

**КУРОЧКИНА ЮЛИЯ ДМИТРИЕВНА**

**ЭФФЕКТ ГЛЮКОКОРТИКОИДОВ НА ФУНКЦИИ ИНТЕРФЕРОН-АЛЬФА-  
ИНДУЦИРОВАННЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И  
БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ**

14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание учёной степени

кандидата медицинских наук

Новосибирск 2019

***Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном  
учреждении «Научно-исследовательский институт фундаментальной и  
клинической иммунологии»***

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук,  
профессор, член-корреспондент РАН

**Черных Елена Рэмовна**

**Официальные оппоненты:**

**Талаев Владимир Юрьевич**, доктор медицинских наук, заведующий лабораторией клеточной иммунологии, Федеральное бюджетное учреждение науки «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И. Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

**Трунов Александр Николаевич**, доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории иммунологии, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» СО РАН, руководитель научного отдела Новосибирского филиала Федерального государственного автономного учреждения "Национальный медицинский исследовательский центр "Межотраслевой научно-технический комплекс "Микрохирургия глаза" имени академика С.Н. Фёдорова" Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России), г.Томск.

Защита состоится «05» сентября 2019 г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 001.001.01 НИИФКИ по адресу: 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИИФКИ

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2019 г.

**Ученый секретарь диссертационного совета,**

кандидат медицинских наук



Хантакова Юлия Николаевна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** Дендритные клетки (ДК) являются профессиональными антигенпрезентирующими клетками, которые наряду со стимулирующей активностью могут оказывать толерогенное действие. Толерогенные ДК (тДК) характеризуются сниженной костимуляторной активностью и повышенной экспрессией ко-ингибиторных молекул, противовоспалительным профилем секретируемых цитокинов и способны индуцировать клональную деплецию и/или анергию Т-клеток, а также индуцировать генерацию регуляторных Т-клеток (Treg) [Domogalla M.P., 2017; Osorio F., 2015]. Учитывая способность тДК подавлять функции аутореактивных Т-лимфоцитов [Torres-Aguilar H., 2010], восстановление иммунологической толерантности с помощью генерируемых *in vitro* тДК или индукции толерогенной активности ДК *in vivo* рассматривается в качестве новой стратегии лечения аутоиммунных заболеваний (АИЗ) [Khan S., 2006; Wenink M. H., 2009]. Соответственно, вопросам генерации тДК и их изучению придается большое значение. Среди различных стимулов, способных индуцировать тДК, глюкокортикоиды привлекают особое внимание, поскольку являются важнейшими эндогенными регуляторами и широко используются в клинической практике. У человека толерогенные эффекты глюкокортикоидов наиболее детально исследованы в культурах ДК, генерируемых из моноцитов в присутствии GM-CSF и IL-4 (ИЛ4-ДК) [Hilkens C.M.U., 2010; Matasić R., 1999; Piemonti L., 1999]. В то же время, важным фактором дифференцировки моноцитов в дендритные клетки и их созревания является интерферон- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) [Rodríguez-Carrio J., 2014; Rönnblom L., 2013]. Генерируемые в присутствии IFN- $\alpha$  ДК (ИФН-ДК) отличаются от ИЛ4-ДК сигнальными путями активации, спектром экспрессируемых генов и обладают целым рядом функциональных особенностей: более высокой миграционной и проапоптогенной активностью, большей стабильностью, сохраняют после активации менее зрелый фенотип [Bella S., 2004; Gessani S., 2014; Leplina O.Y., 2015; Paquette R.L., 1998; Santini S.M., 2000]. Тем не менее, влияние дексаметазона на дифференцировку и созревание ИФН-ДК не изучалось. Не меньший интерес представляет исследование действия глюкокортикоидов на ИФН-ДК у больных ревматоидным артритом (РА). Патогенез РА связан с аутоиммунным воспалением, которое обусловлено срывом иммунологической толерантности и опосредуется аутореактивными Т-лимфоцитами, продуцирующими интерферон- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) и интерлейкин-17 (IL-17) [Chou E.H., 2013]. Современное лечение РА сводится к продолжительной неспецифической иммуносупрессивной терапии, которая эффективна не во всех случаях и повышает риск развития онкологических и инфекционных заболеваний [Guo Q., 2018]. С этой точки зрения, использование тДК представляется более безопасным и целенаправленным воздействием. Экспериментальные исследования показали безопасность и эффективность тДК в моделях артрита [Hochweller K., 2008; Stoop J.N., 2010] и послужили обоснованием для клинической апробации дексаметазон-индуцированных ИЛ4-ДК [Ahmed M.S., 2016; Osorio F., 2015]. В то же время свойства дексаметазон-модифицированных ИФН-ДК в качестве новой клеточной платформы тДК у больных РА не изучались.

Учитывая способность ДК при АИЗ презентировать хрящевые антигены, продуцировать провоспалительные цитокины и активировать Th1 и Th17 ответ [Khan S., 2009; Liu J., 2015; Wenink M.H., 2009], не менее важным остается вопрос, влияет ли глюкокортикоидная терапия на функции ИФН-ДК *in vivo*. Многие АИЗ ассоциированы с повышенным уровнем интерферонов I типа, а терапия интерферонами часто сопровождается развитием аутоиммунных осложнений [Rodríguez-Carrio J., 2014;

Rönnblom L., 2013]. Соответственно, IFN- $\alpha$  может играть важную роль в дифференцировке моноцитов в ДК и поддержании активированного статуса циркулирующих ДК при АИЗ [Blanco P., 2001; Gottenberg J.-E., 2007]. В то же время, вопрос о том, являются ли эти клетки при РА мишенью глюкокортикоидной терапии, остается открытым.

**Цель исследования:** изучить влияние дексаметазона на интерферон-альфа–индуцированную дифференцировку моноцитов в дендритные клетки и охарактеризовать свойства модифицированных глюкокортикоидами дендритных клеток у здоровых доноров и больных ревматоидным артритом.

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

1. Изучить *in vitro* чувствительность ДК доноров, генерируемых из моноцитов в присутствии интерферона-альфа, к толерогенному действию дексаметазона.
2. Оценить толерогенные свойства дексаметазон-модифицированных ИФН-ДК доноров в сравнении с дексаметазон-индуцированными ДК, генерируемыми в присутствии интерлейкина-4.
3. Охарактеризовать фенотипические и функциональные параметры ИФН-ДК у больных ревматоидным артритом и исследовать влияние дексаметазона на созревание и функции ИФН-ДК пациентов.
4. Оценить механизмы ингибирующего влияния дексаметазон-модифицированных ИФН-ДК (ИФН-ДКдекс) больных ревматоидным артритом на функции аутологичных Т-клеток.
5. Изучить эффект пульс-терапии глюкокортикоидами на фенотип и функции ИФН-ДК и структуру циркулирующих моноцитов у больных ревматоидным артритом.

### **Научная новизна**

Впервые показано, что дексаметазон в культурах ИФН-ДК доноров повышает долю CD14<sup>+</sup> ДК и снижает содержание CD83<sup>+</sup> и CD86<sup>+</sup> ДК; увеличивает содержание TLR2<sup>+</sup> и PD-L1<sup>+</sup> ДК, ингибирует продукцию TNF- $\alpha$ , а также индуцирует способность ИФН-ДК подавлять пролиферацию аллогенных Т-лимфоцитов и продукцию цитокинов в аллогенной смешанной культуре лейкоцитов (алло-СКЛ) со смещением баланса в сторону Th2-ответа. При этом пролиферативный ответ в алло-СКЛ, индуцируемый ИФН-ДКдекс, прямо коррелирует с содержанием CD83<sup>+</sup> ДК и обратно – с количеством TLR2<sup>+</sup> ДК. Установлено, что генерируемые в присутствии дексаметазона ИФН-ДК по сравнению с дексаметазон-модифицированными ИЛ4-ДК (ИЛ4-ДКдекс) характеризуются более высоким содержанием CD14<sup>+</sup> и TLR2<sup>+</sup> ДК, более высокой продукцией IL-10, более выраженным ингибирующим действием на пролиферацию аллогенных Т-клеток и подавляют продукцию Th1/провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IFN- $\gamma$ ) в отсутствие супрессорного эффекта на Th2 цитокины (IL-4 и IL-13). Показано, что ИФН-ДК больных РА отличаются меньшим содержанием CD83<sup>+</sup> и большей долей CD14<sup>+</sup> и PD-L1<sup>+</sup> ДК и умеренным снижением аллостимуляторной активности, сохраняя при этом чувствительность к толерогенному действию дексаметазона. Впервые продемонстрировано, что ингибирующий эффект ИФН-ДКдекс больных РА на пролиферацию Т-клеток в аутологичной смешанной культуре лейкоцитов (ауто-СКЛ) ассоциирован с блокированием клеточного цикла CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, подавлением продукции Th1 (IFN- $\gamma$ ), Th17 (IL-17) и в меньшей степени Th2 (IL-13 и IL-4) цитокинов; индукцией апоптоза CD3<sup>+</sup>Т-лимфоцитов и генерацией регуляторных CD4<sup>+</sup>Т-клеток, секретирующих IL-10 (Tr1). Проведение пульс-терапии глюкокортикоидами у больных РА сопровождается изменением структуры

циркулирующих моноцитов (снижением доли CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> моноцитов и возрастанием доли CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> моноцитов), а также усилением экспрессии PD-L1 и снижением аллостимуляторной активности генерируемых ИФН-ДК.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Полученные результаты расширяют представления о свойствах ИФН-ДК, в частности, демонстрируют их чувствительность к толерогенному действию дексаметазона. Выявлены общие и отличительные свойства дексаметазон-модифицированных ИФН-ДК и ИЛ4-ДК и показано, что ИФН-ДКдекс по ряду свойств превышают толерогенную активность ИЛ4-ДКдекс. Продemonстрировано, что ИФН-ДК больных РА сохраняют чувствительность к толерогенному действию дексаметазона, и охарактеризованы механизмы ингибирующего действия ИФН-ДКдекс на аутологичные Т-клетки. Выявленные изменения субпопуляционного состава моноцитов и усиление толерогенных свойств ИФН-ДК на фоне терапии метилпреднизолоном свидетельствуют, что эффект глюкокортикоидов на ИФН-ДК у больных РА реализуется не только *in vitro*, но и *in vivo* и о причастности моноцитов к опосредованию этого эффекта.

Практическая значимость работы заключается в характеристике толерогенных свойств ИФН-ДКдекс и их сравнении со свойствами ИЛ4-ДКдекс, что обосновывает возможность использования ИФН-ДК в качестве новой клеточной платформы для получения толерогенных ДК-вакцин. Продemonстрированная чувствительность ИФН-ДК больных РА к толерогенному действию дексаметазона в совокупности с данными о стабильности ИФН-ДКдекс свидетельствует о возможности генерации толерогенных ИФН-ДК у больных РА. Способность ИФН-ДКдекс больных практически полностью ингибировать пролиферативный ответ в алло-СКЛ при генерации ДК после пульс-терапии метилпреднизолоном позволяет рассматривать данный период в качестве оптимального «терапевтического окна» для получения толерогенных ДК.

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

1. Дексаметазон индуцирует толерогенные свойства ДК доноров и больных РА, генерируемых из моноцитов в присутствии интерферона-альфа.
2. Дексаметазон-модифицированные ИФН-ДК доноров отличаются от дексаметазон-модифицированных ИЛ4-ДК менее зрелым фенотипом, более выраженным ингибирующим эффектом на пролиферацию Т-клеток и подавляют продукцию Th1/провоспалительных цитокинов, не влияя на продукцию Th2-цитокинов.
3. Дексаметазон-модифицированные ИФН-ДК больных РА ингибируют пролиферацию аутологичных Т-клеток посредством индукции анергии, усиления апоптоза и генерации регуляторных CD4<sup>+</sup> Т-клеток, секретирующих IL-10.

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

Достоверность полученных результатов подтверждается достаточным фактическим материалом и использованием современных методов исследования. Диссертация апробирована на заседании клинического отдела НИИФКИ с участием членов Ученого совета и Клинического совета (протокол № 12 от 14 марта 2019 г.). Основные положения диссертации доложены и обсуждены на Всероссийском конгрессе с международным участием «Дни ревматологии в Санкт-Петербурге 2016» (15-17 сентября 2016, г. Санкт-Петербург), IX отчетной научной сессии НИИФКИ "Фундаментальные и клинические аспекты иммунологии" (16-17 июня 2016 г.,

Новосибирск), Европейских конгрессах ревматологов EULAR-2017 (г. Мадрид, Испания, 14-17 июня 2017 г.) и EULAR-2018 (г. Амстердам, Нидерланды, 13-16 июня 2018 г.). Автор лично участвовал в разработке дизайна исследования, рекрутировании пациентов и проведении иммунологических исследований. Обработка полученных данных и статистический анализ проведены автором самостоятельно.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 5 глав собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения и выводов. Материал изложен на 146 страницах машинописного текста, включающего 19 таблиц и 15 рисунков. Работа выполнена на базе лаборатории клеточной иммунотерапии и отделения ревматологии Клиники иммунопатологии НИИФКИ.

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 13 печатных работ, включая 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикации материалов диссертационных работ, из них 1 статья, индексируемая в базе Web of Science.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы исследования**

Диссертационная работа основана на результатах обследования 65 здоровых доноров и 54 больных ревматоидным артритом. Диагноз ревматоидного артрита был установлен на основании критериев ACR/EULAR 2010. Все пациенты имели давность заболевания более года, характеризовались умеренной или высокой степенью активности заболевания (DAS 28 > 3,1) и получали терапию стандартными болезнью-модифицирующими препаратами (метотрексат, лефлуномид, сульфасалазин) в виде монотерапии или в комбинации. Забор крови и все иммунологические исследования проводили после получения письменного информированного согласия.

*Генерация IFN- $\alpha$ -индуцированных ДК (ИФН-ДК).* Мононуклеарные клетки (МНК) из венозной гепаринизированной крови выделяли стандартным методом градиентного центрифугирования на фиколле-верографине. Для генерации ДК прилипающую фракцию МНК культивировали в течение 4 сут при 37° С в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в 6-луночных планшетах (Nunc, Дания) в среде RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 5мМ HEPES-буфера, 100 мкг/мл гентамицина и 5% сыворотки плодов коровы (FCS, Биолот, Санкт-Петербург), в присутствии GM-CSF (40 нг/мл, Sigma-Aldrich) и IFN- $\alpha$  (1000 Ед/мл, Роферон-А, Roche, Швейцария). Для индукции созревания на 4 сут вносили липополисахарид (LPS, 10 мкг/мл, LPS E.colli 0114:B4, Sigma-Aldrich) и продолжали культивирование в течение последующих 24 часов. Генерацию ИФН-ДК проводили в отсутствие (контрольные культуры) и присутствии дексаметазона (10<sup>-6</sup> М), который добавляли на 3 сутки. Клеточный выход ДК составлял в среднем (0,19 x 10<sup>6</sup>)/1 10<sup>6</sup> МНК.

*Генерация IL-4-индуцированных ДК (ИЛ4-ДК).* Для генерации ИЛ4-ДК прилипающую фракцию МНК культивировали в аналогичных условиях в присутствии GM-CSF (40 нг/мл, Sigma-Aldrich) и IL-4 (40 нг/мл, Sigma-Aldrich) в течение 5 сут с последующим добавлением LPS 10 мкг/мл на 48 ч. В опытные культуры на 3 сут также добавляли дексаметазон (10<sup>-6</sup> М).

*Определение субпопуляций клеток методом проточной цитофлуориметрии.* Приготовление образцов для определения относительного содержания субпопуляций

ДК, экспрессирующих поверхностные CD-маркеры, проводили в соответствии с методикой Becton Dickinson с использованием фикоэритрина (PE) или флуоресцеинизотиоцианатом (FITC)-меченых моноклональных анти-CD14, -CD83, -CD16 -CD86, -HLA-DR, -PD-L1, -TLR2 антител (BD PharMingen, США)

*Оценка аллостимуляторной активности ИФН-ДК.* Аллостимуляторную активность ИФН-ДК оценивали в смешанной культуре лейкоцитов (СКЛ) при культивировании МНК доноров ( $0,1 \times 10^6$ /лунку) в 96 - луночных круглодонных планшетах в присутствии аллогенных ИФН-ДК ( $0,1 \times 10^5$ /лунку) в соотношении МНК: ДК=10:1. Интенсивность пролиферации оценивали на 5 сутки радиометрически по включению  $H^3$ -тимидина, вносимого в лунки за 18 ч до конца культивирования в дозе 1 мкКю/лунку. Индекс влияния ДК в алло-СКЛ рассчитывали, как отношение пролиферативного ответа МНК в присутствии ДК к уровню спонтанной пролиферации МНК. Для изучения стабильности дексаметазон-модифицированных ДК (ДКдекс) ДК после отмывки подвергали последующему дополнительному культивированию в течение 24 часов в отсутствие и присутствии LPS (10 мкг/мл), после чего сравнивали аллостимуляторную активность ИФН-ДКдекс как описано выше.

*Аутологичная смешанная культура лейкоцитов.* ИФН-ДК больных РА, генерированные в отсутствие или присутствии дексаметазона, культивировали с аутологичными МНК ( $0,1 \times 10^6$ /лунку) в 96-луночных круглодонных планшетах в среде RPMI-1640 в присутствии 10% инактивированной сыворотки крови АВ(IV) группы в соотношении МНК: ДК=10:1. В отдельной серии экспериментов оценивали способность ДКдекс подавлять пролиферативный ответ аутологичных Т-клеток, индуцированный контрольными ДК. В этом случае в культуры МНК ( $0,1 \times 10^6$ /лунку) больных РА одновременно добавляли контрДК и ДКдекс в соотношении МНК: ДК=10:1 для каждого типа ДК. Пролиферативный ответ оценивали на 5 сутки. Стимуляторную активность ДК в виде индекса влияния (ИВ) рассчитывали, как отношение пролиферативного ответа в ауто-СКЛ к уровню спонтанной пролиферации МНК.

*Определение продукции цитокинов методом иммуноферментного анализа.* Концентрацию продуцируемых цитокинов (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-6, IL-10) в супернатантах LPS-стимулированных ИФН-ДК определяли методом иммуноферментного анализа, используя соответствующую тест-систему производства «Вектор-Бест» (г. Новосибирск).

*Оценка способности ИФН-ДК активировать Th1 и Th2 ответ.* Способность ИФН-ДК активировать Th1- и Th2-ответ оценивали в алло-СКЛ (как описано выше). В качестве отвечающих клеток использовали МНК доноров ( $0,1 \times 10^6$ /лунку), истощенных от фракции адгезивных клеток. Культуральные супернатанты собирали на 5 сут и измеряли концентрацию Th1 и Th2 цитокинов методом ИФА.

*Мультиплексный анализ расширенного спектра цитокинов.* Расширенный спектр цитокинов, включая про-/противовоспалительные цитокины (TNF- $\alpha$ , IL-1b, IL1-ra, IL-10), иммунорегуляторные цитокины (IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13, IL-15, IL-17), ростовые факторы (G-CSF, GM-CSF) и хемокины (IL-8, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ ), в культурах ДК и СКЛ оценивали методом проточной флуориметрии на 2-х лучевом лазерном автоматизированном анализаторе (Bio-Plex Protein Assay System, Bio-Rad, США) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

*Содержание регуляторных Т-клеток.* Содержание регуляторных Т-клеток определяли методом проточной цитометрии по количеству CD4<sup>+</sup>25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Т-клеток (Treg) и CD4<sup>+</sup>IL10<sup>+</sup> (Tr-1) в гейте CD4<sup>+</sup> лимфоцитов, используя анти-CD4 (PerCP или APC), анти-CD25 (FITC), анти-Foxp3 (PE) и анти-IL-10 (PE) моноклональные антитела в

соответствии с инструкциями производителей (BD Biosciences, USA). Фиксацию и пермеабиллизацию МНК для оценки внутриклеточной экспрессии Foxp3 и IL-10 проводили после инкубации клеток с моноклональными антителами против поверхностных антигенов, используя коммерческий набор растворов для фиксации/пермеабиллизации (Transcription Factor Buffer Set) в соответствии с инструкцией производителя («BD Biosciences», США). В тексте относительное содержание описываемых субпопуляций представлено в виде процента от CD4<sup>+</sup> Т-клеток.

*Клеточный цикл.* Клеточный цикл в CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитах оценивали методом трехцветной проточной цитометрии. Для этого МНК ( $1,0 \times 10^6$ ) в объеме 25 мкл инкубировали в течение 45 мин при 4° С в темноте с 5 мкл FITC-конъюгированных анти-CD3-антител и 5 мкл PE-конъюгированных анти-CD4 антител. После однократной отмывки клетки фиксировали 0,5% раствором параформальдегида, центрифугировали и метили 7-амино-актиномицином D (7-AAD, Calbiochem, Германия) в конечной концентрации 2 мкг/мл. Относительное содержание клеток с диплоидным (клетки в G0/G1 фазах клеточного цикла) и гипердиплоидным (клетки в S/G2/M фазах клеточного цикла) набором ДНК определяли в гейте CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов. Результаты выражали в виде процентного соотношения позитивных клеток к общему количеству CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов.

*Уровень апоптоза.* Уровень апоптоза оценивали с помощью окраски аннексином V (An) и пропидиумом иодидом (PI), используя коммерческую тест-систему «BD Pharmingen™». Количество клеток в стадии раннего и позднего апоптоза определяли в гейте CD3<sup>+</sup> Т-лимфоцитов по содержанию An<sup>+</sup>PI<sup>-</sup> и An<sup>+</sup>PI<sup>+</sup> клеток, соответственно.

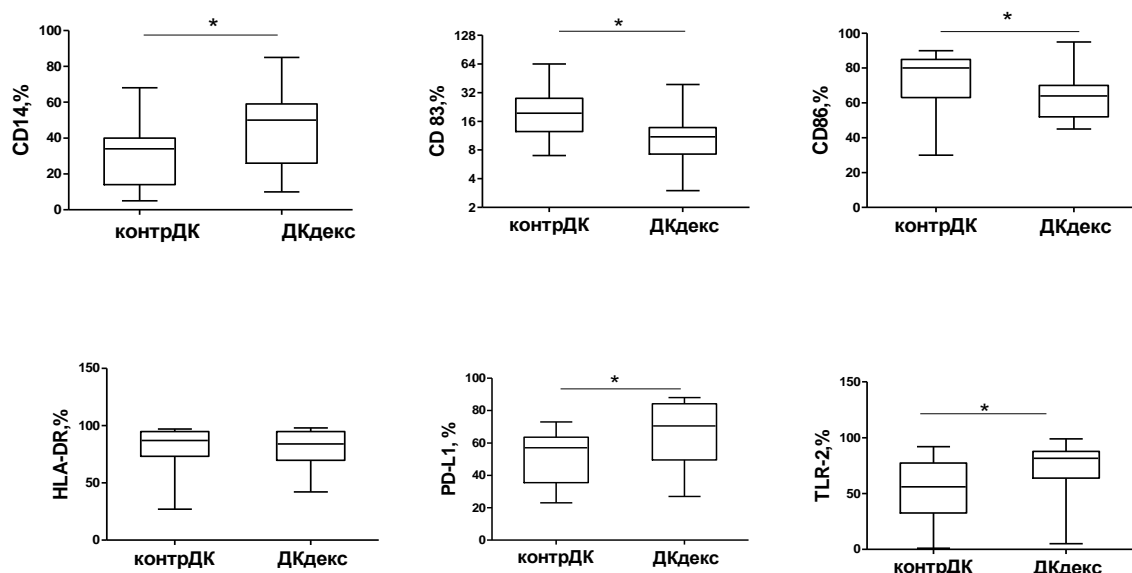
*Способность ИФН-ДК индуцировать антигенспецифический ответ* оценивали путем культивирования МНК ( $0,2 \times 10^6$ /лунку) в 96-луночных круглодонных планшетах в присутствии аутологических ИФН-ДК ( $0,2 \times 10^5$ /лунку), генерируемых в отсутствие и присутствии дексаметазона в соотношении МНК: ДК=10:1. ДК нагружали очищенным туберкулином (PPD, 50 мкг/мл, РАО «Биопрепарат», Санкт-Петербург) в течение 1 часа при 37 °С. Интенсивность пролиферации оценивали радиометрически на 5 сутки.

*Статистическая обработка полученных результатов.* Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием программы «STATISTICA 6.0». Таблицы и рисунки содержат информацию в виде медианных значений, интерквартильных диапазонов и в отдельных случаях– диапазона максимальных и минимальных значений. Для выявления значимых различий использовали непараметрические критерии: рW-критерий Вилкоксона (для связанных, парных выборок) и рU-критерий Манна-Уитни (для несвязанных выборок), критерий знаков. Корреляционный анализ проводили с помощью ранговой корреляции Спирмена (Rs). Различия считали достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

## **Результаты и обсуждение**

Исследование влияния дексаметазона на генерацию ИФН-ДК у доноров показало (рис. 1), что ДКдекс отличались от контрДК более высоким содержанием CD14<sup>+</sup> клеток и меньшей долей CD83<sup>+</sup> и CD86<sup>+</sup> клеток, что свидетельствует о задержке созревания ИФН-ДК. С другой стороны, дексаметазон усиливал экспрессию ко-ингибиторной молекулы PD-L1 и ассоциированной с толерогенной активностью молекулы TLR2.





**Рисунок 1. Влияние дексаметазона на фенотип ИФН-ДК.** Представлены данные (здесь и далее в виде медианы, интерквартильных диапазонов, минимума-максимума) относительного содержания ДК (n=20), генерируемых в отсутствие (контрДК) и в присутствии  $10^{-6}$  М дексаметазона (ДКдекс). \* $p < 0,05$ .

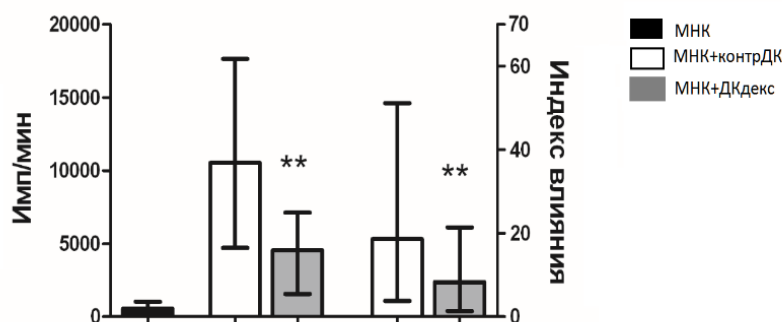
Поскольку созревание ДК индуцируется провоспалительными цитокинами (в первую очередь, TNF- $\alpha$ ), далее исследовали влияние дексаметазона на способность ДК продуцировать про- и противовоспалительные цитокины (табл. 1). Генерация ИФН-ДК в присутствии дексаметазона сопровождалась выраженным подавлением продукции TNF- $\alpha$  при отсутствии значимого ингибирующего эффекта на продукцию IL-10 и резким снижением соотношения TNF- $\alpha$ /IL-10, свидетельствуя о доминировании противовоспалительной активности.

**Таблица 1 - Влияние дексаметазона на продукцию TNF- $\alpha$  и IL-10 в культурах ИФН-ДК**

Цитокины	контрДК	ДКдекс	pW
TNF- $\alpha$ (пг/мл)	3570 (1110 – 3960)	510 (230 – 2110)	0,03
IL-10 (пг/мл)	1834 (666 – 2224)	1020 (750 – 1538)	0,4
Индекс TNF- $\alpha$ / IL-10	1,7 (0,9 – 2,8)	0,33 (0,2 – 2,8)	0,04

Примечание: концентрацию цитокинов оценивали методом ИФА в супернатантах ИФН-ДК доноров (n=9), генерированных в отсутствие (контрДК) и в присутствии (ДКдекс) дексаметазона ( $10^{-6}$  М).

Чтобы выяснить, индуцирует ли дексаметазон ингибирующую активность ИФН-ДК, исследовали пролиферативный ответ Т-клеток и продукцию Th1/Th2 цитокинов в алло-СКЛ. Алло-СКЛ представляет собой классическую модель антигенспецифического ответа Т-клеток на алло-антигены. Соответственно, низкая аллостимуляторная активность рассматривается в качестве характерного признака тДК. Из данных рисунка 2 видно, что пролиферативный ответ и индекс влияния ДК в культурах алло-СКЛ, индуцированных ИФН-ДКдекс, были в 2 раза ниже, чем в алло-СКЛ, стимулированной контрИФН-ДК, что свидетельствовало о способности ИФН-ДКдекс ингибировать пролиферацию Т-клеток, распознающих аллоантигены.



**Рисунок 2. Супрессорный эффект дексаметазона на аллостимуляторную активность ИФН-ДК.** По левой оси представлены данные пролиферативной активности (имп/мин) МНК, а также ответа МНК в алло-СКЛ, стимулированной контрДК или ДКдекс. По правой оси представлены индексы влияния ИФН-ДК в алло-СКЛ. \*\* $pW < 0,01$  – значимость различий по сравнению с контрДК.

Следует отметить, что способность ИФН-ДКдекс стимулировать пролиферативный ответ в алло-СКЛ прямо коррелировала с содержанием  $CD83^+$  клеток ( $R_s=0,89$ ;  $p=0,019$ ,  $n=15$ ), и обратно коррелировала с количеством  $TLR2^+$  клеток ( $R_s=-0,69$ ;  $p=0,012$ ,  $n=12$ ). С этой точки зрения, низкая аллостимуляторная активность ДКдекс во многом объясняется возрастанием среди них доли  $TLR2^+$  клеток и снижением относительного количества  $CD83^+$  ДК.

Оценка Th1 (IFN- $\gamma$ ) и Th2 (IL-6) цитокинов в 5-суточных культурах алло-СКЛ (табл. 2) показала, что ИФН-ДКдекс оказывали выраженный ингибирующий эффект на продукцию IFN- $\gamma$  и умеренно подавляли продукцию IL-6, что сопровождалось практически 15-кратным возрастанием соотношения IL-6/IFN- $\gamma$  и свидетельствовало о смещении баланса в сторону Th2 ответа. Таким образом, генерируемые в присутствии дексаметазона ИФН-ДК приобретали не только фенотипические, но и функциональные свойства толерогенных ДК.

**Таблица 2 - Влияние дексаметазона на Th1- и Th2- стимулирующую активность ИФН-ДК в алло-СКЛ**

Цитокины	МНК	МНК + контрДК	МНК + ДКдекс
IFN- $\gamma$ (пг/мл)	30 (9 – 46)	1100 (580 – 1420)	80 (8 – 270) **
IL-6 (пг/мл)	750 (240 – 7225)	10020 (9280 – 10690)	8320 (7090 – 8960) *
IL-6/IFN- $\gamma$	42 (22 – 150)	11 (6 – 19)	162 (24 – 1090) **

Примечания: МНК культивировали в отсутствие (МНК) или в присутствии аллогенных ИФН-ДК доноров ( $n=13$ ), генерированных в отсутствие (контрДК) или в присутствии дексаметазона (ДКдекс). Концентрацию IFN- $\gamma$  и IL-6 в 5-суточных супернатантах алло-СКЛ оценивали с помощью ИФА. \* $pW < 0,05$ , \*\* $pW < 0,01$  – значимость различий по сравнению с контрДК.

Чтобы сравнить толерогенные свойства дексаметазон-модифицированных ИФН-ДК и ИЛ4-ДК, исследовали фенотип и функциональную активность этих двух типов ДК, полученных от одних и тех же доноров. Оба типа ДКдекс характеризовались повышенным содержанием  $CD14$ -позитивных клеток, меньшим количеством  $CD83$ - и  $CD86$ -позитивных клеток, и большей долей ДК, несущих PD-L1 и TLR2, по сравнению с контрДК (табл. 3). При этом «толерогенный» фенотип ИФН-ДКдекс был более выраженным, судя по более высокому содержанию  $TLR2^+$  ДК и  $CD14^+$  ДК.

**Таблица 3 - Влияние дексаметазона на фенотип ИФН-ДК и ИЛ4-ДК**

Маркеры (%)	ИФН-ДК		ИЛ4-ДК	
	КонтрДК	ДКдекс	КонтрДК	ДКдекс
CD83	23,0 (20,5 – 29,5)	17,0 * (11,0 – 20,0)	39,5 (33,0 – 43,0)	18,5 * (16,5 – 20,0)
CD14	33,5 (23,5 – 43,5)	49,5 * (42,5 – 60,5)	29,0 (27,5 – 33,5)	34,5 *# (17,5 – 48,0)
CD86	85,5 (70,0 – 91,0)	70,0 * (55,0 – 71,5)	83,0 (78,5 – 86,0)	45,5 * (39,5 – 56,5)
HLA-DR	95 (91,5 – 97,0)	94,0 (80,5 – 96,0)	91,0 (87,0 – 96,0)	90,0 (80,5 – 95,5)
PD-L1	59,0 (44,5 – 73,0)	70,0 * (53,0 – 76,0)	57,0 (48,0 – 61,5)	72,5 * (54,5 – 81,0)
TLR2	56,0 (45,0 – 75,0)	85,5 * (81,0 – 87,5)	39,5 (36,5 – 74,5)	79,0 *# (62,5 – 83,0)

Примечания: представлены данные относительного содержания ИФН-ДК и ИЛ4-ДК (n=12), генерируемые в отсутствие (контрДК) и в присутствии  $10^{-6}$  М дексаметазона (ДКдекс). \*pW <0,05 – значимость различий показателей в культурах контрДК и ДКдекс. #pU <0,05 – значимость различий в культурах ИФН-ДК и ИЛ4-ДК.

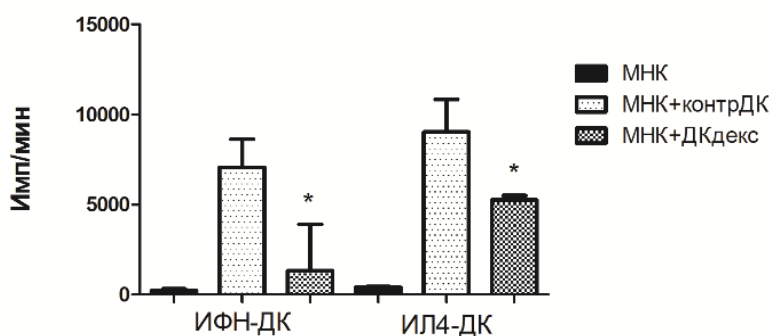
Оба типа дексаметазон-модифицированных ДК характеризовались выраженным снижением продукции TNF- $\alpha$  при отсутствии значимого подавления IL-10. Однако ИФН-ДКдекс отличались более высокой продукцией IL-10, и меньшим соотношением TNF- $\alpha$ /IL-10 (табл. 4).

**Таблица 4 - Влияние дексаметазона на продукцию цитокинов в культурах ИФН-ДК и ИЛ4-ДК**

Цитокины	ИФН-ДК		ИЛ4- ДК	
	контрДК	ДКдекс	контрДК	ДКдекс
TNF- $\alpha$ (пг/мл)	406 (273 – 591)	189* (133 – 271)	458 (255 – 608)	118* # (76 – 129)
IL-10 (пг/мл)	1652 (1508 – 1806)	1092 (952 – 1316)	489 (373 – 568)	430 # (287 – 459)
TNF- $\alpha$ /IL-10	0,25 (0,18 – 0,33)	0,18* (0,14 – 0,2)	0,88 (0,68 – 1,1)	0,27* # (0,26 – 0,29)

Примечания: концентрацию цитокинов исследовали с помощью мультиплексного анализа в супернатантах ИФН-ДК и ИЛ4-ДК (n=12), генерированных от одних и тех же доноров в отсутствие (контрДК) или в присутствии (ДКдекс) дексаметазона ( $10^{-6}$  М). \*pW <0,05 – значимость различий показателей в культурах контрДК и ДКдекс. #pU <0,05 – значимость различий показателей в культурах ИФН-ДК и ИЛ4-ДК.

Оценка пролиферативного ответа в алло-СКЛ (рис. 3) показала способность обоих типов дексаметазон-модифицированных ДК ингибировать пролиферацию Т-клеток, однако супрессорный эффект ИФН-ДКдекс был более выраженным, чем эффект ИЛ4-ДКдекс (80 против 36%; p=0,016).



**Рисунок 3. Ингибирующий эффект дексаметазон-модифицированных ИФН-ДК и ИЛ4-ДК на пролиферативный ответ в алло-СКЛ.** Представлены данные (медиана и интерквартильный диапазон; n=8) пролиферативного ответа (имп/мин) в алло-СКЛ, индуцированном ИФН-ДК (слева) и ИЛ4-ДК (справа), генерируемых в отсутствие (контрДК) и в присутствии дексаметазона (ДКдекс). \*pW <0,01 – значимость различий показателей по сравнению с контрольными ДК.

Еще одной особенностью было то, что в отличие от ИЛ4-ДКдекс, подавляющих в алло-СКЛ продукцию как Th1, так и Th2 цитокинов, ИФН-ДКдекс ингибировали продукцию только Th1/провоспалительных цитокинов, не оказывая ингибирующего действия на продукцию IL-4, IL-5 и IL-13, и в меньшей степени подавляли продукцию IL-6, обуславливая смещение цитокинового баланса в сторону Th2 ответа (табл. 5).

**Таблица 5 - Влияние дексаметазон-модифицированных ИФН-ДК и ИЛ4-ДК на продукцию цитокинов в культурах алло-СКЛ**

Цитокин, пг/мл	МНК + ИФН-ДК		МНК + ИЛ4-ДК	
	КонтрДК	ДКдекс	КонтрДК	ДКдекс
IL-1β	2289 (2195 – 3046)	573* (388 – 853)	762# (635 – 915)	157*# (46 – 101)
TNF-α	768 (618 – 1390)	306* (233 – 366)	415# (341 – 499)	92*# (76 – 118)
IL-2	315 (297 – 370)	210* (164 – 276)	225# (199 – 258)	139*# (123 – 164)
IFN-γ	4759 (3601 – 6946)	2589* (1754 – 2930)	17714 (4878 – 34466)	1245*# (1022 – 655)
IL-4	99 (94 – 122)	91 (89 – 115)	80# (76 – 81)	56*# (46 – 64)
IL-5	14 (14 – 16)	18 (10 – 35)	87# (55 – 130)	16* (10 – 27)
IL-6	31421 (22107 – 34367)	12635* (11430 – 17892)	27306 (23775 – 30822)	9090*# (6599 – 10008)
IL-13	156 (125 – 235)	138 (111 – 200)	252 (152 – 295)	114* (102 – 159)
IL-10	885 (815 – 1029)	556* (469 – 659)	208# (157 – 265)	155# (113 – 187)
G-CSF	9707 (9317 – 10965)	13896* (12190 – 15193)	8220# (5346 – 9507)	8945# (6417 – 12494)
GM-CSF	766 (696 – 824)	485* (460 – 557)	579# (494 – 625)	226*# (160 – 332)

IL-8	37702 (26070 – 45241)	31694 (27999 – 43529)	38148 (29264 – 44539)	30641* <sup>#</sup> (27056 – 36661)
MCP-1	22217 (20040 – 29713)	25292 (23396 – 27943)	20997 (16820 – 26774)	18731 <sup>#</sup> (16404 – 21173)
MIP-1 $\beta$	63862 (58809 – 70930)	64989 (53653 – 74312)	35172 <sup>#</sup> (26730 – 42078)	28905 <sup>#</sup> (11417 – 30838)

Примечания: аллогенные МНК культивировали в течение 5 суток в присутствии ДК (ИФН-ДК или ИЛ4-ДК), генерированных от 12 доноров в отсутствие (контрДК) или в присутствии дексаметазона (ДКдекс). Концентрацию цитокинов оценивали методом мультиплексного анализа. \*pW <0,05 – значимость различий показателей в культурах контрДК и ДКдекс. #pU <0,05 – значимость различий показателей в культурах ИФН-ДК и ИЛ4-ДК.

В целом, полученные данные демонстрируют, что дексаметазон индуцирует толерогенные свойства как в культурах ИФН-ДК, так и ИЛ4-ДК. При этом дексаметазон-модифицированные ИФН-ДК по ряду параметров обладают более выраженными толерогенными свойствами, что обосновывает возможность их использования в качестве новой клеточной платформы для получения толерогенных ДК-вакцин.

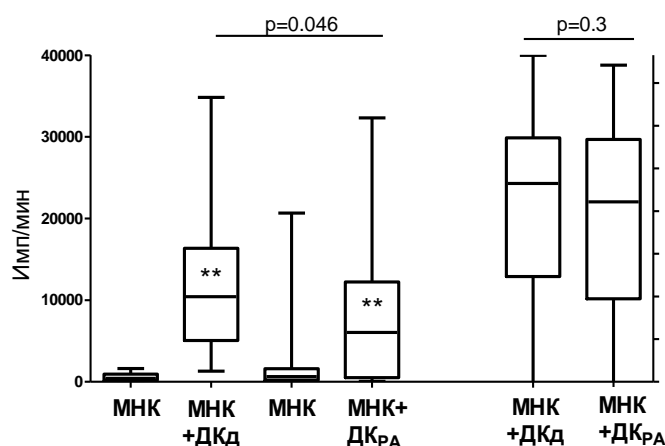
Далее исследовали свойства ИФН-ДК и их чувствительность к действию дексаметазона у больных РА (табл. 6). По сравнению с донорами, ДК больных РА отличались более высоким содержанием CD14-позитивных клеток и меньшей долей CD83-позитивных клеток, а также повышенным содержанием клеток, несущих молекулы PD-L1 и – в виде тренда – экспрессирующих TLR2.

**Таблица 6 - Сравнительная оценка поверхностных маркеров ИФН-ДК у больных РА и здоровых доноров**

Маркер	Количество клеток (%)		pU	СИФ (фл. ед.)		pU
	Доноры (n=13-20)	Больные РА (n=13-24)		Доноры (n=13)	Больные РА (n=7-10)	
CD14 <sup>+</sup>	34 (15-51)	65 (44-83)	0,002	52 (45-66)	170 (123-178)	0,01
CD83 <sup>+</sup>	16 (12-20)	8 (6-23)	0,037	52 (23-93)	46 (32-59)	0,49
CD86 <sup>+</sup>	60(16-74)	40 (33-56)	0,2	86 (67-145)	97 (68-158)	0,79
HLA-DR <sup>+</sup>	77 (72-91)	80 (58-92)	0,8	135 (61-11)	129 (62-334)	0,9
TLR2 <sup>+</sup>	35 (12-51)	51 (26-73)	0,2	71 (36-106)	60 (47-66)	0,71
PD-L1 <sup>+</sup>	57 (39-64)	79 (72-88)	0,01	109 (41-27)	107 (46-516)	0,72

Примечания: представлены данные относительного содержания клеток и средней интенсивности флюоресценции (СИФ) поверхностных маркеров.

ДК больных не отличались значимо от ДК доноров по продукции TNF- $\alpha$  - 4230 (850 – 550) пг/мл против 3570 (1110 – 3960) пг/мл, IL-6 - 22880 (16900 – 24660) пг/мл против 19580 (1848 – 20960) пг/мл и IL-10 - 1992 (1110 – 3174) пг/мл против 1834 (666 – 2224) пг/мл, а также соотношением TNF- $\alpha$ /IL-10 - 1,84 (1,57 – 3,25) против 1,69 (0,95 – 2,82). Аллостимуляторная активность ДК у больных была умеренно снижена (рис. 4).



**Рисунок 4. Аллостимуляторная активность ИФН-ДК больных РА (n=18) в сравнении с таковой у доноров (n=20).** Представлены данные пролиферации (имп/мин) аллогенных МНК доноров в отсутствие, а также в присутствии ИФН-ДК больных РА (МНК+ДК<sub>РА</sub>) и здоровых доноров (МНК+ДК<sub>Д</sub>) в виде медиан, интерквартильных диапазонов, диапазонов минимальных и максимальных значений. \*\* -  $pU < 0,01$ .

Тем не менее, ДК больных обладали сохранной Th1- и Th2-стимулирующей активностью (табл. 7), т.е. концентрация IFN- $\gamma$  и IL-6, и индексы влияния ДК на продукцию IFN- $\gamma$  и IL-6 в СКЛ, стимулированной ДК доноров и больных, не различались. При этом аналогично донорам, ИВ ДК больных на продукцию IFN- $\gamma$  существенно превышали ИВ ДК на продукцию IL-6, что указывало на преобладание Th1-стимулирующей активности.

**Таблица 7 - Способность ИФН-ДК больных РА стимулировать продукцию Th1 и Th2 цитокинов в алло-СКЛ**

Цитокины	Продукция цитокинов в алло-СКЛ (пг/мл)		pU	Индекс влияния (расч. ед)		pU
	ИФН-ДК доноров	ИФН-ДК больных РА		ИФН-ДК доноров	ИФН-ДК больных РА	
IFN- $\gamma$	1280 (710 – 1500)	960 (590 – 1740)	0,87	134 (75 – 158)	101 (62 – 182)	0,45
IL-6	9920 (9280 – 10690)	8560 (6780 – 9280)	0,053	42 (39 – 46)	37 (29 – 40)	0,62

Примечания: представлены концентрации цитокинов в супернатантах алло-СКЛ, индуцированных ИФН-ДК больных РА (n=12) и здоровых доноров (n=13), и индексы влияния ДК на продукцию цитокинов. pU – значимость различий по сравнению с донорами.

Исследование чувствительности ДК больных к действию глюкокортикоидов показало (табл. 8), что генерация ДК в присутствии дексаметазона сопровождалась значимым снижением CD83<sup>+</sup> клеток и возрастанием CD14<sup>+</sup> клеток, а также тенденцией к снижению доли CD86<sup>+</sup> клеток и увеличению доли ДК, экспрессирующих TLR2. Дексаметазон существенно подавлял способность ДК к продукции TNF- $\alpha$  при отсутствии ингибирующего действия на секрецию IL-10. В результате соотношение TNF- $\alpha$ /IL-10 снижалось, свидетельствуя о смещении баланса в сторону противовоспалительных цитокинов. Дексаметазон-модифицированные ДК больных подавляли пролиферативный ответ и продукцию IFN- $\gamma$  в алло-СКЛ, не влияя на продукцию IL-6. Таким образом, преобладание Th2-стимулирующей активности ИФН-ДК было обусловлено угнетением их способности стимулировать Th1-ответ. Кроме

того, корреляционный анализ выявил наличие отрицательной взаимосвязи между способностью ДКдекс стимулировать пролиферацию аллогенных Т-клеток и экспрессией TLR2 ( $R_s=-0,7$ ;  $p=0,01$ ;  $n=11$ ).

**Таблица 8 - Влияние дексаметазона на фенотип и функции ИФН-ДК больных РА**

Параметр	контрДК	ДКдекс	pW
Фенотип (%); n=13-24			
CD14 <sup>+</sup>	65 (44 – 83)	81 (62 – 92)	0,03
CD83 <sup>+</sup>	8,5 (6 – 23)	7,9 (4 – 18)	0,02
CD86 <sup>+</sup>	40 (33 – 56)	36 (16 – 52)	0,1
HLA-DR <sup>+</sup>	80 (58 – 92)	88 (63 – 92)	0,6
TLR2 <sup>+</sup>	51 (26 – 73)	75 (64 – 87)	0,08
PD-L1 <sup>+</sup>	79 (72 – 88)	71 (56 – 83)	0,13
Продукция цитокинов (пг/мл), n=10-13			
TNF- $\alpha$	4230 (850 – 5550)	900 (170 – 1810)	0,001
IL-6	22800 (16960 – 24660)	18220 (9900 – 20480)	0,005
IL-10	1992 (1110 – 3174)	1886 (1596 – 2724)	0,3
TNF- $\alpha$ /IL-10	1,8 (1,57 – 3,25)	0,59 (0,17 – 1,14)	0,005
Ответ в алло-СКЛ, n=18-22			
Пролиферация (имп/мин)	7980 (4204 – 13205)	2005 (809 – 9753)	0,0002
ИБ (расч.ед.)	23,3 (6,8 – 43)	9,7 (2,2 – 23)	0,0003
Th1/Th2–стимулирующая активность в алло-СКЛ n=12			
IFN- $\gamma$ (пкг/мл)	960 (590 – 1740)	60 (30 – 270)	0,001
IL-6 (пкг/мл)	8560 (6780 – 9280)	7710 (6260 – 9610)	0,31
IL-6/IFN- $\gamma$ (расч.ед.)	7,9 (2,5 – 15)	93 (28 – 275)	0,023

Примечание: представлены данные в виде медианы и интерквартильного диапазона.

Характерно, что повторная 24-часовая стимуляция ИФН-ДКдекс больных LPS после предварительной отмывки ДК не усиливала их аллостимуляторную активность, свидетельствуя о стабильности ИФН-ДКдекс больных. Так, ответ в алло-СКЛ, индуцированной ИФН-ДКдекс, рестимулированными LPS, или преинкубированными без каких-либо стимулов, составлял 6053 (4207 – 8178) и 4700 (3766 – 7897) имп/мин, соответственно, и значимо не различался ( $p=0,7$ ;  $n=6$ ).

Следует отметить, что функции ДК больных оценивались в культурах алло-СКЛ с использованием в качестве отвечающих клеток МНК доноров. Поэтому на следующем этапе исследовали, способны ли ДКдекс больных оказывать толерогенный эффект против аутологических Т-клеток, и каковы механизмы этого эффекта. Сравнение пролиферативного ответа в ауто-СКЛ, индуцированной контрольными и дексаметазон-модифицированными ДК больных РА ( $n=17$ ), выявило значимое снижение пролиферативной активности аутологических Т-клеток в присутствии ДКдекс. При этом ИФН-ДКдекс отличались от контрольных ДК практически 3-кратным снижением индекса влияния (табл.9).

Проведенный в отдельной серии экспериментов ( $n=6$ ) анализ клеточного цикла CD4<sup>+</sup> Т-клеток показал, что доля пролиферирующих CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в ауто-СКЛ, стимулированной ИФН-ДКдекс, была значимо ниже, а содержание покоящихся CD4<sup>+</sup> Т-клеток выше, чем при стимуляции контрольными ДК, что приводило к 5-кратному возрастанию соотношения покоящихся и пролиферирующих CD4<sup>+</sup> клеток и свидетельствовало об индукции анергии Т-лимфоцитов.

**Таблица 9 - Влияние дексаметазон-модифицированных ИФН-ДК больных РА на пролиферативный ответ Т-клеток в ауто-СКЛ**

Параметры	Ауто-СКЛ		pW
	контрДК	ДКдекс	
Пролиферация (имп/мин)	10550 (7250 – 15900)	4690 (1070 – 8350)	0,005
Индекс влияния ДК	6,0 (4,3 – 18,6)	1,9 (1,4 – 4,2)	0,005
CD4 <sup>+</sup> T- клетки в G0/G1 (%)	64 (56 – 87)	82 (82 – 86)	0,1
CD4 <sup>+</sup> T-клетки в S/G2+M (%)	22,5 (6 – 30)	6,5 (4 – 8)	0,028
Индекс G0/G1 и S/G2/M	2,5 (2,2 – 14,5)	13,7 (10,3 – 20,5)	0,028

Примечания: ИФН-ДК больных РА, генерированные в отсутствие (контрДК) или в присутствии дексаметазона (ДКдекс). ДК культивировали с аутологичными МНК в соотношении 1:10. Пролиферацию оценивали на 5 сутки.

Чтобы выяснить, какие из субпопуляций CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов были в большей степени подвержены анергии, оценили содержание Th1 (IFN- $\gamma$ ), Th17 (IL-17) и Th2 (IL-4, IL-13) цитокинов в 5-суточных супернатантах ауто-СКЛ. Как видно (табл. 10), ИФН-ДКдекс в наибольшей степени ингибировали продукцию IFN- $\gamma$  и IL-17, тогда как продукция IL-4 и IL-13 снижалась в гораздо меньшей степени. Таким образом, Th1- и Th17 Т-лимфоциты были более чувствительны к супрессорному влиянию дексаметазон-модифицированных ДК, чем Th2 клетки.

**Таблица 10 - Влияние дексаметазон-модифицированных ИФН-ДК больных РА на продукцию Th1 (IFN- $\gamma$ ), Th17 (IL-17) и Th2 (IL-4, IL-13) цитокинов в ауто-СКЛ**

Цитокины (пг/мл)	Ауто-СКЛ		pW	Супрессия (%)
	+ контрДК	+ ДКдекс		
IFN- $\gamma$	1120 (834 – 8620)	660 (330 – 900)	0,017	85 (40 – 96)
IL-17	460 (355 – 610)	150 (140 – 260)	0,027	60 (57 – 72)
IL-4	49 (39 – 54)	37 (29 – 45)	0,04	42 (26 – 67)
IL-13	78 (62 – 199)	52 (44 – 58)	0,011	14 (11 – 39)

Примечания: ИФН-ДК больных РА (n=8), генерированные в отсутствие (контрДК) или в присутствии дексаметазона (ДКдекс), культивировали с аутологичными МНК в соотношении 1:10. Продукцию цитокинов оценивали на 5 сут. Процент супрессии рассчитывали по формуле  $[1 - (\text{ДКдекс} / \text{ДКконтр})] \cdot 100$ .

Оценка уровня апоптоза Т-клеток показала (табл. 11), что снижение пролиферативного ответа Т-клеток в присутствии ДКдекс было сопряжено с возрастанием количества апоптотических Т-клеток (преимущественно за счет Т-клеток в стадии позднего апоптоза). Таким образом, снижение пролиферации аутологичных Т-клеток под действием дексаметазон-модифицированными ДК было обусловлено не только анергией, но и усилением апоптоза.

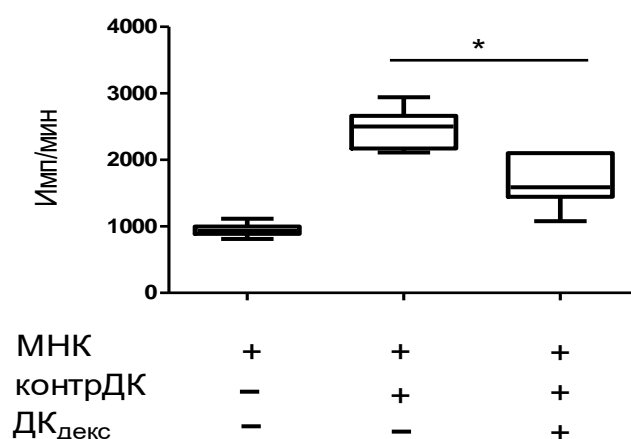


**Таблица 11 - Влияние дексаметазон-модифицированных ИФН-ДК больных РА на уровень апоптоза CD3<sup>+</sup>T-клеток в ауто-СКЛ**

Параметры	МНК	Ауто-СКЛ		pW
		+ контрДК	+ ДКдекс	
CD3 <sup>+</sup> An <sup>+</sup>	9 (7-15)	22 (12-27)	27,5 (17-33)	0,017
CD3 <sup>+</sup> An <sup>+</sup> PI <sup>-</sup>	7 (6-8)	11 (10-11)	12,5 (10-14)	0,028
CD3 <sup>+</sup> An <sup>+</sup> PI <sup>+</sup>	2 (1-7)	11 (2-12)	17 (5-22)	0,018

Примечание: уровень апоптоза оценивали через 48 ч. pW – значимость различий эффекта дексаметазон-модифицированных и контрольных ДК.

Поскольку снижение ответа в ауто-СКЛ могло быть также обусловлено супрессорным эффектом ДКдекс, исследовали их влияние на ответ в ауто-СКЛ, индуцированный контрольными ДК. Как видно на рисунке 5, добавление дексаметазон-модифицированных ДК значимо снижало ответ.



**Рисунок 5. Супрессорный эффект ДКдекс на пролиферацию Т-клеток в ауто-СКЛ.** ДКдекс больных РА добавляли в культуры ауто-СКЛ, индуцированные контрольными ДК больных РА (n=6). \*pW <0,05.

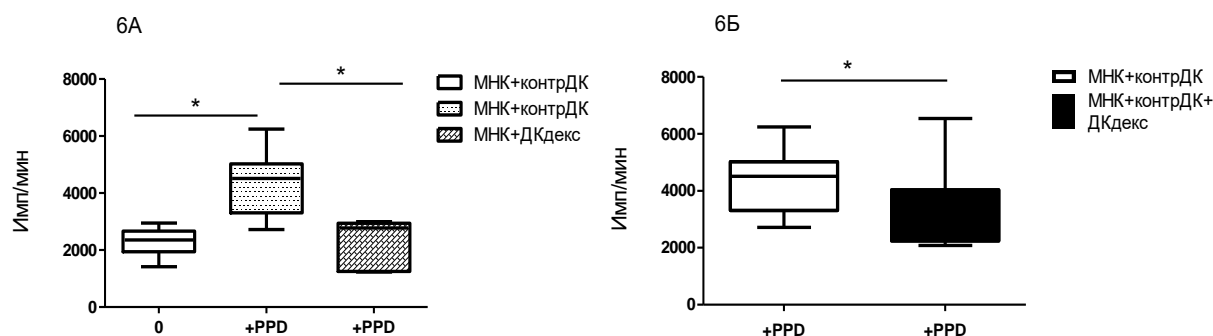
Чтобы выяснить, связан ли супрессорный эффект ДКдекс с индукцией регуляторных Т-клеток, исследовали содержание CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Трег и IL-10-продуцирующих Т-лимфоцитов (Tr1). Относительное количество CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Трег в ауто-СКЛ, стимулированных контрДК или ДКдекс, не различалось, тогда как доля CD4<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> Т-клеток была значимо выше при стимуляции ДКдекс (табл. 12). Таким образом, супрессорная активность ДКдекс в ауто-СКЛ была сопряжена с конверсией CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в регуляторные Т-клетки (Tr1).

**Таблица 12 - Влияние ДКдекс больных РА на индукцию регуляторных Т-клеток**

	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> Трег (n=9)		CD4 <sup>+</sup> IL-10 <sup>+</sup> Tr1 (n=8)	
	% клеток	pW	% клеток	pW
МНК (1)	0,9 (0,7-1,1)	P1-2 = 0,007	4,0 (2,5-7,0)	P1-2= 0,176
МНК + контрДК (2)	1,7 (1,3-2,6)	P1-3 = 0,02	6,5 (4,8-7,0)	P1-3= 0,013
МНК + ДКдекс (3)	1,3 (1,2-2,0)	P2-3 = 0,21	8,5 (6,0-96)	P2-3= 0,012

Примечание: ИФН-ДК больных РА, генерированные в отсутствие (контрДК) или в присутствии дексаметазона (ДКдекс), культивировали с аутологичными МНК в соотношении 1:10. Относительное содержание CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> Т-клеток оценивали на 5 сут.

Для оценки способности ДКдекс больных РА ингибировать антиген-специфический ответ также исследовали влияние ДКдекс на PPD-индуцированную пролиферацию в культурах аутологичных Т-лимфоцитов.



**Рисунок 6. Влияние ИФН-ДКдекс больных РА (n=6) на PPD-специфический пролиферативный ответ.** А – Неприлипающую фракцию аутологичных МНК больных культивировали с контрольными ДК (МНК+контрДК), PPD-нагруженными контрольными ДК (+PPD), или дексаметазон-модифицированными ДК, нагруженными PPD (+PPD). Б - Неприлипающую фракцию аутологичных МНК, стимулированных PPD-нагруженными контрольными ДК, культивировали в отсутствие или присутствии нагруженных PPD ДКдекс (+PPD). \*-pW <0,05.

Как видно (рис. 6 А), пролиферация аутологичных Т-клеток, стимулированных PPD-нагруженными контрольными ДК, 2-кратно превышала таковую в культурах, стимулированных не нагруженными антигеном ДК, что свидетельствовало об индукции PPD-специфического ответа. В то же время в присутствии ДКдекс, нагруженных PPD, ответ значительно снижался (с медианой супрессии 46 (36 – 55) %). Аналогичный эффект наблюдался при добавлении PPD-нагруженных ДКдекс в культуры Т-клеток, стимулированных PPD-нагруженными контрольными ДК (рис. 6 Б). Супрессорный эффект в этом случае составлял 35 (16 – 46) %.

Учитывая активное применение глюкокортикоидов в схемах лечения аутоиммунных заболеваний, представлялось важным выяснить, влияет ли терапия глюкокортикоидами на функции ДК *in vivo*. Для этого использовали 2 подхода. В первом – сравнили свойства ДК больных, получающих синтетические болезнь-модифицирующие препараты (группа РА1) и пульс-терапию метилпреднизолоном (МП, группа РА2). Во втором – сравнили свойства ДК до и после проведения пульс-терапии глюкокортикоидами у одних и тех же пациентов.

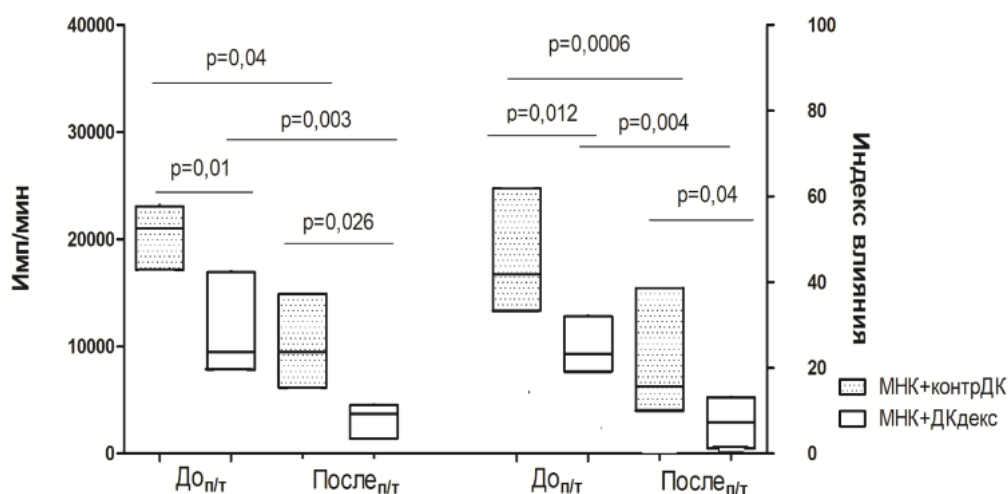
**Таблица13 - Фенотип и функции ИФН-ДК в группах больных РА**

Параметр	РА1 (n=11)	РА2 (n=13)	pU
Фенотип, %			
CD14	73 (51 – 80)	72 (37 – 88)	0,63
CD83	15 (7 – 23)	17 (9 – 25)	0,18
CD86	52 (39 – 82)	37 (17 – 68)	0,18
HLA-DR	87(73 – 93)	91 (72 – 94)	0,61
TLR2	39 (24 – 58)	63 (18 – 78)	0,39
PD-L1	77 (47 – 92)	79 (76 – 91)	0,24
Алло-СКЛ (имп/мин)	7975 (3697 – 13445)	2526 (1058 – 6323)	0,09
Алло-СКЛ (ИБ, расч.ед.)	25,5 (4,6 – 47)	5,3 (1,67 – 14,6)	0,038

Примечание: данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона

Пациенты в группах 1 и 2 (табл. 13) достоверно не различались по содержанию ДК, экспрессирующих различные маркеры. Тем не менее, уровень средней интенсивности флуорисценции PD-L1 на ДК пациентов группы 2 был достоверно выше - 280 (206-370) против 97 (46-116),  $p=0,001$ . Также, ДК пациентов 2-ой группы отличались более низкой аллостимуляторной активностью (табл. 13).

Сравнение свойств ДК больных до и после проведения пульс-терапии (рис. 7) выявило снижение аллостимуляторной активности ДК, генерируемых после пульс-терапии. ДК сохраняли чувствительность к ингибирующему действию дексаметазона *in vitro*, причем дексаметазон-модифицированные ДК, полученные после пульс-терапии, были практически лишены аллостимуляторной активности.



**Рисунок 7. Влияние пульс-терапии МП на стимуляторную активность ИФН-ДК больных РА (n=10) в алло-СКЛ и их чувствительность к действию дексаметазона *in vitro*.** Представлены данные (медиана и интерквартильный диапазон) пролиферативного ответа Т-клеток (по левой оси ординат) и индексы влияния ИФН-ДК в алло-СКЛ (по правой оси ординат) до и после пульс-терапии метилпреднизолоном (До<sub>п/т</sub> и После<sub>п/т</sub>). Значимость различий между МНК+контрДК и МНК+ДКдекс оценивали по критерию Вилкоксона, значимость различий в культурах клеток до и после пульс-терапии – по критерию Манна-Уитни.

Поскольку снижение аллостимуляторной активности ДК после пульс-терапии могло быть связано с изменением субпопуляционного состава моноцитов под действием глюкокортикоидов в завершении было исследовано относительное содержание классических ( $CD14^{++}CD16^{-}$ ), промежуточных ( $CD14^{++}CD16^{+}$ ) и альтернативных ( $CD14^{+}CD16^{++}$ ) моноцитов. До пульс-терапии (табл. 14), у больных отмечалось снижение количества классических моноцитов и увеличение промежуточных и альтернативных моноцитов. После пульс-терапии глюкокортикоидами относительное содержание классических моноцитов возрастало, а доля альтернативных моноцитов снижалась, и эти показатели уже не отличались от таковых у доноров. Таким образом, уменьшение содержания  $CD14^{+}CD16^{++}$  клеток в популяции моноцитов на фоне пульс-терапии МП ассоциировалось со снижением способности ДК стимулировать пролиферацию Т-лимфоцитов.

Кроме того, анализ корреляционных зависимостей выявил обратную взаимосвязь между содержанием альтернативных моноцитов и стимуляторной способностью дексаметазон-модифицированных ДК в ауто-СКЛ ( $R_s = -0,63$ ;  $p = 0,04$ ,  $n = 10$ ). Т.е. более высокое содержание  $CD14^+CD16^{++}$  клеток в популяции моноцитов детерминировало более низкую способность полученных из них ДК декс стимулировать пролиферацию аутологичных Т-клеток.

**Таблица 14 - Влияние пульс-терапии метилпреднизолоном на субпопуляционный состав циркулирующих моноцитов у больных РА**

Группы	Субпопуляции моноцитов (%)		
	$CD14^{++}CD16^-$	$CD14^{++}CD16^+$	$CD14^+CD16^{++}$
Доноры	90 (86-94)	2 (2-6)	1,5 (1-2)
Больные до пульс-терапии МП	78 (74-91) *	4 (3-5) *	5 (2-7) *
Больные после пульс-терапии МП	89 (89-90)	4 (2-4)	1,0 (1,0-6,0)

Примечание: представлено относительное содержание субпопуляций моноцитов в крови здоровых доноров ( $n = 18$ ) и пациентов РА ( $n = 15$ ) до и после пульс-терапии МП. \* $p < 0,05$ ; значимость различий по сравнению с донорами.

Таким образом, эффект пульс-терапии МП связан не только со способностью глюкокортикоидов ингибировать созревание ИФН-ДК и индуцировать их толерогенный фенотип на этапе дифференцировки моноцитов в ИФН-ДК, но и с влиянием на субпопуляционный состав циркулирующих моноцитов, являющихся их предшественниками.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования свидетельствуют, что ДК здоровых доноров, генерируемые из моноцитов в присутствии  $IFN-\alpha$ , чувствительны к действию дексаметазона, в присутствии которого приобретают толерогенные свойства. Это проявляется задержкой созревания ДК (возрастанием доли  $CD14^+$  ДК и снижением  $CD83^+$  и  $CD86^+$  ДК), возрастанием экспрессии ко-ингибиторных ( $PD-L1$ ) и толерогенных ( $TLR2$ ) молекул, снижением продукции провоспалительных цитокинов и появлением способности ингибировать пролиферацию Т-клеток и продукцию цитокинов в алло-СКЛ со смещением баланса в сторону Th2-ответа. Важно отметить, что ИФН-ДК декс не уступают, а по ряду признаков (содержанию  $TLR2^+$  и  $CD14^+$  клеток, продукции IL-10, ингибиции пролиферативного ответа в СКЛ, избирательному подавлению Th1/провоспалительных цитокинов в отсутствие супрессорного эффекта на Th2/противовоспалительные цитокины) превосходят толерогенные свойства ИЛ4-ДК декс. Эти данные позволяют рассматривать ИФН-ДК декс в качестве новой клеточной платформы толерогенных ДК-вакцин.

Анализ свойств ИФН-ДК у больных РА показал, что эти клетки отличаются от таковых у доноров признаками задержки созревания, более высокой экспрессией ко-ингибиторной молекулы  $PD-L1$  и менее эффективно стимулируют пролиферацию Т-клеток в алло-СКЛ. Тем не менее, ДК больных РА сохраняют чувствительность к толерогенному действию дексаметазона, который индуцирует способность ДК ингибировать пролиферацию и Th1 ответ в алло-СКЛ. Генерируемые у больных ДК декс характеризуются стабильностью, и их ингибирующий эффект прямо коррелирует с содержанием  $TLR2^+$  клеток. Проведенные исследования также продемонстрировали, что ИФН-ДК декс пациентов подавляют пролиферативный ответ аутологичных Т-

лимфоцитов в ауто-СКЛ и антиген (PPD)-стимулированных культурах. Причем ингибция аутореактивных Т-клеток опосредуется путем индукции апоптоза и анергии, а также генерации регуляторных CD4<sup>+</sup> Т-клеток, секретирующих IL-10 (Tr1). Эти данные свидетельствуют о возможности генерации у больных РА толерогенных ИФН-ДК, способных супрессировать функции аутологичных Т-лимфоцитов.

Важным результатом являются также данные, о том, что эффект глюкокортикоидов на ИФН-ДК реализуется не только *in vitro*, но и *in vivo*, о чем свидетельствует снижение способности ДК стимулировать пролиферацию Т-клеток в алло-СКЛ на фоне пульс-терапии глюкокортикоидами. В этом случае подавление аллостимуляторной активности ИФН-ДК ассоциировано с изменением субпопуляционного состава моноцитов, в частности, снижением доли CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> и увеличением CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> клеток, указывая на причастность моноцитов к опосредованию эффектов глюкокортикоидов на функции ИФН-ДК.

## ВЫВОДЫ

1. Генерируемые в присутствии дексаметазона ИФН-ДК доноров характеризуются сниженным относительным количеством CD83<sup>+</sup> и CD86<sup>+</sup> ДК и повышенным содержанием CD14<sup>+</sup>, TLR2<sup>+</sup> и PD-L1<sup>+</sup> ДК, выраженным угнетением продукции TNF- $\alpha$ , а также способностью ингибировать пролиферацию Т-клеток и продукцию цитокинов в алло-СКЛ, что свидетельствует о приобретении толерогенных свойств ИФН-ДК под действием глюкокортикоидов.
2. ИФН-ДК доноров отличаются от ИЛ4-ДК более высоким содержанием CD14<sup>+</sup> и TLR2<sup>+</sup> ДК, в большей степени ингибируют пролиферацию Т-клеток и подавляют продукцию Th1/провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IFN- $\gamma$ ) в отсутствие супрессорного действия на Th2 (IL-4, IL-13) цитокины, что указывает на более выраженные толерогенные свойства дексаметазон-модифицированных ИФН-ДК.
3. ИФН-ДК больных РА отличаются от ДК доноров меньшим содержанием CD83<sup>+</sup> ДК, большей долей CD14<sup>+</sup> и PD-L1<sup>+</sup> ДК и умеренно сниженной аллостимуляторной активностью. При этом дексаметазон в культурах ИФН-ДК вызывает дальнейшее снижение доли CD83<sup>+</sup> ДК, подавляет продукцию TNF- $\alpha$  и индуцирует способность ДК ингибировать пролиферацию Т-клеток и продукцию Th1 (IFN- $\gamma$ ) цитокинов в алло-СКЛ, что свидетельствует о сохранной чувствительности ИФН-ДК больных к действию глюкокортикоидов.
4. ИФН-ДК больных РА подавляют пролиферацию аутологичных Т-клеток в ауто-СКЛ, что сопряжено с блокированием клеточного цикла CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, угнетением продукции Th1 (IFN- $\gamma$ ), Th17 (IL-17) и в меньшей степени Th2 (IL-13, IL-4) цитокинов; усилением апоптоза CD3<sup>+</sup> Т-лимфоцитов и возрастанием CD4<sup>+</sup> Т-клеток, экспрессирующих IL-10 (Tr1), свидетельствуя, что ингибирующий эффект ИФН-ДК на аутореактивные Т-клетки реализуется с вовлечением нескольких механизмов.
5. Усиление экспрессии PD-L1 на генерируемых ИФН-ДК и снижение способности ДК стимулировать пролиферацию Т-клеток в алло-СКЛ у больных РА при проведении пульс-терапии метилпреднизолоном ассоциировано со снижением в популяции доли CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> моноцитов и увеличением содержания CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> клеток, что свидетельствует об индукции толерогенных свойств ИФН-ДК на фоне терапии глюкокортикоидами и причастности моноцитов к опосредованию эффектов глюкокортикоидов на функции ИФН-ДК *in vivo*.

### **Список работ, опубликованных по теме диссертации**

1. **Kurochkina Y.** The possibility of generation IFN-dendritic cells with tolerogenic properties in patients with rheumatoid arthritis/ Leplina O., Ostanin A., Sizikov A., Chernykh E. // International Journal of Rheumatic Diseases. 2014. - Vol. 17. № S2. - PP. - 19-20.
2. **Курочкина Ю.Д.** Фенотипические и функциональные свойства ИФН $\alpha$  индуцированных дендритных клеток у здоровых доноров и пациентов с ревматоидным артритом/ Леплина О.Ю., Останин А.А., Тихонова М.А., Сизиков А.Э.// Медицинская иммунология. 2015. - Т. 17. - № S. -С. 134.
3. **Курочкина Ю.Д.** Влияние дексаметазона на интерферон- $\alpha$ -индуцированную дифференцировку моноцитов в дендритные клетки/ Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Тыринова Т.В., Баторов Е.В., Сизиков А.Э., Останин А.А., Черных Е.Р. // Медицинская иммунология. -2016. - Т. 18. - N4 - С.347-356. DOI:10.15789/1563-0625-2016-4-347-3561.
4. **Курочкина Ю.Д.** Влияние дексаметазона на генерацию ИФН- $\alpha$  индуцированных дендритных клеток у здоровых доноров и пациентов с ревматоидным артритом/ Леплина О.Ю., Останин А.А., Тихонова М.А., Тыринова Т.В., Сизиков А.Э., Черных Е.Р.// В книге: фундаментальные и клинические аспекты иммунологии. Материалы IX отчетной научной сессии НИИФКИ. Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии. 2016. - С. 112-114.
5. **Курочкина Ю.Д.** Влияние дексаметазона на генерацию ИФН- $\alpha$  индуцированных дендритных клеток у пациентов с ревматоидным артритом/ Леплина О.Ю., Останин А.А., Тихонова М.А., Тыринова Т.В., Сизиков А.Э., Черных Е.Р.// В книге: Дни Ревматологии в Санкт-Петербурге– 2016. Сборник тезисов конгресса с международным участием. 2016. - С. 117-118.
6. Тихонова М.А. Стратегия выделения и сравнительная характеристика неклассических моноцитов (CD14+CD16++) у больных ревматоидным артритом и доноров/ **Курочкина Ю.Д.**, Останин А.А., Черных Е.Р.// В книге: фундаментальные и клинические аспекты иммунологии Материалы IX отчетной научной сессии НИИФКИ. Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии. 2016. - С. 158-160.
7. Черных Е.Р. Интерферон-альфа-индуцированные дендритные клетки у больных ревматоидным артритом и их чувствительность к дексаметазону/ **Курочкина Ю.Д.**, Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Тыринова Т.В., Сизиков А.Э., Чумасова О.А., Останин А.А.// Медицинская иммунология. – 2017. - Т. 19 - N3 - С.255-266. DOI:10.15789/1563-0625-2017-3-255-266.
8. **Курочкина Ю.Д.** Характеристика дендритных клеток у больных ревматоидным артритом с различным типом медикаментозной терапии/Тихонова М.А., Тыринова Т.В., Леплина О.Ю., Сизиков А.Э., Сулутьян А.Э., Коненкова Л.П., Чумасова О.А., Останин А.А., Черных Е.Р.// Бюллетень сибирской медицины. - 2017. - Т. 16. - N4.- С.-195-206. DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-195-206.
9. **Курочкина Ю.Д.** Дендритные клетки как потенциальные мишени пульс-терапии глюкокортикоидами у больных ревматоидным артритом/ Тихонова М.А., Тыринова Т.В., Олейник Е.А., Сизиков А.Э., Чумасова О.А., Коненкова Л.П., Сулутьян А.Э., Останин А.А.// Материалы XVI Всероссийского научного Форума с международным участием имени академика В.И. Иоффе Дни Иммунологии в Санкт-Петербурге 5-8 июня 2017. Сборника тезисов, специальный выпуск. - Т. 19 - С.117-118.

10. **Курочкина Ю.Д.** Пульс-терапия глюкокортикоидами у больных ревматоидным артритом модифицирует свойства дендритных клеток/ Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Тыринова Т.В., Олейник Е.А., Сизиков А.Э., Чумасова О.А., Сулутьян А.А., Останин А.А.// Конгресс с международным участием Дни Ревматологии в Санкт-Петербурге 8-10 октября 2017. Сборник тезисов. Спб.: Изд-во «Человек и его здоровье» - 2017. - С.131.
11. **Y. Kurochkina.** Drug therapy enhances tolerogenic properties of dendritic cells in patients with rheumatoid arthritis/ M. Tikhonova, T. Tyrinova, O. Leplina, A. Sizikov, A. Sulutian, L. Konenkova, O. Chumasova, A. Ostanin, E. Chernykh. // *Annals of Rheumatic Diseases*. – 2017. - Vol. 76 - suppl. 2- P.771. DOI: 10.1136/annrheumdis-2017-eular.2408.
12. **Курочкина Ю.Д.** Дексаметазон *in vitro*, и пульс-терапия глюкокортикоидами *in vivo* индуцируют толерогенный фенотип дендритных клеток у больных ревматоидным артритом/ Тыринова Т.В., Тихонова М.А., Леплина О.Ю., Сизиков А.Э., Сулутьян А.Э., Чумасова О.А., Останин А.А., Черных Е.Р. // *Иммунология*. – 2018. - Т. 39 - N 4 - С.-195-201. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0206-4952-2018-39-3-195-201>.
13. **Y. Kurochkina.** The safety and tolerability of intra-articular injection of tolerogenic dendritic cells in patients with rheumatoid arthritis: the preliminary results/M. Tikhonova, T. Tyrinova, O. Leplina, A. Sizikov, A. Sulutian, O. Chumasova, A. Ostanin, E. Chernykh. // *Ann Rheum Dis*.-2018. - Vol. 77, Suppl. - P. A966. DOI: 10.1136/annrheumdis-2018-eular.2880

#### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДК	Дендритные клетки
тДК	ДК с толерогенными свойствами
Трег	Т-регуляторные клетки
АИЗ	Аутоиммунные заболевания
ИФН-ДК	Дендритные клетки, генерируемые в присутствии интерферона-альфа
ИЛ4-ДК	Дендритные клетки, генерируемые в присутствии интерлейкина-4
РА	Ревматоидный артрит
МНК	Мононуклеарные клетки
контрДК	Дендритные клетки, генерируемые в отсутствие дексаметазона
ДКдекс	Дендритные клетки, генерируемые в присутствии дексаметазона
СКЛ	Смешанная культура лейкоцитов
МП	Метилпреднизолон