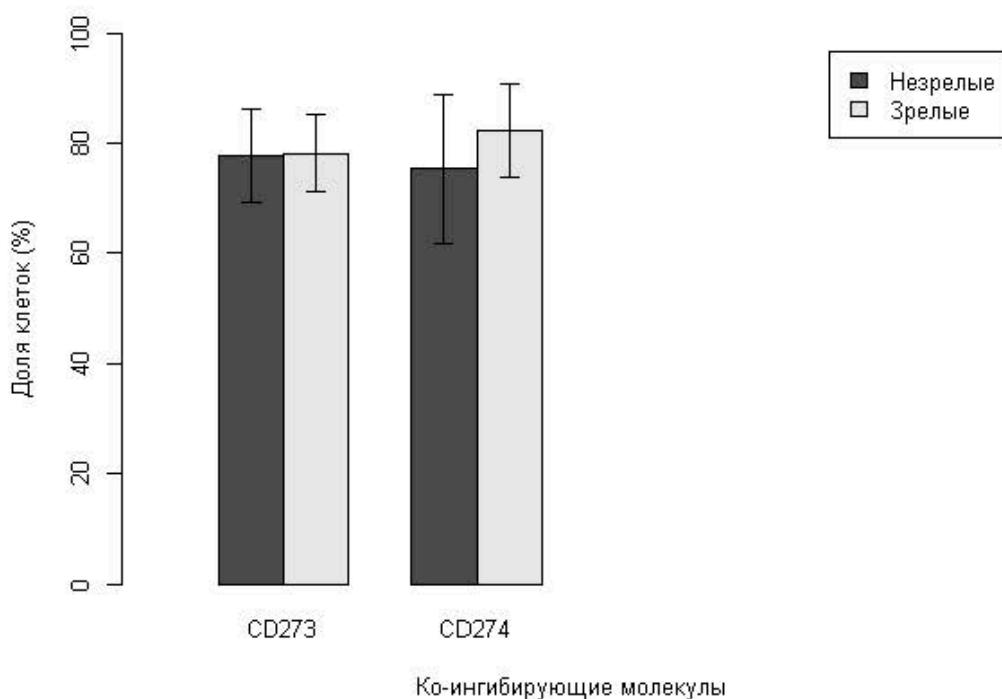


Рисунок 23 – Фенотипическая характеристика ДК пациентов с ХГС ( $M \pm S$ )

Вместе с тем средние значения доли CD273+ и CD274+ незрелых ДК в исследуемой группе были выше, чем в контрольной, и составляли  $77,79 \pm 8,38\%$  против  $68,84 \pm 8,87\%$  ( $p < 0,01$ ) и  $75,43 \pm 13,63\%$  против  $70,85 \pm 9,63\%$ , соответственно (рисунок 24).

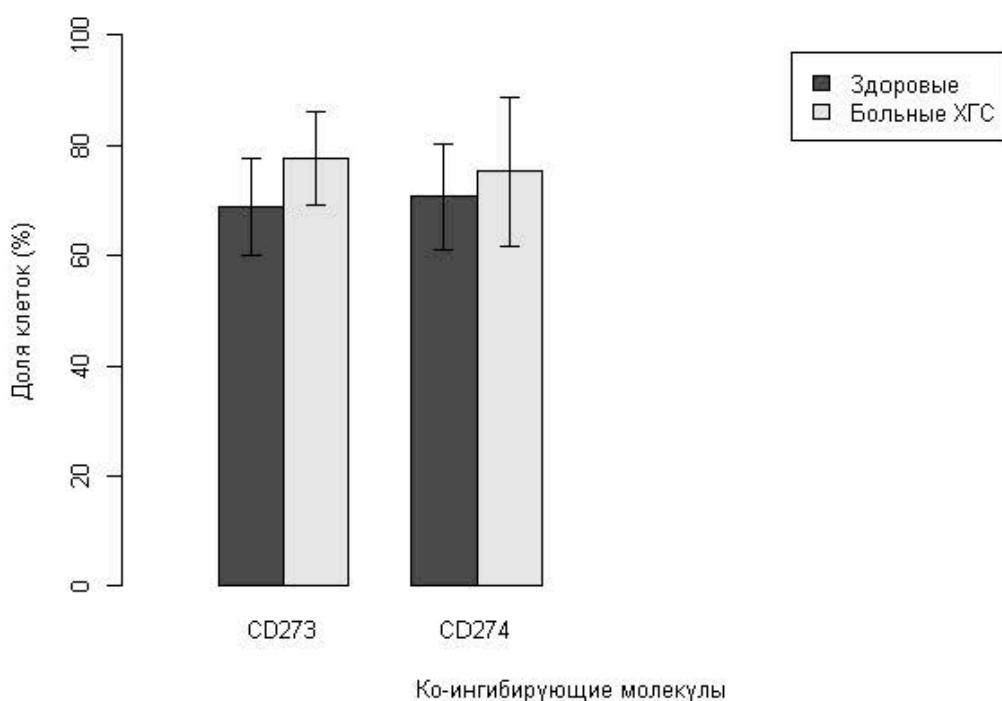


Рисунок 24 – Фенотипическая характеристика незрелых ДК ( $M \pm S$ )

При созревании доля CD273+ ДК существенно не менялась и составляла  $78,25 \pm 6,99\%$ , что было статистически значимо выше, чем в контрольной группе ( $p < 0,01$ ), а доля CD274+ клеток увеличилась до  $82,41 \pm 8,56\%$  ( $p < 0,05$ ) (рисунок 25).

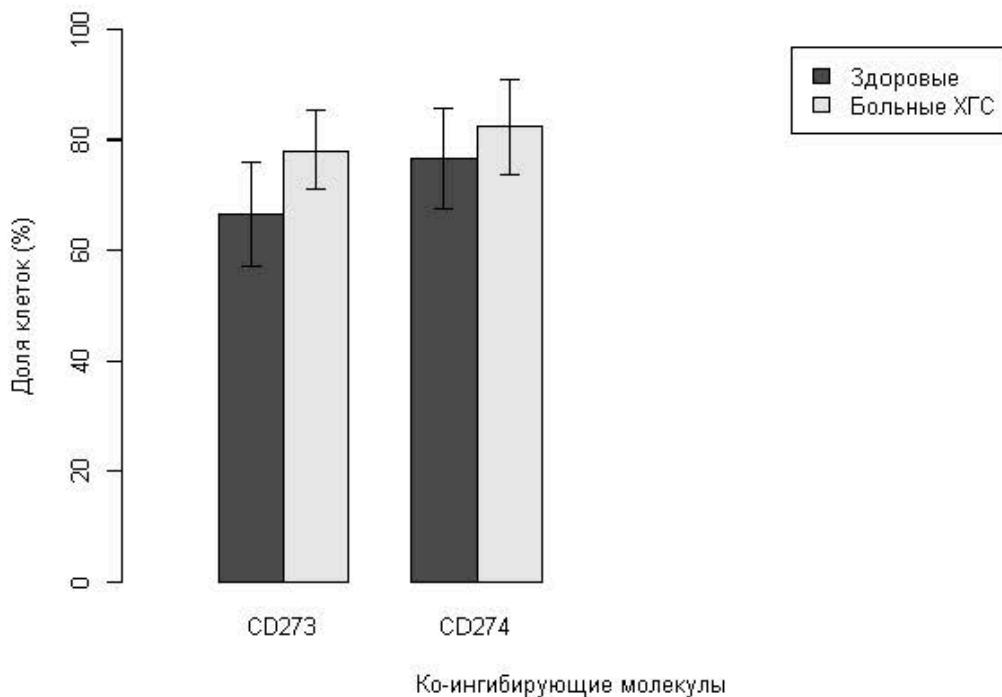


Рисунок 25 – Фенотипическая характеристика зрелых ДК ( $M \pm S$ )

Значения средней интенсивности флуоресценции ко-ингибирующих молекул CD273 и CD274 на поверхности незрелых ДК, полученных от больных ХГС, были существенно выше, чем в контрольной группе, и составили 31,00 и 30,00 против 22,00 и 23,00, соответственно (рисунок 26).

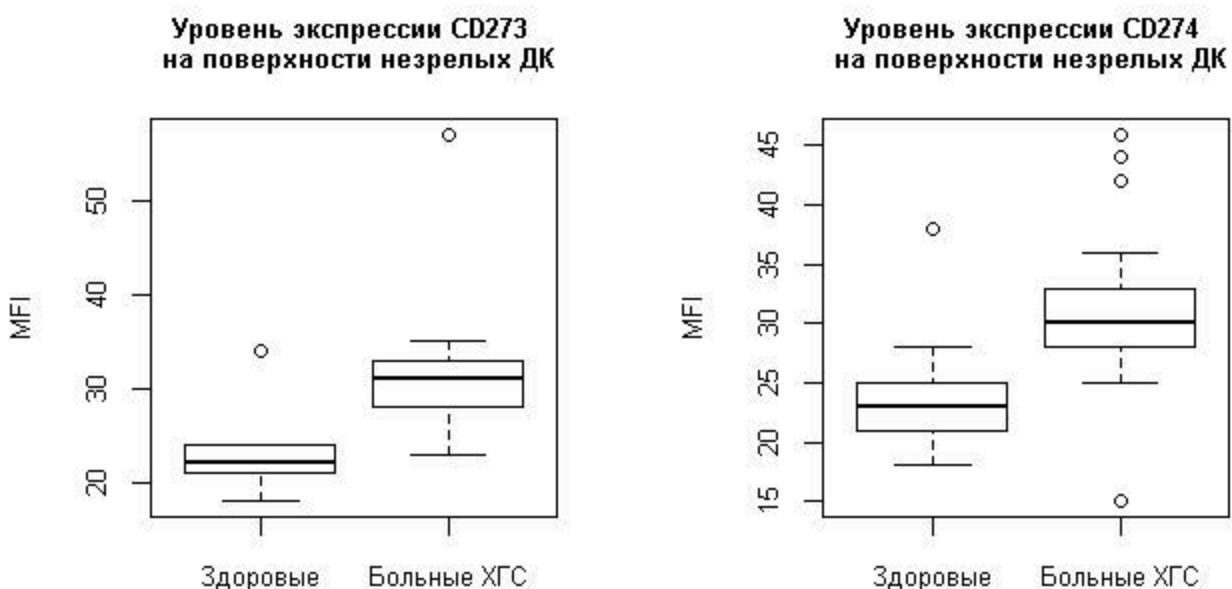


Рисунок 26

При созревании ДК, полученных от больных ХГС, значения средней интенсивности флуоресценции ко-ингибирующих молекул существенно не менялись. Однако средние уровни экспрессии CD273 и CD274 на поверхности зрелых ДК у больных ХГС были статистически значимо выше, чем в контрольной группе, и составляли 31,00 против 21,50 ( $p < 0,01$ ) и 33,00 против 25,50 ( $p < 0,01$ ), соответственно (рисунок 27).

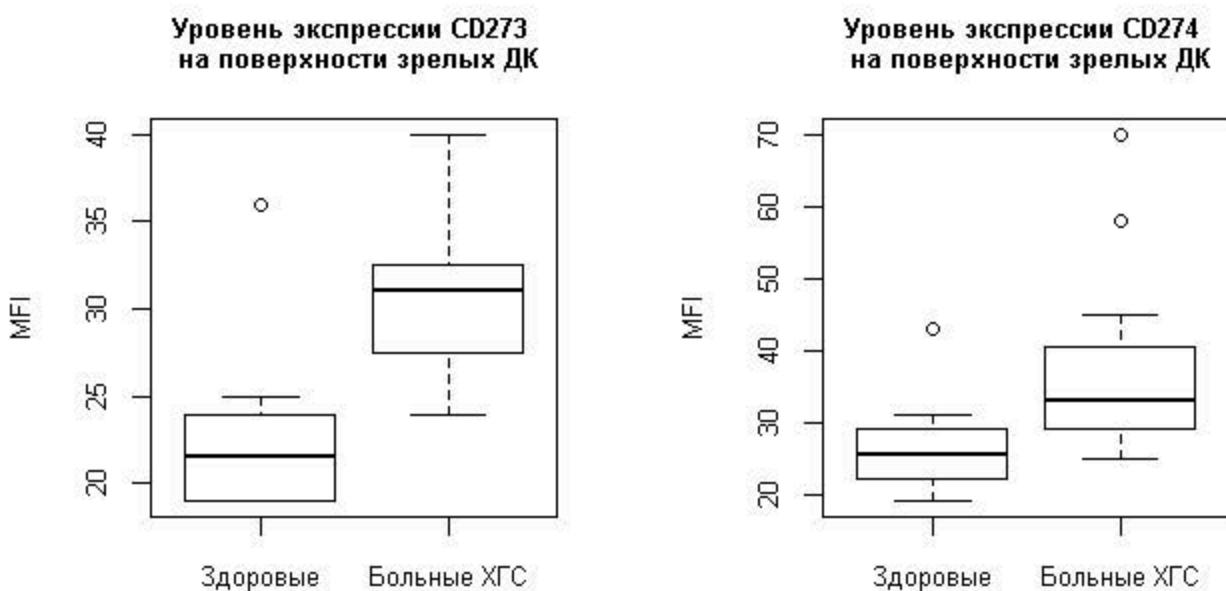


Рисунок 27

Корреляционный анализ полученных данных позволил установить обратную среднюю достоверную корреляционную связь между уровнем экспрессии CD273 на поверхности незрелых ДК и уровнем ГТГП в сыворотке крови больных ХГС ( $r_{xy} = -0,48$ ,  $p < 0,01$ ). Кроме того выявлена прямая средняя достоверная корреляционная связь между уровнем CD274 на поверхности зрелых ДК и уровнем тромбоцитов у больных ХГС ( $r_{xy} = 0,44$ ,  $p < 0,05$ ). Корреляционный анализ между уровнем экспрессии ко-ингибирующих молекул и уровнями экспрессии других функциональных молекул на поверхности незрелых ДК позволил выявить несколько достоверных связей. Установлена прямая сильная достоверная корреляционная связь между значениями доли CD274+ и CD195+ незрелых ДК ( $r_{xy} = 0,9$ ,  $p < 0,01$ ), а также значениями доли CD273+ и CD252+ незрелых ДК ( $r_{xy} = 0,63$ ,  $p < 0,01$ ). Значения средней интенсивности флуоресценции CD273 достоверно коррелировали с уровнями экспрессии на поверхности незрелых ДК CD70 ( $r_{xy} = 0,75$ ,  $p < 0,01$ ) и CD80 ( $r_{xy} = 0,85$ ,  $p < 0,01$ ). Значения средней интенсивности флуоресценции CD274, в свою очередь, достоверно коррелировали с уровнями экспрессии CD40 ( $r_{xy} = 0,73$ ,  $p < 0,01$ ) и

CD80 ( $r_{xy} = 0,72$ ,  $p < 0,01$ ).

Анализ данных, полученных в результате фенотипирования зрелых ДК, позволил установить обратную среднюю достоверную корреляционную связь между уровнем амилазы в сыворотке крови и долей как CD273+ ( $r_{xy} = -0,43$ ,  $p < 0,05$ ), так и CD274+ ( $r_{xy} = -0,38$ ,  $p < 0,05$ ) клеток. Выявлена прямая сильная корреляционная связь между показателями доли зрелых ДК CD274+ и CD195+ ( $r_{xy} = 0,78$ ,  $p < 0,01$ ), CD274+ и CD70+ ( $r_{xy} = 0,71$ ,  $p < 0,01$ ), CD274+ и CD80+ ( $r_{xy} = 0,73$ ,  $p < 0,01$ ), а также показателями доли зрелых ДК CD273+ и CD195+ ( $r_{xy} = 0,67$ ,  $p < 0,01$ ) (рисунок 28), CD273+ и CD70+ ( $r_{xy} = 0,69$ ,  $p < 0,01$ ), CD273+ и CD80+ ( $r_{xy} = 0,65$ ,  $p < 0,01$ ).

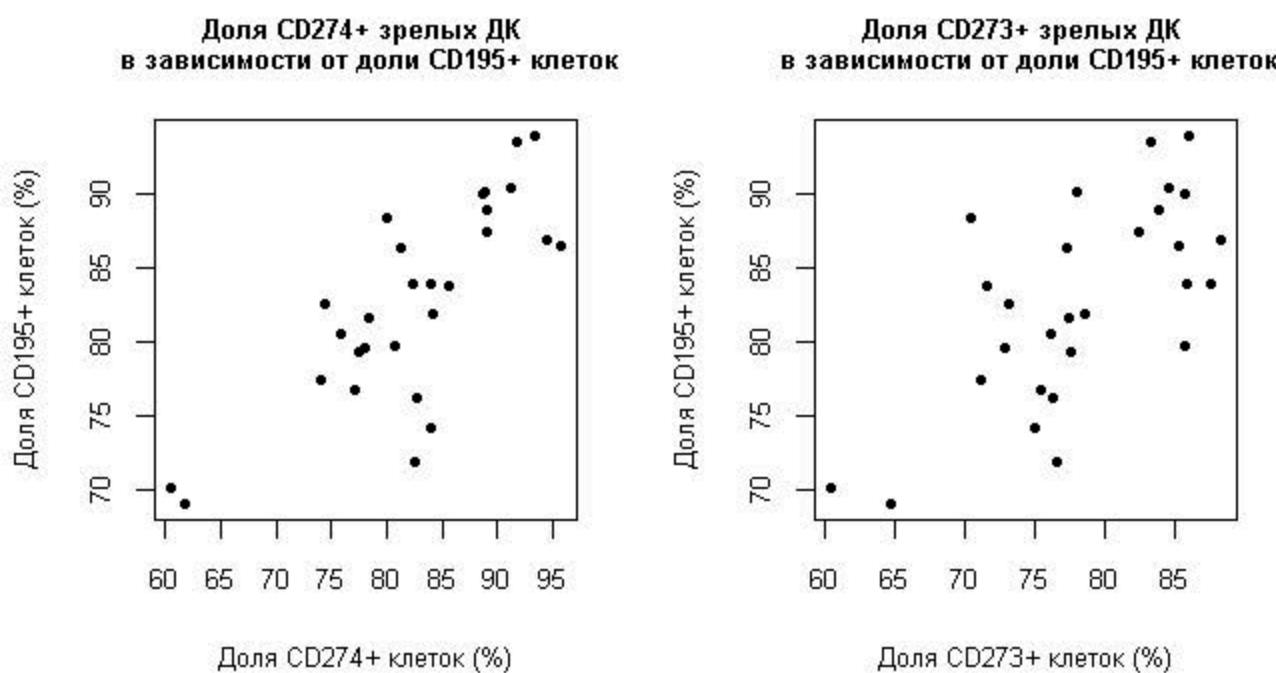


Рисунок 28

Значения средней интенсивности флуоресценции CD273 достоверно коррелировали с уровнем экспрессии на поверхности зрелых ДК CD80 ( $r_{xy} = 0,65$ ,  $p < 0,01$ ) (рисунок 29). Значения средней интенсивности флуоресценции CD274, в свою очередь, достоверно коррелировали с уровнями экспрессии CD40 ( $r_{xy} = 0,64$ ,  $p < 0,01$ ) и CD80 ( $r_{xy} = 0,6$ ,  $p < 0,01$ ) (рисунок 29).

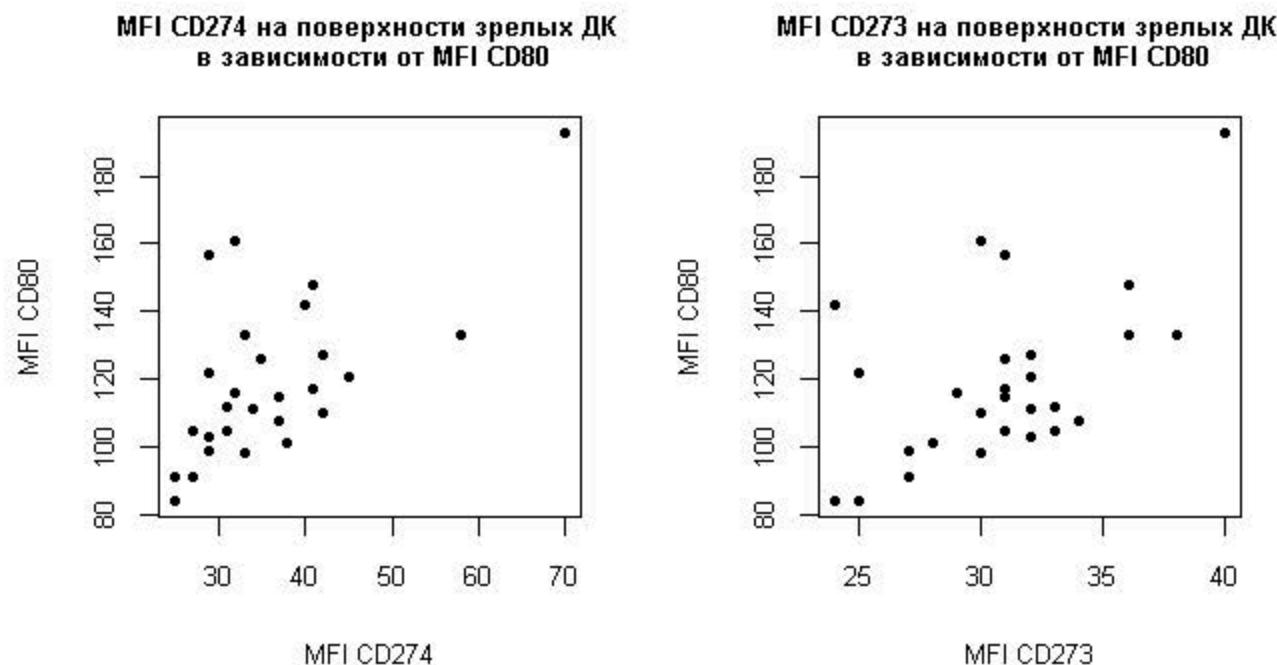


Рисунок 29

Дисперсионных анализ полученных данных позволил выявить влияние стадии фиброза печени на фенотипические показатели ко-ингибирующей активности ДК. Установлено, что более высокие значения средней интенсивности флуоресценции CD274 на поверхности незрелых ДК чаще наблюдались у больных с низкой степенью фиброза печени ( $p < 0,05$ ). Кроме того у данной категории больных на поверхности зрелых ДК наблюдались и более высокие уровни экспрессии CD273, чем среди пациентов с выраженным фиброзом / циррозом печени ( $p < 0,05$ ) (рисунок 30).

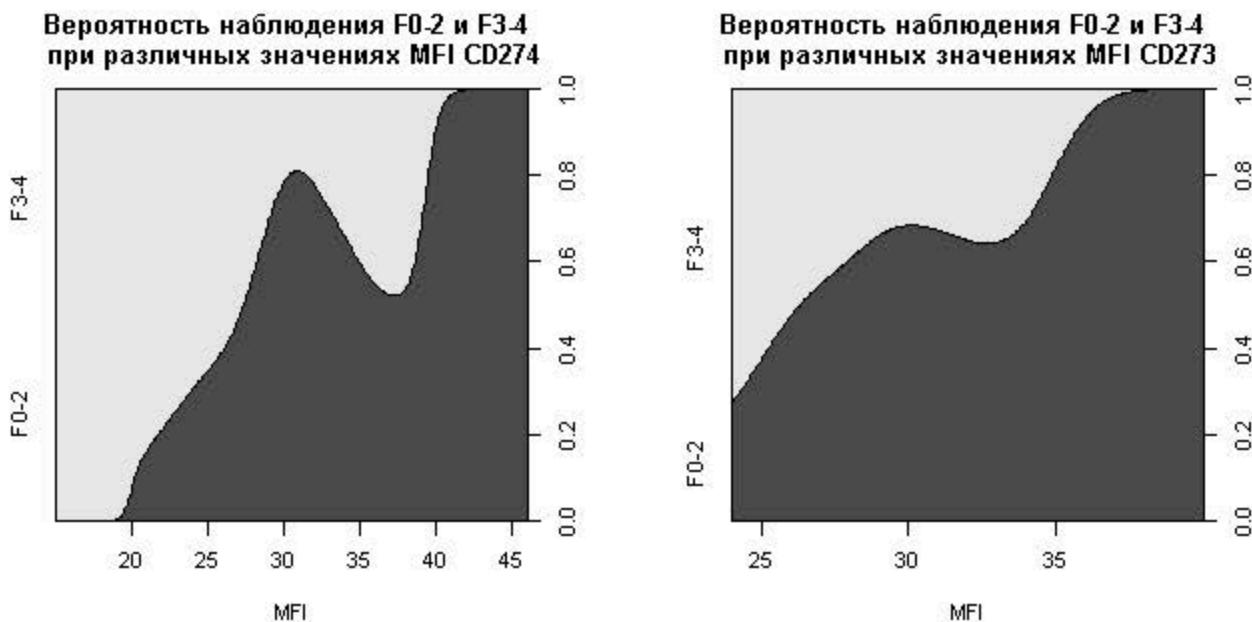


Рисунок 30

Таким образом, в результате оценки способности ДК к передаче ко-ингибирующих молекулярных сигналов установлено, что как незрелые, так и зрелые ДК больных ХГС характеризуются более высокими, чем в контрольной группе, уровнями экспрессии CD273 и CD274. Увеличение доли CD273+ CD274+ ДК у больных ХГС сопровождается существенным увеличением уровней экспрессии этих ко-ингибирующих молекул на поверхности незрелых и зрелых ДК. Показано, что зрелые ДК больных ХГС обладают более выраженной способностью к ингибированию активации и пролиферации Т-лимфоцитов, чем ДК здоровых добровольцев. Полученные данные также свидетельствуют и о том, что оценка функциональной активности ДК у больных ХГС не может проводиться без оценки активности ко-ингибирующих сигналов.

### 3.2.6 Использование интерферона гамма в качестве молекулярного агента, нормализующего функциональную активность дендритных клеток

Известно, что ИНФ- $\gamma$  обладает выраженным иммуномодулирующим действием, является индуктором клеточного звена иммунитета и относится к основным провоспалительным цитокинам. Роль ИНФ- $\gamma$  в регуляции факторов врожденного иммунного ответа является ключевой в реализации иммунной защиты нашего организма. ИНФ- $\gamma$ , продуцируемый в большом количестве на этапе развития приобретенного иммунного ответа, может оказывать повторное стимулирующее действие на клетки, участвующие в реализации неспецифической иммунной защиты нашего организма. Так активация АПК ИНФ- $\gamma$  сопровождается повышением на поверхности этих клеток экспрессии адгезивных молекул (ICAM-1, VCAM-1) и хемокинов (IP-10, MCP-1, MIG, MPR-1 $\alpha/\beta$ , RANTES), что обеспечивает миграцию в очаг воспаления других иммунокомпетентных клеток. Кроме того ИНФ- $\gamma$  повышает экспрессию на поверхности АПК молекул гистосовместимости 1 и 2 классов, что необходимо для успешной передачи сигнала другим Т и В-лимфоцитам и для запуска адаптивного иммунного ответа. Если же усиление экспрессии молекул гистосовместимости 1 и 2 классов происходит на инфицированной клетке, она становится более доступной мишенью для последующего разрушения. Под действием ИФН- $\gamma$  происходит созревание плазматоидных дендритных клеток, с последующей продукцией ими большого количества интерферонов 1 типа [Mosca, 2000].

В ряде экспериментов *ex vivo* была доказана возможность применения IFN- $\gamma$  в качестве фактора созревания миелоидных ДК. Было продемонстрировано, что под действием IFN- $\gamma$  существенно повышаются уровни продукции зрелыми ДК IL-12 и IL-6, в то время как уровень продукции IL-10 наоборот снижается [Frasca, 2008]. Кроме того установлено, что в присутствии IFN- $\gamma$  повышается уровень экспрессии на поверхности зрелых ДК хемокинового рецептора CCR7 [Bettelli, 2007], необходимого для миграции в регионарные лимфатические узлы, а также

молекул главного комплекса гистосовместимости 1 и 2 классов [Frasca, 2008].

С целью оценки потенциальной иммунокорригирующей активности IFN- $\gamma$  к культуре ДК, полученных от 14 пациентов с ХГС, был применен альтернативный способ индукции созревания. Кроме липополисахарида в культуру незрелых ДК добавлялся рекомбинантный IFN- $\gamma$  отечественного производства (препарат Ингарон). При изучении экспрессии ко-ингибирующих молекул было установлено, что доли CD273+ и CD274+ зрелых ДК, полученных из одной и той же культуры незрелых ДК различными способами, существенно отличались. Так средние показатели доли CD273+ и CD274+ зрелых ДК, полученных с добавлением IFN- $\gamma$  и без, составляли  $69,33 \pm 2,02\%$  против  $76,08 \pm 1,15\%$  ( $p < 0,05$ ) и  $70,18 \pm 4,41\%$  против  $80,35 \pm 3,5$  ( $p < 0,05$ ), соответственно (рисунок 31).

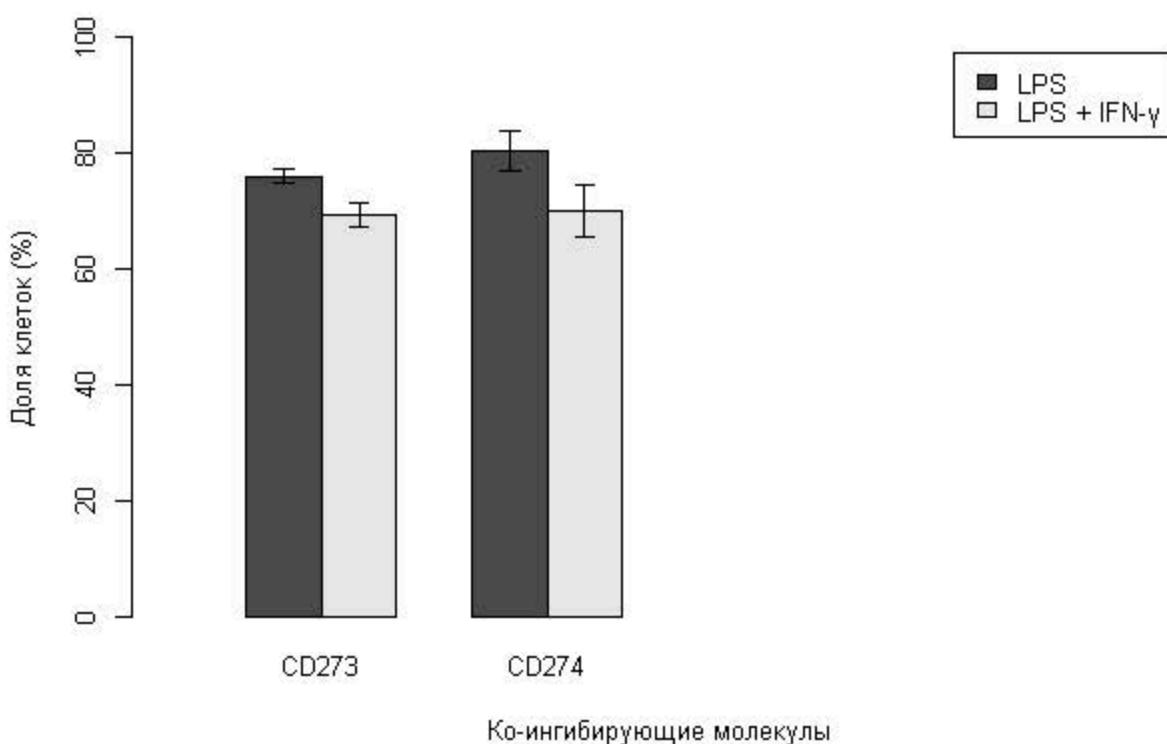


Рисунок 31 – Фенотипическая характеристика зрелых ДК пациентов с ХГС ( $n = 14$ ) в зависимости от способа индукции созревания ( $M \pm S$ )

Средние уровни экспрессии CD273 и CD274 на поверхности зрелых ДК, полученных с добавлением IFN- $\gamma$  и без, также статистически значимо отличались и составляли 29,00 (интерквартильная широта от 28,75 до 29,25) против 32,50

(интерквартильная широта от 31,00 до 34,50),  $p < 0,05$  и 29,00 (интерквартильная широта от 28,00 до 30,50) против 36,00 (интерквартильная широта от 34,50 до 37,00),  $p < 0,01$ , соответственно (рисунок 32).

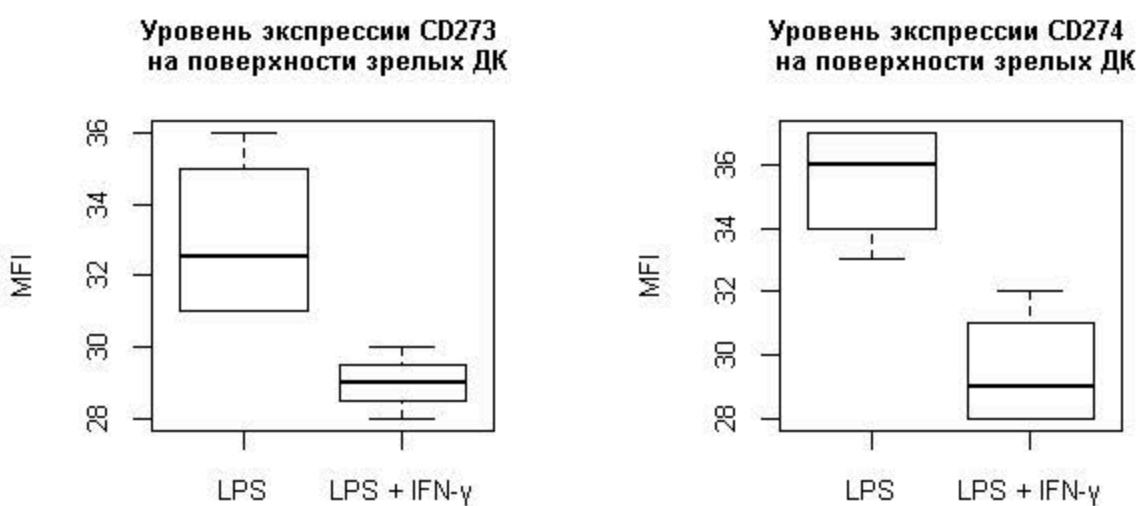


Рисунок 32

Таким образом, было установлено, что добавление в культуру незрелых ДК IFN- $\gamma$  в качестве агента, индуцирующего созревание, способствует снижению ко-ингибирующей активности зрелых ДК у больных ХГС.

### 3.2.7 Включение препарата на основе рекомбинантного интерферона гамма в схему противовирусной терапии больных хроническим гепатитом С

Проведенные исследования позволили установить, что IFN- $\gamma$  является важным молекулярным фактором созревания ДК. Ex vivo в присутствии IFN- $\gamma$  происходит снижение ко-ингибирующей активности зрелых ДК у больных ХГС. Полученные данные позволили обосновать целесообразность включения IFN- $\gamma$  в

качестве третьего препарата в схему лечения больных ХГС. В этой связи было проведено пилотное клиническое исследование по определению терапевтической эффективности данной схемы лечения у больных ХГС с продвинутой стадией фиброза печени. Для выполнения поставленной задачи было отобрано 20 пациентов с ХГС, 1b генотипа, не получавших ранее ПВТ. Все больные были лицами мужского пола с продвинутой стадией фиброза печени (F 3 – 4), низкой и умеренной активностью патологического процесса. Средний возраст пациентов составил  $50,85 \pm 7,61$  лет. Методом случайной выборки пациенты были разделены на 2 группы по 10 человек в каждой: основная группа и группа сравнения. Группу сравнения составили больные ХГС, 1b генотипа (средний возраст  $53,6 \pm 6,29$  лет, средний индекс массы тела  $25,74 \pm 2,70$  кг / м<sup>2</sup>), которым была назначена стандартная ПВТ (цепэгинтерферон альфа – 2b + рибавирин) (таблица 12).

Таблица 12 – Характеристика больных ХГС (n = 10), получавших стандартную ПВТ

№ пациента	Возраст, лет	Рост, см	Вес, кг	Стадия фиброза печени	RNA HCV, МЕ / мл	АЛТ, ЕД / л
1	51	170	82	3	1500000	132
2	59	178	98	4	174000	112
3	62	174	80	3	630000	46
4	58	164	60	4	1000000	100
5	61	170	74	4	493000	39
6	51	171	79	4	1000000	148
7	44	176	81	3	500000	68
8	48	172	74	3	123000	105
9	55	176	70	4	1620000	33
10	47	168	65	4	230000	48

Более чем у половины больных данной группы на старте терапии была выявлена низкая вирусная нагрузка ( $n = 6$ ) и повышение уровня АЛТ ( $n = 8$ ). У 5 из 10 пациентов отмечалось повышение уровня АЛТ более чем в 2 раза от верхней границы нормы. У половины больных наблюдалось снижение показателей свертывающей системы крови. Так тромбоцитопения была выявлена у 5 больных ХГС, а снижение ПТИ – у 4-х пациентов. У 5 пациентов данной группы наблюдалось умеренное повышение уровня общего билирубина. Ни один из пациентов не имел тяжелых сопутствующих заболеваний в стадии декомпенсации.

В основную группу вошли также 10 ранее обследованных нами больных ХГС, 1b генотипа (средний возраст  $48,10 \pm 8,15$  лет, средний индекс массы тела  $27,32 \pm 2,95$  кг / м<sup>2</sup>), которым к стандартной ПВТ (цепэгинтерферон альфа – 2b + рибавирин) был добавлен отечественный препарат на основе рекомбинантного IFN- $\gamma$  (таблица 13).

Таблица 13 – Характеристика больных ХГС ( $n = 10$ ), получавших терапию с включением препарата на основе рекомбинантного IFN- $\gamma$

№ пациента	Возраст, лет	Рост, см	Вес, кг	Стадия фиброза печени	RNA HCV, МЕ / мл	АЛТ, ЕД / л
1	49	172	87	4	5000000	37
2	46	180	95	4	598900	82
3	38	175	80	3	261558	318
4	53	174	86	4	800000	110
5	33	190	105	3	99600	128
6	59	178	98	4	174000	103
7	45	172	78	4	750000	72
8	50	185	72	3	6200000	18
9	50	170	82	4	1500000	132
10	58	164	65	4	240000	100

У большинства больных ХГС основной группы на старте терапии также была выявлена низкая вирусная нагрузка ( $n = 6$ ), у 8 человек отмечалось повышение уровня АЛТ, причем у 7 из них отмечалось повышение уровня АЛТ от верхней границы нормы более чем в 2 раза. У большинства больных наблюдалось снижение показателей свертывающей системы крови. Так снижение уровня тромбоцитов было отмечено у 7 пациентов, а снижение ПТИ у 5 больных ХГС. У 4 из 10 пациентов наблюдалось умеренное повышение уровня общего билирубина. Никто из пациентов данной группы не имел абсолютных противопоказаний к назначению противовирусных препаратов. До начала лечения пациенты обеих групп чаще всего предъявляли жалобы на общую слабость, утомляемость и снижение работоспособности. У абсолютного большинства больных обеих групп выявлялась гепатомегалия, у части пациентов – спленомегалия и наличие малых печеночных знаков (таблица 14).

Таблица 14 – Клинические симптомы у больных ХГС ( $n = 20$ )

Клинические симптомы	Встречаемость признака (абс.)	
	Основная группа ( $n = 10$ )	Группа сравнения ( $n = 10$ )
Слабость	7	6
Утомляемость	7	6
Снижение работоспособности	4	2
Головная боль	1	0
Нарушение сна	1	0
Снижение аппетита	2	2
Тошнота	1	0
Боли в эпигастрии	1	1
Боли и тяжесть в правом подреберье	2	2
Телеангиоэкзазии	3	1
Обложенность языка	7	8
Гепатомегалия	9	10
Сplenомегалия	3	4

Таким образом, в клинической картине заболевания у пациентов обеих групп преобладала субъективная симптоматика, которая укладывалась в клиническую картину астеновегетативного синдрома.

Для лечения больных обеих групп использовались стандартные противовирусные препараты: рибавирин в дозе 15 мг на 1 кг массы тела в сутки в течение 48 недель и цепэгинтерферон альфа-2b ,препарат Альгерон, в дозе 1,5 мг на 1 кг массы тела в неделю в течение также 48 недель. Кроме того пациентам основной группы назначался с первых дней лечения интерферон гамма, препарат Ингарон в дозе 500000 МЕ подкожно через день в течение 12 недель. Наблюдение за больными осуществлялось в динамике в стандартно определенные сроки. Производилась оценка как клинической симптоматики с акцентом на переносимость препаратов и наличие нежелательных явлений. Кроме того изучались данные биохимического и вирусологического обследования для оценки быстрого и раннего вирусологических ответов. Вирусологический ответ оценивался как быстрый при наличии неопределяемого уровня вирусной нагрузки через 4 недели от начала терапии, как ранний – при наличии неопределяемого уровня вирусной нагрузки или снижения уровня вирусной нагрузки более чем на 2 log через 12 недель терапии.

По результатам наблюдения установлено, что быстрый вирусологический ответ был достигнут лишь у 3 из 10 больных ХГС, получавших стандартную ПВТ, а к 12 неделе терапии элиминация возбудителя была достигнута у 5 из 10 обследованных лиц (рисунок 33). Среди больных ХГС, получающих терапию с включение препарата Ингарон, эффективность лечения была существенно выше. Так быстрый вирусологический ответ был достигнут у 6 из 10 пациентов данной группы, а к 12 неделе терапии вирус не определялся уже у 8 из 10 больных ХГС (рисунок 33).

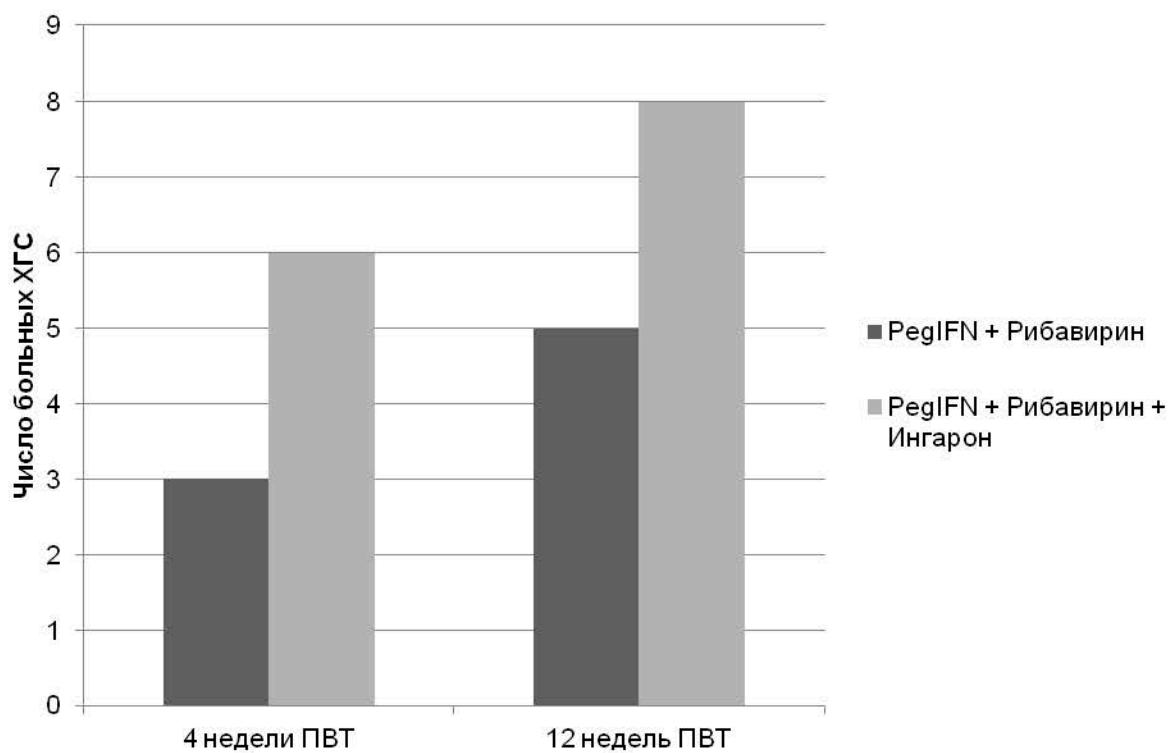


Рисунок 33 – Количество больных ХГС с неопределенным уровнем вирусной нагрузки

Включение препарата Ингарон в комплексную терапию больных ХГС не сопровождалось развитием выраженных нежелательных явлений. Напротив, пациенты, получавшие Ингарон, отмечали улучшение самочувствия: повышение настроения, улучшение аппетита, уменьшение вегетативной симптоматики. В то время как у большинства пациентов из группы сравнения сохранялась выраженная слабость ( $n = 7$ ), утомляемость ( $n = 6$ ) и снижение работоспособности ( $n = 5$ ) (таблица 15).

Таблица 15 – Динамика клинических симптомов у больных ХГС

Клинические симптомы	Встречаемость признака (абс.)			
	Основная группа (n = 10)		Группа сравнения (n = 10)	
	4 недели	12 недель	4 недели	12 недель
Кожный зуд	2	1	2	1
Сухость кожи	1	1	1	1
Слабость	6	4	7	7
Утомляемость	3	4	4	6
Снижение работоспособности	2	2	2	5
Головная боль	1	1	3	2
Нарушения сна	1	2	1	1
Снижение аппетита	1	2	1	1
Тошнота	1	1	1	1
Боли в эпигастрии	1	1	1	1
Боли и тяжесть в правом подреберье	2	1	2	2
Обложенность языка	7	7	8	7
Гепатомегалия	5	2	6	2

При оценке частоты встречаемости нежелательных явлений у больных, получавших противовирусную терапию, установлено, что наиболее часто встречающимися нежелательными симптомами у пациентов обеих групп были лихорадка и алопеция. К 12 неделе терапии у абсолютного большинства больных, получавших Ингарон, температура нормализовалась, и выпадение волос приостановилось, в то время как у 5 человек из группы сравнения лихорадка сохранялась, и наблюдалось прогрессирование алопеции (таблица 16).

Таблица 16 – Нежелательные явления у больных ХГС

Нежелательные явления	Встречаемость признака (абс.)			
	Основная группа (n = 10)		Группа сравнения (n = 10)	
	4 недели	12 недель	4 недели	12 недель
Лихорадка	6	2	8	5
Выпадение волос	1	5	1	6
Снижение массы тела > 5 кг	1	2	1	1
Метеоризм	1	1	0	0
Лекарственно зависимая депрессия	0	0	0	0

При оценке динамики лабораторных показателей установлено, что к 12 неделе терапии у пациентов обеих групп отмечалось умеренное снижение уровня гемоглобина, тромбоцитов, лейкоцитов и абсолютного содержания нейтрофилов (таблицы 17 и 18). Вместе с тем было отмечено, что у пациентов, получавших препарат Ингарон, к 12 неделе терапии наблюдались более высокие, чем у пациентов группы сравнения, значения лейкоцитов и абсолютного содержания нейтрофилов ( $3,86 \pm 1,20 \times 10^9 / \text{л}$  и  $2,32 \pm 1,58 \times 10^9 / \text{л}$  против  $3,10 \pm 0,80 \times 10^9 / \text{л}$  и  $1,70 \pm 0,40 \times 10^9 / \text{л}$ , соответственно). Следует отметить, что у больных основной группы в течение всего периода наблюдения снижение гемоглобина было менее значимым, чем у пациентов из группы сравнения. Так средние значения уровней гемоглобина и эритроцитов к 12 неделе терапии в группе пациентов, получавших Ингарон, составили  $121,8 \pm 11,6 \text{ г} / \text{л}$  и  $3,6 \pm 0,6 \times 10^{12} / \text{л}$  против  $109,0 \pm 7,0 \text{ г} / \text{л}$  и  $3,3 \pm 0,2 \times 10^{12} / \text{л}$  в группе сравнения, соответственно. Средние значения лабораторных показателей в группах больных ХГС, получавших различные схемы ПВТ, в динамике представлены в таблице 17 и 18.

Таблица 17 – Динамика лабораторных показателей у больных ХГС, получавших стандартную ПВТ

Лабораторные показатели	Средние значения, $M \pm S$		
	На старте терапии	4 неделя терапии	12 неделя терапии
Гемоглобин, г / л	$144,5 \pm 13,5$	$120,7 \pm 8,4$	$109,0 \pm 7,0$
Эритроциты, $10^{12} / \text{л}$	$4,6 \pm 0,4$	$3,8 \pm 0,3$	$3,3 \pm 0,2$
Тромбоциты, $10^9 / \text{л}$	$116,0 \pm 34,1$	$80,5 \pm 25,2$	$75,0 \pm 20,0$
Лейкоциты, $10^9 / \text{л}$	$5,0 \pm 1,8$	$3,3 \pm 1,0$	$3,1 \pm 0,8$
Нейтрофилы, $10^9 / \text{л}$	$2,7 \pm 0,9$	$1,1 \pm 0,2$	$1,7 \pm 0,4$
Лимфоциты, $10^9 / \text{л}$	$2,0 \pm 0,9$	$1,6 \pm 0,5$	$1,1 \pm 0,4$
Моноциты, $10^9 / \text{л}$	$0,4 \pm 0,3$	$0,3 \pm 0,2$	$0,3 \pm 0,2$
Эозинофилы, $10^9 / \text{л}$	$0,07 \pm 0,05$	$0,06 \pm 0,04$	$0,07 \pm 0,06$
СОЭ, мм / ч	$7,8 \pm 4,5$	$25,2 \pm 13,9$	$18,0 \pm 15,4$
АЛТ, Ед / л	$96,2 \pm 44,7$	$84,4 \pm 28,3$	$69,8 \pm 27,4$
АСТ, Ед / л	$92,4 \pm 42,1$	$76,6 \pm 27,0$	$65,3 \pm 25,6$
Общий билирубин, мкмоль / л	$16,6 \pm 5,5$	$25,7 \pm 9,6$	$24,5 \pm 4,1$
Креатинин, мкмоль / л	$74,4 \pm 8,6$	$78,4 \pm 25,3$	$83,0 \pm 12,1$
Глюкоза, моль / л	$6,4 \pm 0,5$	$5,4 \pm 0,7$	$5,2 \pm 0,5$
Железо, мкмоль / л	$22,9 \pm 9,9$	$39,3 \pm 11,0$	$29,7 \pm 11,0$

Таблица 18 – Динамика лабораторных показателей у больных ХГС, получавших препарат Ингарон

Лабораторные показатели	Средние значения, $M \pm S$		
	Перед началом лечения	4 неделя терапии	12 неделя терапии
Гемоглобин, г / л	$146,1 \pm 12,4$	$130,2 \pm 10,4$	$121,8 \pm 11,6$
Эритроциты, $10^{12} / \text{л}$	$4,6 \pm 0,4$	$3,9 \pm 0,6$	$3,7 \pm 0,6$
Тромбоциты, $10^9 / \text{л}$	$127,8 \pm 55,7$	$112,6 \pm 61,1$	$95,3 \pm 74,3$
Лейкоциты, $10^9 / \text{л}$	$5,4 \pm 1,9$	$4,8 \pm 2,0$	$3,9 \pm 1,2$
Нейтрофилы, $10^9 / \text{л}$	$3,1 \pm 1,3$	$2,3 \pm 1,1$	$2,3 \pm 1,6$
Лимфоциты, $10^9 / \text{л}$	$1,8 \pm 0,7$	$1,6 \pm 0,7$	$1,3 \pm 0,7$
Моноциты, $10^9 / \text{л}$	$0,4 \pm 0,2$	$0,5 \pm 0,2$	$0,5 \pm 0,2$
Эозинофилы, $10^9 / \text{л}$	$0,08 \pm 0,07$	$0,07 \pm 0,08$	$0,07 \pm 0,05$
СОЭ, мм / ч	$9,4 \pm 7,0$	$15,3 \pm 8,0$	$16,8 \pm 9,5$
АЛТ, Ед / л	$110,0 \pm 81,9$	$73,6 \pm 46,7$	$48,5 \pm 32,3$
АСТ, Ед / л	$75,5 \pm 37,2$	$61,2 \pm 38,3$	$47,4 \pm 28,8$
Общий билирубин, мкмоль / л	$18,7 \pm 8,8$	$19,8 \pm 11,4$	$21,7 \pm 11,6$
Креатинин, мкмоль / л	$75,0 \pm 12,0$	$70,3 \pm 8,7$	$72,0 \pm 10,1$
Глюкоза, моль / л	$6,1 \pm 0,9$	$6,4 \pm 1,0$	$6,4 \pm 1,0$
Железо, мкмоль / л	$25,8 \pm 7,0$	$27,2 \pm 11,3$	$33,9 \pm 15,6$

Также следует отметить, что у большинства пациентов основной группы снижение уровня вирусной нагрузки сопровождалось нормализацией биохимических показателей. Так к 12 неделе терапии у 7 из 8 больных основной группы при наличии неопределенного уровня вирусной нагрузки показатели АЛТ и АСТ не выходили за пределы нормальных значений, и только у 2-х больных сохранялась не только вирусемия, но и высокая биохимическая активность. У больных ХГС из группы сравнения снижение уровня вирусной нагрузки также

сопровождалось нормализацией биохимических показателей. Вместе с тем, более чем у половины больных данной группы к концу 12-ой недели показатели АЛТ и АСТ сохраняли высокие значения. Таким образом, можно заключить, что полученные нами *ex vivo* и *in vivo* предварительные данные могут свидетельствовать о важной роли IFN- $\gamma$  в регуляции дифференцировки и созревания ДК, а также о потенциальной эффективности включения препарата на основе рекомбинантного IFN- $\gamma$  в схемы лечения больных ХГС.

## Заключение

Хронический гепатит С остается глобальной медицинской и социальной проблемой, актуальность которой обусловлена повсеместным распространением и высокой экономической значимостью этого инфекционного заболевания, а также наличием тенденции к росту доли осложненных и терминальных форм болезни. В России ХГС занимает лидирующее место в структуре заболеваемости ХВГ и представляет высокую экономическую значимость с суммой годового экономического ущерба в 1,7 млрд. рублей. Однако сегодня такие проблемы, как отсутствие доступной терапии больных ХГС, а тем более отсутствие эффективной вакцинопрофилактики гепатита С, по-прежнему остаются нерешенными. Окончательно не решен вопрос лечения больных с выраженным фиброзом / ЦП в связи с тем, что элиминация ВГС при проведении современных курсов ПВТ у таких больных затруднена за счет снижения биодоступности лекарственных средств в пораженных участках печени. Кроме того даже достижение УВО у данной категории больных не гарантирует отсутствия дальнейшего прогрессирования фиброза печени. В этой связи представляется чрезвычайно актуальным изучение иммунопатогенетических механизмов формирования причин длительной персистенции вируса в организме человека с последующим развитием фиброза и цирроза печени. Исследованиями отечественных и зарубежных ученых установлено, что ДК играют ключевую роль в реализации иммунной защиты организма, обеспечивая взаимосвязь факторов врожденного и приобретенного иммунного ответа [Hart, 1997; Medzhitov, 2002]. ДК распознают молекулярные сигналы опасности, формируя специфический зрелый фенотип, который посредством прямого межклеточного взаимодействия с другими иммунокомпетентными клетками и передачи им соответствующих ко-стимуляторных или ко-ингибирующих молекулярных сигналов играет ведущую роль в активации и регуляции адаптивного иммунного ответа [Medzhitov, 2007]. Ключевую роль в развитии эффективного клеточного иммунного ответа при

вирусной инфекции, в том числе и при ХГС, играет межклеточное взаимодействие АПК с Т-лимфоцитами [Kawai, 2009]. Зрелые ДК обладают уникальной способностью активировать наивные Т-лимфоциты, что, вероятно, обусловлено наличием многочисленных поверхностных структур, вовлекаемых во взаимодействие. Для активации наивного Т-лимфоцита достаточно передачи трех основных сигналов: 1) взаимодействие Т-клеточного рецептора (TCR) с комплексом МНС-пептид на поверхности ДК; 2) взаимодействие костимулирующих молекул с их лигандами на поверхности Т-лимфоцита в том числе и взаимодействие CD40 / CD40L; 3) продукция ДК цитокинов (IL-10, IL-12, TNF-alpha) и хемокинов [Banchereau, 2000; Guermonprez, 2002]. Поляризация иммунного ответа и баланс между Т-хелперами 1, 2, 17 типов и регуляторными Т-лимфоцитами зависит от: 1) уровней экспрессии комплекса МНС-пептид и различных ко-стимулирующих и ко-ингибирующих молекул на поверхности ДК; 2) цитокинового окружения, в том числе и спектра цитокинов, продуцируемых в данный момент непосредственно ДК [Pulendran, 1999; Liu, 2001; Schuhbauer, 2000]. Известно, что ДК представляют собой привлекательную мишень для многих вирусов, вызывающих формирование социально-значимых инфекций. Так установлено, что ВГС способен инфицировать ДК человека и принимать участие в регуляции их дифференцировки и созревания [Tsubouchi, 2004; Pachiadakis, 2005]. В зарубежной и отечественной научной литературе описаны различные молекулярные механизмы, позволяющие ВГС подавлять факторы врожденного иммунного ответа и снижать активность высокоспецифических иммунных реакций [Sarobe, 2002; Sarobe, 2003; Bain, 2001; Rollier, 2003; Kanto, 2004; Леплина, 2009]. В этой связи изучение функциональной активности ДК у больных ХГС является необходимым условием для более глубокого понимания иммунопатогенетических механизмов формирования и прогрессирования заболевания. Исследования, направленные на оценку функциональной активности ДК у больных ХГС являются своевременными и актуальными. Открытие новых механизмов противостояния ВГС иммунному ответу хозяина позволит разработать новые методы иммунотерапии и вакцинопрофилактики гепатита С и

оптимизировать действующие стандарты лечения. Более того по функциональной активности ДК можно судить о степени выраженности иммунологических нарушений у больных ХГС, а, следовательно, можно прогнозировать характер дальнейшего течения заболевания и его исходы.

Для выполнения настоящей работы было обследовано 125 больных ХГС 1b генотипа. Все пациенты, включенные в исследование, были лицами мужского пола (средний возраст  $36,35 \pm 6,40$  лет, средний индекс массы тела  $27,30 \pm 3,60$  кг /  $m^2$ ). У большинства больных (68 %, n = 85) ХГС впервые был диагностирован в течение последних 5 лет. Никто из обследованных пациентов не имел тяжелой сопутствующей патологии и не получал ранее ПВТ. Наиболее часто у обследованных больных встречались такие сопутствующие заболевания как хронический гастрит, вне обострения (19,2 %, n = 24), гипертоническая болезнь 1-2 степени (17,6 %, n = 24), остеохондроз поясничного отдела позвоночника с грыжей поясничного отдела позвоночника (11,2 %, n = 14) и мочекаменная болезнь почек (11,2 %, n = 14). Главными субъективными признаками заболевания у 32 % больных были проявления астеновегетативного синдрома. При объективном осмотре у абсолютного большинства пациентов (88,8 %, n = 111) отмечалась гепатомегалия, у четверти – спленомегалия (25,6 %, n = 32). Почти у половины обследованных наблюдались малые печеночные знаки: у 43,2 % больных на коже определялись телеангиэкзазии, а у 20,8 % – пальмарная эритема. При лабораторно-инструментальном обследовании установлено, что более чем у половины пациентов имела место начальная стадия фиброза печени (64 %, n = 80), а у 36 % больных (n = 45) была диагностирована продвинутая стадия фиброза печени F 3 – 4. Отмечалась сильная корреляционная связь между стадией фиброза печени и возрастом пациентов ( $r_{xy} = 0,66$ ,  $p < 0,01$ ). Так средний возраст пациентов с F 3 – 4 стадии составил  $48,10 \pm 8,12$  лет, в то время как средний возраст больных с отсутствием или начальными признаками фиброза печени –  $36,78 \pm 6,97$  лет. Кроме того была выявлена обратная корреляционная связь между стадией фиброза печени и показателями свертывающей системы крови: уровнем тромбоцитов ( $r_{xy} = -0,61$ ,  $p < 0,01$ ) и ПТИ ( $r_{xy} = -0,47$ ,  $p < 0,05$ ). Более чем у

половины больных уровень вирусной нагрузки был менее < 800000 МЕ / мл. У 84 % больных отмечалось повышение уровней АЛТ и АСТ, а у четверти – наблюдалась гипербилирубинемия. Выявлена прямая сильная достоверная корреляционная связь между степенью гипербилирубинемии и уровнем железа сыворотки крови ( $r_{xy} = 0,69$ ,  $p < 0,01$ ).

Оценка показателей функциональной активности ДК проводилась у 28 из 125 включенных в исследование больных ХГС. Все пациенты были мужчины (средний возраст  $40,82 \pm 9,11$  лет, средний индекс массы тела  $26,66 \pm 3,32$  кг / м<sup>2</sup>), инфицированные 1b генотипом вируса. У большинства пациентов данной группы методом транзиторной эластографии была диагностирована начальная стадия фиброза печени F 0 – 2 (64 %,  $n = 18$ ), и только у 36 % больных наблюдалась продвинутая стадия фиброза / цирроз печени F 3 – 4. 61 % пациентов имели низкую вирусную нагрузку (< 800000 МЕ / мл), и у 60,5 % больных уровень АЛТ не превышал 80 Ед / мл. Группу сравнения составили 15 здоровых добровольцев мужского пола, средний возраст  $38,41 \pm 5,45$  лет. Получение ДК из моноцитов периферической крови больных ХГС и здоровых добровольцев проводилось по стандартной лабораторной методике. Индукция дифференцировки моноцитов в ДК достигалась добавлением в среду гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF до концентрации 800 Ед / мл) и интерлейкина 4 (IL-4 до концентрации 1000 Ед / мл). В качестве молекулярных факторов созревания ДК использовались липополисахарид и IFN- $\gamma$ . Оценка показателей функциональной активности ДК проводилась с помощью метода проточной цитометрии путем определения на поверхности клеток уровней экспрессии функциональных молекул.

Способность ДК к презентации антигенных эпитопов может быть оценена путем определения уровней экспрессии на поверхности клеток молекул HLA-A,B,C и HLA-DR. Установлено, что созревание ДК, полученных как от здоровых добровольцев, так и от больных ХГС, сопровождалось увеличением уровней экспрессии HLA-A,B,C и HLA-DR. Значения средней интенсивности флуоресценции HLA-A,B,C и HLA-DR на поверхности зрелых ДК, полученных от

больных ХГС, составили 5694,50 и 1877,00, соответственно. Средние уровни экспрессии этих маркеров на поверхности зрелых ДК, полученных от здоровых добровольцев, были сопоставимы со значениями в исследуемой группе и составили 4142,00 и 1102,50, соответственно. Статистически значимых различий между уровнями экспрессии HLA-A,B,C и HLA-DR на поверхности ДК, полученных от здоровых добровольцев и больных ХГС, выявлено не было. Таким образом, было установлено, что вне зависимости от степени фиброза печени, биохимической активности трансаминаз или уровня вирусной нагрузки зрелые ДК, полученные от больных ХГС, сохраняют способность к презентации антигенных структур в составе молекул главного комплекса гистосовместимости 1 и 2 классов. Между тем некоторые зарубежные исследователи приводят данные, свидетельствующие, напротив, о снижении антигенпрезентирующей активности ДК у больных ХГС. Так в клинических исследованиях Auffermann-Gretzinger (2001), Averill (2007), Zimmermann (2008) было показано, что миелоидные ДК, выделенные из периферической крови больных ХГС, экспрессируют на своей поверхности меньшее количество молекул HLA-DR, чем ДК здоровых лиц. Кроме того в экспериментах *ex vivo* Zimmermann (2008) установил, что миелоидные ДК, подвергшиеся воздействию Сор белка ВГС, характеризуются низким уровнем экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости 1 и 2 классов. Результаты исследований других авторов указывают на снижение способности зрелых ДК у больных ХГС к презентации антигенных эпитопов вируса и запуску высокоспецифических иммунных реакций. Вместе с тем антигенпрезентирующая активность различных популяций ДК у больных ХГС требует дальнейшего изучения.

Дальнейшее развитие высокоспецифических иммунных реакций зависит от способности зрелых ДК к миграции из очага воспаления в регионарные лимфатические узлы. Способность ДК к миграции, как в очаг воспаления, так и из него может быть оценена путем изучения фенотипа ДК с определением уровня экспрессии хемокинового рецептора CD195 (CCR5). Проведенное нами исследование позволило установить, что незрелые ДК, полученные от больных

ХГС, экспрессировали на своей поверхности большее количество хемокинового рецептора CD195, чем ДК, полученные от здоровых добровольцев (90,00 против 67,50  $p < 0,01$ ), что свидетельствует об их высокой способности к миграции в очаг воспаления. При созревании ДК, полученные от больных ХГС, продолжали сохранять высокий уровень экспрессии хемокинового рецептора CD195. Таким образом, было установлено, что зрелые ДК у больных ХГС обладают дефектом функциональной активности и неспособны эффективно покинуть очаг воспаления и мигрировать в регионарные лимфатические узлы для запуска высокоспецифических иммунных реакций. Следовательно, изменение фенотипа зрелых ДК, связанное с увеличением уровня экспрессии CD195, можно рассматривать в качестве нового молекулярного механизма, обуславливающего массивную и длительную инфильтрацию печени различными АПК. Аналогичные данные были получены и в исследованиях Ulsenheimer в 2005г.

В регионарных лимфатических узлах зрелые ДК участвуют в многочисленных межклеточных взаимодействиях с другими иммунокомпетентными клетками. Межклеточный контакт осуществляется с помощью молекул межклеточной адгезии, а также с помощью ко-стимулирующих и ко-ингибирующих молекул, экспрессированных на поверхности клеток. Известно, что поляризация иммунного ответа зависит от спектра ко-стимулирующих молекул, участвующих в межклеточном взаимодействии между ДК и Т-лимфоцитом [Kalams, 1998; Ciurea, 2001; Wieland, 2005]. Дисбаланс иммунного ответа, имеющий место у больных ХГС, может быть обусловлен нарушениями ко-стимулирующей активности ДК. Наиболее хорошо изученными ко-стимулирующими молекулами на поверхности ДК являются CD80, CD86 и CD40. Нами установлено, что уровни экспрессии CD80, CD86 и CD40 на поверхности незрелые и зрелых ДК в группе больных ХГС не отличались от соответствующих показателей в группе здоровых добровольцев. Созревание ДК, как в контрольной, так и в исследуемой группе, сопровождалось увеличением доли клеток, экспрессирующих эти маркеры, а также увеличением средней интенсивности флуоресценции молекул CD80 и CD86. Доли CD80+ и CD86+

зрелых ДК, полученные от больных ХГС, были существенно выше, чем в контрольной группе и составили  $63,35 \pm 10,33\%$  и  $82,70 \pm 7,83\%$  против  $52,69 \pm 13,3\%$  и  $75,34 \pm 9,71\%$ , соответственно. Между тем литературные данные об экспрессии этих молекул на поверхности ДК у больных ХГС весьма противоречивы. Так в исследованиях Auffermann-Gretzinger (2001), Averill (2007), Zimmermann (2008) было показано, что миелоидные ДК, выделенные из периферической крови больных ХГС, экспрессируют на своей поверхности меньшее количество молекул CD86 и CD80, чем ДК здоровых. Кроме того в экспериментах Zimmermann (2008) *ex vivo* также было показано, что миелоидные ДК, подвергшиеся воздействию Сор белка ВГС, характеризуются низким уровнем экспрессии ко-стимулирующих молекул CD80 и CD86. Стоит отметить, что результат взаимодействия CD80 и CD86 с их рецепторами на поверхности Т-лимфоцита зависит в первую очередь от уровней экспрессии ко-стимулирующих (CD28) или ко-ингибирующих (CTLA4) рецепторов. Таким образом, изолированное изучение уровней экспрессии CD80 и CD86 на поверхности ДК не дает полного представления о результате взаимодействия ДК и Т-лимфоцита. В этой связи было принято решение расширить спектр изучаемых молекул. Известно, что по уровню экспрессии ко-стимулирующих молекул CD70 и CD252 можно судить о способности ДК к поляризации иммунного ответа [Ito, 2005; Coquet, 2012]. Полученные нами данные позволили выявить наличие вероятных функциональных дефектов ко-стимулирующей активности ДК у больных ХГС. Впервые установлено, что зрелые ДК, полученные от больных ХГС, характеризуются существенно более высокими уровнями экспрессии CD70 и CD252, чем ДК, полученные от здоровых лиц. Так средняя интенсивность флуоресценции CD252 на поверхности ДК в группе больных ХГС была более чем в 2 раза выше, чем у лиц контрольной группы ( $309,00$  против  $135,50$ ,  $p < 0,01$ ), что, вероятно, характеризует способность этих клеток к поляризации иммунного ответа строго по Th 2 типу. Наличие дисбаланса иммунного ответа у больных ХГС с поляризацией по Th 2 типу неоднократно отмечалось в исследованиях Kalams (1998), Ciurea (2001) и Wieland (2005).

При изучении корреляционной зависимости между фенотипическими показателями ко-стимулирующей активности ДК и лабораторными показателями установлено, что у больных ХГС наиболее часто выявлялась обратная корреляционная зависимость между уровнями ГГТП, амилазы, альбумина, холестерина и ЛПНП и уровнями экспрессии CD80 и CD86, а уровень «вирусной нагрузки» имел обратную корреляционную зависимость с уровнем экспрессии CD40. Следовательно, можно предположить, что степень виремии оказывает непосредственное влияние на функциональную активность ДК, нарушая их способность к формированию ко-стимулирующего сигнала, необходимого для запуска высокоспецифических имунных реакций. Кроме того в проведенных нами исследованиях установлено, что главным клиническим факторам, влияющими на уровень экспрессии ко-стимулирующих молекул на поверхности ДК у больных ХГС является стадия фиброза печени.

Развитие иммунной толерантности к антигенным структурам белков ВГС играет ключевую роль в иммунопатогенезе ХГС и обуславливает хроническое, малосимптомное течение болезни с длительной персистенцией вируса [Kalams, 1998; Ciurea, 2001; Wieland, 2005]. Изучение механизмов формирования иммунной толерантности в первую очередь требует оценки функциональной активности ДК с определением уровней экспрессии на их поверхности ко-ингибирующих молекул CD273 и CD274. Такие ингибирующие молекулярные сигналы приводят к подавлению активности и пролиферации антигенспецифических клонов Т-лимфоцитов (Т-хелперов и ЦТЛ), а также к дифференцировке наивных Т-лимфоцитов в индуцибелльные Т-регуляторные клетки с последующим развитием иммунной толерантности. В результате оценки способности ДК к передаче ко-ингибирующих молекулярных сигналов установлено, что как незрелые, так и зрелые ДК больных ХГС характеризовались более высокими, чем в контрольной группе, уровнями экспрессии CD273 и CD274 ( $78,25 \pm 6,99\%$  против  $66,74 \pm 8,41\%$ ,  $p < 0,01$  и  $82,41 \pm 8,56\%$  против  $76,75 \pm 8,98\%$ ,  $p < 0,05$ , соответственно). Кроме того средние уровни экспрессии CD273 и CD274 на поверхности зрелых ДК в группе больных ХГС были также существенно выше, чем в группе здоровых

лиц, и составили 31,00 против 21,50,  $p < 0,01$  и 33,00 против 25,50,  $p < 0,01$ , соответственно. Таким образом, полученные данные позволили установить, что зрелые ДК больных ХГС обладают более выраженной способностью к ингибиции активации и пролиферации Т-лимфоцитов, чем ДК здоровых добровольцев. Наши данные принципиально совпадают с данными, полученными в экспериментальном исследовании *ex vivo* в лаборатории Циммермана (2008). В данном эксперименте было показано, что миелоидные ДК, подвергшиеся воздействию Сог белка ВГС, характеризуются высоким уровнем экспрессии ко-ингибирующей молекулы CD274.

Таким образом, проведенное исследование показало, что у больных ХГС имеет место нарушение функциональной активности ДК, проявляющееся изменением их миграционной и ко-стимуляторной активности, а также повышением уровня экспрессии ко-ингибирующих молекул на их поверхности. Полученные данные позволяют заключить, что ДК, имеющие функциональные дефекты, не способны запускать и регулировать высокоспецифические иммунные реакции, а, следовательно, заболевание приобретает длительное, в большей части хроническое течение с непредсказуемым исходом. Для коррекции функциональной активности ДК *ex vivo* используются различные молекулярные индукторы дифференцировки и созревания. Известно, что IFN- $\gamma$  относится к основным провоспалительным цитокинам и является индуктором клеточного звена иммунитета. В исследованиях Mosca (2000) установлено, что под влиянием IFN- $\gamma$  происходит созревание плазматоидных дендритных клеток, с последующей продукцией ими большого количества интерферонов 1 типа. В ряде экспериментов *ex vivo* была доказана возможность применения IFN- $\gamma$  в качестве фактора созревания миелоидных ДК. Так в экспериментах Frasca (2008) было продемонстрировано, что под действием IFN- $\gamma$  существенно повышаются уровни продукции зрелыми ДК IL-12 и IL-6, в то время как уровень продукции IL-10 наоборот снижается. Кроме того в исследованиях Bettelli (2007) и Frasca (2008) установлено, что в присутствии IFN- $\gamma$  повышается уровень экспрессии на поверхности зрелых ДК хемокинового рецептора CCR7, необходимого для

миграции ДК в регионарные лимфатические узлы. В этой связи нами в качестве иммунокорригирующего агента активности ДК был использован IFN- $\gamma$ . В культуру незрелых ДК, полученных от 14 пациентов с ХГС, кроме липополисахарида добавлялся рекомбинантный IFN- $\gamma$  отечественного производства (препарат Ингарон). В дальнейшем при изучении экспрессии ко-ингибирующих молекул на поверхности уже зрелых ДК было установлено, что в культуре, полученной с добавлением IFN- $\gamma$ , доля CD273+ и CD274+ ДК была ниже, чем в культуре, полученной с добавлением только липополисахарида ( $69,33 \pm 2,02\%$  против  $76,08 \pm 1,15\%$ ,  $p < 0,01$  и  $70,18 \pm 4,41\%$  против  $80,35 \pm 3,50\%$ ,  $p < 0,01$ , соответственно). Существенно отличалась также и интенсивность экспрессии молекул CD273 и CD274 на поверхности зрелых ДК, полученных с добавлением IFN- $\gamma$  и без него ( $29,00$  против  $32,50$ ,  $p < 0,05$  и  $29,00$  против  $36,00$ ,  $p < 0,01$ , соответственно). Таким образом, было установлено, что добавление в культуру незрелых ДК IFN- $\gamma$  в качестве агента, индуцирующего созревание, приводит к снижению ко-ингибирующей активности зрелых ДК у больных ХГС. Можно предположить, что снижение ко-ингибирующей активности зрелых ДК будет способствовать формированию адекватной иммунной реакции с последующей элиминацией возбудителя из организма человека.

Для подтверждения полученных нами экспериментальных данных, свидетельствующих о высокой иммунокорригирующей активности IFN- $\gamma$ , было проведено пилотное исследование по определению терапевтической эффективности и целесообразности включения препарата Ингарон в комплексную терапию больных ХГС. Для выполнения поставленной задачи было отобрано 20 пациентов с ХГС 1b генотипа, не получавших ранее ПВТ. Все больные были лицами мужского пола с продвинутой стадией фиброза печени (F 3 – 4), низкой и умеренной активностью патологического процесса. Ни один из пациентов не имел тяжелых сопутствующих заболеваний в стадии декомпенсации, все больные с циррозом печени имели стадию A по шкале Child-Pugh-Turcotte. Методом случайной выборки пациенты были разделены на 2 группы по 10 человек в каждой: основная группа и группа сравнения. Группу сравнения составили

больные ХГС 1b генотипа (средний возраст  $53,60 \pm 6,29$  лет, средний индекс массы тела  $25,74 \pm 2,70$  кг / м<sup>2</sup>), которым была назначена стандартная ПВТ (цепэгинтерферон альфа – 2b + рибавирин). Более чем у половины больных данной группы на старте терапии была выявлена низкая вирусная нагрузка (n = 6) и повышение уровня АЛТ (n = 8). В основную группу вошли также 10 ранее обследованных нами больных ХГС 1b генотипа (средний возраст  $48,10 \pm 8,15$  лет, средний индекс массы тела  $27,32 \pm 2,95$  кг / м<sup>2</sup>), которым к стандартной ПВТ (цепэгинтерферон альфа – 2b + рибавирин) был добавлен отечественный препарат на основе рекомбинантного IFN-γ (Ингарон) в дозе 500000 МЕ (подкожно через день в течение 12 недель). У большинства больных ХГС основной группы на старте терапии также была выявлена низкая вирусная нагрузка (n = 6), у 8 человек отмечалось повышение уровня АЛТ, причем у 7 из них отмечалось повышение уровня АЛТ от верхней границы нормы более чем в 2 раза. По результатам наблюдения установлено, что быстрый вирусологический ответ был достигнут лишь у 3 из 10 больных ХГС, получавших стандартную ПВТ, а к 12 неделе терапии элиминация возбудителя была достигнута у 5 из 10 обследованных лиц. Среди больных ХГС, получающих терапию с включение препарата Ингарон, эффективность лечения была существенно выше. Так быстрый вирусологический ответ был достигнут у 6 из 10 пациентов данной группы, а к 12 неделе терапии вирус не определялся уже у 8 из 10 больных ХГС. Включение препарата Ингарон в комплексную терапию больных ХГС не сопровождалось развитием выраженных нежелательных явлений. Напротив, пациенты, получавшие Ингарон, отмечали улучшение самочувствия: повышение настроения, улучшение аппетита, уменьшение вегетативной симптоматики. В то время как у большинства пациентов из группы сравнения сохранялась выраженная слабость (n = 7), утомляемость (n = 6) и снижение работоспособности (n = 5). Было отмечено, что у пациентов, получавших препарат Ингарон, к 12 неделе терапии наблюдались более высокие, чем у пациентов группы сравнения, значения лейкоцитов и абсолютного содержания нейтрофилов ( $3,9 \pm 1,2 \times 10^9$  / л и  $2,3 \pm 1,6 \times 10^9$  / л против  $3,1 \pm 0,8 \times 10^9$  / л и  $1,7 \pm 0,4 \times 10^9$  / л, соответственно). Средние значения уровней

гемоглобина и эритроцитов к 12 неделе терапии в группе пациентов, получавших Ингарон, составили  $121,8 \pm 11,6$  г / л и  $3,6 \pm 0,6 \times 10^{12}$  / л против  $109,0 \pm 7,0$  г / л и  $3,3 \pm 0,2 \times 10^{12}$  / л в группе сравнения, соответственно. Полученные нами данные согласуются с результатами, продемонстрированным в работах Фазылова (2014) и Кремень (2009), и свидетельствуют о важной роли IFN- $\gamma$  в регуляции дифференцировки и созревания ДК, а также о потенциальной эффективности включения препаратов на основе рекомбинантного IFN- $\gamma$  в схемы лечения больных ХГС.

В заключении следует отметить, что состояние иммунологической реактивности организма оказывает существенное влияние на характер течения ХГС. Определение функциональной активности ДК позволяет выявить наличие у больных ХГС иммунных нарушений, играющих центральную роль в иммунопатогенезе заболевания. Для коррекции функциональной активности ДК могут быть использованы препараты на основе рекомбинантного интерферона гамма. Между тем терапевтическая эффективность и безопасность схем лечения с включением препарата Ингарон требуют дальнейшего изучения и проведения масштабных клинических исследований.

## Выводы

1. У абсолютного большинства больных, включенных в исследование, отмечалась гепатомегалия, у 1 / 5 – гепатосplenомегалия, у половины обследованных определялись малые печеночные знаки и наблюдались признаки астено-вегетативного синдрома. Выявлена обратная корреляционная связь между степенью выраженности фиброза печени и показателями свертывающей системы крови, а также прямая корреляционная связь между уровнями билирубина и сывороточного железа.

2. Установлено, что у больных ХГС, вне зависимости от стадии фиброза печени, активности АЛТ или уровня вирусной нагрузки, зрелые дендритные клетки сохраняли способность к эффективной презентации антигенных эпитопов в составе молекул главного комплекса гистосовместимости 1 и 2 классов, что было обусловлено высоким уровнем экспрессии молекул HLA-A,B,C и HLA-DR, а также характеризовались высоким уровнем экспрессии хемокинового рецептора CD195, что свидетельствует о нарушении их миграционной способности.

3. Уровни экспрессии ко-стимулирующих (CD80, CD86 и CD252) и ко-ингибирующих молекул (CD274 и CD273) на поверхности зрелых дендритных клеток у больных ХГС превышали соответствующие показатели у здоровых лиц, что свидетельствует о высокой их Th2-поларизующей активности и снижении способности к эффективной активации и стимуляции пролиферации Т-лимфоцитов.

4. У больных ХГС с продвинутой стадией фиброза печени уровни экспрессии ко-стимулирующих (CD80, CD86 и CD252) и ко-ингибирующих молекул (CD274 и CD273) на поверхности дендритных клеток были ниже, чем у лиц с отсутствием фиброза или минимальными его значениями, что свидетельствует об истощении иммунологического резерва у пациентов с циррозом печени. У лиц с высоким уровнем вирусной нагрузки, вне зависимости от стадии фиброза печени, отмечалось резкое снижение уровня экспрессии ко-

стимулирующей молекулы CD40, продукция которой, по-видимому, блокировалась вирусом или его белками.

5. Использование интерферона гамма в качестве иммунокорригирующего агента *ex vivo* способствовало снижению уровней экспрессии ко-ингибирующих молекул (CD273 и CD274) на поверхности зрелых дендритных клеток, полученных от больных ХГС. Включение препарата Ингарон в стандартную схему ПВТ больных ХГС является патогенетически обоснованным и целесообразным.

## Рекомендации для внедрения в медицинскую науку и практику

Определение функциональной активности ДК у больных ХГС может быть использовано для оценки эффективности ПВТ, в том числе для определения продолжительности лечения и решения вопроса о возможности досрочного его прекращения. Сокращение длительности применения противовирусных препаратов может позволить избежать развития большого числа нежелательных явлений, требующих дополнительного медикаментозного лечения. С учетом результатов, полученных в настоящем исследовании, сотрудниками ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России разработан протокол клинической апробации: «Апробация метода прогноза эффективности противовирусной терапии, основанного на оценке функциональной активности дендритных клеток у больных хроническим гепатитом С 1 генотипа».

В дальнейшем, используя опыт применения ДК в иммунотерапии злокачественных новообразований в ФГУ «Российский научно-исследовательский нейрохирургический институт им. проф. А.Л. Поленова», может быть приготовлена вакцина для лечения больных ХГС на основе зрелых ДК, презентирующих консервативные антигенные эпитопы белка NS3 ВГС. Метод лечения больных ХГС, основанный на применении дендритноклеточных вакцин, содержащих консервативные антигенные эпитопы белка NS3, представляется перспективным и является патогенетически обоснованным.

Включение в стандартную схему ПВТ препаратов на основе рекомбинантного IFN- $\gamma$  является патогенетически обоснованным и может быть рекомендовано для внедрения в медицинскую практику. Кроме того, оценка функциональной активности ДК, полученных от больных ХГС, может быть использована для персонализированного подбора различных иммуномодулирующих препаратов, позволяющих корректировать иммунологические дефекты.

## Список сокращений и условных обозначений

- АЛТ – аланинаминотрансфераза
- АПК – антигенпрезентирующая клетка
- АСТ – аспартатаминотрансфераза
- ВГС – вирус гепатита С
- ГГТП – гамма-глутамилтранпептидаза
- ГЦК – гепатоцеллюлярная карцинома
- ДК – дендритная клетка
- ЛПС – липополисахарид
- НК – нуклеиновая кислота
- ОГС – острый гепатит С
- ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени
- ПВТ – противовирусная терапия
- ПТИ – протромбиновый индекс
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- РФ – Российская Федерация
- УВО – устойчивый вирусологический ответ
- ХВГ – хронический вирусный гепатит
- ХГВ – хронический гепатит В
- ХГС – хронический гепатит С
- ЦП – цирроз печени
- ЩФ – щелочная фосфатаза
- CCL / CXCL / CX3CL – хемокины различных подсемейств
- CCR / CXCR (chemokine receptor) – хемокиновый рецептор
- CD (cluster of differentiation) – кластер дифференцировки
- CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 / CD152) – цитотоксичный Т-лимфоцит ассоциированный белок 4
- DAMP (damage-associated molecular pattern) – молекулярный паттерн,

ассоциированный с повреждением собственных клеток организма

Fc $\gamma$ R (Fc-gamma receptor) – Fc-гамма рецептор

FDA (food and drug administration) - управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных препаратов США

Flt3-L – fms-like tyrosine kinase 3 ligand

fMLP – формилированный пептид

FOXP3 (forkhead box P3 / scurfin) – транскрипционный фактор, участвующий в развитии регуляторных Т-клеток

GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

HLA (human leukocyte antigen) – человеческий лейкоцитарный антиген

IFN- $\alpha$  – интерферон альфа

IFN- $\beta$  – интерферон бета

IFN- $\gamma$  – интерферон гамма

IL (interleukin) – интерлейкин

IRF (interferon regulatory factors) – регуляторный фактор интерферонов

Mfge8 – Milk fat globule-EGF factor 8 protein / лактодерин

MFI (mean fluorescence intensity) – средняя интенсивность флуоресценции

MHC (major histocompatibility complex) – главный комплекс гистосовместимости

MMR – макрофагальный маннозосвязывающий рецептор

NKT-клетки – натуральные киллерные Т-лимфоциты

NK-клетка – натуральный / естественный киллер

NLR (Nod-like receptor) – Nod-подобный рецептор

PAMP (pathogen-associated molecular pattern) – патоген-ассоциированный молекулярный паттерн

PD-1 (programmed cell death-1 / CD279) – белок запрограммированной клеточной смерти 1

PKR – интерферон-индукцируемая протеин киназа R

RLR (RIG-I-like receptor) – RIG-I-подобный рецептор

SOCS-1 (Suppressor of cytokine signaling-1) – супрессор сигналов цитокинов 1

SR-BI – скавенджер-рецептор класса В типа I

TCR – Т-клеточный рецептор

TLR (toll-like receptor) – толл-подобный рецептор

TNF- $\alpha$  – фактор некроза опухоли альфа

TSLP – стромальный лимфопоэтин тимуса

## Список литературы

1. Алексеева В.М., Д.Т. Абдурахманов, К.А. Серенко (2010). Анализ стоимости лечения хронического гепатита С. Руководителю ЛПУ. Экономика. ТОМ 1 2010.
2. Арямкина, О. Л. Хроническая HBV- и HCV- инфекция и рак печени: клинико-эпидемиологические и дифференциально-диагностические параллели / О. Л. Арямкина // Эпидемиология и инфекционные болезни. - 2006. - № 2. - С. 36-39.
3. Байкова, Т. А. Многообразие внепеченочных проявлений хронических вирусных гепатитов В и С, общие принципы лечения / Т.А. Байкова, Т.Н. Лопаткина // Терапевтический архив. - 2013. - № 4. - С. 106-110.
4. Богомолов, П. О. Возможности повышения эффективности противовирусной терапии больных хроническим гепатитом С, инфицированных 3-м генотипом вируса / П. О. Богомолов, А. О. Буеверов, М. В. Мациевич [и др.] // Инфекц. болезни. - 2012. - Т. 10, № 2. - С. 8-14.
5. Богомолов, П. О. Эффективность лечения больных хроническим гепатитом С с 1-м генотипом вируса стандартным интерфероном альфа / П. О. Богомолов, А. О. Буеверов, Н. В. Дубинина, и др. // Клин. перспект. гастроэнтерол. гепатол. – 2011. – № 6. – С. 17–22.
6. Вирусные гепатиты: клиника, диагностика, лечение / Н. Д. Ющук, Е. А. Климова, О. О. Знойко [и др.]. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. - 160 с.
7. Вирусные гепатиты: клиника, диагностика, лечение / Ю. В. Лобзин, К. В. Жданов, В. М. Волжанин, Д. А. Гусев. - СПб. : ФОЛИАНТ, 2006. - 192 с.
8. Громова, Н. И. Эффективность противовирусной терапии у больных хроническим гепатитом С, протекающим с нормальным уровнем АЛТ / Н. И. Громова // Инфекц. болезни. - 2011. - Т. 9, № 4. - С. 5-10.

9. Дерябин П.Г., Шахгильян И.В. «Гепатит С: фундаментальные и прикладные проблемы» в кн.: «Изучение эволюции вирусов в рамках проблемы безопасности и социально значимых инфекций». - М, 2011. - С. 88-98.
10. Жебрун, А. Б. Микробиология и иммунология, вызов времени / А. Б. Жебрун // Инфекция и иммунитет. - 2011. - Т. 1, № 1. - С. 7-9.
11. Иванова, М. Р. Цитокиновый профиль у больных острыми вирусными гепатитами В и С / М. Р. Иванова, Р. Х. Жемухова // Клин. лаб. диагностика. - 2009. - № 3. - С. 41-43.
12. Ивашкин, В. Т. Иммунная система и повреждения печени при хронических гепатитах В и С // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. - 2009. - № 6. - С. 4-10.
13. Ивашкин, В. Т. Механизмы иммунной толерантности и патологии печени / В. Т. Ивашкин // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. - 2009. - № 2. - С. 8-13.
14. Ивашкин, В. Т. Современные схемы лечения хронического гепатита С / В. Т. Ивашкин, М. В. Маевская, М. А. Морозова, Е. О. Люсина // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии, - 2012. - Т.22. - №1. - С.36-44.
15. Игнатова, Т.М. Телапревир в лечении больных хроническим гепатитом С: вопросы безопасности, Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии, - 2012. - Т.22. - №4. - С.47-57.
16. Игнатьева, Т. М. Вирус гепатита С как основной фактор смешанной криоглобулинемии / Т. М. Игнатьева // Гепатологический форум. - 2005. - № 3. - С. 11-13.
17. Краснова, Л. И. Фиброз печени при ХГС (по данным непрямой эластометрии) в зависимости от показателей АЛАТ / Л. И. Краснова, И. П. Баранова // Гепатология сегодня : мат. Восемнадцатой Рос. конф., Москва, 25-27 марта 2013 г. - С. 34. - Прил. № 40 к Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. - 2013. - Т. XXIII, № 1.

18. Крель, П.Е. Внепеченочная локализация вируса гепатита С: особенности клинических проявлений и прогностическая значимость / П. Е. Крель, О. Д. Цинзерлинг // Тер арх. – 2009. № 11. – С. 63-68.
19. Лапшин, А. В. Влияние генетических полиморфизмов гена IL28B на эффективность противовирусной терапии хронического гепатита С стандартным интерфероном-α / А. В. Лапшин, М. В. Маевская, В. Т. Ивашкин, П. О. Богомолов, И. Г. Никитин, О. О. Знойко //Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. - 2013. - Т. 23. - № 1. - С. 23
20. Леплина, О. Ю. Фенотип и функции дендритных клеток у больных хроническими вирусными гепатитами / О. Ю. Леплина, М. А. Тихонова, А. Е. Борисова, Н. М. Старостина, А. А. Останин, Е. Р. Черных, В. А. Козлов // Медицинская Иммунология. - 2009. - Т. 11, № 2-3. - С. 191-196.
21. Маевская, М. В. Лечение больных хроническим гепатитом С препаратом цепэгинтерферон альфа-2b в сочетании с рибавирином (Итоговые результаты рандомизированного сравнительного клинического исследования) / М. В. Маевская, О. О. Знойко, Е. А. Климова, С. Л. Максимов, С. Н. Кижло, Н. А. Петроченкова, Ф. И. Нагимова, Ю. Н. Линькова // РЖГК, - 2014, №2, - С. 53-64.
22. Малый, В. П. Молекулярная эпидемиология облигатно-гепатотропных вирусов и их влияние на клинические проявления и исход болезни / В. П. Малый, Т. И. Лядова, О. В. Волобуева, О. В. Гололобова // Междунар. мед. журн. - 2012. - № 1. - С. 89-94.
23. Нагоев, Б. С. Некоторые аспекты иммунопатологии при хронических гепатитах / Б. С. Нагоев, Ж. Б. Понежева // Эпидемиология и инфекц. Болезни. - 2009. - № 6. - С. 45-49.
24. Нагоев, Б. С. Эпидемиологические и клинико-иммунологические аспекты ХГС в зависимости от генотипа / Б. С. Нагоев, Ж. Б. Понежева // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. - 2010. - № 3 (52). - С. 48-53.
25. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2014 году: Государственный доклад. - М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека,

2015. - 206 с.

26. Павлов, Ч. С. Фиброз печени при хронических вирусных гепатитах В и С : автореф. дис. ... докт. мед. наук : 14.00.05 / Павлов Чавдар Саввов; [Московская мед. Академия им. И. М. Сеченова]. - М., 2010. - 45 с.
27. Пацук, Н. В. Вирусный гепатит С : эпидемиологические особенности и меры профилактики [Электронный ресурс] / Н. В. Пацук – Екатеринбург : ФГУН «Екатеринбургский НИИ вирусных инфекций» Роспотребнадзора, 2010. – Режим доступа: [http://admin.rosпотребnadzor.ru/directions\\_of\\_activity/profilaktika/obzor/4538](http://admin.rosпотребnadzor.ru/directions_of_activity/profilaktika/obzor/4538)
28. Пименов, Н. Н. Гепатит С в России: эпидемиологическая характеристика и пути совершенствования диагностики и надзора / Н. Н. Пименов, В. П. Чуланов, С. В. Комарова, И. В. Карандашова, А. Д. Неверов, Г. В. Михайлова, В. А. Долгин, Е. Б. Лебедева, К. В. Пашкина, Г. С. Коршунова // Эпидемиология и инфекционные болезни, - 2012. № 3. С. 4-10.
29. Поздеева, Е. С. Интеграционная эпидемиология гепатитов В и С в Приморском крае : дис. ... канд. мед. наук : 14.02.02 / Поздеева Екатерина Сергеевна; [ГОУ ВПО «Омская гос. мед. академия】. - Омск, 2010. - 109 с. : ил.
30. Понежева, Ж. Б. Некоторые патогенетические особенности при хроническом гепатите С / Ж. Б. Понежева // Инфекц. Болезни. - 2010. - Т. 8, № 1. - С. 249-250.
31. Сафиуллина, Н. Х. Диагностическая роль коллагена IV типа и гиалуроновой кислоты в оценке степени воспаления и стадии фиброза печени у больных хроническим гепатитом С : дис. ... канд. мед. наук : 14.00.10 / Сафиуллина Наиля Ханифовна; [ЦНИИ эпидемиологии]. - М., 2004. - 10 с. : ил.
32. Скляр, Л. Ф. Система цитокинов и показатели оксидативного стресса при хроническом гепатите С с учетом иммунокорригирующей терапии : дис. ... докт. мед. наук : 14.00.36 / Скляр Лидия Федоровна; [ГОУ ВПО Владивостокский гос. Мед. Ун-т]. - Владивосток, 2006. - 270 с. : ил.
33. Современный взгляд на вирусные гепатиты / В. В. Малеев, Т. В. Сологуб, Ф. И. Ершов [и др.]; под ред. А. В. Шаброва. - М. : Миклоп, 2010. - 168 с.

34. Тиглиев, Г.С. Способ лечения злокачественных опухолей головного мозга / Г. С. Тиглиев, В. Е. Олошин, О. В. Острейко, М. В. Филатов, Е. И. Иванов // Патент Российской Федерации № 2192263. – 2002.
35. Тихонова, Н. Ю. Фармакогеномика и фармакогенетика HCV-инфекции / Н. Ю. Тихонова // Гепатологический форум. - 2011. - № 3. - С. 22-32.
36. Фрейдлин, И. С. Взаимосвязи врожденного и приобретенного иммунитета при инфекциях (ревизия классических догм) / И. С. Фрейдлин // Инфекция и иммунитет. - 2011. - Т. 1, № 3. - С. 199-206.
37. Хайтов, Р. М. Иммунология. Норма и патология / Р. М. Хайтов, Г. А. Игнатьева, И. Г. Видорович. - М. : Медицина, 2010. - 752 с.
38. Хронические гепатиты: учебно-методическое пособие для врачей-терапевтов, гастроэнтерологов и патоморфологов / С. А. Алексеенко, С. С. Колтунов, А. Н. Евсеев, А. С. Колтунов. - Хабаровск, 2010. - 168 с.
39. Шмелева, Е. В. Иммунопрогностические критерии развития цирроза печени как исхода хронического вирусного гепатит С : дис. ... канд. Мед. Наук : 14.00.36 / Шмелева Евгения Васильевна; [Рос. ун-т дружбы народов]. - М., 2009. - 126 с. : ил.
40. Щекотова, А. П. Взаимосвязь маркеров эндотелиальной дисфункции и фиброза печени с вирусной нагрузкой при хроническом вирусном гепатите С // Современные проблемы науки и образования. - 2012. - № 1.
41. Ющук, Н. Д. Протокол диагностики и лечения больных вирусными гепатитами В и С / Н. Д. Ющук, Е. А. Климова, О. О. Знойко, и др. // Рос. журн. гастроэнтерол. гепатол. колопроктол. – 2010. – Т. 20, № 6. – С. 4–60.
42. Ющук, Н. Д. Рекомендации по диагностике и лечению взрослых больных гепатитом С / Н. Д. Ющук, В. Т. Ивашкин, К. В. Жданов, О. О. Знойко, Е. А. Климова, Г. М. Кожевникова [и др.] // - 2013.
43. Abe, T. Hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates the toll-like receptor-MyD88-dependent signaling pathway in macrophage cell lines / T. Abe, Y. Kaname, I. Hamamoto, et al. // J Virol. – 2007. – Vol. 81. – P. 8953-66.

44. Aguzzi, A. Characterizing follicular dendritic cells: A progress report / A. Aguzzi, N. J. Krautler // Eur J Immunol. – 2010. – Vol. 40, № 8. – P. 2134-8.
45. Anderson, G. Differential effects of peptide diversity and stromal cell type in positive and negative selection in the thymus / G. Anderson, K. M. Partington, E. J. Jenkinson // J. Immunol. - 1998. - Vol. 161. - P. 6599–6603.
46. Arima, S. Impaired function of antigen-presenting dendritic cells in patients with chronic hepatitis B: localization of HBV DNA and HBV RNA in blood DC by in situ hybridization / S. Arima, S. M. Akbar, K. Michitaka, et al. // Int. J. Mol. Med. – 2003. – Vol. 11, – P. 169-174.
47. Auffermann-Gretzinger, S. Impaired dendritic cell maturation in patients with chronic, but not resolved, hepatitis C virus infection / S. Auffermann-Gretzinger, E. B. Keeffe, S. Levy // Blood. – 2001. – Vol. 97. – P. 3171-6.
48. Averill, L. Differential dysfunction in dendritic cell subsets during chronic HCV infection / L. Averill, W. M. Lee, N. J. Karandikar // Clin Immunol. - 2007. - Vol. 123, № 1. - P. 40-9.
49. Averill, L. Differential dysfunction in dendritic cell subsets during chronic HCV infection / L. Averill, W. M. Lee, N. J. Karandikar // Clin Immunol. – 2007. – Vol. 123, № 1. – P. 40-9.
50. Bain, C. Impaired allostimulatory function of dendritic cells in chronic hepatitis C infection / C. Bain, A. Fatmi, F. Zoulim, J. P. Zarski, C. Trepo, G. Inchauspe // Gastroenterology. – 2001. – Vol. 120. – P. 512-24.
51. Balazs, M. Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses / M. Balazs, F. Martin, T. Zhou, J. Kearney // Immunity. - 2002. - Vol. 17. - P. 341–352.
52. Bamchereau, J. Dendritic cells and the control of immunity / J. Bamchereau, R. M. Steinman // Nature. - 1998. - Vol. 392. - P. 245-252.
53. Banchereau, J. Immunobiology of dendritic cells / J. Banchereau, F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran, K. Palucka // Annu. Rev. Immunol. - 2000. - Vol. 18. - P. 767–811.

54. Barchet, W. Plasmacytoid dendritic cells—virus experts of innate immunity / W. Barchet, M. Cella, M. Colonna // Semin Immunol. – 2005. - Vol. 17. – P. 253-61.
55. Barth, H. Scavenger receptor class B is required for hepatitis C virus uptake and cross-presentation by human dendritic cells / H. Barth, E. K. Schnober, C. Neumann-Haefelin, et al. // J Virol. – 2008. – Vol. 82. – P. 3466-79.
56. Basu, S. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin / S. Basu, R. J. Binder, T. Ramalingam, P. K. Srivastava // Immunity. - 2001. - Vol. 14. - P. 303–313.
57. Bergtold, A. Cell surface recycling of internalized antigen permits dendritic cell priming of B cells / A. Bergtold, D. D. Desai, A. Gavhane, R. Clynes // Immunity. - 2005. - Vol. 23. - P. 503–514.
58. Bertoletti, A. Kinetics of the immune response during HBV and HCV infection / A. Bertoletti, C. Ferrari // Hepatology. – 2003. – Vol. 38. – P. 4-13.
59. Bjorck, P. Human interdigitating dendritic cells directly stimulate CD40-activated naive B cells / P. Bjorck, L. Flores-Romo, Y. J. Liu // Eur. J. Immunol. - 1997. - Vol. 27. - P. 1266–1274.
60. Blander, J.M. Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors / J. M. Blander, R. Medzhitov // Science. - 2004. - Vol. 304. - P. 1014–1018.
61. Blom, B. Generation of interferon-producing predendritic cell (Pre-DC)2 from human CD34 hematopoietic stem cells / B. Blom, S. Ho, S. Antonenko, Y. J. Liu // J. Exp. Med. – 2000. – Vol. 192. – P. 1785–1796.
62. Brocker, T. Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo / T. Brocker, M. Riedinger, K. Karjalainen // J. Exp. Med. - 1997. - Vol. 185. - P. 541–550.
63. Bronowicki, J. P. Lymphocyte reactivity to hepatitis C virus (HCV) antigens shows evidence for exposure to HCV in HCV-seronegative spouses of HCV-infected patients / J. P. Bronowicki, D. Vetter, G. Uh1, H. Hudziak, A. Uhrlacher, J. Vetter, et al. // J Infect Dis. – 1997. – Vol. 176, N 2. – P. 518-522.
64. Caux, C. GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic

Langerhans cells / C. Caux, C. Dezutier-Dambuyant, D. Schmitt, J. Banchereau // Nature. – 1992. – Vol. 360. – P. 258.

65. Cella, M. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation / M. Cella, D. Scheidegger, K. Palmer-Lehmann, P. Lane, A. Lanzavecchia, et al. // J Exp Med. – 1996. – Vol. 184. – P. 747–752.

66. Cella, M. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type 1 interferon / M. Cella, D. Jarrossay, F. Facchetti, et al. // Nat. Med. – 1999. – Vol. 5. – P. 919-923.

67. Cerny, A. Cytotoxic T lymphocyte response to hepatitis C virus-derived peptides containing the HLA A2.1 binding motif / A. Cerny, J. G. McHutchison, C. Pasquinelli, M. E. Brown, M. A. Brothers, B. Grabscheid, et al. // J Clin Invest. – 1995. – Vol. 95. – P. 521-53.

68. Chen, S. L. The Natural History of Hepatitis C Virus (HCV) Infection / S. L. Chen, T. R. Morgan // Int J Med Sci. - 2006. - Vol. 3, № 2. - P. 47–52.

69. Chen, W. Modification of cysteine residues in vitro and in vivo affects the immunogenicity and antigenicity of major histocompatibility complex class I restricted viral determinants / W. Chen, J. W. Yewdell, R. L. Levine, J. R. Bennink // J. Exp. Med. - 1999. - Vol. 189. - P. 1757–1764.

70. Ciurea, A. Impairment of CD4(+) T cell responses during chronic virus infection prevents neutralizing antibody responses against virus escape mutants / A. Ciurea, L. Hunziker, P. Klenerman, H. Hengartner, R. M. Zinkernagel // J Exp Med. – 2001. – Vol. 193. – P. 297-305.

71. Colino, J. Dendritic cells pulsed with intact Streptococcus pneumoniae elicit both protein- and polysaccharide-specific immunoglobulin isotype responses in vivo through distinct mechanisms / J. Colino, Y. Shen, E.A. Snapper // J. Exp. Med. - 2002. - Vol. 195. - P. 1–13.

72. Conti, L. Reciprocal activating interaction between dendritic cells and pamidronate-stimulated gammadelta T cells: role of CD86 and inflammatory cytokines /

L. Conti, R. Casetti, M. Cardone, B. Varano, A. Martino, F. Belardelli, F. Poccia, S. Gessani // J. Immunol. - 2005. - Vol. 174. - P. 252–260.

73. Coquet, J. M. The CD27 and CD70 costimulatory pathway inhibits effector function of T helper 17 cells and attenuates associated autoimmunity / J. M. Coquet, S. Middendorp, G. van der Horst, J. Kind, E. A. Veraar, Y. Xiao, et al. // Immunity. – 2012. – Vol. 38. – P. 53–65.

74. Cormier, E. G. L-SIGN (CD209L) and DC-SIGN (CD209) mediate transinfection of liver cells by hepatitis C virus / E. G. Cormier, R. J. Durso, F. Tsamis, et al. // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2004. – Vol. 101. – P. 14067-72.

75. Crotta, S. Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein / S. Crotta, A. Stillà, A. Wack, et al. // J Exp Med. – 2002. – Vol. 195. – P. 35-41.

76. Das, S. K. Genesis of hepatic fibrosis and its biochemical markers // S. K. Das, D. M. Vasudevan // Scand. J. Clin. Lab. Invest. - 2008. - Vol. 4, № 68. - P. 260-269.

77. Degos, F. Hepatitis C virus related cirrhosis: time to occurrence of hepatocellular carcinoma and death / F. Degos, C. Christidis, N. Ganne-Carrie, J. P. Farmachidi, C. Degott, C. Guettier, et al. // Gut. - 2000. – Vol. 47, № 1. – P. 131-6.

78. Deuffic-Burban, S. Estimating the future health burden of chronic hepatitis C and human immunodeficiency virus infections in the United States / S. Deuffic-Burban, T. Poynard, M. S. Sulkowski, J. B. Wong // J Viral Hepat. - 2007. - Vol. 14. - P. 107-15.

79. Dominguez-Villar ,M. Hepatitis C virus core protein up-regulates anergy-related genes and a new set of genes, which affects T cell homeostasis / M. Dominguez-Villar, A. Muñoz-Suano, B. Anaya-Baz, S. Aguilar, J. P. Novalbos, J. A. Giron, et al. // Journal of leukocyte biology. - 2007. – Vol. 82, № 5. – P. 1301-10.

80. Dominguez-Villar, M. The effects of hepatitis C virus core protein on functional responses in the NK cell line YTS / M. Dominguez-Villar, F. J. Garcia-Cozar, B. J. Chambers // Scandinavian journal of immunology. - 2012. – Vol. 75, № 1. – P. 54-60.

81. Dominguez-Villar, M. Up-regulation of FOXP3 and induction of suppressive function in CD4 Jurkat T-cells expressing hepatitis C virus core protein / M.

- Dominguez-Villar, A. Muñoz-Suano, M. Rodríguez-Iglesias, F. García-Cozar, C. Fernandez-Ponce, E. Gomez, et al. // Clinical science (London, England : 1979). - 2012. – Vol. 123, № 1. – P. 15-27.
82. Duan, X. Z. Decreased numbers and impaired function of circulating dendritic cell subsets in patients with chronic hepatitis B infection / X. Z. Duan, M. Wang, H. W. Li, J. C. Liu, F. S. Wang // J. Gastroenterol. Hepatol. – 2005. – Vol. 20. – P. 234-242.
83. Dubois, B. Dendritic cells directly modulate B cell growth and differentiation / B. Dubois, J. M. Bridon, J. Fayette, C. Barthelemy, J. Banchereau, C. Caux, F. Briere // J. Leukoc. Biol. - 1999. - Vol. 66. - P. 224–230.
84. Dzionaek, A. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood / A. Dzionaek, A. Fuchs, P. Schmidt, et al. // J. Immunol. – 2000. – Vol. 165. – P. 6037-6046.
85. EASL Clinical Practice Guidelines: Recommendations on treatment of hepatitis C 2015. <http://www.easl.eu/research/our-contributions/clinical-practice-guidelines/detail/recommendations-on-treatment-of-hepatitis-c-2015>
86. Ebner, S. Expression of C-type lectin receptors by subsets of dendritic cells in human skin / S. Ebner, Z. Ehammer, S. Holzmann, P. Schwingshakl, M. Forstner, P. Stoitzner, G. M. Huemer, P. Fritsch, N. Romani // Int. Immunol. – 2004. – Vol. 16. – P. 877– 887.
87. Encke, J. Prophylactic and Therapeutic Vaccination with Dendritic Cells against Hepatitis C Virus Infection / J. Encke, J. Findeklee, J. Geib, E. Pfaff, W. Stremmel // Clinical and Experimental Immunology. – 2005. – Vol. 142. – P. 362-369.
88. Engering, A. J. The mannose receptor functions as a high capacity and broad specificity antigen receptor in human dendritic cells / A. J. Engering, M. Cella, D. Fluitsma, M. Brockhaus, E. C. Hoefsmit, A. Lanzavecchia, J. Pieters // Eur. J. Immunol. - 1997. - Vol. 27. - P. 2417–2425.
89. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatitis C virus infection // Journal of Hepatology. – 2011. - Vol. 55. – P. 245–264.

90. Fallarino, F. CTLA-4-Ig activates forkhead transcription factors and protects dendritic cells from oxidative stress in nonobese diabetic mice / F. Fallarino, R. Bianchi, C. Orabona, C. Vacca, M. L. Belladonna, M. C. Fioretti, D. V. Serreze, U. Grohmann, P. Puccetti // J. Exp. Med. - 2004. - Vol. 200. - P. 1051–1062.
91. Fanger, N. A. Characterization of expression, cytokine regulation, and effector function of the high affinity IgG receptor Fcγc1 (CD64) expressed on human blood dendritic cells / N.A. Fanger, D. Voigtlaender, C. Liu, et al. // J. Immunol. – 1997. – Vol. 158. – P. 3090-3098.
92. Fattovich, G. Morbidity and mortality in compensated cirrhosis type C: a retrospective follow-up study of 384 patients / G. Fattovich, G. Giustina, F. Degos, F. Tremolada, G. Diodati, P. Almasio, et al. // Gastroenterology. -1997. – Vol. 112, № 2. – P. 463-72.
93. Fernandez, N. C. Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo / N. C. Fernandez, A. Lozier, C. Flament, P. Ricciardi-Castagnoli, D. Bellet, M. Suter, M. Perricaudet, T. Tursz, E. Maraskovsky, L. Zitvogel // Nat. Med. - 1999. - Vol. 5. - P. 405–411.
94. Frazier, A. D. Programmed death-1 affects suppressor of cytokine signaling-1 expression in T cells during hepatitis C infection / A. D. Frazier, C. L. Zhang, L. Ni, C. J. Ma, Y. Zhang, X. Y. Wu, et al. // Viral immunology. - 2010. – Vol. 23, N 5. – P. 487-95.
95. Frazier, A.D. Programmed death-1 affects suppressor of cytokine signaling-1 expression in T cells during hepatitis C infection / A. D. Frazier, C. L. Zhang, L. Ni, C. J. Ma, Y. Zhang, X. Y. Wu, A. N. Atia, Z. Q. Yao, J. P. // Viral immunology. - 2010. – Vol. 23, № 5. – P. 487-95.
96. Fried, M. W. Peginterferon Alfa-2a plus Ribavirin for Chronic Hepatitis C Virus Infection / M. W. Fried, M. L. Shiffman, K. R. Reddy, C. Smith, G. Marinos, F. L. Gonzales, et al. // N Engl J Med. – 2002. – Vol. 347. – P. 975-982.
97. Fujii, S. Innate Valpha14+ natural killer T cells mature dendritic cells, leading to strong adaptive immunity / S. Fujii, K. Shimizu, H. Hemmi, R. M. Steinman // Immunol. Rev. - 2007. - Vol. 220. - P. 183–198.

98. Fujii, S. The linkage of innate to adaptive immunity via maturing dendritic cells in vivo requires CD40 ligation in addition to antigen presentation and CD80/86 costimulation / S. Fujii, K. Liu, C. Smith, A. J. Bonito, R. M. Steinman // *J. Exp. Med.* - 2004. - Vol. 199. - P. 1607–1618.
99. Fukushi, S. Complete 5' noncoding region is necessary for the efficient internal initiation of hepatitis C virus RNA / S. Fukushi, K. Katayama, C. Kurihara, N. Ishiyama, F. B. Hoshino, T. Ando, et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 1994. - Vol. 199. - P. 425–432.
100. Gallegos, A. M. Central tolerance to tissuespecific antigens mediated by direct and indirect antigen presentation / A. M. Gallegos, M. J. Bevan // *J. Exp. Med.* - 2004. - Vol. 200. - P. 1039–1049.
101. Garcia, F. Detection of HCV and GBV-CHGV RNA in peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic type C hepatitis / F. Garcia Jr., F. Garcia, C. Roldan, et al. // *Microbios.* - 2000. - Vol. 103. - P. 7-15.
102. Gerosa, F. The reciprocal interaction of NK cells with plasmacytoid or myeloid dendritic cells profoundly affects innate resistance functions / F. Gerosa, A. Gobbi, P. Zorzi, S. Burg, F. Briere, G. Carra, G. Trinchieri // *J. Immunol.* - 2005. - Vol. 174. - P. 727–734.
103. Godiska, R. Human macrophage derived chemokine (MDC) a novel chemoattractant for monocytes, monocyte derived dendritic cells, and natural killer cells / R. Godiska, D. Chantry, C. J. Raport, S. Sozzani, P. Allavena, D. Leviten, A. Mantovani, P. W. Gray // *J. Exp. Med.* - 1997. - Vol. 185. - P. 1595-1604.
104. Goldschneider, I. A central role for peripheral dendritic cells in the induction of acquired thymic tolerance / I. Goldschneider, R. E. Cone // *Trends. Immunol.* - 2003. - Vol. 24. - P. 77–81.
105. Goutagny, N. Evidence of viral replication in circulating dendritic cells during hepatitis C virus infection / N. Goutagny, A. Fatmi, L. V. De, et al. // *J Infect Dis.* - 2003. - Vol. 187. - P. 1951-8.

106. Gowans, E. J. A phase i clinical trial of dendritic cell immunotherapy in hcv-infected individuals / E. J. Gowans, S. Roberts, K. Jones, I. Dinatale, P. A. Latour, B. Chua, et al. // *J Hepatol.* – 2010. – Vol. 53, N 4. – P. 599–607.
107. Grouard, G. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand / G. Grouard, M. C. Rissoan, L. Filgueira, I. Duran, J. Banchereau, Y. J. Liu // *J. Exp. Med.* – 1997. – Vol. 185. – P. 1101-1111.
108. Guermonprez, P. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells / P. Guermonprez, J. Valladeau, L. Zitvogel, C. Thery, S. Amigorena // *Annu. Rev. Immunol.* - 2002. - Vol. 20. - P. 621–267.
109. Hadziyannis, S. J. Peginterferon alfa-2a (40kD) (PEGASYS) in combination with ribavirin (RBV): efficacy and safety results from a phase III, randomised, double-blind multicentre study examining effect of duration of treatment and RBV dose / S. J. Hadziyannis, H. Cheinquer, T. Morgan, M. Diago, D. M. Jensen, H. Sette, et al. // *J Hepatol.* – 2002. – Vol. 36 (Suppl 1). – P. 3.
110. Hall, A. Rho GTPases: Molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton / A. Hall, C. D. Nobes // *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* - 2000. - Vol. 355. - P. 965–970.
111. Hart, D. N. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response / D. Hart // *Blood.* - 1997. - Vol. 90. - P. 3245-3287.
112. He, X. S. Quantitative analysis of hepatitis C virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells in peripheral blood and liver using peptide-MHC tetramers / X.S. He, B. Rehermann, F. X. Lopez-Labrador // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1999. – Vol. 96. – P. 5692-569.
113. Inaba, K. The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli / K. Inaba, S. Turley, T. Iyoda, F. Yamaide, S. Shimoyama, C. Reis e Sousa, R. N. Germain, I. Mellman, R. M. Steinman // *J. Exp. Med.* - 2000. - Vol. 191. - P. 927-36.
114. Ito, T. A CD1a+/CD11c+subset of human blood dendritic cells is a direct precursor of Langerhans cells / T. Ito, M. Inaba, K. Inaba // *J. Immunol.* - 1999. - Vol. 163. - P. 1409-1419.

115. Ito, T. TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand / T. Ito, Y. H. Wang, O. Duramad, T. Hori, G. J. Delespesse, N. Watanabe, et al. // The Journal of experimental medicine. - 2005. - Vol. 202, N 9. - P. 1213-23.
116. Jarrossay, D. Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells / D. Jarrossay, G. Napolitani, M. Colonna, F. Sallusto, A. Lanzavecchia // Eur. J. Immunol. - 2001. - Vol. 31. - P. 3388 –3398.
117. Jenkins, S. J. Dendritic cell expression of OX40 ligand acts as a costimulatory, not polarizing, signal for optimal Th2 priming and memory induction in vivo / S. J. Jenkins, G. Perona-Wright, A. G. Worsley, N. Ishii, A. S. MacDonald // J. Immunol. - 2007. - Vol. 179. - P. 3515–3523.
118. Jiang, W. The receptor DEC–205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing / W. Jiang, W. J. Swiggard, C. Heufler, M. Peng, A. Mirza, R. M. Steinman, M. C. Nussenzweig // Nature. - 1995. - Vol. 375. - P. 151–155.
119. Jonuleit, H. Proinflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions / H. Jonuleit, U. Kuhn, G. Muller, K. Steinbrink, L. Paragnik, et al. // Eur J Immunol. - 1997. - Vol. 27. - P. 3135–3142.
120. Jurgens, M. Activation of human epidermal Langerhans cells by engagement of the high affinity receptor for IgE, Fc epsilon RI / M. Jurgens, A. Wollenberg, D. Hanau, H. de la Salle, T. Bieber // J. Immunol. - 1995. - Vol. 155. - P. 5184–5189.
121. Kaimori, A. Pseudotype hepatitis C virus enters immature myeloid dendritic cells through the interaction with lectin / A. Kaimori, T. Kanto, L. C. Kwang, et al. // Virology. - 2004. - Vol. 324. - P. 74-83.
122. Kalams, S. A. The critical need for CD4 help in maintaining effective cytotoxic T lymphocyte responses / S. A. Kalams, B. D. Walker // J Exp Med. - 1998. - Vol. 188. - P. 2199-204.

123. Kanto, T. Reduced numbers and impaired ability of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to polarize T helper cells in chronic hepatitis C virus infection / T. Kanto, M. Inoue, H. Miyatake, et al. // J Infect Dis. – 2004. – Vol. 190. – P. 1919-26.
124. Katsuaki, S. Dendritic Cells-Nature and Classification / S. Katsuaki, F. Shigeharu // Allergology International. – 2007. – Vol. 56. – P. 183-191.
125. Katz, S. I. Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow / S. I. Katz, K. Tamaki, D. H. Sachs // Nature. – 1979. – Vol. 282. – P. 324–326.
126. Kawai, T. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition / T. Kawai, S. Akira // Int Immunol. – 2009. – Vol. 21. – P. 317–337.
127. Keeffe, E. B. (2003) Management of Hepatitis C Treatment Failure. Accessed: <http://www.hcvadvocate.org/hcsp/articles/Keeffe-3.html>
128. Klenerman, P.T. Cell responses in persistent virus infection // Monothematic conference: Immune Mediated Liver Injury. – Hamburg, Germany, December 4–6, 2008.
129. Kohara, M. Impairment of interferon regulatory factor-3 activation by hepatitis C virus core protein basic amino acid region 1 / M. Kohara, M. Yoneyama, T. Fujita, K. Inoue, K. Tsukiyama-Kohara, C. Matsuda, et al. // Biochemical and biophysical research communications. - 2012. – Vol. 428, № 4. – P. 494-9.
130. Kovacs-Bankowski, M. A phagosomes-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules / M. Kovacs-Bankowski, K. L. Rock // Science. - 1995. - Vol. 267. - P. 243-6.
131. Kranich, J. Follicular dendritic cells control engulfment of apoptotic bodies by secreting Mfge8 / J. Kranich, N. J. Krautler, E. Heinen, M. Polymenidou, C. Bridel, A. Schildknecht, C. Huber, M. H. Kosco-Vilbois, R. Zinkernagel, G. Miele, A. Aguzzi // J Exp Med. – 2008. – Vol. 205, №. 6. – P. 1293-302.
132. Kurokohchi, K. Use of recombinant protein to identify a motif-negative human cytotoxic T-cell epitope presented by HLA-A2 in the hepatitis C virus NS3 region / K. Kurokohchi, T. Akatsuka, C. D. Pendleton, A. Takamizawa, M. Nishioka, M. Battegay, et al. // J Virol. – 1996. – Vol. 70. – P. 232-240.

133. Lange, C. Dendritic cell-regulatory T-cell interactions control self-directed immunity / C. Lange, M. Durr, H. Doster, A. Melms, F. Bischof // Immunol. Cell. Biol. - 2007. - Vol. 85. - P. 575–581.
134. Langerhans, P. Ueber die Nerven der menschlichen Haut / P. Langerhans // Archiv fur pathologische Anatomie und Physiologie, und fur Klinische Medicin. – 1868. - Vol. 44. – P. 325–337.
135. Leslie, D. S. CD1-mediated gamma/delta T cell maturation of dendritic cells / D. S. Leslie, M. S. Vincent, F. M. Spada, H. Das, M. Sugita, C. T. Morita, M. B. Brenner // J. Exp. Med. - 2002. - Vol. 196. - P. 1575–1584.
136. Lesterhuis, W. J. Platinumbased drugs disrupt STAT6-mediated suppression of immune responses against cancer in humans and mice / W. J. Lesterhuis, C. J. Punt, S. V. Hato, D. Eleveld-Trancikova, B. J. Jansen, S. Nierkens, et al. // J. Clin. Invest. – 2011. – Vol. 121. – P. 3100–3108.
137. Lin, C. H. Efficient expansion of regulatory T cells in vitro and in vivo with a CD28 superagonist / C. H. Lin, T. Hunig // Eur. J. Immunol. - 2003. - Vol. 33. - P. 626–638.
138. Lin, W. Hepatitis C virus core protein blocks interferon signaling by interaction with the STAT1 SH2 domain / W. Lin, S. S. Kim, E. Yeung, et al. // J Virol. – 2006. – Vol. 80, № 18. – P. 9226–9235.
139. Liu, Y. J. Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation / Y. J. Liu, H. Kanzler, V. Soumelis, M. Gilliet // Nat. Immunol. - 2001. - Vol. 2. - P. 585–589.
140. Liu, Y. J. Follicular dendritic cells and germinal centers / Y. J. Liu, G. Grouard, O. de Bouteiller, J. Banchereau // Int Rev Cytol. – 1996/ - Vol. 166. – P. 139–79.
141. Liu, Y.J. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors / Y. J. Liu // Annu Rev Immunol. – 2005. – Vol. 23. – P. 275–306.
142. Longman, R. S. Normal Functional Capacity in Circulating Myeloid and Plasmacytoid Dendritic Cells in Patients with Chronic Hepatitis C / R. S. Longman, A.

H. Talal, I. M. Jacobson, C. M. Rice, M. L. Albert // The Journal of Infectious Diseases. - 2005. - Vol. 192. - P. 497–503.

143. Lozach, P. Y. DC-SIGN and L-SIGN are high affinity binding receptors for hepatitis C virus glycoprotein E2 / P. Y. Lozach, H. Lortat-Jacob, D. L. de Lacroix, et al. // J Biol Chem. – 2003. – Vol. 278. – P. 20358-66.

144. Ludwig, I. S. Hepatitis C virus targets DC-SIGN and LSIGN to escape lysosomal degradation / I. S. Ludwig, A. N. Lekkerkerker, E. Depla, et al. // J Virol. – 2004. – Vol. 78. – P. 8322-32.

145. Major, M. E. Long-term follow-up of chimpanzees inoculated with the first infectious clone for hepatitis C virus / M. E. Major, K. Mihalik, J. Fernandez, et al. // J Virol. – 1999. – Vol. 73. – P. 3317-25.

146. Manns, M. P. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial / M. P. Manns, J. G. McHutchison, S. C. Gordon, V. K. Rustgi, M. Schiffman, R. Reindollar, et al. // Lancet. – 2001. – Vol. 358, № 9286. – P. 958-65.

147. Manns, M. P. Treating viral hepatitis C: efficacy, side effects, and complications / M. P. Manns, H. Wedemeyer, M. Cornberg // Gut. – 2006. – Vol. 55/ - P. 1350–1359.

148. Maraskovsky, E. In vivo generation of human dendritic cell subsets by Flt3 ligand / E. Maraskovsky, E. Daro, E. Roux, M. Teepe, C. R. Maliszewski, J. Hoek, D. Caron, M. E. Lebsack, H. J. McKenna // Blood. – 2000. – Vol. 96. – P. 878–884.

149. Martell, M. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution / M. Martell, J. I. Esteban, J. Quer, J. Genesc, A. Weiner, R. Esteban, et al. // J Virol. – 1992. – Vol. 66, N 5. – P. 3225–3229.

150. Matsuda, J.L. Presentation of self and microbial lipids by CD1 molecules / J. L. Matsuda, M. Kronenberg // Curr. Opin. Immunol. - 2001. - Vol. 13. - P. 19–25.

151. Mazumdar, B. Hepatitis C virus-mediated inhibition of cathepsin S increases invariant-chain expression on hepatocyte surface / B. Mazumdar, H. Kim, K. Meyer, S.

K. Bose, A. M. Di Bisceglie, R. Ray, et al. // Journal of virology. - 2012. - Vol. 86, N 18. - P. 9919-28.

152. Medzhitov, R. Decoding the Patterns of Self and Nonself by the Innate Immune System / R. Medzhitov, C. A. Janeway // Science/ - 2002. - Vol. 296. - P. 298–300.
153. Medzhitov, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response / R. Medzhitov // Nature. – 2007. – Vol. 449. – P. 819.
154. Millet, V. Intercellular MHC transfer between thymic epithelial and dendritic cells / V. Millet, P. Naquet, R. R. Guinamard // Eur. J. Immunol. - 2008. - Vol. 38. - P. 1257–1263.
155. Missale, G. Different clinical behaviors of acute hepatitis C virus infection are associated with different vigor of the anti-viral cell-mediated immune response / G. Missale, R. Bertoni, V. Lamonaca, et al. // J Clin Invest. – 1996. – Vol. 98. – P. 706-14.
156. Mosse, C.A. The class I antigen-processing pathway for the membrane protein tyrosinase involves translation in the endoplasmic reticulum and processing in the cytosol / C. A. Mosse, L. Meadows, C. J. Luckey, D. J. Kittlesen, E. L. Huczko, L. Slingluff, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, V. H. Engelhard // J. Exp. Med. - 1998. - Vol. 187. - P. 37–48.
157. Münz, C. Mature myeloid dendritic cell subsets have distinct roles for activation and viability of circulating human natural killer cells / C. Münz, T. Dao, G. Ferlazzo, M. A. de Cos, K. Goodman, J. W. Young // Blood. - 2005. - Vol. 105. - P. 266–273.
158. Murakami, H. Decreased interferon-alpha production and impaired T helper 1 polarization by dendritic cells from patients with chronic hepatitis C / H. Murakami, S. M. F. Akbar, H. Matsui, N. Horike, M. Onji // Clin. Exp. Immunol. – 2004. – Vol. 137. – P. 559-565.
159. Nakamoto, N. et al. Functional restoration of HCV-specific CD8 T cells by PD-1 blockade is defined by PD-1 expression and compartmentalization // Gastroenterology. – 2008. – Vol. 134. – P. 1927–1937.

160. Narbutt J. The distribution of peripheral blood dendritic cells assayed by a new panel of anti-BDCA monoclonal antibodies in healthy representatives of the polish population / J. Narbutt, A. Lesiak, M. Zak-Prelich, et al. // Cell. Mol. Biol. Lett. – 2004. – Vol. 9. – P. 497-509.
161. Navas, M. C. Dendritic cell susceptibility to hepatitis C virus genotype 1 infection / M. C. Navas, A. Fuchs, E. Schvoerer, A. Bohbot, A. M. Aubertin, F. Stoll-Keller // J Med Virol. – 2002. – Vol. 67. – P. 152-61.
162. O'Doherty, U. Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature / U. O'Doherty, M. Peng, S. Gezelter, et al. // J. Immunol. – 1994. – Vol. 82. – P. 487-493.
163. Ostankovitch, M. Regulated folding of tyrosinase in the endoplasmic reticulum demonstrates that misfolded full-length proteins are efficient substrates for class I processing and presentation / M. Ostankovitch, V. Robila, V. H. Engelhard // J. Immunol. - 2005. - Vol. 174. - P. 2544–2551.
164. Pachiadakis, I. Is hepatitis C virus infection of dendritic cells a mechanism facilitating viral persistence? / I. Pachiadakis, G. Pollara, B. M. Chain, N. V. Naoumov // Lancet Infect Dis. – 2005. – Vol. 5, № 5. – P. 296–304.
165. Park, S. H. The mouse CD1d-restricted repertoire is dominated by a few autoreactive T cell receptor families / S. H. Park, A. Weiss, K. Benlagha, T. Kyin, L. Teyton, A. Bendelac // J. Exp. Med. - 2001. - Vol. 193. - P. 893–904.
166. Patsoukis, N. Selective effects of PD-1 on Akt and Ras pathways regulate molecular components of the cell cycle and inhibit T cell proliferation / N. Patsoukis, J. Brown, V. Petkova, F. Liu, L. Li, V. A. Boussiotis // Sci. Signal. – 2012. – Vol. 5, N 230, ra46. doi: 10.1126/scisignal.2002796
167. Pfeifer, J. D. Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells / J. D. Pfeifer, M. J. Wick, R. L. Roberts, K. Findlay, S. J. Normark, C. V. Harding // Nature. - 1993. - Vol. 361. - P. 359–362.
168. Pham, T. N. Hepatitis C virus persistence after spontaneous or treatment-induced resolution of hepatitis C / T. N. Pham, S. A. MacParland, P. M. Mulrooney, H. Cooksley, N. V. Naoumov, T. I. Michalak // J Virol. – 2004. – Vol. 78. – P. 5867-74.

169. Pham, T. N. Hepatitis C virus replicates in the same immune cell subsets in chronic hepatitis C and occult infection / T. N. Pham, D. King, S. A. MacParland, et al. // Gastroenterology. – 2008. – Vol. 134. – P. 812-22.
170. Power, C. A. Cloning and characterization of a specific receptor for the novel CC chemokine MIP-3 alpha from lung dendritic cells / C. A. Power, D. J. Church, A. Meyer, S. Alouani, A. E. I. Proudfoot, I. Clark-Lewis, S. Sozzani, A. Mantovani, T. N. C. Wells // J. Exp. Med. – 1997. – Vol. 186. – P. 825-835.
171. Pulendran, B. Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo / B. Pulendran, J. L. Smith, G. Caspary, K. Brasel, D. Pettit, E. Maraskovsky, C. R. Maliszewski // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1999. - Vol. 96. - P. 1036–1041.
172. Regnault, A. Fcgamma receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization / A. Regnault, D. Lankar, V. Lacabanne, A. Rodriguez, C. Thery, M. Rescigno, T. Saito, S. Verbeek, C. Bonnerot, P. Ricciardi-Castagnoli, S. Amigorena // J. Exp. Med. - 1999. - Vol. 189. - P. 371–380.
173. Reid, C. D. Interactions of tumor necrosis factor with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor with granulocyte-macropahge colony-stimulating factor and other cytokines in the regulation of dendritic cell growth in vitro from early bipotent CD34+ progenitors in human bone marrow / C. D. Reid, A. Stackpoole, A. Meager, J. Tikerpae //J. Immunol. – 1992. – Vol. 149. – P. 2681.
174. Reis e Sousa C. Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro / C. Reis e Sousa, P. D. Stahl, J. M. Austyn // J. Exp. Med. - 1993. - Vol. 178. - P. 509–519.
175. Reizis, B. Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions / B. Reizis, A. Bunin, H. S. Ghosh, K. L. Lewis, V. Sisirak // Annu Rev Immunol. – 2011. – Vol. 29. – P. 163-83.
176. Rissoan, M. C. Reciprocal control of T helper cell dendritic cell differentiation / M. C. Rissoan, V. Soumelis, N. Kadowaki, et al. // Science. – 1999. – Vol. 283. – P. 1183-1186.

177. Robinson, S. P. Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cell / S. P. Robinson, D. Davies, N. English, S. Patterson, S. C. Knight, C. D. L. Reid // Eur. J. of Immunol. – 1999. – Vol. 29. – P. 2769-2778.
178. Rodrigue-Gervais, I. G. Poly(I:C) and lipopolysaccharide innate sensing functions of circulating human myeloid dendritic cells are affected in vivo in hepatitis C virus-infected patients / I. G. Rodrigue-Gervais, L. Jouan, G. Beaule, et al. // J Virol. – 2007. – Vol. 81. – P. 5537-46.
179. Rollier, C. Chronic hepatitis C virus infection established and maintained in chimpanzees independent of dendritic cell impairment / C. Rollier, J. A. Drexhage, B. E. Verstrepen, et al. // Hepatology. – 2003. – Vol. 38. – P. 851-8.
180. Romani, N. Proliferating [sic] dendritic cell progenitors in human blood / N. Romani, S. Gruner, D. Brang, E. Kampgen, A. Lenz, B. Trockenbacher, G. Konwalinka, P. O. Fritsch, R. M. Steinman, G. Schuler // J. Exp. Med. - 1994. - Vol. 180. - P. 83–93.
181. Rosen, H. R. Determination of Hepatitis C virus-specific effector CD4. T cell by flow cytometry: Correlation with clinical disease stages / H. R. Rosen, C. Miner, D. Lewinsohn, A. W. Sasaki, A. J. Conrad, A. Bakke, et al. // Hepatology. – 2002. – Vol. 35. – P. 190-19.
182. Ryan, E. J. Chronic hepatitis C infection blocks the ability of dendritic cells to secrete IFN- $\alpha$  and stimulate T-cell proliferation / E. J. Ryan, N. J. Stevenson, J. E. Hegarty, C. Ofarrelly // J Viral Hepat. - 2011. - Vol. 18, № 12. - P. 840-51.
183. Saito, T. et al. Regulation of innate immunity against hepatitis C virus infection // Hepatol. Res. – 2008. – Vol. 38. – P. 115–122.
184. Sallusto, F. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor / F. Sallusto, A. Lanzavecchia // J. Exp. Med. - 1994. - Vol. 179. - P. 1109 –1118.
185. Santiago-Schwarz, F. TNF in combination with GM-CSF enhances the differentiation of neonatal cord blood stem cells into dendritic cells and macrophages / F. Santiago-Schwarz, E. Belilos, B. Diamond, S. E. Carsons // J. Leukoc. Biol. – 1992. – Vol. 52. – P. 274.

186. Sarobe, P. Abnormal Priming of CD4(+) T Cells by Dendritic Cells Expressing Hepatitis C Virus Core and E1 Proteins / P. Sarobe, J. J. Lasarte, N. Casares, et al. // *J Virol.* – 2002. – Vol. 76. – P. 5062–70.
187. Sarobe, P. Hepatitis C virus structural proteins impair dendritic cell maturation and inhibit in vivo induction of cellular immune responses / P. Sarobe, J. J. Lasarte, A. Zabaleta, L. Arribillaga, A. Arina, I. Melero, et al. // *J Virol.* – 2003. – Vol. 77. – P. 10862–71.
188. Sauter, B. Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells / B. Sauter, M. L. Albert, L. Francisco, M. Larsson, S. Somersan, N. Bhardwaj // *J. Exp. Med.* - 2000. - Vol. 191. - P. 423–434.
189. Scholer, A. Intercellular adhesion molecule-1-dependent stable interactions between T cells and dendritic cells determine CD8+T cell memory / A. Scholer, S. Hugues, A. Boissonnas, L. Fetler, S. Amigorena // *Immunity.* – 2008. – Vol. 28. – P. 258–270.
190. Schuhbauer, D. M. Interaction within clusters of dendritic cells and helper T cells during initial Th1/Th2 commitment / D. M. Schuhbauer, N. A. Mitchison, B. Mueller // *Eur. J. Immunol.* - 2000. - Vol. 30. - P. 1255–1262.
191. Shimizu, Y. K. Early events in hepatitis C virus infection of chimpanzees / Y. K. Shimizu, A. J. Weiner, J. Rosenblatt, et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1990. – Vol. 87. – P. 6441–4.
192. Siegal, F. P. The nature of the principal Type 1 interferon producing cells in human blood / F. P. Siegal, N. Kadowaki, M. Shodell, et al. // *Science.* – 1999. – Vol. 284. – P. 1835–1837.
193. Singh-Jasuja, H. The heat shock protein gp96 induces maturation of dendritic cells and down-regulation of its receptor / H. Singh-Jasuja, H. U. Scherer, N. Hilf, D. ArnoldSchild, H. G. Rammensee, R. E. Toes, H. Schild // *Eur. J. Immunol.* - 2000. - Vol. 30. - P. 2211–2215.
194. Sozzani, S. Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties / S. Sozzani, P. Allavena, G.

D'Amico, W. Luini, G. Bianchi, M. Kataura, T. Imai, O. Yoshie, R. Bonecchi, A. Mantovani // *J. Immunol.* – 1998. – Vol. 161. – P. 1083-1086.

195. Sozzani, S. Human monocyte-derived and CD34+ cell-derived dendritic cells express functional receptors for platelet activating factor / S. Sozzani, D. Longoni, R. Bonecchi, W. Luini, L. Bersani, G. D'Amico, A. Borsatti, F. Bussolino, P. Allavena, A. Mantovani // *FEBS Lett.* – 1997. – Vol. 418. – P. 98-100.

196. Sozzani, S. Migration of dendritic cells in response to formyl peptides, C5a and a distinct set of chemokines / S. Sozzani, F. Sallusto, W. Luini, D. Zhou, L. Piemonti, P. Allavena, J. Van Damme, S. Valitutti, A. Lanzavecchia, A. Mantovani // *J. Immunol.* – 1995. – Vol. 155. – P. 3292-3295.

197. Sozzani, S. Receptor expression and responsiveness of human dendritic cells to a defined set of CC and CXC chemokines / S. Sozzani, W. Luini, A. Borsatti, N. Polentarutti, D. Zhou, L. Piemonti, G. D'Amico, C. A. Power, T. N. Wells, M. Gobbi, P. Allavena, A. Mantovani // *J. Immunol.* - 1997. - Vol. 159. - P. 1993-2000.

198. Steinman, R. M. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution / R. M. Steinman, Z. A. Cohn // *J. Exp. Med.* – 1973. – Vol. 137. – P. 1142–1162.

199. Stranska, R. Hepatitis C virus fails to activate NF-kappaB signaling in plasmacytoid dendritic cells / R. Stranska, J. Florentin, C. Dental, B. Aouar, F. Gondois-Rey, D. Durantel, T.F. Baumert, J.A. Nunes, D. Olive, I. Hirsch // *J. Virol.* - 2012. - Vol. 86, № 2. - P. 1090-1096.

200. Sugita, M. CD1c molecules broadly survey the endocytic system / M. Sugita, N. van Der Wel, R. A. Rogers, P. J. Peters, M. B. Brenner // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 2000. - Vol. 97. - P. 8445–8450.

201. Sugita, M. Separate pathways for antigen presentation by CD1 molecules / M. Sugita, E. P. Grant, E. van Donselaar, V. W. Hsu, R. A. Rogers, P. J. Peters, M. B. Brenner // *Immunity.* - 1999. - Vol. 11. - P. 743–752.

202. Szabo, G. Subversion of plasmacytoid and myeloid dendritic cell functions in chronic HCV infection / G. Szabo, A. Dolganiuc // *Immunobiology.* - 2005. - Vol. 210. - P. 237–47.

203. Takaki, A. Hepatitis C virus NS4 protein impairs the Th1 polarization of immature dendritic cells / A. Takaki, M. Tatsukawa, Y. Iwasaki, K. Koike, Y. Noguchi, H. Shiraha, K. Sakaguchi, E. Nakayama and K. Yamamoto // Journal of Viral Hepatitis. - 2010. - Vol. 17. - P. 555–562.
204. Takamizawa, M. Dendritic cells that process and present nominal antigens to naive T lymphocytes and derived from CD2+ precursors / M. Takamizawa, A. Rivas, F. Fagnoni, et al. // J. Immunol. – 1997. – Vol. 158. – P. 2134-2142.
205. Tarbell, K. V. CD25+CD4+ T cells, expanded with dendritic cells presenting a single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes / K. V. Tarbell, S. Yamazaki, K. Olson, P. Toy, R. M. Steinman // J. Exp. Med. - 2004. - Vol. 199. - P. 1467-77.
206. Taylor, D. R. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein / D. R. Taylor, S. T. Shi, P. R. Romano, G. N. Barber, M. M. Lai // Science. -1999. – Vol. 285, № 5424. – P. 107–110.
207. Thimme, R. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection / R. Thimme, D. Oldach, K. M. Chang, C. Steiger, S. C. Ray, F. V. Chisari // J Exp Med. – 2001. – Vol. 194. – P. 1395-1406.
208. Thomas, R. Human peripheral blood dendritic cell subset. Isolation and characterisation of precursor and mature antigen-presenting cells / R. Thomas, P. E. Lipsky // J. Immunol. - 1994. - Vol. 153. - P. 4016-4028.
209. Thurner, B. Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application / B. Thurner, C. Roder, D. Dieckmann, M. Heuer, M. Kruse, A. Glaser, P. Keikavoussi, E. Kampgen, A. Bender, G. Schuler // J. Immunol. Methods. - 1999. - Vol. 223. - P. 1–15.
210. Trombetta, E. S. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo / E. S. Trombetta, I. Mellman // Annu. Rev. Immunol. - 2005. - Vol. 23. - P. 975–1028.
211. Trombetta, E. S. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo / E. S. Trombetta, I. Mellman // Annu. Rev. Immunol. - 2005. - Vol. 23. - P. 975–1028.

212. Tseng, C. T. Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions / C. T. Tseng, G. R. Klimpel // J Exp Med. – 2002. – Vol. 195. – P. 43-9.
213. Tsubouchi, E. Isolation and functional analysis of circulating dendritic cells from hepatitis C virus (HCV) RNA-positive and HCV RNA-negative patients with chronic hepatitis C: role of antiviral therapy / E. Tsubouchi, S. M. F. Akbar, H. Murakami, N. Horike, M. Onji // Clin. Exp. Immunol. – 2004. – Vol. 137, № 2. – P. 417-423.
214. Ulsenheimer, A. Plasmacytoid dendritic cells in acute and chronic hepatitis C virus infection / A. Ulsenheimer, J. T. Gerlach, M. C. Jung, et al. // Hepatology. – 2005. – Vol. 41, N 3. – P. 643-651.
215. van der Werf, N. Th2 responses to helminth parasites can be therapeutically enhanced by, but are not dependent upon, GITR–GITR ligand costimulation in vivo / N. van der Werf, S. A. Redpath, A. T. Phythian-Adams, M. Azuma, J. E. Allen, R. M. Maizels, et al. // J. Immunol. - 2011. – Vol. 187. – P. 1411–1420.
216. van Nierop, K. Human follicular dendritic cells: function, origin and development / K. van Nierop, C. de Groot // Semin Immunol. – 2002. – Vol. 14, № 4. – P. 251-7.
217. Velazquez, V. M. Hepatic Enrichment and Activation of Myeloid Dendritic Cells During Chronic Hepatitis C Virus Infection / V. M. Velazquez, H. Hon, C. Ibegbu, S. J. Knechtle, A. D. Kirk, A. Grakoui // Hepat. - 2012. - Vol. 56, № 6. - P. 2071-2081.
218. Vertuani, S. Effect of interferon-alpha therapy on epitope-specific cytotoxic T lymphocyte responses in hepatitis C virus-infected individuals / S. Vertuani, M. Bazzaro, G. Gualandi, F. Micheletti, M. Marastoni, C. Fortini, et al. // Eur J Immunol. – 2002. – Vol. 32. – P. 144-154.
219. Villadangos, J. A. Control of MHC class II antigen presentation in dendritic cells: a balance between creative and destructive forces / J. A. Villadangos, P. Schnorrer, N. S. Wilson // Immunol. Rev. - 2005. - Vol. 207. - P. 191–205.

220. Wang, F. S. Dysfunction of peripheral blood dendritic cells from patients with chronic hepatitis B virus infection / F. S. Wang, L. X. Xing, M. X. Liu, C. L. Zhu, H. G. Liu, H. F. Wang, Z. Y. Lei // Wold J. Gastroenterol. – 2001. – Vol. 7. – P. 537-541.
221. Ward, S. Cellular immune responses against hepatitis C virus: The evidence base 2002 / S. Ward, G. Lauer, R. Isba, B. Walker, P. Klenerman // Clin Exp Immunol. – 2002. – Vol. 128. – P. 195-203.
222. Ware, C. F. TNF Superfamily Networks: bidirectional and interference pathways of the herpesvirus entry mediator (TNFSF14) / C. F. Ware, J. R. Sedy // Curr. Opin. Immunol. - 2011. – Vol. 23. – P. 627–631.
223. Watanabe, N. Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus / N. Watanabe, Y. H. Wang, H. K. Lee, T. Ito, Y. H. Wang, W. Cao, Y. J. Liu // Nature. - 2005. - Vol. 436. - P. 1181–1185.
224. Wedemeyer, H. Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells in chronic hepatitis C virus infection / H. Wedemeyer, X. S. He, M. Nascimbeni, A. R. Davis, H. B. Greenberg, J. H. Hoofnagle, et al. // J Immunol. – 2002. – Vol. 169. – P. 3447-3458.
225. Weiss, J. M. Osteopontin is involved in the initiation of cutaneous contact hypersensitivity by inducing Langerhans and dendritic cell migration to lymph nodes / J. M. Weiss, A. C. Renkl, C. S. Maier, M. Kimmig, L. Liaw, T. Ahrens, S. Kon, M. Maeda, H. Hotta, T. Uede, J. C. Simon // J. Exp. Med. - 2001. - Vol. 194. - P. 1219–1229.
226. Westbrook, R. H. Natural history of hepatitis C / R.H. Westbrook, G. Dusheiko // Hepatol. - 2014. - Vol. 61, № 1. - P. 58-68.
227. Wieland, S. F. Intrahepatic induction of alpha/beta interferon eliminates viral RNA-containing capsids in hepatitis B virus transgenic mice / S. F. Wieland, et al. // J. Virol. – 2005. – Vol. 79. – P. 9369–9380.
228. Wieland, S.F. et al. Intrahepatic induction of alpha/beta interferon eliminates viral RNA-containing capsids in hepatitis B virus transgenic mice // J. Virol. – 2005. – Vol. 79. – P. 9369–9380.

229. Yamanaka, R. Dendritic cell-based glioma immunotherapy (Review) / R. Yamanaka, N. Yajima, T. Abe, N. Tsuchiya, J. Homma, M. Narita, et al. // Int J Oncol. – 2003. – Vol. 23. – P. 5–15.
230. Zarling, A.L. Phosphorylated peptides are naturally processed and presented by major histocompatibility complex class I molecules in vivo / A. L. Zarling, S. B. Ficarro, F. M. White, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, V. H. Engelhard // J. Exp. Med. - 2000. - Vol. 192. - P. 1755–1762.
231. Zhang, C. L. Cross-talk between programmed death-1 and suppressor of cytokine signaling-1 in inhibition of IL-12 production by monocytes/macrophages in hepatitis C virus infection / C. L. Zhang, L. Ni, C. J. Ma, Y. Zhang, X. Y. Wu, Z. Q. Yao, et al. // Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950). -2011. – Vol. 186, N 5. – P. 3093-103.
232. Zimmermann, M. Hepatitis C virus core protein impairs in vitro priming of specific T cell responses by dendritic cells and hepatocytes / M. Zimmermann, C. Flechsig, N. La Monica, M. Tripodi, G. Adler, N. Dikopoulos // J Hepatol. – 2008. – Vol. 48. – P. 51-60.
233. Zitvogel, L. Targeting PD-1/PD-L1 interactions for cancer immunotherapy / L. Zitvogel, G. Kroemer // Oncoimmunology. – 2012. – Vol. 1. – P. 1223–1225.