

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

На правах рукописи



ФИШЕР МАРИНА СЕРГЕЕВНА

**ИНДУКЦИЯ АНТИГЕН-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ С
ПОМОЩЬЮ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК, ТРАНСФИЦИРОВАННЫХ ДНК-
КОНСТРУКЦИЯМИ, ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АРТРИТЕ**

3.2.7. Иммунология

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор
Сенников Сергей Витальевич

Новосибирск 2025

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	4
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1 Дисбаланс иммунной системы и способы его восстановления	13
1.2 Клеточные методы терапии аутоиммунных заболеваний	18
1.2.1 Мезенхимальные стромальные клетки	20
1.2.2 Дендритные клетки	24
1.2.3 Т-регуляторные клетки.....	31
1.3 Экспериментальные модели артрита	40
1.4 Заключение	44
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	45
2.1 Объект исследования	45
2.2 Этическое заключение	45
2.3 Лабораторные животные	45
2.4 Получение миелоидных дендритных клеток у мышей	46
2.5 Схема эксперимента.....	46
2.6 Получение ДНК-конструкций, кодирующих IL-10, CCR9 и эпитопы коллагена II типа	47
2.7 Транфекция	51
2.8 Оценка продукции IL-10 трансфицированными дендритными клетками	52
2.9 Со-культивирование лимфоцитов и дендритных клеток.....	52
2.10 Пролиферативная активность CD4 ⁺ -лимфоцитов при со-культивировании с Т-рег.....	53
2.11 Анализ миграционной активности дендритных клеток <i>in vitro</i>	54
2.12 Анализ содержания Т-рег в сочетанной культуре дендритных клеток и клеток тимуса	55
2.13 Проточная цитометрия	56
2.14 Протокол антиген-коллаген индуцированного артрита	56
2.15 <i>In vivo</i> исследование	57
2.16 Оценка влияния трансфицированных дендритных клеток на течение экспериментального артрита	58
2.17 Статистический анализ данных	59
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	60

3.1 Получение толерогенных дендритных клеток.....	60
3.2 Оценка содержания IL-10 ⁺ и TGF-β ⁺ CD4 ⁺ -лимфоцитов в совместной культуре ДК и CD4 ⁺ лимфоцитов.....	66
3.3 Пролиферация CD4 ⁺ спленоцитов в совместной культуре Т-рег, CD4 ⁺ лимфоцитов и коллагена II типа.....	67
3.4 Анализ in vitro миграционных возможностей ДК, трансфицированных ДНК-конструкциями CCR9	69
3.5 Анализ количества Т-рег в совместной культуре ДК и клеток тимуса.....	70
3.6 Отработка модели антиген-коллаген индуцированного артрита.....	71
3.7 Оценка влияния полученных дендритных клеток на течение экспериментального артрита у мышей	75
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	82
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	90
ВЫВОДЫ	92
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	94
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	95

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Одними из ключевых особенностей аутоиммунных заболеваний (АИЗ) являются утрата толерантности и запуск иммунного ответа против собственных антигенов, что приводит к повреждению клеток и тканей организма [1]. В связи с этим восстановление иммунологической толерантности остается одним из приоритетных направлений клеточной иммунотерапии, направленных на устранение причин заболеваний. На сегодняшний день одобренные методы лечения АИЗ включают в себя постоянный прием иммунодепрессивных препаратов, биологических средств с таргетным действием и синтетических ингибиторов сигнальных путей. Однако использование этих препаратов может вызвать иммуносупрессию, что, в свою очередь, может привести к развитию хронических инфекций или онкологических заболеваний [2, 3, 4]. Современные методы лечения АИЗ редко приводят к полному излечению или безмедикаментозной ремиссии [5, 6]. В связи с этим разработка новых подходов к терапии АИЗ, которые могут обеспечить стойкую ремиссию и минимизировать побочные эффекты, остается актуальной научной задачей.

Одним из перспективных подходов к восстановлению иммунологической толерантности является применение толерогенных дендритных клеток (толДК). Известно, что толДК способны инициировать и поддерживать как центральную, так и периферическую толерантность [7]. Применение толДК в ряде клинических исследованиях оказалось успешным [8-10], однако существуют некоторые недостатки, которые необходимо учитывать для улучшения разработки эффективной терапии с помощью толДК. Неспецифические толДК обладают потенциалом подавлять функциональную активность не только аутореактивных Т-клеток, но и Т-клеток с другой специфичностью Т-клеточного рецептора. Это вновь ведет к риску возникновения побочных эффектов: инфекционным и онкологическим заболеваниям, нефро- и гепатотоксичности. При получении

антиген-специфических ДК встает проблема выбора антигенов, так как в патогенезе многих АИЗ участвует несколько аутоантигенов, и толерантность только к одному из них, может не привести к ожидаемому клиническому эффекту. Возможно, решением проблемы выбора антигенов для терапии будет одновременное использование в качестве мишени нескольких аутоантигенов, пептидов или трансфекция экзогенной ДНК, кодирующей несколько иммуногенных пептидов. Эффективность использования подхода с применением ДНК-конструкций была приведена в нескольких исследованиях по терапии онкологических заболеваний и трансплантационных реакций [11, 12, 13].

Важным аспектом является миграция и накопление толДК в пораженных болезнью органах и/или лимфатических узлах. В целях усиления терапевтического эффекта используются различные пути введения или изменение характеристик толДК через сверхэкспрессию хемокиновых рецепторов [14]. Также важным фактором является стабильность толДК в области развития воспалительного процесса. Поэтому, следует рассмотреть возможности совершенствования протоколов для стабилизации фенотипа и функциональности. Одним из хемокинов, который может одновременно влиять на миграцию и сохранение толерогенного фенотипа ДК, является CCR9. Рецептор хемокина CCR9 представляет собой G-белок-связанный рецептор, который можно обнаружить на различных типах иммунных клеток, включая CD4⁺T-клетки, дендритные клетки (ДК) и В-клетки [15]. CCR9 стимулирует перемещение иммунных клеток по градиенту концентрации своего лиганда CCL25, который экспрессируется эпителиальными клетками кишечника и тимуса [16]. Известно, что CCR9⁺ДК участвуют в регуляции воспаления, пищевой аллергии, аутоиммунных и трансплантационных реакциях [17]. CCR9⁺ДК, взаимодействуя с лимфоидными и миелоидными клетками в тимусе, вторичных лимфоидных тканях и слизистой оболочке, играют ключевую роль в поддержании иммунного гомеостаза [18]. Существуют данные о том, что повышенная экспрессия CCR9 на ДК приводит к снижению экспрессии МНС II и CD86 ДК, что может привести к устойчивому толерогенному фенотипу ДК [19].

В рамках этой научной работы были изучен метод создания толДК с использованием ДНК-конструкций, которые кодируют IL-10, CCR9 и эпитопы коллагена II типа. Кроме того, была проанализирована эффективность применения трансфицированных ДК для стимулирования толерантности к коллагену в условиях экспериментального артрита. Использование ДНК-конструкции, которая кодирует CCR9, способствует миграции ДК в тимус. Это может влиять на формирование центральной толерантности. Также известно, что миелоидные ДК экспрессируют CCR7, который способствует миграции к лимфатическим узлам, где формируются процессы периферической иммунной толерантности. Таким образом, актуальность данной работы также подтверждается изучением механизмов формирования иммунологической толерантности.

Степень разработанности темы исследования

Восстановление иммунологической толерантности посредством использования толДК широко изучалось как в отечественных, так и в зарубежных исследованиях. Значительная часть работ была сосредоточена на неспецифических толДК, которые широко модулируют иммунные ответы, демонстрируя свой потенциал как в доклинических, так и клинических исследованиях.

Кроме того, разработка и применение антиген-специфических толДК тоже исследовались. Этот подход является многообещающим. Несмотря на значительный прогресс в этой области, многие вопросы остаются открытыми. В частности, недостаточно изучены способы нагрузки антигенами ДК и стабильность толерогенного фенотипа ДК в условиях воспаления. Представленная работа была посвящена решению указанных вопросов.

Цель и задачи исследования

Целью данной работы является изучение индукции антиген-специфической толерантности с помощью дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими IL-10, CCR9 и эпитопы коллагена II типа в модели антиген-коллаген индуцированного артрита у мышей.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Разработать протокол получения дендритных клеток с толерогенным фенотипом, при помощи трансфекции ДНК-конструкциями, кодирующими IL-10, CCR9 и эпитопы коллагена II типа.
2. Изучить влияние толерогенных дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими IL-10, CCR9 и эпитопы коллагена II типа, на содержание регуляторных Т-клеток в совместной культуре со спленоцитами, содержание в кондиционной среде IL-10, и потенциал подавления пролиферативной активности CD4⁺ спленоцитов в условиях *in vitro*.
3. Оценить миграционный потенциал дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкцией, кодирующей CCR9, к клеткам тимуса *in vitro*.
4. Проанализировать влияние толерогенных дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими IL-10, CCR9 и эпитопы коллагена II типа, на течение экспериментального коллаген-индуцированного артрита у мышей *in vivo*.

Научная новизна

Разработан новый протокол получения толДК, с помощью трансфекции ДНК-конструкциями, кодирующими IL-10, CCR9 и эпитопы коллагена II типа. Полученные ДК имеют сниженный уровень экспрессии маркеров зрелости CD80, CD86 и H-2Db (MHC I), а также способны к продукции IL-10, что указывает на их толерогенный фенотип.

Показано, что со-культивирование полученных ДК и спленоцитов, приводит к достоверному увеличению содержания FoxP3⁺Т-регуляторных клеток, стимуляции продукции IL-10 и TGF-β CD4⁺спленоцитами.

Установлено, что совместное культивирование антиген-специфических Т-регуляторных клеток и CD4⁺спленоцитов (полученных от мышей с антиген-

коллаген индуцированным артритом), приводит к достоверному снижению пролиферативной активности в ответ на антиген (коллаген II типа).

Получены новые данные о том, что трансфекция миелоидных ДК генетической конструкцией, кодирующей ген CCR9, приводит к повышению его экспрессии и увеличению миграционной активности миелоидных ДК к клеткам тимуса *in vitro*. Данный феномен является нетипичным для миелоидных ДК.

Впервые показана способность толДК, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими IL-10, CCR9 и эпитопы коллагена II типа, к подавлению активности антиген-коллаген индуцированного артрита (АКИА) у мышей.

Теоретическая и практическая значимость работы

В работе была продемонстрирована потенциальная возможность применения ДК, модифицированных с помощью ДНК-конструкций, для целенаправленного подавления активности аутоиммунных реакций. Этот метод представляет собой новый подход к созданию иммунологической толерантности при АИЗ. Представлены данные о получении антиген-специфических ДК, с использованием ДНК-конструкций, кодирующих IL-10, CCR9 и эпитопы коллагена II типа.

Ценность данной работы заключается в том, что она позволяет сравнить толерогенные свойства антиген-специфических и неспецифических ДК. Результаты показывают, что антиген-специфические ДК эффективно подавляют АКИА у мышей. Полученные антиген-специфические ДК могут стать основой для создания клеточных вакцин для лечения АИЗ.

Материалы, полученные в результате исследования, могут иметь практическую значимость для восстановления иммунологической толерантности к аутоантигенам при аутоиммунных заболеваниях. Активация миграции в тимус ДК, нагруженных антигеном, представляет важный вклад в формирование платформы технологий по индукции иммунологической толерантности при клеточной терапии аутоиммунных заболеваний.

Методология и методы исследования

Исследование выполнено на базе лаборатории молекулярной иммунологии НИИФКИ. В работе применялись методы культивирования клеточных культур, метод трансфекции клеток ДНК-конструкциями, проточная цитофлуориметрия, иммуноферментный анализ, функциональные пролиферативные тесты, витальное окрашивание и оценка миграции клеток, гистологический и серологический методы, визуальную оценку припухлостей лап с помощью штангенциркуля, статистическую обработку данных.

Объектом исследования были выбраны ДК, полученные из клеток костного мозга лабораторных мышей линии BALB/c. Предмет исследования - изучение влияния ДК, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими CCR9, IL-10 и эпитопы коллагена II типа, на индукцию иммунологической толерантности.

ДК трансфицированы ДНК-плазмидами, кодирующими IL-10, CCR9 и эпитопы коллагена II типа посредством метода электропорации. ДК также охарактеризованы по экспрессии маркеров созревания и дифференцировки, посредством проточной цитофлуориметрии. Полученные трансфицированные ДК сокультивированы со спленоцитами для оценки их влияния на пролиферативную активность эффекторных клеток, содержание регуляторных Т-клеток и иммунорегуляторных цитокинов (IL-10, TGF- β) с помощью методов проточной цитофлуориметрии и иммуноферментного анализа. Для оценки антиген-специфичности используемых трансфицированных ДК, проводился пролиферативный тест в совместной культуре со спленоцитами в ответ на коллаген II типа, с последующим анализом с использованием проточной цитофлуориметрии. Оценка миграции ДК проводилась посредством витальной окраски (CFSE) целевых клеток с последующим со-культивированием с клетками тимуса и лимфоузлов и исследованием миграционного потенциала с помощью прибора In cell. Оценка эффективности влияния полученных антиген-специфических толДК на течение экспериментального артрита у мышей осуществлялась по измерению припухлостей суставов, гистологической оценке суставов и содержанию антител к

коллагену II типа в сыворотке лабораторных животных посредством иммуноферментного анализа.

Положения, выносимые на защиту:

1. Дендритные клетки, трансфицированные ДНК-конструкциями, кодирующими IL-10, CCR9 и эпитопы коллагена II типа, обладают толерогенным фенотипом и потенциалом к индукции антиген-специфической толерантности *in vitro*, посредством генерации Т-регуляторных клеток и IL-10, TGF- β CD4⁺клетками.
2. Дендритные клетки, трансфицированные ДНК-конструкциями, кодирующими IL-10, CCR9 и эпитопы коллагена II типа способны к антиген-специфическому подавлению активности антиген-коллаген индуцированного артрита, снижая припухлость лап экспериментальных животных, уровень антител к коллагену II типа и вызывают регресс патологических гистологических изменений.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Достоверность результатов, полученных в ходе диссертационного исследования, обеспечивается комплексным подходом, включающим использование современных, научно обоснованных методов, полностью соответствующих поставленным целям и задачам работы. Применение сертифицированного и калиброванного оборудования, а также достаточный объем экспериментальной выборки с участием лабораторных животных гарантируют точность и воспроизводимость данных. Все научные положения и выводы подтверждены фактическим материалом, наглядно представленного в виде графиков и рисунков, что позволяет объективно оценить полученные результаты.

Статистическая обработка данных выполнена с применением корректных методов анализа. Проведен детальный анализ экспериментальных данных, включая их сопоставление с актуальными научными публикациями, что

подтверждает соответствие результатов современным исследованиям в данной области.

Основные научные положения и выводы диссертационной работы были доложены и обсуждены на:

- OpenBio-2024 (г. Новосибирск, 2024).
- XVII Всероссийском научном форуме с международным участием имени академика В.И. Иоффе «ДНИ ИММУНОЛОГИИ В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ» (г. Санкт-Петербург, 2023).
- OpenBio-2023 (г. Новосибирск, 2023).
- EULAR 2022 (г. Копенгаген, Дания, 2022).
- Отчетных научно-практических конференциях аспирантов НИИФКИ (г. Новосибирск, 2020-2023).

Публикации по теме исследования

По теме диссертационного исследования опубликовано 7 научных работ, из них 3 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования Российской Федерации для публикаций основных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.2.7. Иммунология, из них 3 статьи в журналах, индексируемых в международных базах данных (Scopus и/или Web of Science).

Личный вклад автора

Автор участвовал в разработке дизайна всех экспериментов. Результаты, представленные в работе, получены автором лично. Выделение и культивирование клеток, оценка пролиферативного ответа, оценка экспрессии маркеров зрелости, продукции цитокинов, миграционной активности клеток, постановка модели экспериментального артрита, все манипуляции с лабораторными животными, проводились лично соискателем на базе лаборатории молекулярной иммунологии НИИФКИ. Автором лично заполнялись все протоколы исследования, выполнена

статистическая обработка полученных результатов и интерпретация экспериментальных данных. Подготовка всех публикаций по выполненной работе проведена лично автором.

Объем и структура диссертации

Диссертация написана в традиционном стиле и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения и выводов. Материал изложен на 111 страницах машинописного текста, включающего 3 таблицы и 21 рисунок. Прилагаемая библиография содержит ссылки на 176 литературных источников.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Дисбаланс иммунной системы и способы его восстановления

Аутоиммунные заболевания (АИЗ) представляют собой широкий спектр состояний, характеризующихся нарушениями в работе иммунной системы, что приводит к неконтролируемой реакции В-клеток и Т-клеток на собственные клетки организма. Эти заболевания могут поражать практически любую систему органов и возникать у людей любого возраста. Точные этиологические факторы развития АИЗ остаются невыясненными, однако растет понимание в отношении того, что они развиваются в результате взаимодействий генетических факторов и окружающей среды [20, 21]. При этом общей чертой всех АИЗ является патогенетический механизм, включающий срыв иммунологической толерантности. Возникновение АИЗ тесно связано с дисбалансом между эффекторными и супрессорными механизмами в работе иммунной системы. При возникновении патологического иммунного ответа, происходит накопление эффекторных клеток в тканях, что может сопровождаться относительным уменьшением количества супрессорных клеток [22]. Дисбаланс в функционировании эффекторных и регуляторных клетках может привести к аутоиммунным реакциям или повреждению тканей [23]. Таким образом, разработка стратегий устранения аутоиммунных реакций и восстановления баланса эффекторных и регуляторных клеток становится важной задачей достижения иммунной толерантности и профилактики аутоиммунных заболеваний.

Многие факторы, включая цитокины, иммунные клетки и микробиоту, играют важную роль в поддержании иммунного баланса [24, 25]. Иммунная система должна быть невосприимчивой к аутоантигенам и безвредным объектам окружающей среды, но при появлении патогена или злокачественной пролиферации аутологичных клеток создавать целенаправленный и эффективный

ответ. После успешного преодоления угрозы, иммунная система должна вернуться в состояние гомеостаза. Если этого не произойдет, то есть риск развития аутоиммунных или онкологических заболеваний [26].

Иммунологическая толерантность определяется как состояние невосприимчивости к антигенам, которые могут вызвать иммунный ответ. Важно отметить, что нарушение толерантности и реагирование на аутоантигены способствуют индукции аутоиммунных реакций [27]. Иммунная толерантность достигается посредством центральных и периферических механизмов [28]. Центральная толерантность формируется в тимусе у Т-лимфоцитов и в костном мозге у В-лимфоцитов и действует преимущественно посредством негативной селекции путем элиминации незрелых Т- и В-лимфоцитов, распознающих аутоантигены [28]. Периферическая толерантность начинает формироваться после того, как Т- и В- лимфоциты покидают центральные лимфоидные органы. Механизмы, посредством которых толерантность поддерживается на периферии, включают: апоптоз, анергию и подавление активности Т-эффекторных клеток опосредованное регуляторными Т-клетками (Т-рег).

Известно, что гемопоэтические лимфоидные предшественники мигрируют и развиваются в тимусе в $CD4^+CD8^+$ тимоциты, экспрессирующие рецептор Т-клеточного антигена (TCR). $CD4^+CD8^+$ тимоциты подвергаются положительной и негативной селекции в корковом и мозговом веществах тимуса соответственно, на основе сродства их TCR к молекулам главного комплекса гистосовместимости класса I (MHC-I) или MHC класса II (MHC-II). В корковом веществе тимуса все $CD4^+CD8^+$ тимоциты, способные связываться с молекулами MHC, представленными на поверхности кортикальных эпителиальных клеток, подвергаются положительному отбору и перемещаются в мозговое вещество. Клетки, которые не могут взаимодействовать с молекулами MHC, погибают. Это происходит по мере их продвижения к мозговому веществу [29]. В тимусе взаимодействие между TCR и MHC на поверхности ДК и медуллярных эпителиоцитов определяет дальнейшую судьбу тимоцитов [30]. Т-клетки, несущие TCR с высокой аффинностью, удаляются, Т-клетки с промежуточной

аффинностью перенаправляются в Т-рег, а Т-клетки с низкой аффинностью становятся наивными Т-клетками и выходят в периферические лимфоидные органы. Однако некоторые аутореактивные Т-клетки могут ускользать от механизмов селекции и мигрировать на периферию [31]. Основные механизмы толерантности Т-клеток представлены на рисунке 1.

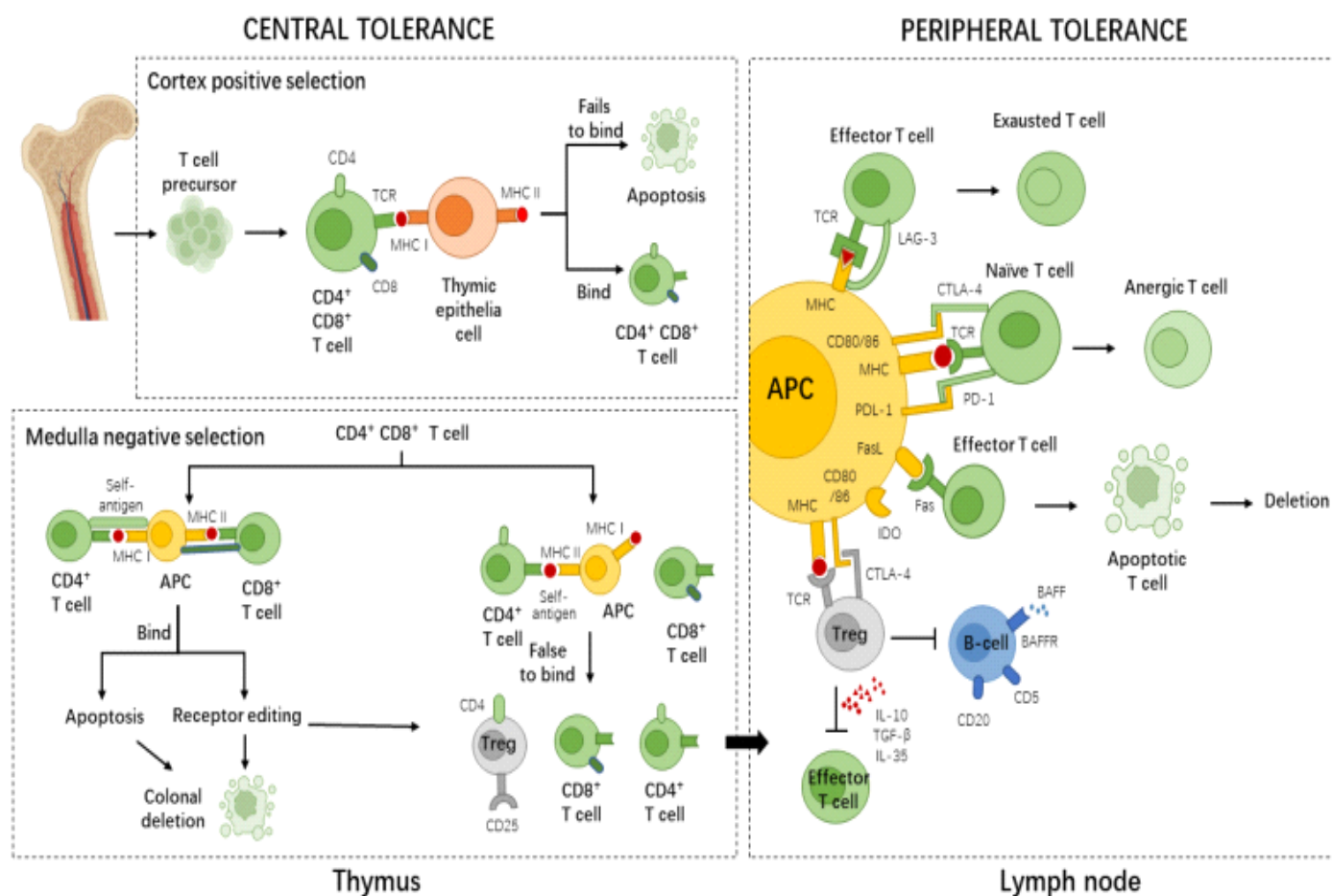


Рисунок 1 - Основные механизмы иммунной толерантности [31].

Механизмы формирования периферической толерантности более обширные и включают взаимодействия многих клеток и процессов.

Антиген-презентирующие клетки (АПК), а именно ДК макрофаги и В-клетки, инициируют как защитные, так и аутоиммунные Т-клеточные ответы, а ДК обладают наиболее высоким потенциалом презентации антигенов, о чем свидетельствует индукция активации наивных Т-клеток [32].

По данным литературы, ДК могут поддерживать толерантность несколькими способами: индукция апоптоза или анергии аутореактивных Т-клеток и индукция, экспансия и поддержание Т-рег [33]. В гомеостатических условиях незрелые ДК представляют аутоантигены в отсутствие обширной ко-стимуляции или помощи цитокинов, что приводит к непродуктивной активации Т-клеток и аутореактивному апоптозу Т-клеток и анергии [7, 34]. Другим способом влияния ДК на течение иммунных реакция является индукция Т-рег. ДК способствуют увеличению содержания Т-рег, когда презентация аутоантигена, управляемая МНСII, сочетается с иммуносупрессивными молекулами, такими как IL-10, IDO, PGE-2 и TGF- β [34]. Даже при воспалительных состояниях ДК, экспрессирующие аутоантигены, могут увеличивать количество аутоантиген-специфичных Т-рег [35].

Помимо ДК, существуют и другие АПК, экспрессирующие МНСII, которые способны к формированию иммунной толерантности. Эти клетки включают синусоидальные эндотелиальные клетки печени (LSEC), макрофаги и Т-клетки. LSEC экспрессируют МНСII, низкие уровни костимулирующих молекул и не продуцируют провоспалительный цитокин IL-12, поэтому они не способны стимулировать патогенные ответы Th1. Вместо этого LSEC увеличивают количество Т-рег [33]. M2-подобные макрофаги и маргинальные макрофаги продуцируют IL-10, TGF- β и PD-L1. Эти молекулы играют ключевую роль в регуляции иммунных реакций, способствуя формированию регуляторных Т-клеток или элиминации аутореактивных Т-лимфоцитов [33].

АИЗ являются следствием нарушения иммунной толерантности, а ее восстановление — актуальным направлением для разработки новых видов терапии. В последние годы было разработано несколько потенциально толерогенных методов клеточной терапии, которые используют мезенхимальные стромальные клетки, Т-регуляторные клетки и толДК. Каждый из них имеет свои преимущества, недостатки, а также особенность воздействия на иммунную систему: неспецифическое или антиген-специфическое.

В основе современных подходов восстановления иммунной толерантности лежит индукция иммуносупрессии. Она неспецифическим образом ингибирует иммунные реакции путем инактивации субпопуляций Т- или В-клеток, а также путем неселективного ингибирования презентации антигена, продукции провоспалительных цитокинов [36]. Несмотря на свои преимущества, эти стратегии не являются полностью эффективными и могут снизить как клеточный, так и гуморальный иммунитет у пациентов, что несет в себе риски восприимчивости к оппортунистическим инфекциям, вирусной реактивации и другим нежелательным последствиям.

Индукция антиген-специфической иммунологической толерантности с целью блокирования нежелательных иммунных ответов на антигены при сохранении целостности оставшейся иммунной системы является основным направлением исследований на протяжении нескольких десятилетий, поскольку это может изменить нынешнюю ситуацию в лечении многочисленных аутоиммунных заболеваний, предотвращения посттрансплантационных осложнений, и послужить ключевой технологией для клеточной иммунотерапии.

1.2 Клеточные методы терапии аутоиммунных заболеваний

Современные достижения в области клеточной терапии позволили разработать ряд подходов, направленных на формирование иммунологической толерантности при аутоиммунных патологиях. Эти стратегии условно разделяются на антиген-специфические и неспецифические, включая применение мезенхимальных стромальных клеток (МСК), толДК, Т-рег, а также методов генной инженерии с использованием Т-клеточных (TCR) и химерных антигенных рецепторов (CAR). Каждый подход отличается уникальными механизмами действия, преимуществами и ограничениями. Антиген-специфические методы обеспечивают прецизионное воздействие, но требуют сложных протоколов стандартизации, тогда как неспецифические подходы проще в применении, однако сопряжены с риском системных побочных эффектов.

Таблица 1 - Сравнительная характеристика клеточных методов терапии аутоиммунных заболеваний [Разработана автором]

Метод	Тип воздействия	Характеристики	Преимущества	Недостатки
Мезенхимальные стромальные клетки	Неспецифический	Секретируют противовоспалительные цитокины (TGF- β , IL-10), подавляют пролиферацию Т-клеток, стимулируют Т-рег.	Низкая иммуногенность, универсальность, тропизм к очагам воспаления.	Риск неконтролируемой дифференцировки, потенциальная онкогенность.
Толерогенные дендритные клетки неспецифическое	Неспецифический	Секретируют иммуносупрессивные цитокины (IL-10, TGF- β), подавляют активацию Т-клеток независимо от антигена.	Широкий спектр действия, отсутствие необходимости идентификации аутоантигена.	Риск системной иммуносупрессии.

Метод	Тип воздействия	Характеристики	Преимущества	Недостатки
Толерогенные дендритные клетки	Антиген-специфический	Индуктируют анергию Т-клеток и активацию Т-рег через презентацию антигена без ко-стимуляции.	Высокая специфичность, минимальное влияние на системный иммунитет.	Неустойчивость толерогенного фенотипа <i>in vivo</i> .
Регуляторные Т-клетки — поликлональные	Неспецифический	Подавляют иммунный ответ через прямые межклеточные взаимодействия и секрецию IL-10, IL-35.	Простота получения, быстрое подавление воспаления.	Риск генерализованной иммуносупрессии, повышение уязвимости к инфекциям.
TCR-Трег	Антиген-специфический	Распознают антигены в комплексе с HLA, обеспечивая адресное подавление аутоиммунного ответа.	Высокая специфичность, долгосрочный эффект.	Ограничение по HLA-гаплотипам, риск перекрестной реактивности.
CAR-T-клетки и CAR-Трег	Антиген-специфический	Нацелены на поверхностные антигены независимо от HLA, опосредуют цитотоксичность или супрессию.	Универсальность для пациентов с разными HLA-профилями, мощный эффект.	Риск цитокинового шторма, сложности в подборе безопасных мишеней-аутоантигенов.

1.2.1 Мезенхимальные стромальные клетки

МСК обладают способностью к самообновлению и дифференцировке в различные типы клеток, которые играют важную роль в иммуномодуляции и регенерационной активности. МСК обладают разнообразными способностями, включая дифференцировку в ряд клеточных линий, таких как остеобласты, адипоциты и нейроподобные клетки [37]. Они также способны мигрировать в поврежденные ткани, стимулировать ангиогенез, проявлять антиапоптотическую активность, секретировать биоактивные растворимые факторы и оказывать иммуносупрессивные эффекты. МСК отличаются наличием специфических молекул, таких как CD105, CD73 и CD90. При этом они не экспрессируют другие молекулы, включая CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a и CD19 [38]. МСК могут быть получены из различных источников, таких как пуповина, слизистая оболочка матки, костный мозг, жировая ткань и другие [39]. Эти свойства делают МСК перспективным методом лечения аутоиммунных заболеваний. Механизм регенерации тканей запускается стимуляцией эндогенных программ репарации посредством увеличения пролиферации дифференцированных клеток или активации резидентных стволовых клеток. Антиапоптотические механизмы мезенхимальных стволовых клеток заключаются в повышении репарации ДНК и понижении регуляции путей гибели митохондрий, повышении антиоксидантной активности и изменении экспрессии анти- и проапоптотических белков. Секретируемые МСК медиаторы, такие как SDF-1, IGF-1, Nrf2, HIF, HO-1 и VEGF, подавляют активность проапоптотических белков [39]. МСК могут способствовать неоваскуляризации в поврежденных тканях путем экспрессии ангиогенных цитокинов, таких как VEGF (фактор роста эндотелия сосудов), FGF1 и 2 (факторы роста фибробластов), HGF (фактор роста гепатоцитов), Ang-1,2 (ангиопозтин). Растворимые факторы МСК стимулируют рост новых эндотелиальных клеток и неоангиогенез [37].

Наиболее привлекательным свойством МСК, которое делает их перспективными для лечения АИЗ, является их способность подавлять иммунный ответ. Этот эффект достигается благодаря нескольким механизмам. Одним из ключевых механизмов является выработка растворимых факторов [40, 41]. МСК выделяют различные биологически активные вещества, такие как простагландин E2 [42], TGF- β [43], оксид азота [44], CCL2 [45], IDO [46] и IL-10 [47], которые подавляют иммунный ответ и способствуют модуляции функций иммунных клеток. Эти факторы оказывают множество воздействий: тормозят активацию и пролиферацию Т-клеток, индуцируют апоптоз Т-эффекторных клеток и дифференцировку Т-регуляторных клеток, модулируют функции натуральных киллеров (NK), ДК и В-клеток, а также способны изменять полярность макрофагов, способствуя развитию не воспалительных фенотипов. Помимо выработки растворимых факторов, МСК могут подавлять иммунную систему через рецепторы PD-L1 и PD-L2, расположенные на их поверхности [40, 41, 48].

Иммуносупрессивные эффекты МСК неспецифичны в отношении определенного антигена и не зависят от экспрессии МНС, что делает их потенциальной терапией широкого спектра заболеваний [49]. В настоящее время проводится несколько клинических испытаний, в которых используются МСК для лечения различных патологических состояний человека, включая отторжение аллотрансплантата, реакцию "трансплантат против хозяина" и аутоиммунные заболевания.

Многие доклинические исследования, в которых для терапии использовались МСК показали положительный эффект их применения. Было показано, что МСК подавляют иммунную систему и уменьшают воспаление при этих состояниях, что приводит к снижению активности заболеваний [50]. В случае экспериментального артрита МСК подавляют пролиферацию и функцию Т-лимфоцитов, снижают концентрацию TNF-альфа, увеличивают количество Т-рег и способствуют дифференцировке макрофагов в противовоспалительный M2 фенотип [50, 51]. В модели системной красной волчанки МСК ингибируют пролиферацию В-лимфоцитов, снижают выработку антител и способствуют дифференцировке

регуляторных Т-клеток, а в модели воспалительного заболевания кишечника МСК уменьшают воспаление, стимулируют восстановление тканей и регенерацию [50, 51].

Также, описано множество клинических исследований с применением МСК. Например, Wang и соавторы [52] провели клиническое исследование, в которое были включены 40 пациентов с активной и рефрактерной СКВ. Их наблюдения показали значительное снижение показателей SLEDAI и BILAG, а также протеинурии, сывороточного креатинина и азота мочевины. Побочных эффектов, связанных с введением, выявлено не было, и все участники хорошо переносили вмешательство. Однако у семи пациентов произошел рецидив через 6 месяцев после вмешательства, что свидетельствует о необходимости повторного лечения, чтобы избежать рецидива. В другом исследовании Deng с соавторами [53] провел проспективное рандомизированное двойное слепое клиническое исследование у 18 пациентов с СКВ. Результаты продемонстрировали улучшение функции почек, индексов активности заболевания, и снижение протеинурии, в то время как уровень сывороточного альбумина повысился. Кроме того, в ходе исследования также сообщалось о нескольких побочных эффектах.

Так как терапия с использованием МСК представляет собой неспецифическое подавление иммунной системы, её применение может вызывать побочные эффекты, схожие с теми, что наблюдаются при стандартной иммуносупрессивной терапии. К числу таких эффектов относится повышение риска развития инфекционных и онкологических заболеваний. Кроме того, использование МСК может быть связано с рядом других побочных явлений, таких как трансформация клеток в культуре, контаминация вирусами или микоплазмами, а также реакции после введения, включая тромбоэмболию [54].

В настоящее время активно разрабатываются методы, направленные на устранение некоторых из этих реакций или на усиление эффективности воздействия МСК. Например, внеклеточные везикулы, полученные из МСК, стали новой терапевтической альтернативой культивируемым клеткам и уже показали свою эффективность при некоторых АИЗ [38]. Наномодификация МСК - это

перспективный подход к преодолению препятствий в терапии. Исследование Lu и соавторов [55] показало, что нанопептид-модифицированные МСК, обогащенные пептидами, могут быть использованы для усиления терапевтического эффекта при лечении РА, и возможно других АИЗ. Это связано с их возможностью выживать при окислительном стрессе, повышенной способностью к миграции, противовоспалительным действием и активации хондрогенеза [55].

1.2.2 Дендритные клетки

ДК являются профессиональными АПК, которые захватывают антигены и представляют их Т-клеткам для активации иммунных реакций. ДК играют важную роль в инициации адаптивных иммунных ответов и в этом случае определяются как иммуногенные ДК (имДК). ИмДК могут быть вовлечены в индукцию аутоиммунных реакций через активацию аутореактивных Т-клеток [56, 57]. И наоборот, ДК в стационарном состоянии или специализированные подмножества ДК, называемые толерогенными, способствуют развитию и поддержанию толерантности с помощью нескольких непересекающихся механизмов [56, 57]. ТолДК могут индуцировать апоптоз эффекторных Т-клеток и стимулировать анергию и/или регуляторные Т-клетки (Т-рег) [58]. ТолДК характеризуются сниженной экспрессией молекул, участвующих в активации Т-клеток: CD40, CD80 и CD83. Однако они демонстрируют повышенную экспрессию ингибиторных молекул PD-L1, CD95L и IDO. Кроме того, они способны продуцировать противовоспалительные цитокины, такие как IL-10 и TGF- β [59, 60]. ТолДК оказывают влияние на процесс пролиферации Т-клеток, вызывая их апоптоз, анергию и гипореактивность. Кроме того, они иницируют образование Т-регуляторных и В-регуляторных клеток [59]. Оптимальный баланс между имДК и толДК имеет фундаментальное значение для предотвращения аутореактивных иммунных реакций и поддержания иммунного гомеостаза.

ТолДК снижают пролиферацию Т-клеток посредством индукции апоптоза, анергии и гипореактивности. Кроме того, они могут способствовать индукции Т-рег и В-рег [61]. Механизмы этого процесса включают контактно-зависимый и контактно-независимый пути. К контактно-зависимому пути относятся взаимодействие молекул PD-L1, Fas-L и ILT3/4 [62-65]. Механизм, не зависящий от контакта, включает в себя повышение выработки противовоспалительных молекул, таких как IL-10, TGF- β , IL-35 и IL-27 [66, 67]. ТолДК также могут осуществлять свою функцию, экспрессируя IDO, HO-1 и лактат. Взаимодействие

между PD-1 и PD-L1 направляет ингибирующие сигналы в Т-клетки, что приводит к их анергии [69]. Fas-L, который экспрессируется на ДК, способен индуцировать апоптоз Т-клеток, связываясь с Fas, экспрессируемым на Т-клетках [64]. Повышенная экспрессия ILT3/ILT4 на ДК способствует активации регуляторных Т-клеток [62, 63]. Аналогичным образом, IL-10 и TGF- β могут подавлять активацию Т-клеток [66, 67], вмешиваясь в передачу сигналов через Т-клеточный рецептор, что в итоге приводит к активации регуляторных Т-клеток за счет выработки IDO [68]. IDO катализирует расщепление триптофана с образованием кинуренинов, что нарушает пролиферацию Т-клеток и способствует их дифференцировке в регуляторные клетки. HO-1 может способствовать дифференцировке Т-рег и предотвращать опосредованные Т-клетками воспалительные процессы из-за повышенного уровня СО [69]. ТолДК могут продуцировать высокие количества лактата, которые снижают гликолиз, а также активацию и пролиферацию Т-клеток [70].

Описанные иммуносупрессивные механизмы толДК представлены на рисунке 2.



Рисунок 2 - Иммуносупрессивные механизмы толДК [Разработан автором].

Для получения толДК в экспериментальных условиях и клинической практике используются различные методы и протоколы. Целью этих протоколов является получение ДК со стабильным фенотипом, способных вызывать толерантность. На первом этапе создания ДК используются клетки различного происхождения: плюрипотентные стволовые клетки, предшественники костного мозга и моноциты из периферической крови. Затем, на втором этапе, стоит задача получить именно толДК, и в зависимости от целей - неспецифические или антиген-специфические. Для создания неспецифических ДК существует множество методов, основанных на различных подходах. Эти методы включают использование противовоспалительных цитокинов, таких как IL-10, TGF- β , а также простагландина E2. Также применяются иммунодепрессанты, такие как 1 α ,25-дигидроксивитамин D3, дексаметазон и дезоксиспергуалин. Кроме того, для создания ДК можно использовать апоптотические клетки, что было

продемонстрировано в работах [71, 72]. Генетические модификации могут значительно повысить экспрессию различных агентов, включая IL-10, IL-4, TGF- β , CTLA4, IDO, Foxp3, TRAIL и FasL. Для получения антиген-специфических ДК применяются методы, такие как нагрузка пептидами и трансфекция экзогенной ДНК. В исследовании Akbari O. и коллег [73] было показано, что трансфекция экзогенной ДНК может привести к трансфекции небольшой доли ДК, но это позволяет добиться общей активации всех ДК. Нагрузка ДК пептидами может быть стратегией, определяющей тип иммунного ответа [74]. Эти методы позволяют контролировать деятельность ДК для презентации определенных антигенов, активации иммунных реакций и возможного формирования иммунологической толерантности или специфических иммунных ответов, в зависимости от желаемых целей в контексте иммунотерапии онкологических заболеваний, АИЗ или трансплантации.

Существуют интересные данные об применении неспецифических толДК не только при АИЗ, но и при трансплантации. Например, в исследовании Moreau A. и коллег [75] использовались аутологичные толДК у реципиентов почечного трансплантата. Восемь пациентов получали толДК за день до трансплантации в сочетании со стандартной иммуносупрессивной терапией с расчетом на уменьшение дозы микофенолата мофетила. Контрольная группа из девяти пациентов получала только стандартную иммуносупрессивную терапию, и сокращение дозы микофенолата мофетила не допускалось. В течение трехлетнего периода наблюдения не было летальных исходов, а выживаемость трансплантата составила 100%. Эпизоды отторжения наблюдались у двух пациентов из группы толДК и у одного пациента из контрольной группы, но все случаи отторжения были успешно купированы глюкокортикоидами. Количество микофенолата мофетила было успешно снижено или прекращено у пяти пациентов из группы толДК, а двоим из них разрешен прием такролимуса. В группе толДК была обнаружена повышенная экспрессия Foxp3.

Применяя неспецифические толДК необходимо помнить о существовании риска побочных эффектов, например, таких как инфекционные и онкологические

заболевания, нефро- и гепатотоксичность. Дальнейшие разработки по созданию антиген-специфических толДК, с минимизацией побочных эффектов и хорошим и устойчивым клиническим эффектом, являются наиболее перспективными.

Терапевтический потенциал антиген-специфических толДК уже доказан на экспериментальных животных моделях различных АИЗ, а также в экспериментах *in vitro* с использованием человеческих толДК, полученных *ex vivo* (таблица 2). Например, в исследовании Zubizarreta I. и коллег [76] 2019 года использовались толДК, нагруженные специфическими для центральной нервной системы пептидами. Была показана безопасность терапии у пациентов с рассеянным склерозом и способность вызывать иммунную толерантность, о чем свидетельствовала индукция активности регуляторных Т-клеток Tr1. Примерами других клинических исследований терапии РА являются - AutoDecRa и Rheumavax [9, 10]. В исследовании Rheumavax применялись нагруженные цитруллиновыми пептидами толДК, а в исследовании AutoDecRa - толДК, нагруженные аутологичной синовиальной жидкостью. Было доказано, что применение толДК в клинической практике эффективно и безопасно.

Обобщенные данные по применению толДК в доклинических и клинических исследованиях, приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Примеры некоторых доклинических и клинических исследований по применению толДК при аутоиммунных заболеваниях [Разработана автором]

Заболевание/Модель	Тип толДК	Способ генерации	Основные результаты	Ссылки/Источник и
Доклинические исследования				
Рассеянный склероз (ЕАЕ)	Антиген-специфическое	ДК, загруженные MOG _{35–55} + обработка витамином D3/глюкокортикоидами	Снижение тяжести заболевания, индукция Т-рег, уменьшение инфильтрации в ЦНС.	[77]
Сахарный диабет 1 типа (мышинская модель NOD)	Неспецифические	Олигонуклеотиды, нацеленные на костимуляционные	Профилактика диабета за счет снижения активации аутореактивных Т-клеток	[8]

Заболевание/Модель	Тип толДК	Способ генерации	Основные результаты	Ссылки/Источник и
		молекулы (CD40, CD80)		
Рассеянный склероз (ЕАЕ)	Антиген-специфическое	ДК, нагруженные пептидами МВР и РLP (ЦНС-специфичные) обработка IL-10	Подавление аутореактивных Т-клеток, уменьшение демиелинизации, улучшение неврологических симптомов.	[76]
Клинические исследования				
Ревматоидный артрит	Антиген-специфическое	ДК, нагруженные цитруллинированными пептидами (Rheumavax, фаза I/II)	Умеренное снижение аутоантител, улучшение клинических показателей.	[9]
Ревматоидный артрит	Антиген-специфическое	Нагрузка аутологичной синовиальной жидкостью ДК	Индукция антиген-специфических Т-рег, снижение воспаления, улучшение клинических исходов	[10]

Однако существует несколько факторов, которые необходимо оптимизировать для повышения эффективности толДК. Например, наиболее подходящий путь введения. В экспериментальных моделях и клинических испытаниях фазы I использовалось несколько путей доставки, включая внутривенный, подкожный, внутрибрюшинный, внутрикожный, внутриузловой и внутрисуставной путь [14]. Важно понимать влияние различных методов доставки клеток и мест доставки на функциональные результаты, а также вариабельность контроля качества функциональных результатов в результате различных подходов к созданию толДК для клинического использования.

Восстановление иммунологической толерантности - это не конечная точка в лечении АИЗ. В их патогенезе главную роль играет взаимодействие генетических

факторов и факторов окружающей среды. В связи с этим, может возникнуть проблема сохранения длительности эффекта, а также определения количества введений для поддержания эффекта в долгосрочной перспективе [78].

В процессе формирования индукции антиген-специфической толерантности одним из ключевых этапов является выбор антигенов, которые будут мишенью. В АИЗ человека существует множество потенциальных аутоантигенов. Одним из решений этой проблемы может быть одновременное использование трансфекции экзогенной ДНК с несколькими антигенами.

Таким образом, с учётом ряда технологических моментов, метод с применением толДК представляет собой перспективную стратегию, направленную на восстановление иммунологической толерантности. Для преодоления возникающих технологических и концептуальных проблем, необходимо провести дальнейшие исследования.

1.2.3 Т-регуляторные клетки

Т-рег представляют собой специализированное популяцию иммуносупрессивных $CD4^+$ Т-клеток, которые модулируют иммунные реакции и поддерживают иммунологическую толерантность [79]. Т-рег клетки обеспечивают иммунологический гомеостаз, подавляя аутореактивные $CD4^+$ Т-клетки, которые избежали негативной селекции в тимусе [80]. Кроме того, Т-рег действуют как ключевые негативные регуляторы воспаления при различных патологических состояниях, включая инфекции, аутоиммунные заболевания и онкологические заболевания [81-84]. Они контролируют aberrantные иммунные реакции в отношении широкого спектра антигенов, включая аутоантигены, пищевые антигены, аллергены и опухолевые антигены [79].

Среди Т-рег было выявлено несколько субпопуляций. Основными из них являются естественные Т-рег (nТ-рег) и индуцированные Т-рег клетки (iT-рег). Естественные Т-рег отличаются постоянной экспрессией белка FoxP3 и Т-клеточного рецептора (TCR) с относительно высокой степенью сродства [85]. Естественные Т-рег активно функционируют в кровотоке и лимфатических узлах, контролируя толерантность к аутоантигенам и предотвращают возникновение аутоиммунных реакций [86]. Во вторичных лимфоидных органах, под влиянием цитокинов, метаболитических медиаторов и гормонов как в невоспалительных, так и в воспалительных условиях, наивные $CD4^+$ -Т-клетки могут дифференцироваться в FoxP3⁺-Т-рег [87]. Важными отличительными особенностями nТ-рег являются наличие Helios и нейропилина-1, присутствие которых предполагает происхождение в тимусе, а также стабильность экспрессии FoxP3 в различных условиях [85].

Индукцированные Т-регуляторные клетки активируются при определенных ситуациях в присутствии IL-2 и TGF- β на периферии и при активации начинают экспрессировать FoxP3, становясь функциональным эквивалентом nТ-рег клеток. Однако iT-рег обнаруживаются в основном в периферических барьерных тканях,

где они в первую очередь участвуют в предотвращении воспаления в присутствии внешних антигенов [85]. iT-рег могут быть дополнительно разделены на субпопуляции IL-10-секретирующих CD4⁺T-рег клеток (Tr1-клетки), TGF- β -секретирующих T-рег (Th3), CD8⁺ T-рег и CD4⁺CD25⁺FoxP3⁻ IL-35-зависимые (iTr35) [88].

Иммуносупрессия, вызываемая T-рег, осуществляется несколькими способами. Одним из них является подавление АПК, опосредованное CTLA-4. Кроме того, T-рег конкурентно потребляют IL-2 и производят иммуносупрессивные цитокины и метаболиты [85]. Опосредуется это двумя способами: прямым, где T-рег индуцируют ответ непосредственно на иммунную клетку, и непрямым, где иммунный ответ подавляется посредством других клеток или молекул, запущенных T-рег.

К прямому пути относятся контакт-зависимый механизм супрессии T-клеток через PD-L1 и способность T-рег к высвобождению гранзима А, гранзима В и перфорины, приводящая к апоптозу клеток-мишеней [86]. К непрямому ингибирующему механизму работы T-рег относится: продукция цитокинов, воздействие на ДК и способность регулировать метаболические нарушения.

Ингибирование цитокинами является ключевой стратегией для контроля иммунного ответа, используемой T-рег. Основными ингибирующими цитокинами, продуцируемыми T-рег, являются TGF- β и IL-10 [89]. IL-10 тормозит презентацию антигенов АПК, и подавляет активацию T-клеток. TGF- β , в свою очередь, активируя экспрессию Foxp3, способствует образованию T-рег. Кроме того, он может подавлять размножение T-лимфоцитов, угнетая экспрессию IL-2 через сигнальный путь Smad3, а также циклинов, включая циклин D2 и циклин E, циклинзависимой киназы (CDK-4) и c-мус. TGF- β также способен подавлять процесс дифференцировки клеток, относящихся к Th1 и Th2, путём блокирования сигнальных путей T-bet/STAT4 и GATA-3/NFAT [89]. Член семейства IL-12 - IL-35, продуцируется T-рег и также подавляет пролиферацию T-клеток [91].

Активированные T-рег способны подавлять метаболические процессы, производя аденозин из АТФ. Затем аденозин метаболизируется CD39 и CD73, что

приводит к угнетению Т-клеток за счет запуска отрицательной передачи сигналов к АПК и эффекторным Т-клеткам [92]. С высокой поверхностной экспрессией CD25 и способностью поглощать IL-2, Т-рег могут уменьшать передачу сигналов провоспалительных цитокинов [93].

Т-рег могут воздействовать на ДК нарушая их созревание, увеличивая тем самым долю толДК. Это происходит благодаря взаимодействию LAG3 с МНСII и CTLA-4 с CD80/86. Связывание CD80 и/или CD86 с CTLA-4 приводит к активации выработки IDO ДК. IDO индуцирует образование проапоптотических метаболитов в результате катаболизма триптофана, что, в свою очередь, подавляет активность Т-эффекторных клеток [94]. Кроме того, это блокирует связывание CD80/86 с CD28 на Т-эффекторных клетках, что необходимо для их активации [95].

Исследования показали, что Т-регуляторные клетки могут успешно подавлять активность аутоиммунных В-лимфоцитов. Для достижения этого эффекта Т-регуляторным клеткам требуется наличие двух ключевых условий: высокий уровень экспрессии PD-1 на аутоиммунных В-клетках и одновременная активность двух молекул, PDL-1 и PDL-2, связанных с PD-1. Кроме того, Т-рег могут использовать гранзим В и перфорин для косвенного подавления активности эффекторных В-лимфоцитов. Это, в свою очередь, приводит к снижению производства аутоантител [96].

Описанную в научных источниках терапию с помощью Т-рег можно разделить на два вида: неспецифические Т-рег, а именно поликлональные, и антиген-специфические Т-рег. Большинство исследований изучают применение поликлональных Т-рег, но в последнее время акцент смещается на применении антиген-специфических Т-рег.

Для адаптивного переноса нужно получить клетки из периферической крови, с помощью магнитной сортировки выделить Т-рег и увеличить их количество. Для этого применяют: гранулы, покрытые анти-CD3/CD28, IL-2, рапамицин, TGF- β , транс-ретиноевой кислоту (ATRA), и различные сочетания приведенных веществ.

В настоящее время проводится или уже получены результаты множества клинических исследований, в которых использовались поликлональные Т-рег,

полученные различными методами. Первые клинические исследования с применением поликлональных Т-рег были посвящены болезни трансплант против хозяина (РТПХ) в 2009 году [97] и болезни Крона в 2012 году [98]. Терапия была безопасной и привела к снижению выраженности симптомов заболеваний, а при РТПХ еще и снизила потребность в иммуносупрессивной терапии.

В дальнейшем поликлональные Т-рег применялись при многих АИЗ. Например, у пациентов с сахарным диабетом I типа (СД1), получавших терапию Т-рег, потребность в инсулине и уровни С-пептида оставались стабильно в пределах нормальных значений, но снижения прогрессирования заболевания не наблюдалось [99-101]. Тем не менее, клинические испытания при СД1 находятся во второй фазе исследований. При системной красной волчанке (СКВ) применение поликлональных Т-рег привело к временной стабилизации заболевания; в биоптатах кожи пациента с активным кожным заболеванием были обнаружены вводимые Т-рег [102].

Несмотря на эффективность и безопасность применения поликлональных Т-рег, доказанных многими исследованиями, существуют некоторые недостатки. Во-первых, сохраняется проблема с получением достаточного количества Т-рег с устойчивым фенотипом для эффективного клинического применения. Во-вторых, это их неспецифичность, что может сказаться на стабильности эффекта лечения. Возможно, данные проблемы помогут решить использование антиген-специфических Т-рег, или работа над стабилизацией гена FOXP3 [103].

Недавно была предложена новая стратегия, направленная на увеличение числа Т-рег. Она заключается в трансформации антиген-специфических эффекторных Т-клеток в индуцированные Т-рег с помощью анти-CD3, ингибитора CDK8/19 и TGF- β . Применение этих трех веществ совместно позволило в десять раз увеличить относительное количество CD25^{high}FoxP3⁺ Трег в культуре CD4⁺ лимфоцитов [104].

Исследования показали, что антиген-специфические Т-рег могут быть более эффективными, чем поликлональные Т-рег, поскольку для достижения желаемого эффекта требуется меньше клеток. К тому же, иммуносупрессивный эффект при

использовании антиген-специфичных Т-рег происходит целенаправленное, чем при лечении поликлональными Т-рег [105].

Активное развитие получают методы терапии, основанные на антиген-специфических Т-рег, которые могут быть созданы *in vitro* путем внедрения синтетических рецепторов. Эти рецепторы могут быть сконструированными с помощью TCR рецепторов или химерных антигенных рецепторов (CAR) [106]. Изначально эти методы применялись для лечения онкологических заболеваний, однако сегодня они стали перспективными и в контексте АИЗ.

CAR-T метод основан на том, что за счет экспрессии химерных антигенных рецепторов на поверхности Т-клеток, они становятся способными более эффективно распознавать и уничтожать опухолевые клетки или клетки, участвующие в патогенезе аутоиммунных заболеваний [107]. Исследования и клинические испытания CAR-T-терапии в лечении аутоиммунных заболеваний показали ее потенциальную эффективность. Например, в одном исследовании участвовали пациенты с СКВ [108]. Аутологичные Т-клетки пациентов с СКВ трансдуцировали лентивирусным вектором, кодирующим CAR против CD19, размножали и реинфузировали. В результате было получено достижение ремиссии через 3 месяца, при этом немедикаментозная ремиссия сохранялась более 8 месяцев. В другом исследовании провели наблюдение в течение двух лет у пятнадцати пациентов с тремя различными аутоиммунными заболеваниями, включая СКВ, идиопатический воспалительный миозит и системный склероз, которые получили однократную инфузию Т-клеток с химерным антигенным рецептором CD19 [109]. У всех пациентов наблюдался значительный клинический ответ, но у некоторых наблюдались побочные эффекты в виде синдрома высвобождения цитокинов, нейротоксичности и пневмонии.

Однако помимо потенциальной эффективности терапия CAR-T-клетками также сопряжена с определенными трудностями и рисками. Неконтролируемая активация и размножение CAR-T-клеток может вызвать нежелательные эффекты, такие как цитокиновый шторм и тромбоцитопению [110]. Кроме того, возможны осложнения в виде токсичности для органов и тканей из-за неконтролируемого

уничтожения здоровых клеток. Также, могут возникнуть аутоиммунные реакции при более широком распространении и пролиферации CAR-T-клеток по органам и тканям, что может вызвать новые аутоиммунные заболевания [110].

Для решения проблем, связанных с применением CAR-T, можно рассмотреть использование технологии CRISPR–Cas9 [111]. Например, модифицированные CRISPR–Cas9 CAR-T с двойным нацеливанием на антигены CD19 и CD22 были успешно применены для лечения 11 пациентов с острым В-клеточным лимфобластным лейкозом [112]. В ходе лечения не было выявлено случаев гепатотоксичности или инфекционных осложнений. Этот подход продемонстрировал безопасный профиль и высокую противолейкозную активность.

Другим эффективным подходом для решения данных проблем, были разработаны CAR-Tрег. Источником для создания CAR-Tрег могут быть CD4⁺T-клетки или T-рег. Описан подход к восстановлению иммунной толерантности, который предполагает изменение фенотипа T-клеток с цитотоксического на регуляторный [113]. Не вызывая системной иммуносупрессии, CAR могут доставлять T-рег к месту аутоиммунной реакции, усиливая их супрессивную способность [114]. CAR-Tрег представляют собой CAR-T-клетки, которые трансформировались в T-рег путем трансдукции FOXP3, который регулирует пути, участвующие в формировании и работе регуляторных T-клеток в сочетании с трансдукцией CAR [115]. Считается, что CAR-Tрег посредством клональной делеции, индукции анергии и продукции иммуномодулирующих цитокинов, могут контролировать аутоиммунные T-клетки [116, 117]. CAR-Tрег не зависят от МНС, обладают высокой специфичностью к целевому антигену, низкой неспецифической иммуносупрессией и низкой чувствительностью к концентрации IL-2, что является их существенным преимуществом [118].

Недавно предложенный подход к оптимизации CAR-Tрег, заключается в универсальных CAR-Tрег (UniCAR-Treg), которые разработаны на основе CAR-T, нацеленных на опухоль [119]. Активация UniCAR-Treg осуществляется с помощью scFv, который связан с пептидным эпитопом, направленным на клеточную

поверхность. UniCAR представляет собой сигнальную конструкцию CAR второго поколения. Основное отличие UniCAR от других CAR заключается в том, что он не связывается напрямую с клетками-мишенями. Вместо этого взаимодействие происходит через специальный модуль нацеливания, который включает антигенсвязывающий фрагмент и небольшой пептидный эпитоп, распознаваемый UniCAR [119]. Регуляция антиген-специфичности UniCAR-Treg с помощью scFv, позволяет расширить область их применения. В нескольких исследованиях уже была показана эффективность применения данного подхода [120-124].

Трансдукция вирусных рекомбинантных TCR в Т-рег, может обеспечить физиологический способ активации Т-рег и позволяет нацеливать на внеклеточные и внутриклеточные антигены, представленные МНС, на АПК [125]. Проводимые доклинические исследования с применением данного вида клеток, показали эффективность. Например, использование TCR-Трег, специфичных для основного белка миелина, для лечения аутоиммунного энцефаломиелита [126, 127], аутоантигенам при экспериментальном артрите [128] или специфичных для островков поджелудочной железы в модели СД1 у мышей NOD [129], подтвердило эффективность подхода к терапии с использованием TCR-Т-рег.

Несмотря на это, остается проблема идентификации подходящего высокоаффинного аутоантиген-специфичного TCR для трансдукции в Т-рег при некоторых аутоиммунных заболеваниях с неопределенными доминантными эпитопами. Для идентификации TCR требуется секвенирование отдельной клетки, поскольку каждый клон Т-клеток экспрессирует последовательность TCR, отличную от другой, и для успешной идентификации одного TCR требуется успешное секвенирование как альфа-, так и бета-цепей TCR [130].

Многообещающей перспективой для создания TCR-модифицированных Т-рег может быть использование TCR, первоначально идентифицированных в Т-рег, а не в эффекторных Т-клетках. Однако знания о специфичных для Т-рег TCR и их распознаваемых пептидах пока ограничены, особенно в контексте аутоиммунитета [106].

В клинической практике применение антиген-специфичных Т-рег затруднено из-за необходимости выделения этих клеток из общего пула поликлональных Т-рег. Одним из подходов для обхождения данного препятствия является перепрограммирование Т-клеток в Т-рег. Так, в исследовании Райта и др., проводили трансформацию CD4⁺ Т-клеток в антиген-специфические Т-рег, при помощи трансдукции FOXP3 и специфического TCR (нацеленного на серпин) [128]. Это привело к накоплению TCR-трансдуцированных FOXP3 CD4⁺ Т-клеток в дренирующих лимфатических узлах, уменьшению количества Th17 и снижению разрушения костной ткани [131]. Для получения достаточного количества Т-рег, также, может использоваться метод трансформации антиген-специфических эффекторных Т-клеток в индуцированные Т-рег с помощью стимуляции TGF- β и IL-2, гиперэкспрессии трансгенного FOXP3, блокады передачи сигналов циклин-зависимых киназ 8/19 (CDK8 и CDK19) или сочетанию сверхэкспрессии CTLA-4, IL-2 и антигенной стимуляции.

Исследования TCR-Трег ассоциированы с МНС II класса. Возможно, TCR класса I будут более эффективными, поскольку они достаточно распределены в тканях, что обеспечивает более широкий доступ к клеткам-мишеням. Существуют исследования, где применялись высокоаффинные или низкоаффинные TCR класса I, специфичные к различным опухолевым антигенам [132-135]. В исследовании 70 подчеркивалась независимость TCR-Трег в корецепторе CD8. Авторы исследования 71 продемонстрировали ограниченные HLA-A2 трансдуцированные Т-рег, которые не экспрессировали CD8, поддерживали экспрессию FOXP3 и могли подавлять специфические к тирозиназе Т-клетки. По данным исследования [135] были описаны Т-рег, независимые от корецептора CD4, тем самым объясняя их способность стимулироваться низкоаффинными TCR класса I без CD8, в отличие от CD4⁺ Tconv. Таким образом, увеличивается выбор клеток для отбора TCR, позволяющих напрямую распознавать тканевые антигены независимо от АПК.

Учитывая преимущества и недостатки TCR T-рег и CAR T-рег, необходимо провести дальнейшие исследования, чтобы получить представление о том, какая технология более подходит для терапии конкретного АИЗ.

Разработка новых методов клеточных терапии требует использования экспериментальных моделей, отражающих патогенетические механизмы заболеваний человека, для проверки их эффективности и безопасности. Это позволит смоделировать эффекты от проводимой терапии. На данный момент существует несколько видов экспериментальных артритов, которые имеют сходство с ревматоидным артритом человека.

1.3 Экспериментальные модели артрита

Мышиные модели артрита имеют решающее значение для понимания патогенеза РА и разработки эффективных терапевтических стратегий. При этом, данные модели должны обладать схожими патогенетическими и морфологическими изменениями с РА. Например, такими как синовиальный паннус, который включает пролиферирующие и инвазивные фибробластоподобные синовиоциты, инфильтрирующие воспалительные клетки и связанную с ним неоангиогенную реакцию, клинические изменения, выражающиеся в припухлости суставов и образование аутоантител.

Можно выделить несколько общих черт патогенеза для РА и мышинных моделей артрита (рисунок 3) [136]:

- Аутореактивные Т-клетки. Данные клетки взаимодействуют с В-клетками, и способствуют высвобождению провоспалительных цитокинов [137, 138].
- Антитела к циклическому цитруллинированному пептиду (АЦЦП), которые определяются при РА, также встречаются и являются важными в патогенезе экспериментального артрита [139, 140].
- Нейтрофилы. Они действуют, высвобождая цитотоксические продукты и медиаторы. Нейтрофилы также способны усиливать аутоиммунный процесс благодаря формированию внеклеточных ловушек хроматина (NETs), что способствует активации АЦЦП [141, 142].
- При аутоиммунном артрите разрушение хрящей и костей обусловлено возникновением синовиального паннуса, типичным для поражения сустава со стороны капсулы. Исследования на мышях показали, что образование паннуса происходит, но паннус также может происходить из области под суставным хрящом [143].
- Макрофаги, проникающие в синовиальную оболочку, играют ключевую роль в развитии РА. Они являются основным источником

сильнодействующих провоспалительных цитокинов, например, интерлейкина 1β (IL- 1β) и фактора некроза опухоли α (TNF- α). Кроме того, вещества, выделяемые макрофагами, а также их действие на фибробласты синовиальной оболочки являются необходимыми для того, чтобы остеокласты сформировались и произошел остеолиз [136].

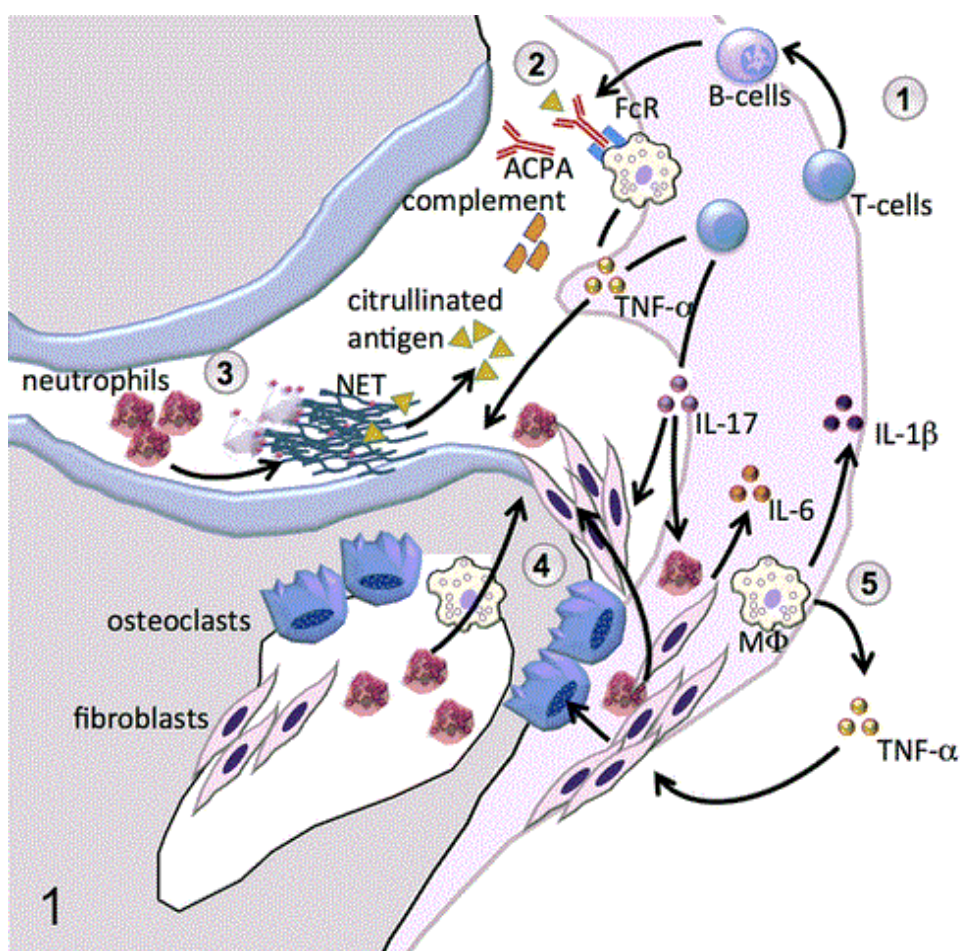


Рисунок 3 - Общие концепции патогенеза у экспериментальных моделей артрита и ревматоидного артрита [136]. 1. Аутореактивные Т-клетки. 2. АЦЦП. 3. Нейтрофилы. 4. Формирование паннуса. 5. Макрофаги.

Модели артрита на мышах можно разделить на системно индуцированные (активная, пассивная иммунизации и введение раздражающих веществ), локальные и спонтанные (генетически модифицированные).

Спонтанные модели являются генетически модифицированными со спонтанным развитием артрита без вмешательства. Данные модели включают

трансгенных мышей, экспрессирующих человеческий TNF- α , мышей SKG и K/BxNy которых развивается синовиальная гиперплазия, инфильтрация воспалительных клеток, образование паннуса, разрушение хряща и эрозия костей [144-147]. Существенным минусом этих моделей является высокая стоимость и сложность репродукции.

Коллаген - индуцированный артрит (КИА) у грызунов является широко используемой и хорошо зарекомендовавшей себя моделью РА на животных [148, 149]. Модель КИА очень похожа на РА с точки зрения течения заболевания, гистологических особенностей и патогенеза. КИА, подобно РА, является АИЗ, которое характеризуется синовиальным воспалением, разрушением сустава и выработкой аутоантител, в том числе ревматоидного фактора и антител к циклическому цитруллинированному пептиду (АЦЦП). Модель КИА создается путем иммунизации мышей коллагеном II типа (СII), эмульгированным в полном адьюванте Фрейнда, что приводит к развитию надежного аутоиммунного ответа против СII, который является основным компонентом суставного хряща [148-150]. Модель КИА обладает высокой воспроизводимостью, примерно в 80% случаев, легко индуцируется, но имеет ремитирующее течение. Данная модель может воспроизводиться только на определенных видах мышей, несущих МНС класса II подтипов IA^q, IA^g и H-2^q, что существенно ограничивает ее применение [151].

Артрит, индуцированный клеточной стенкой стрептококка, регрессирует в течение семи дней, но при повторных введениях может развиваться хронизация процесса [152]. Однако образование паннуса и эрозий не происходит, поэтому данная модель не является аналогией для РА.

Пристан-индуцированный артрит (ПИА) является простой и воспроизводимой моделью, сходной с РА. Сходство между ПИА и РА проявляется в синовиальной гиперплазии, эрозии хрящей, инфильтрации воспалительными клетками и паннус-подобных образованиях [153]. Но существенным минусом является то, что артрит развивается у 22-100% мышей с весьма неопределенными сроками, через 2-10 месяцев.

Антиген-индуцированный артрит, гистопатологически сходен с РА. Восприимчивый вид мышей иммунизируют подкожными или внутрикожными инъекциями антигена, затем локально вводят тот же антиген. Воспаление быстро прогрессирует, приводя к разрушению сустава. В результате образуются иммунные комплексы, которые локально активируют систему комплемента и приводят к разрушению хряща [154]. Однако поражается только инъецированный сустав, артрит не носит системный характер, в отличие от РА.

Протеогликан, который был выделен из хрящей человека, используется для индуцирования артрита у восприимчивых линий мышей. Он может развиваться у мышей линий BALB/с и СЗН. Эта модель не является МНС-специфичной, так как другие мыши с такими же аллелями II класса не подвержены воздействию PGIA. Протеогликан, эмульгированный с адьювантом, вводят внутрибрюшинно несколько раз. Развитие полиартрита, отложение иммунных комплексов и наличие ревматоидного фактора – общие признаки с РА [155].

В последнее время активно внедряются комбинации различных видов моделей артрита. Исследования указывают на то, что для имитации патогенеза ревматоидного артрита у мышей Balb/с наилучшим образом подходит комбинированная модель, в которой применяется метилированный сывороточный альбумин (mBSA), коллаген и в качестве антигена токсин *Bordetella pertussis*. Морфологические и гистопатологические изменения сходны с таковыми при РА. Артрит у мышей развивается на 21-30 день, и сохраняется активным около 4-х недель, и имеются данные даже о хронизации процесса у некоторых особей и обнаружения АЦЦП [156].

1.4 Заключение

Аутоиммунные заболевания возникают из-за потери толерантности и развития иммунного ответа на собственные антигены, что приводит к повреждению клеток и тканей. Восстановление иммунной толерантности является одним из направлений лечения АИЗ.

Клеточные методы лечения АИЗ включают в себя как специфические, так и неспецифические подходы, направленные на восстановление иммунной толерантности. В последнее время наблюдается значительный рост исследований, посвященных разработке антиген-специфической клеточной терапии. Это обусловлено тем, что она позволяет минимизировать побочные эффекты и повысить эффективность лечения по сравнению с неспецифическими методами.

Однако, несмотря на успех антиген-специфических методов, существуют определенные проблемы и ограничения. Для более глубокого понимания и оптимизации лечения необходимо провести дополнительные исследования. Важно выявить целевые антигены, определить оптимальные дозировки, установить длительность и частоту введений, а также разработать стратегии, позволяющие поддерживать положительный эффект терапии на протяжении длительного времени.

В связи с этим, данная работа направлена на создание более эффективных экспериментальных подходов подавления аутоиммунных реакций путем индукции антиген-специфической иммунологической толерантности с помощью ДК. Для этого в работе используется новый способ загрузки ДК антигеном – с помощью трансфекции, ДНК-конструкциями, кодирующими IL-10, эпитопы коллагена II типа и CCR9. А для апробации разработанного подхода используется антиген-коллаген индуцированная модель, наиболее сходная с патогенетическими процессами при РА.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объект исследования

Объектом исследования были ДК, полученные из клеток костного мозга лабораторных мышей линии BALB/c. Предметом исследования, выступила изучение влияния ДК, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими CCR9, IL-10 и антигенные детерминанты коллагена II типа, на индукцию иммунологической толерантности.

2.2 Этическое заключение

Все манипуляции с экспериментальными животными проводились под изофлурановым наркозом согласно принципам гуманного обращения с животными. Исследование проводилось в соответствии с принципами, изложенными в Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментах и в иных научных целях (№ 123, Страсбург, 18.03.1986) и ГОСТ 33216-2014 Государственный стандарт Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Все протоколы и методы исследования были утверждены этическим комитетом НИИФКИ, Новосибирск, Россия (Протокол № 146).

2.3 Лабораторные животные

В исследовании использовали 100 самцов мышей линии BALB/c в возрасте 2-6 мес. Мышей содержали в виварии НИИФКИ в условиях естественного освещения и неограниченного доступа к еде и воде. Выведение мышей из эксперимента осуществляли с помощью цервикальной дислокации.

2.4 Получение миелоидных дендритных клеток у мышей

Для создания ДК использовали лабораторных мышей линий BALB/c (самцы). Клетки костного мозга (ККМ) получали путем промывания костномозгового канала бедренных костей фосфатно-солевым буфером (ФСБ). Затем, клетки дважды отмывали: центрифугировали 10 минут при 1500 об/мин в присутствии фосфатно-солевого буфера (ФСБ), с удалением надосадка. ККМ рассаживали в культуральные флаконы площадью 75 см² в концентрации 1млн/1-2мл полной среды RPMI-1640 с добавлением 10% FCS (Biowest, Франция), 2 mM L-глутамина (Биолот, Россия), 10 mM HEPES (Биолот, Россия), 5×10^{-4} M 2-меркаптоэтанола (Sigma-Aldrich, США), 80 мкг/мл гентамицина (KRKA, Словения), 100 мкг/мл бензилпенициллина (Биолот, Россия). В качестве ростовых факторов использовали GM-CSF и IL-4 в концентрации 20 мкг/мл. Половину питательной среды меняли каждые 2-3 сутки с добавлением 1/2 объема факторов роста. Клетки собирали на 7 сутки для электропорации и цитометрического анализа.

2.5 Схема эксперимента

Схема полного эксперимента представлена на рисунке 4.

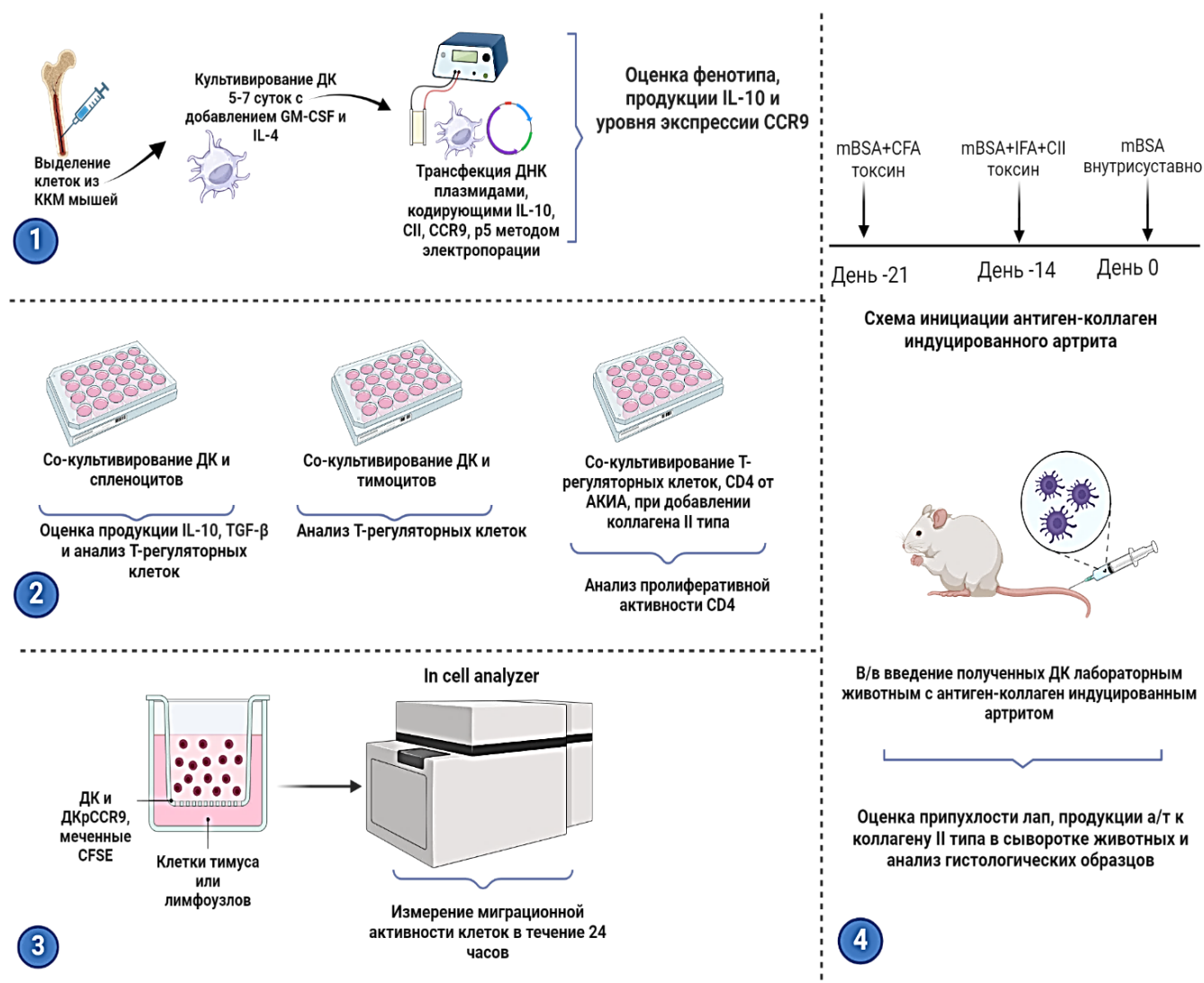


Рисунок 4 - Схема эксперимента по оценке влияния ДК, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими IL-10, CCR9 и эпитопы коллагена II типа, на подавление активности экспериментального артрита [Разработан автором].

2.6 Получение ДНК-конструкций, кодирующих IL-10, CCR9 и эпитопы коллагена II типа

Для разработки искусственных генов была использована программа Gene Designer 2.0 (DNA2.0, INC.). В нуклеотидной последовательности генов были исключены сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции AgeI, BamHI и SacI, чтобы упростить процесс клонирования в вектор pmax-Ub.

Клонирование искусственных генов в вектор рmax-Ub и получение рабочих генетических конструкций, кодирующих целевые белковые продукты, проводили согласно следующим стадиям: гидролиз ДНК эндонуклеазами рестрикции, элюция фрагментов ДНК из агарозного геля, лигирование ДНК, трансформация компетентных клеток *E.coli*, выделение плазмидной ДНК, секвенирование ДНК.

Для дальнейшей работы были отобраны два независимых клона с подтвержденной нуклеотидной последовательностью встроенных искусственных генов. Каждая плазмидная генетическая конструкция с подтвержденной нуклеотидной последовательностью была наработана в препаративном количестве и очищена от эндотоксинов с помощью набора EndoFreePlasmidMaxiKit ("Qiagen", Германия) в соответствии с рекомендациями производителя. Концентрацию плазмидной ДНК измеряли спектрофотометрически на приборе Ultrospec 3000 pro ("GE HealthCareLifeSciences", США). Чтобы подтвердить правильность структуры очищенных ДНК-конструкций, проводили рестрикционный анализ относительно исходных клонов и секвенирование по обеим цепям. На рисунке 5 представлена диаграмма плазмиды, кодирующей мышинный рецептор хемотаксиса CCR9.

В качестве контрольной выступала неcodирующая плазмида (p5) на основе вектора рmax-Ub.

ДНК-конструкция pIL-10 кодировала мышинный IL-10, последовательность которого была взята из базы данных UniProtKB P18893.

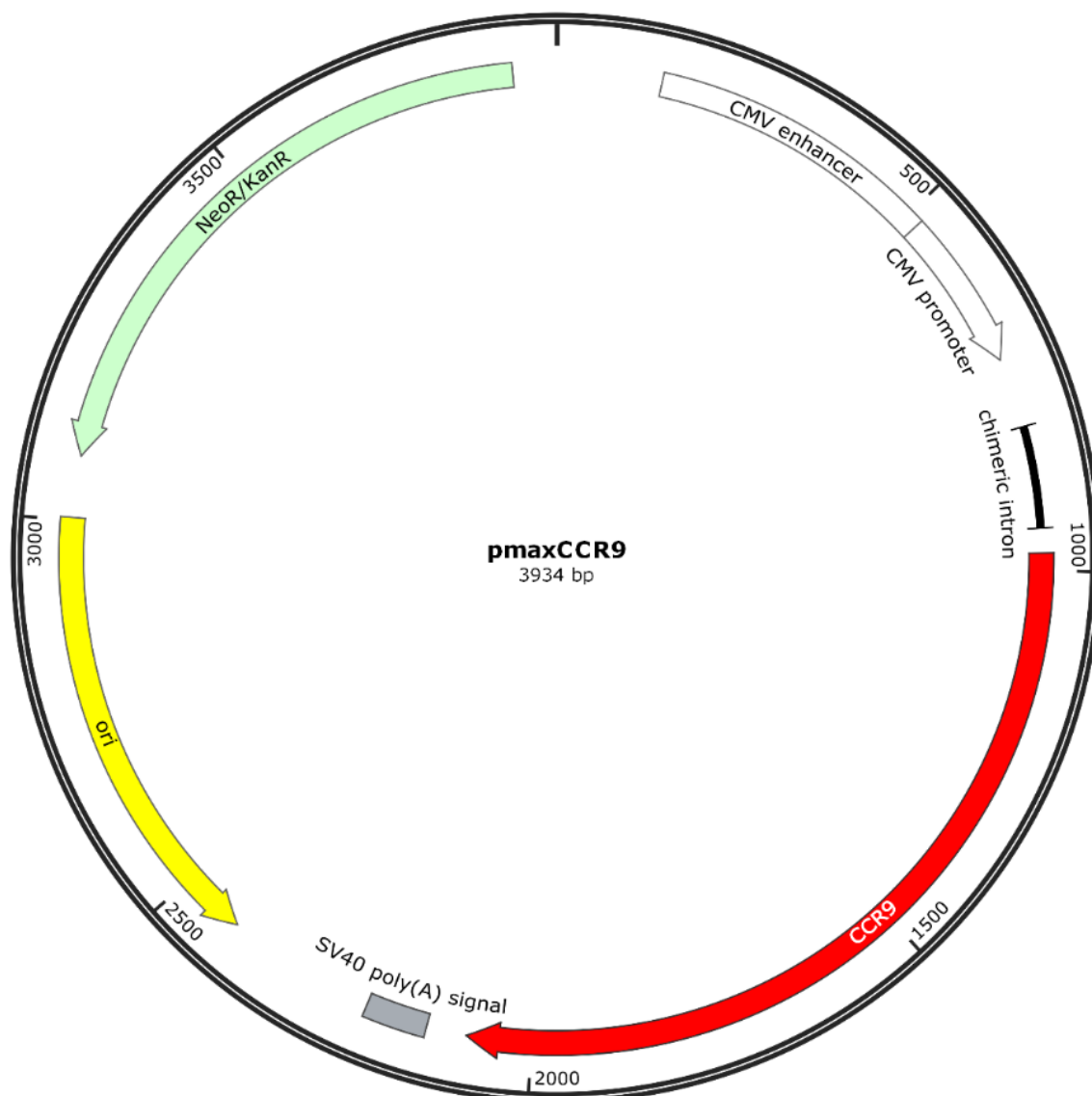


Рисунок 5 - Диаграмма плазмиды, кодирующей мышины CCR9.

Для получения плазмидной ДНК, кодирующей эпитопы коллагена II типа (pCII), на первом этапе работы была проведена оптимизация первичных нуклеотидных последовательности гена anti-C02A1_human с учетом частоты встречаемости различных кодонов для повышения уровня экспрессии гена в эукариотической системе экспрессии. Нуклеотидная последовательность была синтезирована ЗАО «Евроген Ру» (Российская Федерация) в составе векторной плазмиды.

Далее полученную фирменную векторную плазмиду, содержащую ген *anti-C02A1_human*, гидролизовали эндонуклеазами рестрикции *Bam*HI и *Sac*I и встраивали в рекомбинантную плазмиду *rmax_Ub_C57BI6* (получена ранее, содержит последовательность, кодирующую убиквитин), предварительно гидролизованную данными эндонуклеазами рестрикции (взамен гена *C57BI6*). Последовательность, встраиваемая в вектор:

**GGATCCGGCAGTGTGTTGCTGACACTTCTCGTGGCAGCCTACTTGGAcGAG
GCTGCTGGCAACCTGAGACTTGGCGCTCCACAGACTCTGGTGAATCTGGCCC
CCAACACAGCCAACGTCGCTGACTGTGTCTACCCCAATCCTGCCAACGTTGC
CGACAGCTTGAACAACCAGATCGAGTCAATCGCAGACGTGCAAATGACATT
CTTGAGACTGCTTGCCGAcCTGCTGATCCAAGGGAGCAACGACGTGGTATTG
CTGACACTGCTGGTGGCAGCAGTGTATCTGGACGAGGCCGCAGGCAACTTG
AAGAAAGCATTGCTGATCCAAGGCTCCAACGA_tGTGGCAGACAGTCTGAAC
AATCAGATCGAGTCCATCAACCTTGCTCCTAACACTGCCAACGTGCAGATG
ACCTTTCTACGCTTGCTGAGGCTGAGAGCCAGACTTGGTGCACCTCAGACAC
TGGTGT_TACTGACATTGCTAGTTGCAGCCGTTGCCGACGGG**AGCTC****

GGATCC – *Bam*HI

GAGCTC - *Sac*I

Структуру полученной рекомбинантной плазмиды подтверждали при помощи электрофоретического анализа, рестрикционного анализа и секвенирования концевых участков гена. В результате был отобран клоновый вариант плазмиды *pCII*, проведена наработка плазмиды и очистка от эндотоксинов при помощи «EndoFree Plasmid Maxi Kit» («Qiagen», Германия). Далее проводили проверку подлинности выделенной плазмидной ДНК при помощи электрофоретического, рестрикционного анализов и секвенирования концевых фрагментов встроенных генов.

2.7 Трансфекция

После 7 дней культивирования клеточные культуры собирали и подвергали электропорации ДНК-конструкциями, кодирующими CCR9 (pCCR9), IL-10 (pIL-10) и плазмидой кодирующей эпитопы коллагена II типа (pCII). Для электропорации $1-6 \times 10^6$ клеток ресуспендировали в OptiMEM (Thermo Fisher Scientific, США), в концентрации 1 млн/10 мкл с добавлением ДНК плазмид 10 мкг/1 млн или без них, и переносили в 1-мм кювету (VTX, США). Электропорацию проводили с помощью электропоратора VTX 830 (VTX, США) одиночным импульсом (сила 260 В, длительность импульса 200 мкс). После электропорации следовала 10-минутная фаза покоя. После фазы покоя клетки переносили для последующего культивирования в полной среде в 12-луночном (или 6-ти луночном) планшете в концентрации 1-2 млн/мл с добавлением GM-CSF и IL-4. Были созданы следующие группы трансфицированных клеток: НеЭП ДК - ДК без воздействия электропорации, ДКp5 - культура ДК, которой проводили электропорацию контрольной не кодирующей плазмидой p5, ДКpIL10 - культура ДК, которой проводили электропорацию экспериментальной плазмидой pIL10, ДКpCII - культура ДК, которой проводили электропорацию экспериментальной плазмидой pCII, ДКpCCR9 - культура ДК, которой проводили электропорацию экспериментальной плазмидой pCCR9, ДКpIL10+pCII - культура ДК, которой проводили электропорацию экспериментальными плазмидами pIL10 и pCII, ДКpCII+pCCR9+pIL10 - культура ДК, которой проводили электропорацию экспериментальными плазмидами pCII, pCCR9 и pIL10, ДКpCCR9+pCII - культура ДК, которой проводили электропорацию экспериментальными плазмидами pCCR9 и pCII.

2.8 Оценка продукции IL-10 трансфицированными дендритными клетками

При помощи ИФА проводился анализ содержания IL-10 в кондиционной среде исследуемых ДК через 24 часа после трансфекции. ИФА проводили с помощью коммерческого набора на определение концентрации IL-10, согласно инструкции производителя (Biolegend, США), анализ данных производился на мультимодальном планшетном ридере Varioskan LUX (США).

2.9 Со-культивирование лимфоцитов и дендритных клеток

Спленоциты извлекали из селезенок мышей линии Balb/c путем измельчения гомогенизатором. Полученную клеточную суспензию фильтровали через 45 мкм в присутствии ФСБ, центрифугировали и удаляли супернатант. Эритроциты удаляли методом осмотического шока. ДК собирали, и со-культивировали со спленоцитами в соотношении 1:10 ($2 \times 10^4 / 2 \times 10^5$). По истечении 5 суток клетки собирались, подвергались центрифугированию и оценивались по количеству Т-регуляторных клеток, IL-10 и TGF- β методом проточной цитометрии.

Для анализа содержания клеток, продуцирующих IL-10 и TGF- β , сначала проводилась стимуляция при помощи Cell Activation Cocktail (BioLegend, США), согласно протоколу производителя. Затем клетки собирали, отмывали в ФСБ и проводили поверхностное окрашивание клеток против CD3 – BV421, CD4-PerCP (BioLegend, США) согласно протоколу производителя. После инкубации с поверхностными антителами клетки промывали в 500 мкл ФСБ. Для внутриклеточного анализа после окрашивания поверхностными антителами клетки фиксировали в растворе ФСБ, содержащем 1% параформальдегида, по 500 мкл на пробу в течение 20 минут, пермеабелизировали 0,1% раствором Tween-20 (Biolegend, США) и окрашивали моноклональными антителами против IL-10-PE и TGF- β -APC (Biolegend, США).

С помощью проточной цитометрии, изучали относительное количество $CD3^+CD4^+CD25^+FoxP3^+T-reg$ в совместной культуре *in vitro*. Для проточной цитометрии использовали поверхностное мечение $CD3 - BV421$, $CD4 - PerCP$, $CD25 - FITC$ антителами (Biolegend, США), согласно протоколам производителей. Для внутриклеточного окрашивания использовались анти-FoxP3-PE (Biolegend, США), и для фиксации и пермеабиллизации использовался True-Nuclear Transcription Factor Buffer Set (Biolegend, США) согласно инструкциям производителя.

По истечении 5 суток в сочетанной культуре ДК и спленоцитов собирали супернатанты и оценивали концентрацию IL-10 методом ИФА (ИФА набор ELISA MAX Deluxe Set Mouse IL-10).

2.10 Пролиферативная активность $CD4^+$ -лимфоцитов при со-культивировании с T-reg

На 5 сутки культивирования полученных ДК и спленоцитов, выполнялась магнитная сортировка T-reg из групп ДКpIL-10 (неспецифические T-reg, далее - HeAgT-reg) и ДКpIL-10+СП+CCR9 (антиген-специфические T-reg, далее - AgT-reg). Магнитную сортировку $CD4^+CD25^+$ лимфоцитов осуществляли в соответствии с протоколом производителя (Mojosort, США). Процедура включала два этапа: негативную и позитивную селекцию. Точность сортировки достигала 98-99%. $CD4^+$ -лимфоциты были получены от мышей с АКИА и выделялись с помощью негативной магнитной сортировки согласно инструкции производителя (Mojosort, США). Затем $CD4^+$ -лимфоциты метили CFSE (Biolegend, США) (5 мМоль/мл) в течение 20 мин по стандартному протоколу и со-культивировали с HeAgT-reg или AgT-reg в соотношении 10:1 (200 тыс. $CD4^+$ /20 тыс. T-reg) Через 48 часов добавляли бычий коллаген II типа (Collagen Type II, Bovine, Lyophilized, Sigma-Aldrich, Германия), в концентрации 2 мг/мл по 25 мкл на 200 тысяч $CD4^+$, и еще через 3 суток проводился анализ пролиферативной активности

CD4⁺лимфоцитов. В качестве контроля использовали популяцию CD4⁺ -Т-лимфоцитов, культивированных при добавлении коллагена II типа, и без его добавления.

Для анализа пролиферативной активности CD4⁺ -лимфоцитов в совместной культуре Т-рег и CD4⁺ -лимфоцитов в присутствии коллагена II типа клетки собирали, отмывали в ФСБ и подвергались поверхностному мечению анти-CD4-PerCP (BioLegend, США) в течение 20 минут в темном месте при комнатной температуре.

2.11 Анализ миграционной активности дендритных клеток *in vitro*

Для оценки миграционной активности полученных ДК в условиях *in vitro* использовали transwell-системы с размером пор 5 мкм (Corning, США). Клетки тимуса и лимфатических узлов (подмышечные и паховые) выделяли и измельчали при помощи ножниц на небольшие кусочки. Фрагменты тимуса и лимфоузлов инкубировались в течение 30 минут на магнитной мешалке в ФСБ без Ca²⁺ и Mg²⁺. Клеточные суспензии собирались и затем фрагменты тимуса смешивали магнитной мешалкой в RPMI-1640 с 2 мг/мл коллагеназы («Биолот», Россия) в течение 30 мин. Полученную клеточную суспензию промывали в среде, содержащей ФКС, фильтровали через 45 мкм.

В нижний отсек лунок планшета transwell-системы добавляли 500 мкл культуральной среды и различные аттрактанты: 5×10^5 клеток тимуса мышей Balb/c, 5×10^5 клеток лимфатических узлов мышей Balb/c, и в качестве контроля – культуральная среда без добавления аттрактантов. В верхний отсек добавляли по 1×10^5 неэлектропорированных ДК (группа ДК0), и электропорированных с рmaxCCR9 (группа ДКpCCR9) жизнеспособных ДК мышей, предварительно меченных CFSE (Biolegend, США) по стандартному протоколу. Миграцию *in vitro* оценивали с помощью флуоресцентной микроскопии нижних отделов с использованием In Cell Analyzer 6000 с модулем жизнеобеспечения клеточных

культур (GE Healthcare, США). Микроскопические изображения были получены в каналах светлого поля и FITC (CFSE) каждые 4 часа на протяжении 24 часов после посева клеток. Для каждой лунки было проанализировано 25 полей зрения в проекции transwell-мембраны. Подсчёт мигрировавших клеток осуществлялся с помощью программы In Cell Developer Toolbox 1.9.3, разработанной в США компанией GE Healthcare. Индекс миграции для каждой группы рассчитывали, как [количество клеток, мигрировавших к хемоаттрактантам] / [количество клеток, мигрировавших в культуральную среду].

2.12 Анализ содержания Т-рег в сочетанной культуре дендритных клеток и клеток тимуса

Клетки тимуса выделяли из тимусов мышей линии Balb/c и измельчали при помощи ножниц на небольшие кусочки. Фрагменты тимуса и лимфоузлов инкубировались в течение 30 минут на магнитной мешалке в ФСБ без Ca^{2+} и Mg^{2+} . Клеточные суспензии собирались и затем фрагменты тимуса смешивали магнитной мешалкой в RPMI-1640 с 2 мг/мл коллагеназы («Биолот», Россия) в течение 30 мин. Полученную клеточную суспензию промывали в среде, содержащей ФКС, фильтровали через 45 мкм. Полученные клетки тимуса ссаживали с всеми группами трансфицированных ДК в соотношении 5×10^4 ДК/ 5×10^5 клеток тимуса. По истечении 5 суток оценивали количество Т-регуляторных клеток методом проточной цитометрии.

Для изучения способности трансфицированных ДК индуцировать Трег, использовали проточную цитометрию. Для этого применяли анти-FoxP3-PE, CD3 – BV421, CD4 – PerCP, CD25 – PE-Cy7 антитела (Biolegend, США). Для внутриклеточного окрашивания FoxP3, и для фиксации и пермеабиллизации использовался True-Nuclear Transcription Factor Buffer Set (Biolegend, США) согласно инструкциям производителя.

2.13 Проточная цитометрия

На 7-е сутки культивирования ДК, с помощью метода проточной цитометрии, выполнялся анализ частоты встречаемости полученных миелодных клеток. Через 24 часа после трансфекции оценивался фенотип полученных клеток методом проточной цитометрии. Для проведения проточной цитометрии собирали 2×10^5 полученных трансфицированных клеток и инкубировали 20 минут в темноте при комнатной температуре при добавлении флуоресцентных моноклональных антител: анти-CD11c-PE-Cy7 и анти-SIRP α -PE-Cy5.5 для анализа субпопуляций ДК. Для анализа фенотипа полученных ДК использовали анти-CD11c-PE-Cy7, анти-CCR9-PE, анти-H-2Db-FITC, анти-CD80-PerCP и анти-CD86-APC (Biolegend, США).

Все анализы выполнялись на проточном цитометре Attune NxT (Life Technologies, США).

2.14 Протокол антиген-коллаген индуцированного артрита

За основу протокола индукции АКИА взята модель из работы U. Baddack, S. Hartmann и соавт. [156]. Для индукции АКИА использовались мыши линии BALB/c в возрасте 2-6 месяцев.

Протокол №1. Первую иммунизацию проводили (день 0), вводя подкожно 100 мкг альбумина метилированного из бычьей сыворотки (mBSA, Sigma-Aldrich, Германия), разведенного в 50 мкл ФСБ и эмульгированного с 50 мкл полного адьюванта Фрейнда (CFA, Sigma-Aldrich, Германия). Через неделю (день 7) мышей повторно подкожно иммунизировали раствором, содержащим 100 мкг бычьего коллагена типа II (Collagen Type II, Bovine, Lyophilized, Sigma-Aldrich, Германия), 50 мкг mBSA, эмульгированного с 50 мкл неполного адьюванта Фрейнда (IFA, Sigma-Aldrich, Германия). Параллельно с каждой иммунизацией внутрибрюшинно вводили 200 нг токсина Bordetella p. (Pertussis toxin from Bordetella pertussis, PTX,

lyophilized powder, Sigma-Aldrich, Германия). Через 14 дней после последней иммунизации (день 21) в полость левого коленного сустава вводили 50 мкг mBSA, разведенного в 20 мкл ФСБ, в экспериментальной группе, в группе контроля – 20 мкл ФСБ внутрисуставно.

Протокол №2 и №3. В день первой иммунизации доза mBSA для подкожного введения была увеличена до 200 мкг mBSA. При повторной иммунизации вводилось подкожно 200 мкг бычьего коллагена типа II (Collagen Type II, Bovine, Lyophilized, Sigma-Aldrich, Германия), 200 мкг mBSA эмульгированного с 50 мкл неполного адьюванта Фрейнда (IFA, Sigma-Aldrich). Для внутрибрюшинного введения дозировка токсина Bordetella p. Была увеличена до 300 нг (Pertussis toxin from Bordetella pertussis, PTX, lyophilized powder, Sigma-Aldrich, Германия). При индукции локального артрита в полость левого коленного сустава вводилось: в 2-ом протоколе 100 мкг mBSA разведенного в 20 мкл ФСБ, в 3-м протоколе 250 мкг в 20 мкл ФСБ, в группу контроля - 20 мкл ФСБ внутрисуставно.

2.15 *In vivo* исследование

Согласно протоколу, проводился запуск модели антиген-коллаген индуцированного артрита.

Миелодные ДК были получены, указанным выше способом. На 7-е сутки выполнялась электропорация экзогенной ДНК, с использованием ДНК-конструкций, кодирующими рецептор хемотаксиса мыши CCR9 (pCCR9), плазмидой кодирующей продукцию IL-10 (pIL-10) и плазмидой кодирующей эпитопы коллагена II типа (pCII). ДК, трансфицированные плазмидой p5, использовались в качестве контроля. Полученные ДК собирались через 24 часа после проведения электропорации, дважды отмывались средой RPMI-1640, и разводились в 0,9% растворе натрия хлорида, в концентрации 500 тыс/150 мкл. Полученный раствор ДК вводился в хвостовую вену экспериментальных животных, на 6-7 сутки после индукции локального артрита (индукция локального

артрита – день 21, введение ДК проводилось на 28 сутки от запуска модели артрита), при появлении первых клинических признаков. Экспериментальные и контрольные группы указаны в таблице 3.

Таблица 3 - Группы ДК для введения лабораторным животным с АКИА [Разработана автором]

Номер группы	Группы, вводимых ДК
1	ДКpIL10
2	ДКpIL10+pCII
3	ДКpCCR9+pCII+pIL10
4	ДКpCCR9+pCII
5	Контроль, введен раствор натрия хлорида
6	Контроль, введены ДКp5

На 7 и на 14 сутки после введения ДК, проводилось измерение толщины (поперечный размер) пораженных лап, с помощью штангенциркуля, оценка содержания антител к коллагену II типа в сыворотке лабораторных животных методом ИФА, забор суставов для гистологического исследования.

2.16 Оценка влияния трансфицированных дендритных клеток на течение экспериментального артрита

Припухлость лап оценивали, измеряя среднюю толщину обеих задних лап с помощью штангенциркуля 0–10 мм на 0, 3, 6, 7–23 сутки после индукции локального артрита.

Содержание антител, специфичных к мышинному коллагену II типа, измеряли в сыворотке крови лабораторных животных методом иммуноферментного анализа (ИФА; IgG против мышинного коллагена типа II, Cayman chemical, США).

На 10 и 23 сутки после внутрисуставного введения по схеме индукции артрита, мышей выводили из эксперимента при помощи цервикальной дислокации. Забирались, фиксировались в забуференном 10 % растворе формалина и

пропитывались парафином для гистологического исследования коленные суставы. Срезы тканей подготавливали при помощи микротомы и собирали на предметные стекла, которые затем депарафинизировали и окрашивали гематоксилином и эозином. Воспаление оценивали, как гиперплазию слоя синовиальной оболочки и инфильтрацию лейкоцитов в синовиальную мембрану/пространство сустава, разрушение тканей – по образованию паннуса и наличию эрозии хряща.

2.17 Статистический анализ данных

Статистическая обработка данных была выполнена с помощью программы Prism 8.0 (GraphPad Software, США). Статистические выборки проверялись на нормальность с помощью критериев Шапиро-Уилка и Колмогорова-Смирнова. Значимость различий между выборками оценивали с помощью однофакторного или двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA с множественными сравнениями Тьюки, или с помощью критерия Манна-Уитни. Данные были представлены в виде медианы и межквартильного интервала (25–75%). Различия сравниваемых параметров считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Значимые отличия проиллюстрированы на рисунках символами и скобками.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Получение толерогенных дендритных клеток

ДК были получены при помощи GM-CSF и IL-4. На 7 сутки культивирования выполнялся анализ субпопуляций ДК. Было показано, что описанный протокол позволяет генерировать ДК с преимущественным миелоидным фенотипом (рисунок 6).

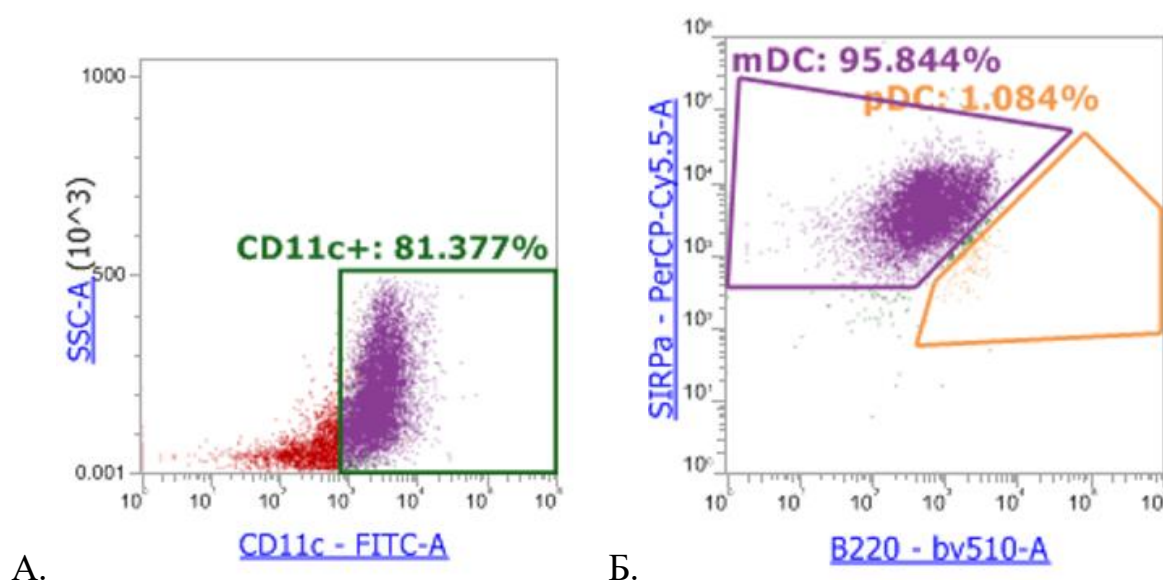


Рисунок 6 - Данные полученные при помощи проточной цитометрии. А. стратегия гейтирования и количество клеток CD11c⁺ из популяции лимфоцитов; Б. относительное содержание миелоидных ДК (mDC) и плазмацитоидных ДК (pDC).

На 7 сутки культивирования выполнялась трансфекция ДНК плазмидами p5, pIL-10, pCCR9, pCIP. Через 24 часа после трансфекции выполнялся анализ фенотипа трансфицированных ДК. Было обнаружено достоверное снижение клеток с экспрессией CD80, CD86, H-2Db в экспериментальных группах клеток, по сравнению с культурой ДК, не подвергшимся трансфекции (рисунок 7). Это обстоятельство может свидетельствовать о толерогенном фенотипе трансфицированных ДК.

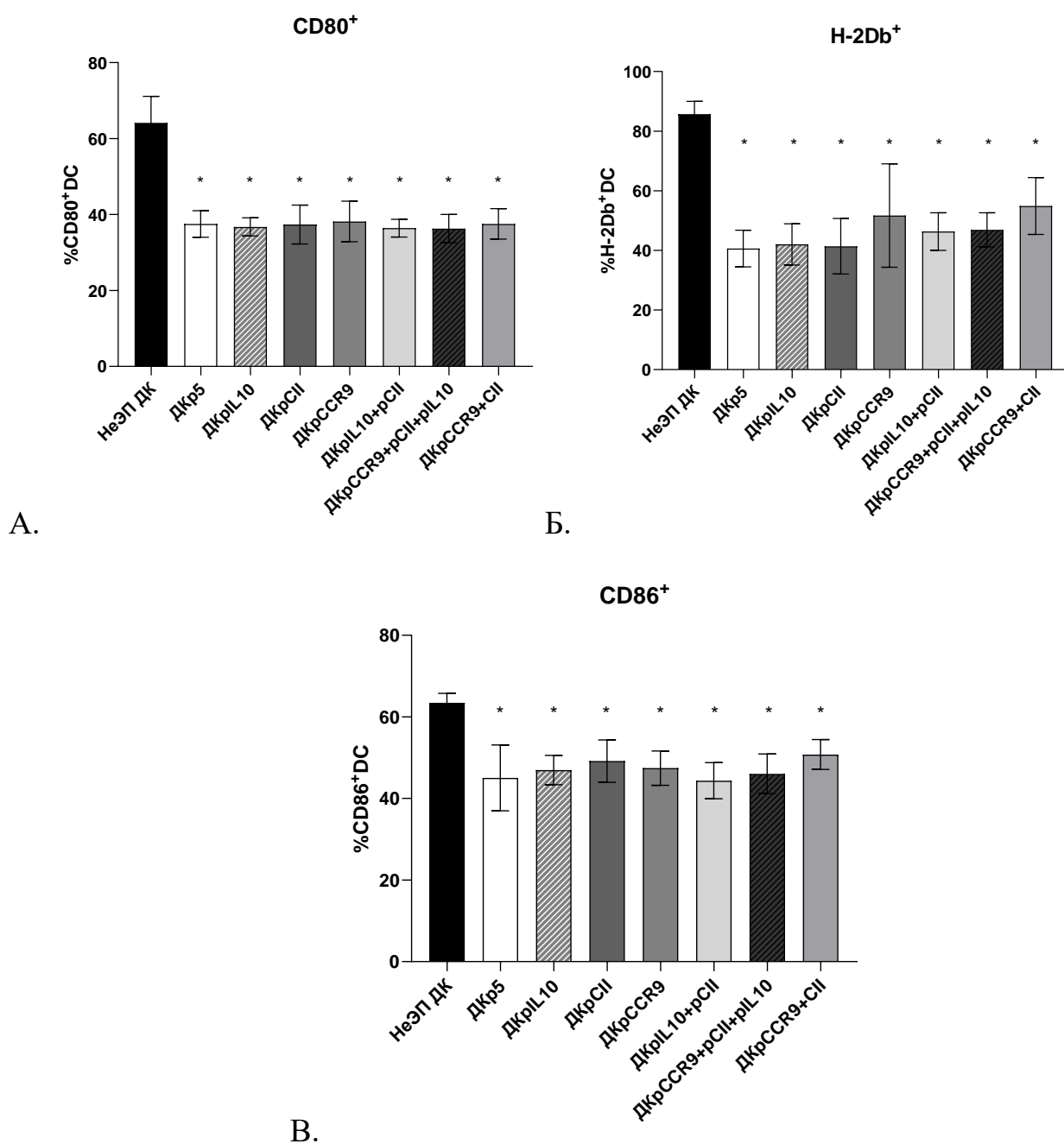


Рисунок 7 - Анализ экспрессии маркеров созревания ДК, трансфицированных различными плазмидами. А. относительное содержание ДК, экспрессирующих CD80; Б. относительное содержание ДК, экспрессирующих H-2D^b; В. относительное содержание ДК, экспрессирующих CD86, (n=8). * - статистически значимые различия всех экспериментальных групп от группы неЭП ДК ($p \leq 0.01$).

При оценке экспрессии CCR9 исследуемыми ДК (рисунок 8), было получено, что в группах ДК, где для трансфекции использовались pCCR9, наблюдается повышенная экспрессия CCR9, по сравнению с другими группами.

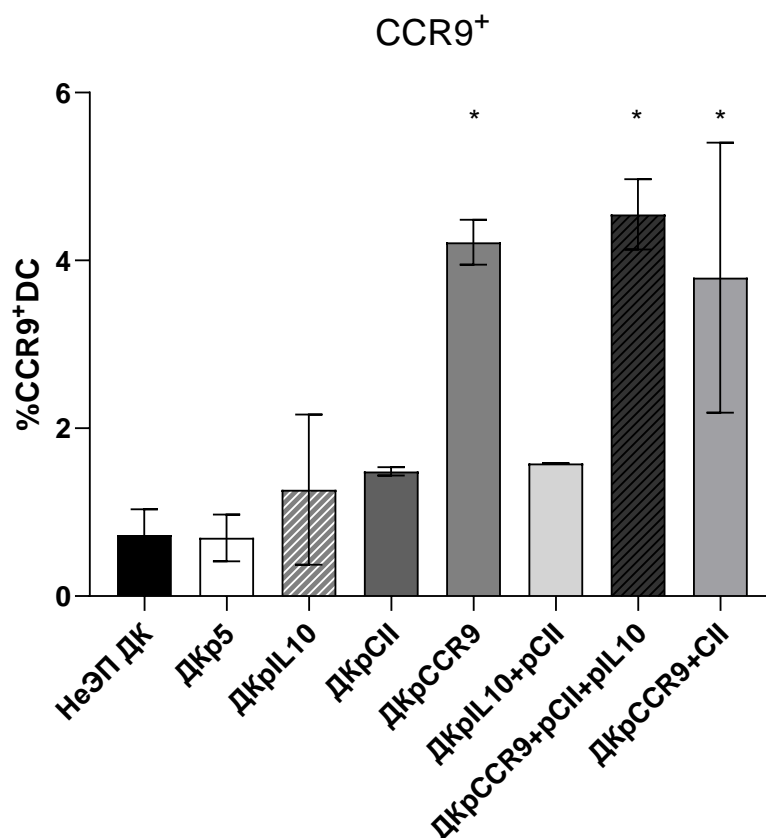


Рисунок 8 - Анализ экспрессии CCR9 культивированными ДК после трансфекции различными плазмидами (n=8). * - статистически значимые различия от групп неЭПДК, ДКp5, ДКpIL-10, ДКCII и ДКpIL10+pCII ($p \leq 0.001$).

При анализе продукции IL-10 было обнаружено достоверное увеличение IL-10 в кондиционных средах всех групп ДК, которые подвергались трансфекции плазмидой pIL-10 (рисунок 9).

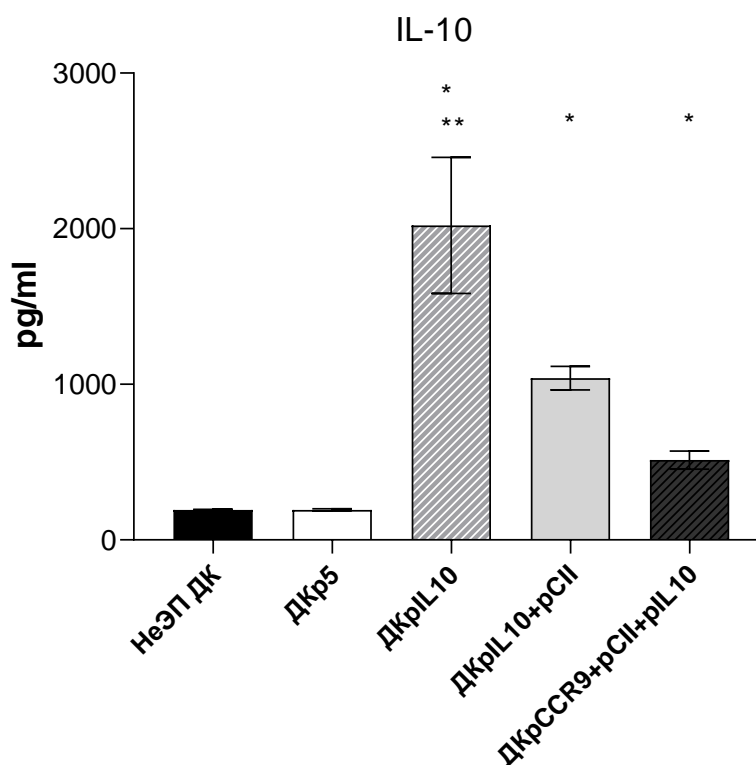


Рисунок 9 - Анализ содержания IL-10 в кондиционной среде культуры ДК после трансфекции различными плазмидами. * - статистически значимые различия от группы неЭП ДК, ** - группы ДКpIL10 от остальных групп ($p \leq 0.001$).

В результате, можно сделать вывод, что полученные ДК обладают незрелым фенотипом, а группы трансфицированные плазмидой pCCR9, характеризуются еще и повышенной экспрессией CCR9. В связи с этим, исследуемые ДК обладают толерогенными фенотипом и могут быть использованы для индукции иммунологической толерантности.

Толерогенный потенциал трансфицированных ДК, оценивали по количеству Т-регуляторных клеток и продукции IL-10 в совместной культуре ДК и спленоцитов (рисунок 10). Было получено достоверное увеличенное содержание Т-рег в группах ДКpIL-10, ДКpCCR9+pCII+pIL-10 и ДКpCCR9+pCII, по сравнению с другими группами.

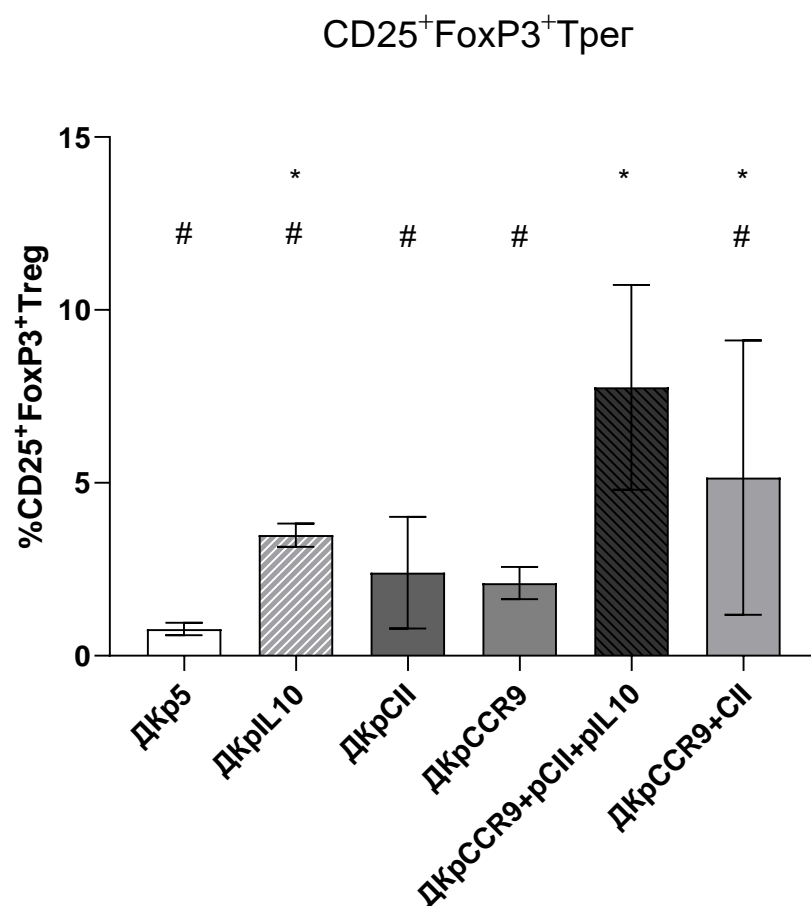


Рисунок 10 - Анализ относительного содержания Т-регуляторных клеток (CD25⁺FoxP3⁺) в совместной культуре исследуемых ДК и спленоцитов (n=8). * - статистически значимые различия от группы ДКp5, # - статистически значимые различия от группы ДКpCCR9+pCII+pIL-10 (one-way ANOVA, p ≤ 0.0001).

При оценке содержания IL-10 в кондиционной среде совместной культуры исследуемых ДК и спленоцитов было показано повышение содержания данного цитокина в следующих экспериментальных группах ДК: ДКpIL-10, ДКpCCR9+pCII+pIL-10 и ДКpIL-10+pCII (рисунок 11).

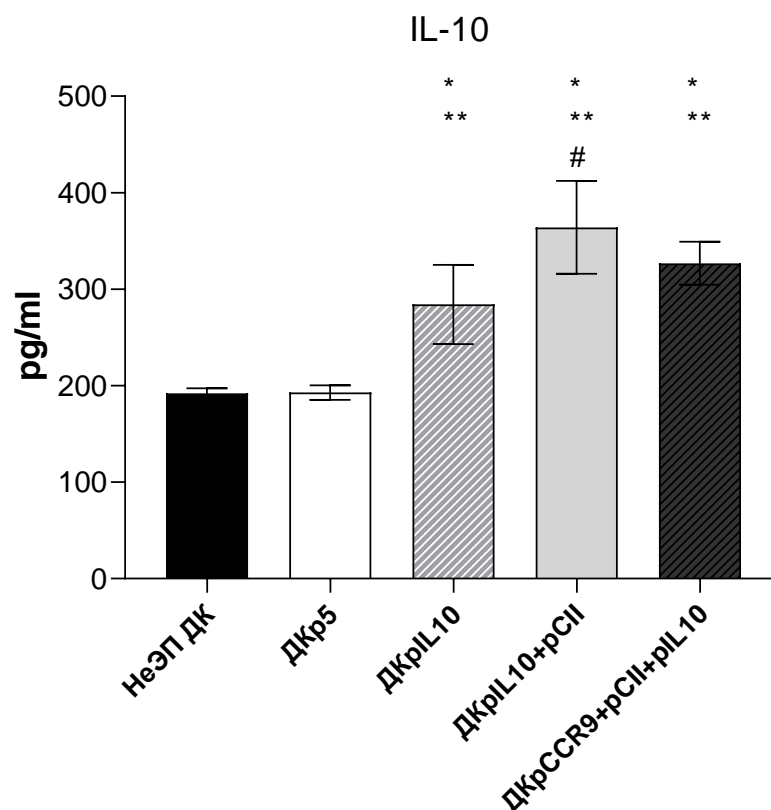


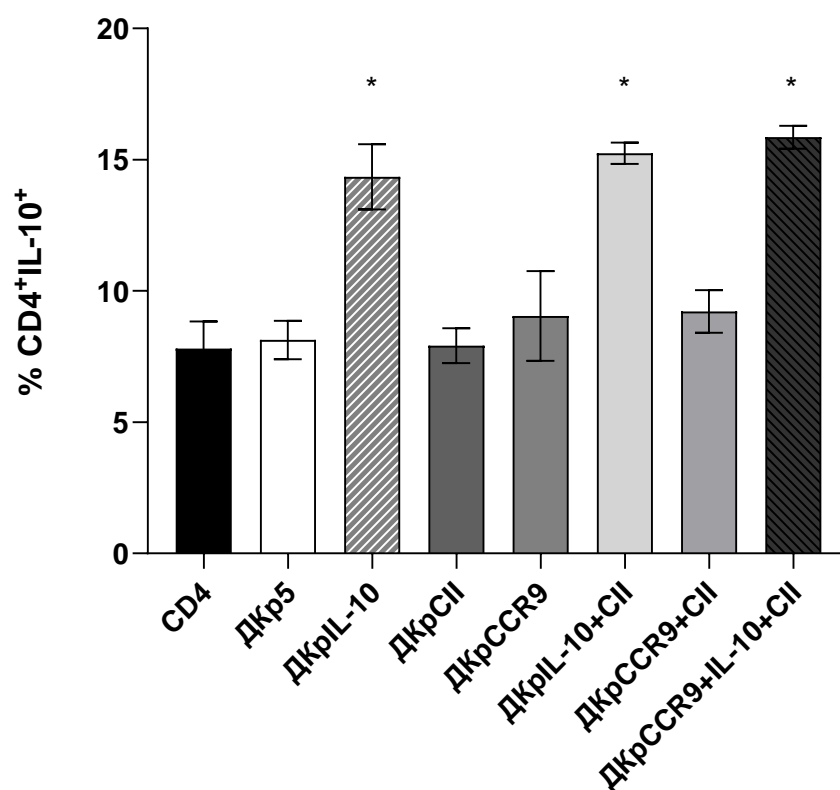
Рисунок 11 - Анализ содержания IL-10 в кондиционной среде совместной культуры исследуемых ДК и спленоцитов (n=8). * - статистически значимые различия от группы неЭП ДК, ** - от группы ДКp5 ($p \leq 0.0001$), # - группы ДКpIL-10 от остальных групп ($p \leq 0.001$).

Полученный результат (увеличение относительного содержания Т-рег и повышение продукции IL-10) в совместной культуре в трансфицированных ДК со спленоцитами, может говорить об успешной индукции иммунологической толерантности полученными ДК, что позволит использовать их в дальнейших экспериментах, связанных с иммунологической толерантностью.

3.2 Оценка содержания IL-10⁺ и TGF-β⁺ CD4⁺-лимфоцитов в совместной культуре ДК и CD4⁺лимфоцитов

При анализе относительного содержания IL-10⁺ и TGF-β⁺ CD4⁺лимфоцитов в совместной культуре ДК и CD4⁺лимфоцитов, было зарегистрировано достоверное увеличение клеток, продуцирующих IL-10 в ДКpIL-10, ДКpIL-10+pCII и ДКpIL-10+pCII+pCCR9, и достоверное увеличение количества TGF-β в группах ДКpIL-10 и ДКpCCR9+pCII+pIL-10 (рисунок 12).

Количество IL-10⁺CD4⁺лимфоцитов



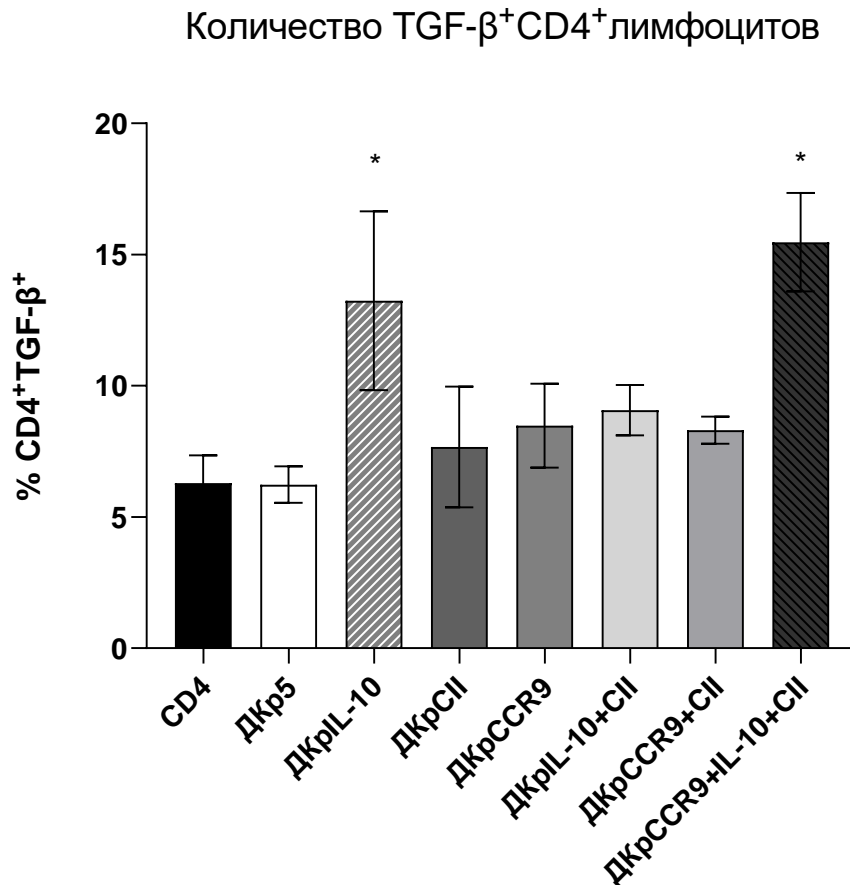


Рисунок 12 - Анализ относительного содержания IL-10^+ (сверху) и $\text{TGF-}\beta^+$ (снизу) CD4^+ лимфоцитов в совместной культуре ДК и CD4^+ лимфоцитов ($n=8$). CD4 - CD4^+ лимфоциты. * - статистически значимые отличия групп ДКpIL-10, ДКpIL-10+pCII и ДКpCCR9+pCII+pIL-10 от контрольных групп ДКp5 и CD4 -лимфоцитов (one-way ANOVA, $p \leq 0.0001$).

3.3 Проплиферация CD4^+ спленоцитов в совместной культуре Т-рег, CD4^+ лимфоцитов и коллагена II типа

Анализ пролиферативной активности CD4^+ спленоцитов (полученных от мышей больных АКИА) в сочетанной культуре с антиген-специфическими (полученными от группы ДКpCCR9+pCII+pIL-10) или неспецифическими Т-рег (полученными от группы ДКpIL-10) при добавлении коллагена II типа, показал достоверное увеличение пролиферации CD4^+ спленоцитов при добавлении коллагена II типа, кроме групп с AgТ-рег и HeAgТ-рег (рисунок 13). Группа с антиген-специфическими Т-рег, напротив, показала наименьший уровень

пролиферативной активности $CD4^+$ спленоцитов, равный группе контроля $CD4^+$ спленоцитов без добавления коллагена II типа. Группа HeAgT-рег показала тенденцию к снижению пролиферативной активности, но не полное ее подавление. Полученные данные могут свидетельствовать о подавлении пролиферативной активности $CD4^+$ спленоцитов антиген-специфическими Т-рег в присутствии стимулирующего фактора коллагена II типа, т.е. развитие иммунной толерантности.

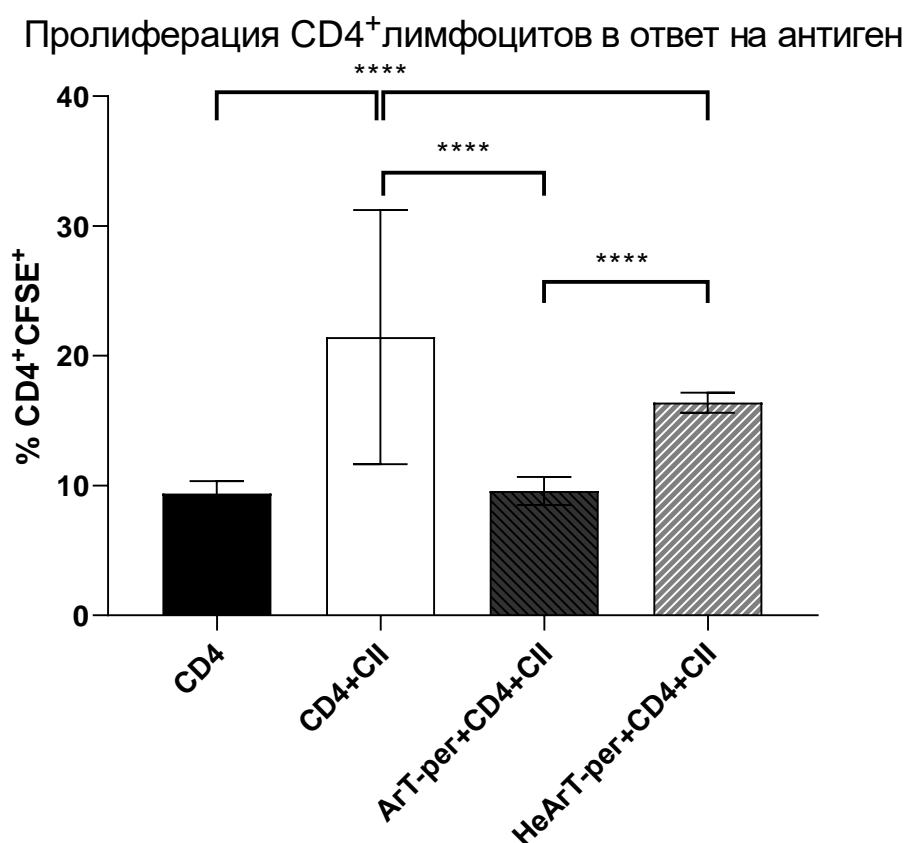


Рисунок 13 - Оценка пролиферативной активности $CD4^+$ лимфоцитов в совместной культуре с Т-рег при добавлении коллагена II типа (n=6). Только CD4 - $CD4^+$ спленоциты без добавления Т-рег и коллагена II типа, CD4+CII - $CD4^+$ спленоциты при добавлении коллагена II типа, AgT-рег+CD4+CII – антиген-специфические Т-рег, $CD4^+$ спленоциты и коллаген II типа, HeAgT-рег+CD4+CII – неспецифические Т-рег, $CD4^+$ спленоциты и коллаген II типа. Медианы и межквартильный интервал. Скобками указаны статистически значимые отличия (one-way ANOVA, **** - $P < 0.0001$).

3.4 Анализ *in vitro* миграционных возможностей ДК, трансфицированных ДНК-конструкциями CCR9

Следующим этапом была изучена миграционная активность ДК, трансфицированных ДНК-конструкцией, кодирующей CCR9, к клеткам тимуса и клеткам лимфатических узлов *in vitro* с помощью transwell-систем (рисунок 14). Индекс миграции высчитывали как отношение количества клеток, мигрировавших к клеткам тимуса, или к клеткам лимфатических узлов, к количеству клеток, мигрировавших в культуральную среду без хемоаттрактантов.

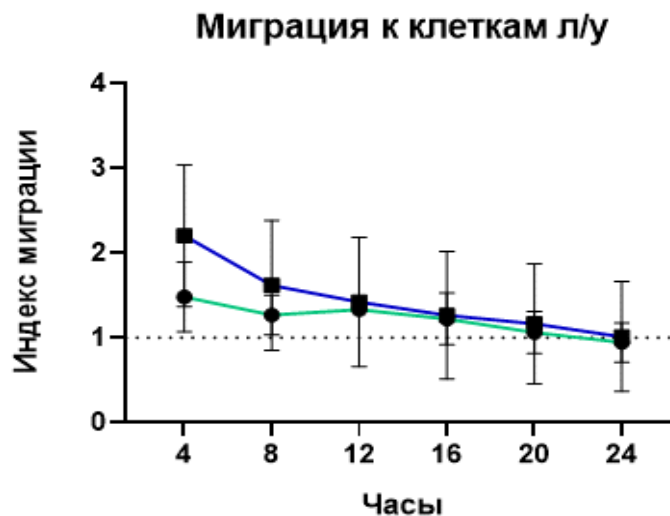
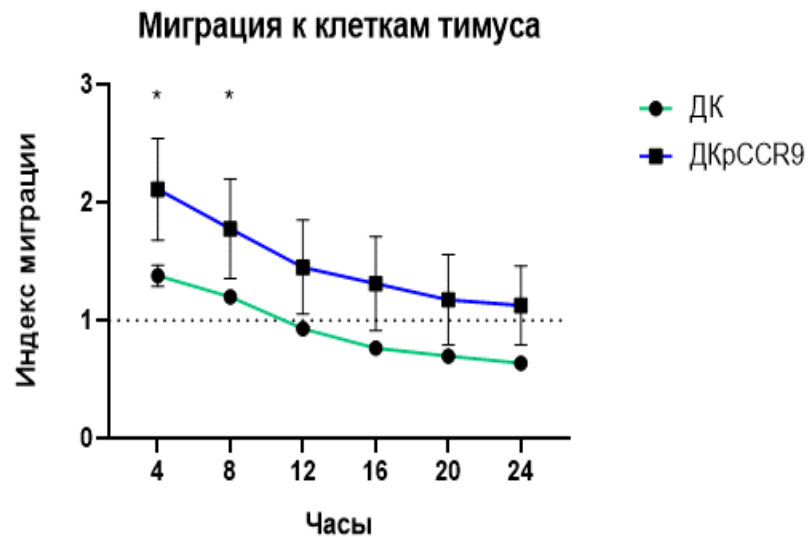


Рисунок 14 - Оценка миграционной способности ДК к клеткам тимуса (сверху), к клеткам лимфоузлов (снизу) (n=6). ДК – дендритные клетки без воздействия электропорации, ДКрCCR9 – дендритные клетки, трансфицированные плазмидой CCR9. Л/у – лимфатические узлы. Медианы и межквартильный интервал. * - указаны статистически значимые отличия от группы ДК (2way ANOVA, $P < 0,0001$).

Было выявлено, что через 4 и 8 часов после посадки дендритные клетки, трансфицированные рCCR9, в 1,5 раза более активно мигрируют к клеткам тимуса по сравнению с неэлектропорированными ДК. Анализ миграции ДК к клеткам лимфатических узлов не выявил какой-либо достоверности.

3.5 Анализ количества Т-рег в совместной культуре ДК и клеток тимуса

На 5 сутки совместного культивирования полученных ДК и тимоцитов, был проведен анализ количества Т-рег (рисунок 15). Эксперимент показал, что в группах, где использовалась плазида CCCR9, обнаруживается достоверное увеличение содержания Т-рег, по сравнению с остальными группами.

Количество Т-рег в совместной культуре ДК и клеток тимуса

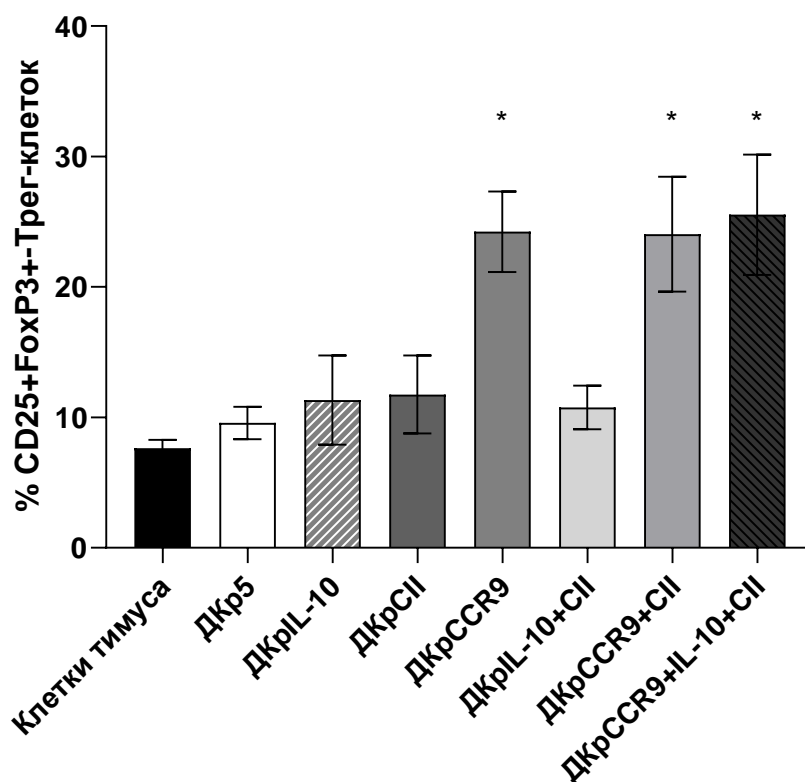


Рисунок 15 - Анализ количества Т-рег в совместной культуре ДК и клеток тимуса (n=6).

* - статистически значимые отличия групп ДКpCCR9, ДКpCCR9+pCII и ДКpCCR9+pIL-10+pCII от контрольных групп ДКp5 и клеток тимуса ($p \leq 0.0001$).

3.6 Обработка модели антиген-коллаген индуцированного артрита

Обработка модели экспериментального артрита была проведена по трём различным протоколам: первый – классическая модель АКИА, второй и третий - модель АКИА с измененными дозировками препаратов. Изменения в первый протокол были внесены с целью достижения более выраженных клинических симптомов у испытуемых животных. Было также проведено сравнение результатов для определения наиболее оптимального протокола для последующих исследований.

После запуска моделей проводилась оценка клинических, лабораторных и гистологических параметров.

При оценке припухлости лап у мышей, задействованных в протоколе 1 (далее пр.1), было выявлено достоверное увеличение этого параметра в экспериментальной группе на 10-е сутки, по сравнению с контрольной группой. К 23-м суткам интенсивность припухлостей лап спадала, и достоверных различий обнаружено не было (рисунок 16).

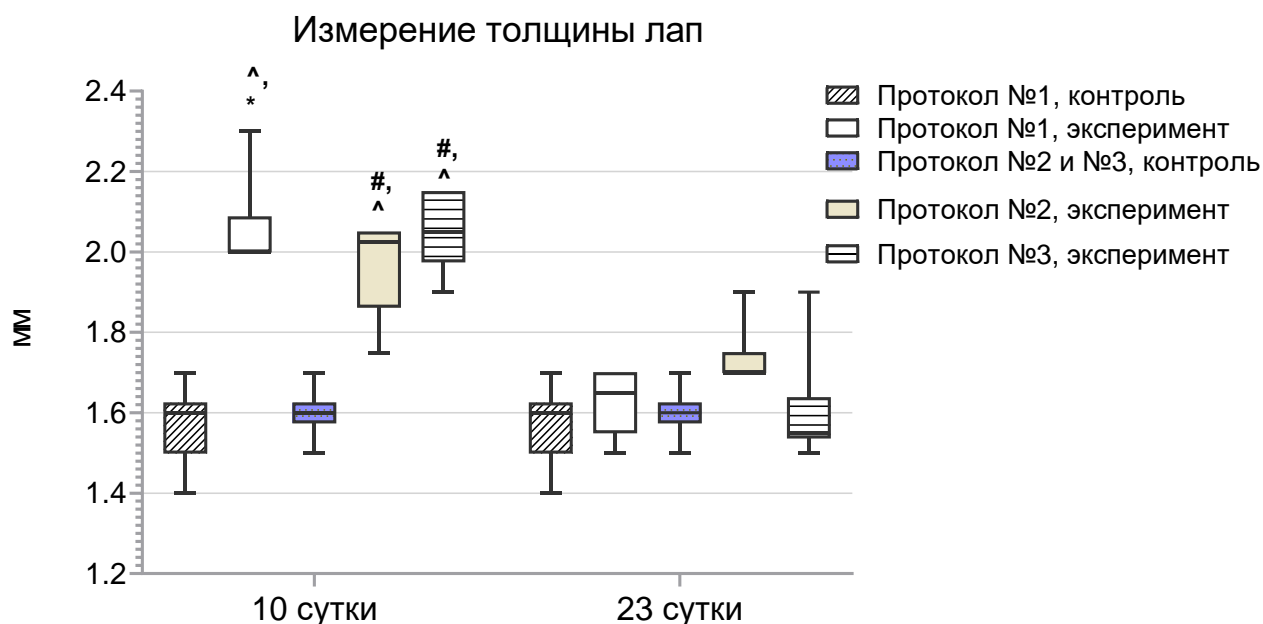


Рисунок 16 - Сравнение толщины задних лап мышей линии BALB/c индуцированных по протоколам №1, №2 и №3 на 10 сутки и 23 сутки (n=6-10). Контроль – введение ФСБ. Данные представлены в виде медианы межквартильного интервала, минимума и максимума значений.

* - указаны статистически значимые отличия от группы контроля в протоколе №1 на 10-е сутки,
 # - указаны статистически значимые отличия от группы контроля в протоколе № 2 на 10-е сутки,
 ^ - указаны статистически значимые отличия данных 10 суток от 23 суток у мышей из всех протоколов (two-way ANOVA, $p \leq 0.0001$).

Анализ изменения толщины лап в эксперименте, проведенному на мышах по протоколу №2 (далее пр. 2), и в эксперименте, проведенному на мышах по протоколу №3 (далее пр. 3), показал достоверное увеличение размеров толщины лап во всех экспериментальных группах по сравнению с контрольными группами. На 23-е сутки анализ толщины лап, также, не выявил статистически значимых отличий. Увеличение толщины лап на 10-е сутки, по сравнению с 23-ми сутками, оказалось достоверным во всех экспериментальных группах.

Анализ содержания антител к коллагену II типа в сыворотке лабораторных животных (рисунок 17) пр. 1 на 10, 23 сутки показал достоверное увеличение уровня антител в экспериментальных группах по сравнению с контрольными. Также, увеличение антител к коллагену II типа на 10-е сутки в экспериментальной группе пр.1 достоверно выше, чем в экспериментальных группах пр. 2 и пр. 3. На 23-е сутки достоверным оказалось увеличение антител к коллагену II типа в экспериментальной группе пр. 2, по сравнению с показателями мышей из других протоколов.

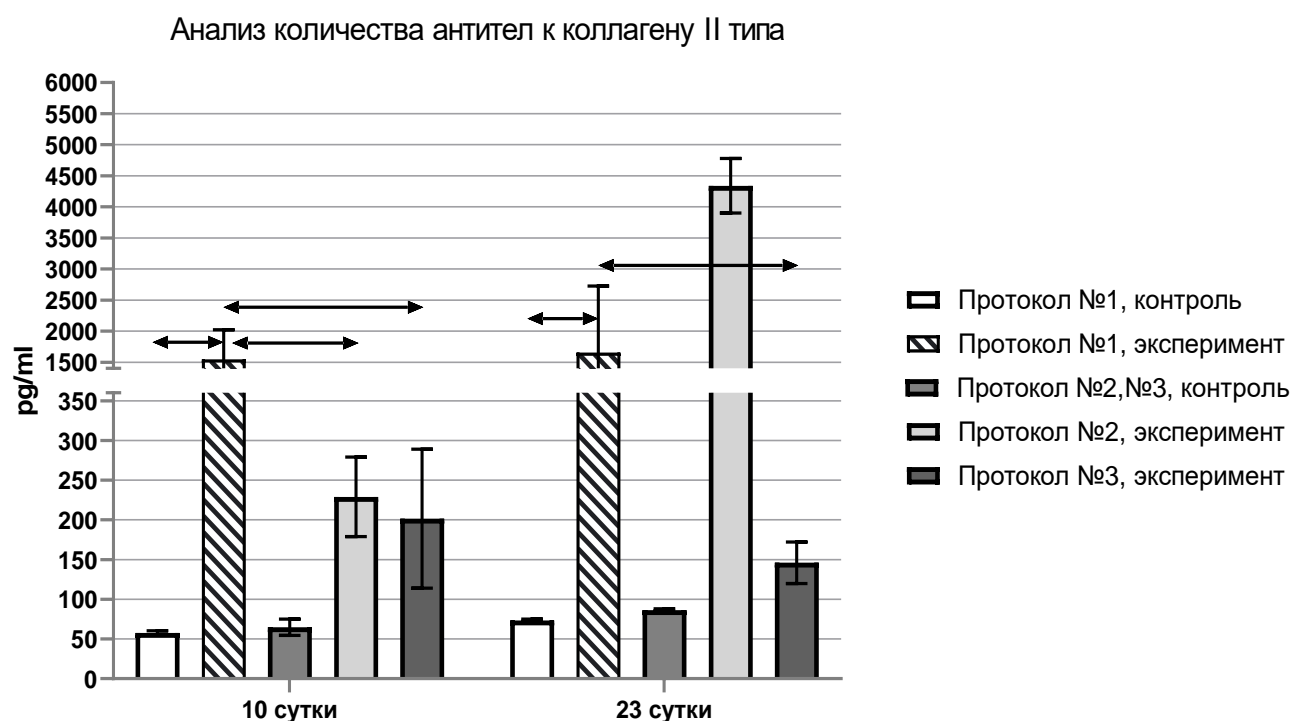


Рисунок 17 - Анализ содержания антител к коллагену II типа в сыворотке лабораторных животных, индуцированных по протоколам №1, №2 и №3 на 10 и 23 сутки ($n = 6-10$). Средние значения и стандартные ошибки средних, медианы и межквартильный интервал. Стрелкой указаны статистически значимые различия (Mann-Whitney test, $p \leq 0.0001$).

Далее проводился анализ гистологических изменений в образцах суставов экспериментальных животных (рисунок 18). В экспериментальной группе лабораторных животных из пр.1 на 10-е сутки во всех опытных образцах были обнаружены гипертрофия синовиальной оболочки, инфильтрация лейкоцитами; в

3-х образцах (из 10) – паннус. На 23-е сутки вышеуказанные изменения проявлялись менее выражено, но в 2-х образцах наблюдался паннус. У образцов из пр. 2 и пр. 3 наблюдалось сходство в выявленных изменениях, присутствовало реактивное разрастание синовиальной оболочки при слабой воспалительно-клеточной инфильтрации и сохранении хрящевого слоя, кроме 2-х образцов от мышей пр. 2 и 1-го образца пр. 3. Также, у нескольких мышей пр. 2 было обнаружено образование паннусов на 10 сутки.

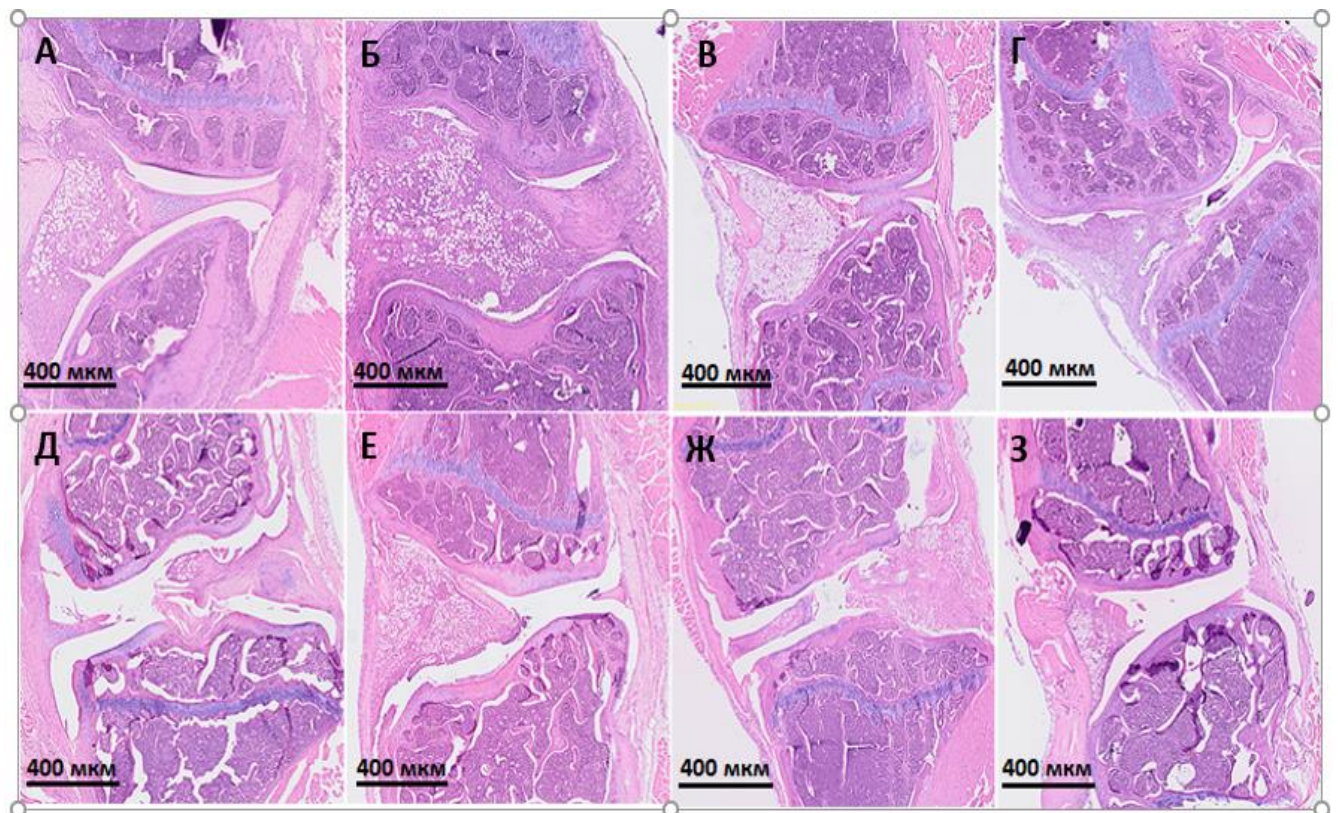


Рисунок 18 - Гистологическое исследование. А, Б, В, Г, Д, Е, Ж, З - микрофотографии тканей суставов мышей после окраски гематоксилином и эозином при увеличении в 400 раз (n=4-6).

Протокол №1, 11 сутки: (А) Контроль: патологических изменений нет. (Б) Опыт: увеличенная толщина синовиальной оболочки с многоочаговой лейкоцитарной инфильтрацией, большая площадь покрытия суставной поверхности - «паннус». Синовиальная оболочка имеет утолщенные немногочисленные ворсины.

Протокол №1, 25 сутки. (В) Контроль: норма. (Г) Опыт: выраженные разрастания синовиальной оболочки, значительная инфильтрация лейкоцитами, присутствует нарастание синовиальной оболочки на суставной хрящ (паннус).

Протокол №2, 10 сутки. (Д) Контроль: патологических изменений нет. (Е) Опыт: дефект суставного хряща в виде узур, удлиненные разрастания синовиальной оболочки по типу ворсин, но довольно тонкие. Присутствуют нейтрофилы группами в полости сустава. Протокол №2, 23 сутки. (Ж) Контроль: норма. (З) Опыт: гипертрофия синовиальной оболочки, мелкая группа нейтрофилов в синовиальной полости, мелкие очаги инфильтрации лейкоцитами синовиальной оболочки.

В ходе исследования все использованные протоколы индукции продемонстрировали патологические изменения, аналогичные наблюдаемым при РА у человека. Это подтверждает адекватность выбранной модели для доклинической оценки потенциальных терапевтических стратегий. У экспериментальных животных были зафиксированы характерные клинические проявления, включая отечность суставов и гиперемию околосуставных тканей. При гистологическом анализе выявлены типичные патоморфологические признаки РА: гиперплазия синовиальной оболочки, дегенеративные изменения суставного хряща, формирование паннуса. Полученные данные свидетельствуют, что экспериментальная модель достоверно воспроизводит ключевые патогенетические механизмы заболевания, что делает ее релевантной для скрининга новых лекарственных препаратов и биомедицинских технологий.

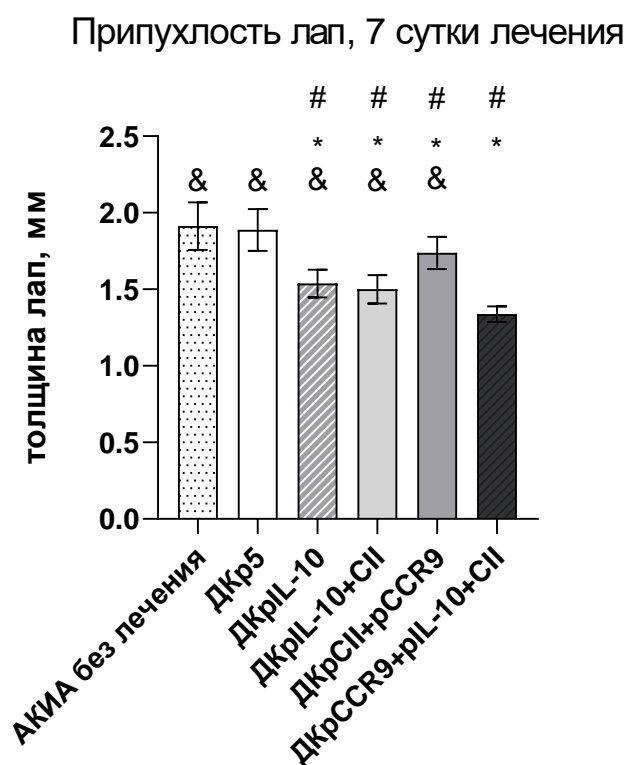
Делая вывод необходимо отметить, что у мышей, индуцированных по протоколу №1 наблюдалось более стабильное увеличение уровней антител к коллагену 2 типа, а гистологические изменения обнаруживались наиболее выраженные. Таким образом, для дальнейшего исследования была выбрана классическая модель индукции АКИА.

3.7 Оценка влияния полученных дендритных клеток на течение экспериментального артрита у мышей

ДК собирались через 24 часа после проведения электропорации, дважды отмывались средой RPMI-1640, и разводились в 0,9% растворе натрия хлорида, в

концентрации 500 тыс/150 мкл. Полученный раствор ДК вводился в хвостовую вену экспериментальных животных, на 7 сутки после индукции локального артрита, при появлении первых клинических признаков, в соответствии с созданными группами лечения.

После введения полученных ДК мышам с АКИА, было проведено сравнение припухлостей лап, уровней антител к коллагену II типа на 7 и 14 сутки лечения (рисунок 19). Показано, что припухлость лап во всех экспериментальных группах была достоверно меньше, чем в контрольных группах как на 7, так и на 14 сутки. Также, припухлость лап группы ДКpCCR9+pCII+pIL10 была достоверно менее выражена, чем во всех группах на 7 сутки.



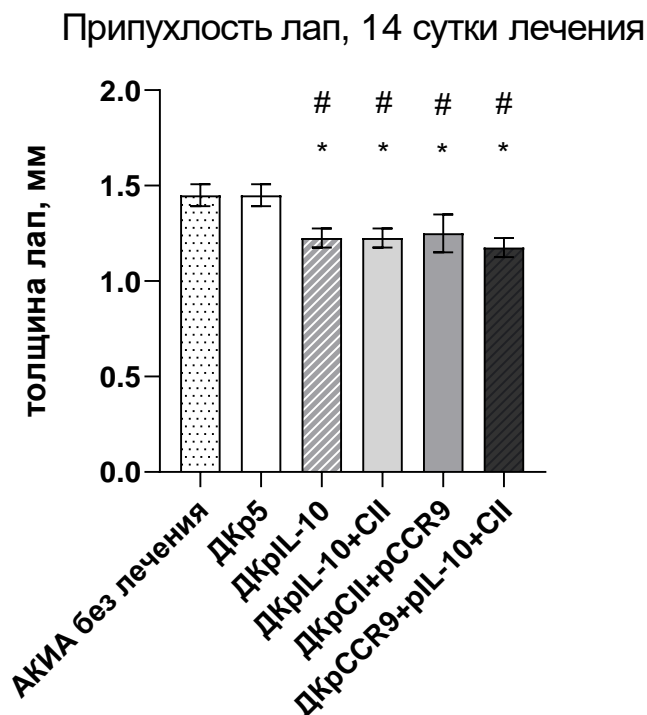
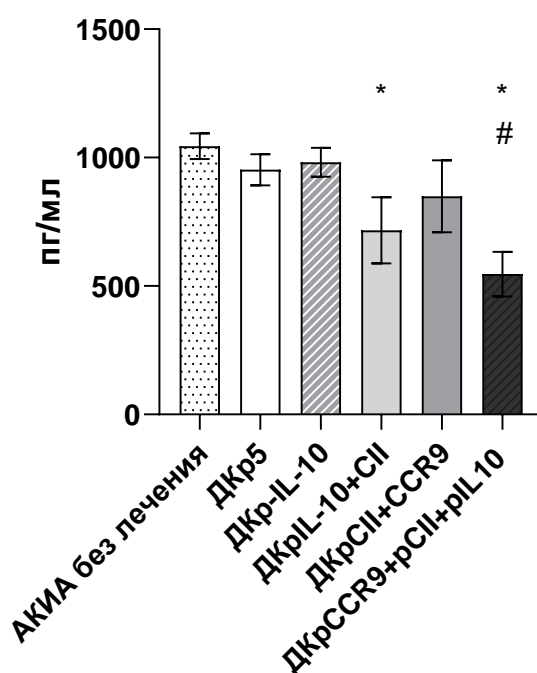


Рисунок 19 - Сравнение припухлостей лап лабораторных животных на 7 сутки (сверху) и на 14 сутки (снизу) после начала терапии (n=8-12). АКИА без лечения, ДКр5 – группы контроля. Медианы и межквартильный интервал. # — статистически значимые отличия от контрольной группы АКИА без лечения, * — статистически значимые отличия от контрольной группы ДКр5, & — статистически значимые отличия от группы ДКрCCR9+рСII+рIL10 (one-way ANOVA, $P < 0,0001$).

Однако при анализе уровней антител к коллагену II типа было выявлено достоверное снижение содержание антител только в группах ДКрIL10+рСII и ДКрCCR9+рСII+рIL10, по сравнению с контрольными группами на 7 сутки лечения (рисунок 20). На 14 сутки после начала лечения во всех экспериментальных группах, кроме ДКр5, было обнаружено снижение титра антител к коллагену II типа. Причем, группа ДКрCCR9+рСII+рIL10 показала наиболее низкий уровень антител к коллагену II типа по сравнению с остальными группами, как на 7 сутки, так и на 14 сутки.

Уровень антител к коллагену II типа, 7 сутки лечения



Уровень антител к коллагену II типа, 14 сутки лечения

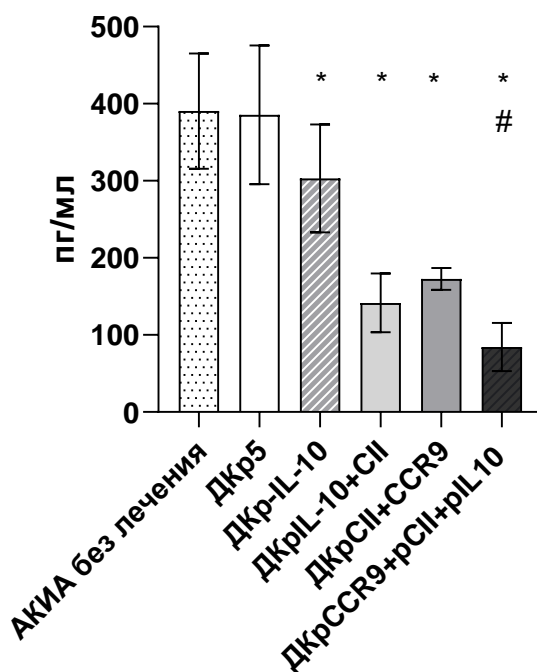


Рисунок 20 - Сравнение уровней антител к коллагену II типа лабораторных животных на 7 сутки (сверху) и 14 сутки (снизу) после лечения (n=8-12). АКИА без лечения, ДКр5 – группы контроля. Медианы и межквартильный интервал. * - указаны статистически значимые отличия от групп

контроля, # - статистически значимые отличия группы ДКpCCR9+pCII+pIL10 от остальных групп (one-way ANOVA, $P < 0,001$).

Таким образом, в/в введение исследуемых ДК привело к снижению уровней припухлостей лап и антител к коллагену II типа в экспериментальных группах. Причем, группа ДКpCCR9+pCII+pIL10 показала наиболее низкие уровни сравниваемых параметров.

При анализе гистологических образцов (рисунок 21), полученных через неделю после начала лечения (7 суток) достоверной разницы с контрольными группами, не было обнаружено: у всех животных отмечались воспалительная инфильтрация синовиальной оболочки, у некоторых – формирование паннуса и пенетрация синовии в суставной хрящ, утолщение синовиальной оболочки.

Через 14 суток после введения ДК, наиболее выраженные изменения обнаруживались в контрольных группах (5 и 6) - утолщение и инфильтрация синовиальной оболочки лимфоцитами, у одного животного с формированием ворсин и мелкими группами лейкоцитов в полости сустава (рисунок 21). В 3 группе у всех животных патологические изменения отсутствовали. В 1 группе у двух животных формирование ворсин синовиальной оболочки, слабая лимфоцитарная инфильтрация. Во 2 и 4 группах схожие патоморфологические явления – умеренная лимфоцитарная инфильтрация. Обозначения групп, вводимых ДК указаны в таблице 3.

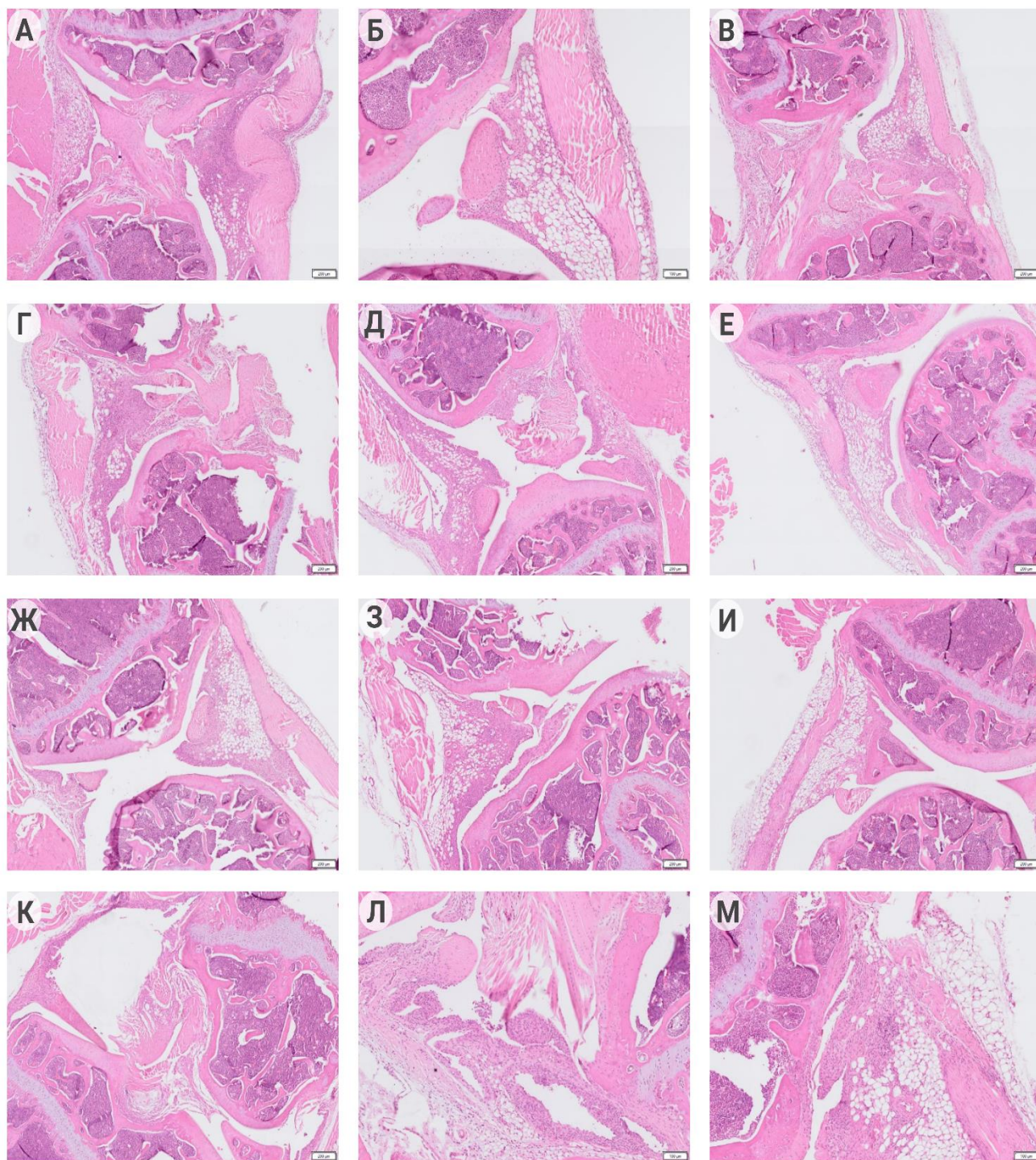


Рисунок 21 - Данные гистологического анализа тканей суставов мышей. А, Б, В, Г, Д, Е, Ж, З, И, К, Л, М - микрофотографии тканей суставов мышей после окраски гематоксилином и эозином при увеличении в 400 раз (n=4-6).

На 7-й день после лечения: 1-я группа – выраженная лимфоцитарная инфильтрация синовиальной стромы, образование субхондральной кисты (А); 2-я группа - образование паннуса, слабая воспалительная инфильтрация синовиальной оболочки (Б); 3-я группа - утолщение синовиальной оболочки со слабой лимфоцитарной инфильтрацией, образование синовиальных ворсинок (В); группа 4 – умеренная инфильтрация синовиальной оболочки, проникновение

синовиальной оболочки в суставной хрящ (Г); группа 5 – врастание синовиальной оболочки в костную ткань вблизи суставного хряща, умеренная лимфоцитарная инфильтрация синовиальной оболочки с ее утолщением и образованием ворсинок (Д); 6–я группа - слабая воспалительная инфильтрация синовиальной оболочки, визуализируется паннус (Е).

На 14–й день после лечения: группа 1 – инфильтрация синовиальной оболочки лимфоцитами (Ж); группа 2 – умеренная инфильтрация синовиальной оболочки сустава, пролиферация фибробластов (З); группа 3 – видимых патологических изменений обнаружено не было (И); группа 4 - умеренная лимфоцитарная инфильтрация сустава. субсиновиальная строма (к); 5–я группа - утолщение и многочисленные наросты (ворсинки) синовиальной оболочки, небольшие скопления лейкоцитов в полости сустава (Л); 6–я группа - разрастание синовиальной оболочки с образованием паннуса, лимфоцитарная инфильтрация субсиновиальной стромы (М).

Таким образом, минимальные изменения обнаружены в 1 группе (ДКpIL-10) на 7 сутки лечения, и отсутствие патологии у животных 3 группы (ДКpCCR9+pCII+pIL-10) на 14 сутки лечения, наиболее выраженные в группах контроля.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

В рамках проведенного исследования была разработана технология, которая позволит получить клеточный препарат, способствующий восстановлению иммунологической толерантности к антигенам при аутоиммунных заболеваниях. Предполагается, что использование данной технологии может вызвать ремиссию заболевания. Важным преимуществом предлагаемого подхода перед традиционными методами терапии аутоиммунных заболеваний является безопасность иммунотерапии для здоровых клеток и тканей, поскольку созданный клеточный препарат обладает антиген-специфическими свойствами и способностью избирательно оказывать действие только на те клетки и антигены, к которым произошел срыв толерантности.

В данном исследовании изучалась способность неспецифических и антиген-специфических ДК индуцировать иммунную толерантность путем образования Т-регуляторных клеток. Для усиления стабильности толерогенного фенотипа ДК проводилась трансфекция с использованием хемокинового рецептора CCR9 и IL-10. Теоретически, это позволило задействовать не только механизмы периферической иммунологической толерантности, но и активировать центральную толерантность, так как показано, что CCR9 способствует миграции ДК в тимус.

При анализе фенотипа ДК было обнаружено низкое количество клеток с экспрессией маркеров зрелости CD80, CD86 и H-2Db (рисунок 7). Считается, что незрелые ДК могут индуцировать толерантность, обеспечивая недостаточные стимулирующие сигналы для Т-клеток. В стационарных условиях толДК захватывают аутоантигены из апоптотических клеток, комменсальных бактерий [62, 157]. Затем они мигрируют в дренирующие лимфатические узлы без достаточного созревания, что приводит к индукции периферической толерантности. Свойства толДК, индуцирующие толерантность, определяются их происхождением и рядом факторов, таких как цитокины, факторы роста и

транскрипционные программы, которые в совокупности придают этим клеткам супрессивные функции [60, 157, 158]. Зрелые ДК, получив сигнал созревания, активируются и приобретают иммуногенный фенотип. Это, в свою очередь, приводит к активации эффекторных и цитотоксических Т-клеточных ответов [60]. Незрелые ДК могут приобретать способность индуцировать новые популяции Т-рег. Ожидается, что индуцированные Т-рег будут обладать антигенной специфичностью. Данные литературы подтверждают идею о том, что незрелые ДК могут более эффективно индуцировать развитие клеток Foxp3⁺ Т-рег в присутствии TGF-β, чем зрелые ДК [159]. Таким образом, низкая экспрессия ко-стимулирующих молекул, полученными ДК может указывать на их толерогенный потенциал.

В проведенном исследовании мы получили ДК, продуцирующие высокие уровни IL-10, в тех группах где использовалась pIL-10 (рисунок 9). В исследованиях *in vitro* и *in vivo* было установлено, что IL-10, продуцируемый ДК, стимулирует образование CD4⁺IL-10-клеток. Эти клетки обладают способностью подавлять пролиферацию Т-клеток и активировать Т-рег [160-162]. Известно, что толДК, продуцирующие высокие уровни IL-10, экспрессируют ILT4 и HLA-G и могут индуцировать клетки Tr1. Взаимодействие молекул ILT4/HLA-G на ДК увеличивает выработку IL-10 этими клетками, что в свою очередь стимулирует экспрессию ILT4 и HLA-G на других ДК [161]. Также, несколькими исследованиями был описан контактно-независимый иммуносупрессивный механизм IL-10-продуцирующих ДК, который включает ингибирование активации Т-клеток [66, 67], вмешиваясь в передачу сигналов Т-клеточного рецептора, и в конечном итоге приводя к индукции Т-рег за счет продукции IDO [68]. Таким образом, продукция IL-10 полученными ДК может свидетельствовать в пользу их толерогенного потенциала.

В результате использования разработанного протокола были получены трансфицированные ДК, экспрессирующие достоверно повышенные уровни рецептора хемокина CCR9 (рисунок 8). В настоящее время мало что известно о присутствии или функциональном влиянии CCR9 именно на миелоидные ДК.

Однако существуют данные о том, что ДК, экспрессирующие высокие уровни CCR9, являются менее зрелыми, чем ДК, экспрессирующие низкие уровни CCR9 [163]. Это связано с тем, что повышенная экспрессия CCR9 на ДК приводит к снижению экспрессии МНС II и CD86 на ДК [164]. CCR9 может также использовать механизм для предотвращения созревания ДК путем ингибирования сборки домена V-АТФазы или активации пути NFκB для регуляции секреции TSLP [165, 166]. TSLP - молекула, которая, как известно, секретируется ДК и способствует индукции Т-рег [167]. Согласно нашим данным, CCR9⁺ДК обладали достоверно сниженными уровнями экспрессии маркеров созревания ДК (рисунок 7). Стоит отметить, что все ДК, подвергшиеся трансфекции, даже пустой плазмидой р5, обладали незрелым фенотипом, по сравнению с ДК без трансфекции, которые оказались зрелыми. Возможно, такая разница в данных связана с самим методом доставки экзогенной ДНК - трансфекцией методом электропорации, которая сама по себе может приводить к сохранению незрелого фенотипа ДК в нашем протоколе. Существуют данные о том, что помимо влияния на ДК, CCR9 может с помощью внутренней сигнализации в ДК влиять на дифференцировку регуляторных Foxp3⁺CD4⁺-Т-клеток, влиять на продукцию IL-2 [168]. На рисунке 8 видно, что трансфекция ДНК-конструкцией, кодирующей CCR9, привела к достоверному увеличению экспрессии данного хемокина в группах, где использовалась данная конструкция. Хотя процент увеличился всего до 4%, это может показаться недостаточным количеством для реализации задуманных реакций. Однако согласно литературным данным обычно трансфицируется небольшая часть ДК, но это приводит к общей активации всех ДК, обнаруженных в дренирующих лимфатических узлах, обеспечивая тем самым оптимальные условия для эффективной активации Т-рег [169].

Таким образом, применяя данный оригинальный протокол с одновременным использованием трансфекции ДК, ДНК-конструкциями, кодирующими IL-10 и CCR9, мы получили ДК, обладающие толерогенным потенциалом, что подтверждается пониженным содержанием клеток с экспрессией маркеров

зрелости CD80, CD86 и H-2Db, повышенной экспрессией CCR9, а также способностью к повышенной продукции IL-10.

Далее мы исследовали миграционный потенциал полученных ДК. Важно отметить, что в данной работе были использованы миелоидные ДК, которые после трансфекции ДНК-конструкцией, кодирующей CCR9, продемонстрировали достоверно высокий потенциал для миграции к клеткам тимуса по сравнению с нетрансфицированными ДК (рисунок 14). Подобные исследования ранее не были описаны в научной литературе. В дальнейшем полученные клетки были протестированы в условиях совместного культивирования с клетками тимуса с целью оценить способность ДК, трансфицированных ДНК-конструкцией, кодирующей CCR9, к индукции Т-рег. Было показано, что CCR9⁺ ДК способствовали образованию Т-рег клеток (рисунок 15) в данных условиях со-культивирования.

Также известно, что миелоидные ДК являются клетками, экспрессирующими CCR7, который способствует миграции ДК к лимфатическим узлам, что и было показано в нашем эксперименте. Учитывая описанные данные, ДК, трансфицированные ДНК-конструкцией, кодирующей рецептор хемокина CCR9, обладали миграционным потенциалом к клеткам тимуса, лимфатических узлов и способностью к индукции Т-рег при со-культивировании с клетками тимуса. Тем самым, мы можем предполагать, что косвенно могут затрагиваться механизмы не только периферической иммунной толерантности, но и центральной.

Затем нам потребовалось проверить способны ли ДК, созданные по описанному протоколу к индукции Т-рег при со-культивировании со спленоцитами, и какой механизм может этому способствовать. Наше исследование показало, что в со-культуре ДК и CD4⁺ достоверно увеличивалось количество клеток, продуцирующих IL-10 в группах ДКpIL-10, ДКpIL-10+pCII и ДКpIL-10+pCII+pCCR9, и достоверно увеличивалось количество клеток, продуцирующих TGF-β в группах ДКpIL-10 и ДКpIL-10+pCII+pCCR9, т.е. в группах как неспецифических ДК, так и антиген-специфических ДК (рисунок 12). Интересно, что достоверное увеличенное содержание Т-рег было получено в тех же группах:

ДКpIL-10, ДКpIL-10+pCII+pCCR9, по сравнению с другими группами (рисунок 12). Известно, что TGF- β и IL-10 являются важными молекулами, которые участвуют в генерации Т-рег [170]. TGF- β особенно важен для баланса иммунного ответа. Он подавляет активность Т-клеток, что необходимо для поддержания иммунной толерантности и гомеостаза [171, 172]. Исследования показывают, что TGF- β стимулирует образование и поддержание Т-рег, которые являются основными регуляторами иммунной системы [172, 173]. IL-10, с другой стороны, действует как другой ключевой регулятор иммунной системы [173]. Он ограничивает воспалительные реакции, которые могут привести к повреждению тканей, что особенно важно для поддержания иммунного гомеостаза. IL-10 экспрессируется различными иммунными клетками, включая Т-рег. Его сигнальные компоненты необходимы для контроля иммунных реакций в зависимости от контекста. Это делает IL-10 критическим фактором иммунной регуляции [172, 174]. Синергия между TGF- β и IL-10 в модуляции иммунных реакций, особенно в создании и функционировании Т-рег, подчёркивает их важность в поддержании баланса иммунной системы и предотвращении аутоиммунных реакций [174, 175]. Анализируя уровень пролиферации CD4⁺лимфоцитов в ответ на антиген (рисунок 15), в группе неспецифических Т-рег уровень пролиферации был снижен относительно контроля. В группе антиген-специфических Т-рег было обнаружено подавление пролиферативной активности CD4⁺лимфоцитов, причем достоверно более низкий уровень по сравнению с НеАгТ-рег, и равный контролю без добавления коллагена. Таким образом, можно предположить возникновение антиген-специфической толерантности в нашем эксперименте. Однако интересно, что обе группы ДКpIL-10 и ДКpIL-10+pCII+pCCR9 вызывают индукцию FoxP3⁺ Т-рег. ДК, трансфицированные pIL-10, также могут восстанавливать иммунную толерантность. Однако это происходит за счёт неспецифического подавления иммунных реакций (в результате воздействия IL-10 и индукции поликлонального пула Т-рег), что может иметь определённые побочные эффекты.

Таким образом, ДК, трансфицированные ДНК-конструкциями, кодирующими IL-10, CCR9 и эпитопы коллагена II типа, индуцируя Т-рег и увеличивая количество CD4⁺лимфоцитов, продуцирующих IL-10 и TGF- β в совместной культуре ДК и спленоцитов, а также подавляя пролиферативную активность CD4⁺Т-клеток в ответ на антиген, обладают антиген-специфическим толерогенным потенциалом.

Следующим этапом работы была оценка эффективности трансфицированных ДК. Модели артрита на мышах - незаменимые инструменты для разработки новых методов терапии. Для настоящего исследования была выбрана модель АКИА, так как по данным литературы, она наиболее точно имитирует патогенез РА у мышей линии Balb/c [156]. При индукции артрита было отработано несколько протоколов, для получения модели с наиболее выраженными клиническими и патологическими изменениями [176]. По результатам эксперимента была выбрана классическая модель, позволяющая получить стабильный результат с увеличением припухлостей лап (рисунок 16), возрастанием антител к коллагену II типа (рисунок 17), и гистологическими изменениями, подобными РА (рисунок 18).

Введение толДК лабораторным животным с антиген-коллаген индуцированным артритом производилось внутривенным способом, так как выбранная модель артрита является системно-индуцированной, и локального введения ДК могло быть недостаточно для получения эффекта. Внутривенное введение также проводилось в связи с планированием задействовать не только периферические механизмы толерантности, но и центральные. Существует несколько периодов введения препаратов в животных моделях: лечебный, при первых клинических признаках артрита, и профилактический - на 28 сутки от начала иммунизации. Нами был выбран лечебный период, и определен срок появления первых клинических проявлений на этапе отработки моделей - 7 сутки от индукции локального артрита (5 недель после первой иммунизации). Согласно литературным данным, исследование эффективности проводимой терапии регистрируется через 1 и 2 недели после начала лечения.

Были сформированы следующие группы: ДКpIL10, ДКpIL10+pCII, ДКpCCR9+pCII+pIL10, ДКpCCR9+pCII и 2 контрольные группы – группа без лечения, с введением раствора натрия хлорида, и группа ДКp5.

Введение толДК, одновременно трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими эпитопы коллагена II типа, IL-10 и CCR9, лабораторным животным с антиген-коллаген индуцированным артритом, позволяло снизить выраженность припухлости лап экспериментальных мышей (рисунок 19), уменьшить уровень антител к коллагену II типа (рисунок 20) и патологические изменения тканей суставов (рисунок 21). Причем группа ДКpCCR9+pCII+pIL10 показала наиболее низкие уровни параметров патогенетического течения и отсутствие патологических изменений на 14 сутки после введения лечения при гистологическом исследовании. Мы можем предполагать именно антиген-специфическое подавление, поскольку группа ДКpCCR9+pCII+pIL10 показала наиболее низкий уровень антител к коллагену II типа по сравнению с остальными группами, как на 7 сутки, так и на 14 сутки, а при гистологическом исследовании на 14 сутки лечения – отсутствие патологических изменений в тканях суставов.

Группа с неспецифическим подавлением ДКpIL-10 показала достоверное снижение выраженности припухлостей лап, то есть оказала влияние на клинический параметр активности артрита. Также, при исследовании гистологических данных, был показан эффект группы ДКpIL-10 на 7 сутки лечения, без сохранения эффекта на 14 сутки. Однако при исследовании уровня антител к коллагену II типа в сыворотке лабораторных животных, группа ДКpIL-10 не вызвала снижение количества антител. Таким образом, группа ДКpIL-10 за счет неспецифического подавления иммунных реакций может оказывать ранний положительный эффект, но не вызывает снижение количества антител, и не способна сохранить эффект и оказать его в должном объеме для купирования патологического процесса.

В результате проведенных экспериментов, можно заключить, что введение толДК, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими эпитопы коллагена II типа, IL-10 и CCR9, лабораторным животным с антиген-коллаген

индуцированным артритом, позволяет снизить выраженность припухлости лап экспериментальных животных, уменьшить уровень антител к коллагену II типа и нивелировать гистологические изменения, что может говорить об антиген-специфическом подавлении данной патологической реакции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной работе был разработан оригинальный протокол получения ДК, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими IL-10, CCR9 и эпитопы коллагена II типа, обладающих толерогенным потенциалом, что подтверждается пониженным содержанием клеток с экспрессией маркеров зрелости CD80, CD86 и H-2Db, повышенной экспрессией CCR9, а также способностью к повышенной продукции IL-10.

Потенциал к подавлению аутоиммунных реакций полученными ДК клетками проявлялся в их способности к генерации Т-рег, продукции IL-10 и TGF- β CD4⁺ лимфоцитами, и угнетении пролиферативной активности при их совместном культивировании. При этом был продемонстрирован разный характер подавления иммунных реакций. Группа ДКpIL-10 показала неспецифический иммуносупрессивный эффект, а группа ДКpIL-10+pCII+pCCR9, в свою очередь, антиген-специфическое подавление пролиферативной активности CD4⁺лимфоцитов в ответ на антиген. Уровень антиген-специфического подавления оказался более высоким, так как наблюдалось снижение пролиферативной активности до уровня группы контроля без добавления коллагена.

Как показало данное исследование, трансфекция ДНК-конструкцией, кодирующей CCR9, приводит к тому, что ДК приобретают более высокий миграционный потенциал по отношению к тимическим клеткам, чем нетрансфицированные ДК. А также CCR9⁺ДК способствуют индукции Т-рег клеток при совместном культивировании с тимоцитами.

Введение лабораторным животным с антиген-коллаген индуцированным артритом модифицированных толДК привело к снижению выраженности припухлости лап, уменьшению уровня антител к коллагену II типа и патологических изменений тканей суставов. Наиболее выраженный эффект наблюдался в группе ДКpCCR9+pCII+pIL10, где к 14 суткам после введения уже не обнаруживалось патологических изменений, а также снижался уровень антител

к коллагену II типа. Группа ДКpIL-10 показала снижение выраженности припухлостей лап, что повлияло на припухлость лап лабораторных животных. При исследовании уровня антител к коллагену II типа в сыворотке, группа ДКpIL-10 не вызвала его снижение. Таким образом, группа ДКpIL-10 может оказывать ранний положительный эффект, но не способна сохранить его для купирования патологической реакции.

В заключение следует отметить, что ДК, трансфицированные ДНК-конструкциями, кодирующими эпитопы коллагена II типа, IL-10 и CCR9, способствуют развитию антиген-специфической толерантности, контролируют воспаление и уменьшают тяжесть экспериментального артрита за счет исследованных механизмов: индукции Т-регуляторных клеток, IL-10, TGF- β .

В исследовании представлен подход, позволяющий модулировать иммунные реакции и воздействовать на аутоиммунные заболевания при помощи ДК, трансфицированных ДНК-конструкциями.

ВЫВОДЫ

1. Трансфекция дендритных клеток, ДНК-конструкциями, кодирующими IL-10, CCR9 и коллаген II типа, способствует снижению уровней экспрессии маркеров зрелости CD80, CD86 и H-2Db, повышению экспрессии CCR9, а также продукции IL-10, что говорит об толерогенном фенотипе полученных дендритных клеток.
2. Трансфекция дендритных клеток, ДНК конструкцией, кодирующей рецептор хемокина CCR9, приводит к повышению миграционной способности к клеткам тимуса *in vitro*, а также к индукции Т-регуляторных при со-культивировании с клетками тимуса, что указывает на миграционный и толерогенный потенциал полученных дендритных клеток.
3. Дендритные клетки, трансфицированные ДНК-конструкциями, кодирующими IL-10, CCR9 и эпитопы коллагена II типа, способны к генерации Т-рег, CD4⁺Т-клеток, продуцирующих IL-10 и TGF- β в совместной культуре ДК и спленоцитов, а также к подавлению пролиферативной активности CD4⁺Т-клеток в ответ на антиген, что свидетельствует об антиген-специфическом толерогенном действии.
4. Введение толерогенных дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими IL-10, CCR9 и эпитопы коллагена II типа, лабораторным животным с антиген-коллаген индуцированным артритом, позволяет снизить выраженность припухлости лап экспериментальных животных, уменьшить уровень антител к коллагену II типа и вызвать регресс гистологических изменений, что может говорить об антиген-специфическом подавлении данной патологической реакции.
5. Дендритные клетки, трансфицированные ДНК-конструкциями, кодирующими IL-10, CCR9 и эпитопы коллагена II типа, способны к индукции антиген-специфической толерантности в модели антиген-коллаген индуцированного артрита, посредством генерации Т-регуляторных клеток, продукции IL-10 и TGF- β CD4⁺Т-клетками, и подавлению коллаген-

индуцированной пролиферативной активности $CD4^+$ T-клеток, и вызывают уменьшение припухлости лап мышей, снижают уровень антител к коллагену II типа и восстанавливают нормальную гистологическую картину суставов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АИЗ - аутоиммунные заболевания

АКИА - антиген-коллаген индуцированный артрит

АПК - антигенпрезентирующие клетки

ДК - дендритные клетки

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

ККМ - клетки костного мозга

МНС - главный комплекс гистосовместимости

РА - ревматоидный артрит

СII - коллаген II типа

Т-рег - Т-регуляторные клетки

ТолДК - толерогенные дендритные клетки

ЭП - электропорация

CAR - химерные антигенные рецепторы

CCR9- рецептор хемокина 9

CD - кластер дифференцировки

GM-CSF - гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

НО-1 - гемоксигеназа-1

IDO - индолеамин-2,3-диоксигеназа

IL – интерлейкин

P5 - ДНК-конструкция, некодирующая

PD-1 - рецептор программируемой клеточной гибели 1

PD-L1 и 2 - лиганд к рецептору программированной клеточной смерти-1 и 2

TCR Т-клеточный рецептор

TGF- β - трансформирующий фактор роста бегта

pCCR9 - ДНК-конструкция, кодирующая CCR9

pCII - ДНК-конструкция, кодирующая коллаген II типа

pIL10 - ДНК-конструкция, кодирующая IL10

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Weyand C. M., Goronzy J. J. The immunology of rheumatoid arthritis //Nature immunology. – 2021. – Т. 22. – №. 1. – С. 10-18.
2. Lortholary O. et al. Infectious complications of rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis during targeted and biological therapies: a viewpoint in 2020 //Annals of the rheumatic diseases. – 2020. – Т. 79. – №. 12. – С. 1532-1543.
3. Huss V. et al. Short-and longer-term cancer risks with biologic and targeted synthetic disease-modifying antirheumatic drugs as used against rheumatoid arthritis in clinical practice //Rheumatology. – 2022. – Т. 61. – №. 5. – С. 1810-1818.
4. Scottà C. et al. Impact of immunosuppressive drugs on the therapeutic efficacy of ex vivo expanded human regulatory T cells //Haematologica. – 2016. – Т. 101. – №. 1. – С. 91.
5. Greenberg J. D. et al. Association of methotrexate and tumour necrosis factor antagonists with risk of infectious outcomes including opportunistic infections in the CORRONA registry //Annals of the rheumatic diseases. – 2010. – Т. 69. – №. 2. – С. 380-386.
6. Durcan L., O'Dwyer T., Petri M. Management strategies and future directions for systemic lupus erythematosus in adults //The Lancet. – 2019. – Т. 393. – №. 10188. – С. 2332-2343.
7. Fucikova J. et al. Induction of tolerance and immunity by dendritic cells: mechanisms and clinical applications //Frontiers in immunology. – 2019. – Т. 10. – С. 485788.
8. Machen J. et al. Antisense oligonucleotides down-regulating costimulation confer diabetes-preventive properties to nonobese diabetic mouse dendritic cells //The Journal of Immunology. – 2004. – Т. 173. – №. 7. – С. 4331-4341.
9. Benham H. et al. Citrullinated peptide dendritic cell immunotherapy in HLA risk genotype-positive rheumatoid arthritis patients //Science translational medicine. – 2015. – Т. 7. – №. 290. – С. 290ra87-290ra87.

10. Bell G. M. et al. Autologous tolerogenic dendritic cells for rheumatoid and inflammatory arthritis //Annals of the rheumatic diseases. – 2017. – Т. 76. – №. 1. – С. 227-234.
11. Kurilin V. et al. Dendritic cells transfected with a polyepitope DNA construct stimulate an antitumor cytotoxic response in various tumors //Molecular and Clinical Oncology. – 2022. – Т. 17. – №. 5. – С. 1-9.
12. Kulikova E. V. et al. Dendritic Cells Transfected with a DNA Construct Encoding Tumour-associated Antigen Epitopes Induce a Cytotoxic Immune Response Against Autologous Tumour Cells in a Culture of Mononuclear Cells from Colorectal Cancer Patients //Scandinavian Journal of Immunology. – 2015. – Т. 82. – №. 2. – С. 110-117.
13. Хантакова Ю.Н. Влияние дендритных клеток, трансфицированных полиэпитопными ДНК-конструкциями, на индукцию цитотоксического ответа культуры моноклеарных клеток больных раком молочной железы: дис. ...канд.мед.наук 14.03.09/ Хантакова Ю.Н. – Новосибирск, 2016. -121 с.
14. Mansilla M. J., Hilkens C. M. U., Martínez-Cáceres E. M. Challenges in tolerogenic dendritic cell therapy for autoimmune diseases: the route of administration //Immunotherapy Advances. – 2023. – Т. 3. – №. 1. – С. 124012.
15. Kulkarni N., Pathak M., Lal G. Role of chemokine receptors and intestinal epithelial cells in the mucosal inflammation and tolerance //Journal of Leucocyte Biology. – 2017. – Т. 101. – №. 2. – С. 377-394..
16. Wurbel M. A. et al. The chemokine TECK is expressed by thymic and intestinal epithelial cells and attracts double-and single-positive thymocytes expressing the TECK receptor CCR9 //European journal of immunology. – 2000. – Т. 30. – №. 1. – С. 262-271.
17. Uehara S. et al. A role for CCR9 in T lymphocyte development and migration //The Journal of Immunology. – 2002. – Т. 168. – №. 6. – С. 2811-2819.
18. Pathak M., Lal G. The regulatory function of CCR9+ dendritic cells in inflammation and autoimmunity //Frontiers in immunology. – 2020. – Т. 11. – С. 536326.
19. Pathak M. et al. CCR9 signaling in dendritic cells drives the differentiation of Foxp3+ Tregs and suppresses the allergic IgE response in the gut //European Journal of Immunology. – 2020. – Т. 50. – №. 3. – С. 404-417.

20. Ellis J. A., Kemp A. S., Ponsonby A. L. Gene–environment interaction in autoimmune disease //Expert Reviews in Molecular Medicine. – 2014. – T. 16. – C. e4.
21. Lleo A. et al. Definition of human autoimmunity—autoantibodies versus autoimmune disease //Autoimmunity reviews. – 2010. – T. 9. – №. 5. – C. A259-A266.
22. Buckner J. H. Mechanisms of impaired regulation by CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ regulatory T cells in human autoimmune diseases //Nature Reviews Immunology. – 2010. – T. 10. – №. 12. – C. 849-859.
23. Rosenblum M. D. et al. Mechanisms of human autoimmunity //The Journal of clinical investigation. – 2015. – T. 125. – №. 6. – C. 2228-2233.
24. Riva A., Chokshi S. Immune checkpoint receptors: homeostatic regulators of immunity //Hepatology international. – 2018. – T. 12. – №. 3. – C. 223-236.
25. Belkaid Y., Hand T. W. Role of the microbiota in immunity and inflammation //Cell. – 2014. – T. 157. – №. 1. – C. 121-141.
26. Huntington N. D., Gray D. H. D. Immune homeostasis in health and disease //Immunology and Cell Biology. – 2018. – T. 96. – №. 5. – C. 451-452.
27. Theofilopoulos A. N., Kono D. H., Baccala R. The multiple pathways to autoimmunity //Nature immunology. – 2017. – T. 18. – №. 7. – C. 716-724.
28. Bluestone J. A., Anderson M. Tolerance in the age of immunotherapy //New England Journal of Medicine. – 2020. – T. 383. – №. 12. – C. 1156-1166.
29. Gallimore A. et al. Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus–specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class I–peptide complexes //The Journal of experimental medicine. – 1998. – T. 187. – №. 9. – C. 1383-1393.
30. Wherry E. J. et al. Antigen-independent memory CD8 T cells do not develop during chronic viral infection //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2004. – T. 101. – №. 45. – C. 16004-16009.
31. Meng X. et al. Immunological mechanisms of tolerance: Central, peripheral and the role of T and B cells //Asia Pacific Allergy. – 2023. – T. 13. – №. 4. – C. 175-186.
32. Steinman R. M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity //Annual review of immunology. – 1991. – T. 9. – №. 1. – C. 271-296.

33. Moorman C. D., Sohn S. J., Phee H. Emerging therapeutics for immune tolerance: tolerogenic vaccines, T cell therapy, and IL-2 therapy //Frontiers in immunology. – 2021. – T. 12. – C. 657768.
34. Domogalla M. P. et al. Tolerance through education: how tolerogenic dendritic cells shape immunity //Frontiers in immunology. – 2017. – T. 8. – C. 315167.
35. Yogev N. et al. Dendritic cells ameliorate autoimmunity in the CNS by controlling the homeostasis of PD-1 receptor+ regulatory T cells //Immunity. – 2012. – T. 37. – №. 2. – C. 264-275.
36. Luo X., Miller S. D., Shea L. D. Immune tolerance for autoimmune disease and cell transplantation //Annual review of biomedical engineering. – 2016. – T. 18. – C. 181-205.
37. Shen Z. et al. Effects of mesenchymal stem cell-derived exosomes on autoimmune diseases //Frontiers in immunology. – 2021. – T. 12. – C. 749192.
38. Dominici M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement //Cytotherapy. – 2006. – T. 8. – №. 4. – C. 315-317.
39. Ding D. C., Shyu W. C., Lin S. Z. Mesenchymal stem cells //Cell transplantation. – 2011. – T. 20. – №. 1. – C. 5-14.
40. Abumaree M. et al. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells //Stem Cell Reviews and Reports. – 2012. – T. 8. – C. 375-392.
41. P De Miguel M. et al. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications //Current molecular medicine. – 2012. – T. 12. – №. 5. – C. 574-591.
42. Qi J. et al. Mesenchymal stem cells inhibited the differentiation of MDSCs via COX2/PGE2 in experimental sialadenitis //Stem cell research & therapy. – 2020. – T. 11. – C. 1-11.
43. Putra A. et al. The role of TNF- α induced MSCs on suppressive inflammation by increasing TGF- β and IL-10 //Open access Macedonian journal of medical sciences. – 2018. – T. 6. – №. 10. – C. 1779.

44. Zhang Z. et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells inhibit T follicular helper cell expansion through the activation of iNOS in lupus-prone B6. MRL-Fas^{lpr} mice //Cell Transplantation. – 2017. – T. 26. – №. 6. – C. 1031-1042.
45. Che N. et al. Impaired B cell inhibition by lupus bone marrow mesenchymal stem cells is caused by reduced CCL2 expression //The Journal of Immunology. – 2014. – T. 193. – №. 10. – C. 5306-5314.
46. Kim D. S. et al. Enhanced immunosuppressive properties of human mesenchymal stem cells primed by interferon- γ //EBioMedicine. – 2018. – T. 28. – C. 261-273.
47. Park M. J. et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells induce expansion of interleukin-10-producing regulatory B cells and ameliorate autoimmunity in a murine model of systemic lupus erythematosus //Cell Transplantation. – 2015. – T. 24. – №. 11. – C. 2367-2377.
48. Davies L. C. et al. Mesenchymal stromal cell secretion of programmed death-1 ligands regulates T cell mediated immunosuppression //Stem cells. – 2017. – T. 35. – №. 3. – C. 766-776.
49. Nauta A. J., Fibbe W. E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells //Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2007. – T. 110. – №. 10. – C. 3499-3506.
50. Shandil R. K. et al. Evaluation of the therapeutic potential of mesenchymal stem cells (MSCs) in preclinical models of autoimmune diseases //Stem Cells International. – 2022. – T. 2022.
51. Zaripova L. N. et al. Mesenchymal Stem Cells in the Pathogenesis and Therapy of Autoimmune and Autoinflammatory Diseases //International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – T. 24. – №. 22. – C. 16040.
52. Wang D. et al. Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation in active and refractory systemic lupus erythematosus: a multicenter clinical study //Arthritis research & therapy. – 2014. – T. 16. – C. 1-14.
53. Deng D. Q. et al. A randomised double-blind, placebo-controlled trial of allogeneic umbilical cord-derived mesenchymal stem cell for lupus nephritis //Annals of the rheumatic diseases. – 2017. – T. 76. – №. 8. – C. 1436-1439.

54. Baranovskii D. S. et al. Adverse events, side effects and complications in mesenchymal stromal cell-based therapies //Stem Cell Investigation. – 2022. – Т. 9.
55. Lu Y. et al. Highly effective rheumatoid arthritis therapy by peptide-promoted nanomodification of mesenchymal stem cells //Biomaterials. – 2022. – Т. 283. – С. 121474.
56. Steinman R. M., Hawiger D. Nussenzweig, M. c //Tolerogenic dendritic cells. Annu Rev Immunol. – 2003. – Т. 21. – С. 685-711.
57. Amodio G., Gregori S. Dendritic cells a double-edge sword in autoimmune responses //Frontiers in immunology. – 2012. – Т. 3. – С. 27808.
58. Сенников С. В. и др. Молекулярно-клеточные механизмы, опосредуемые дендритными клетками, участвующие в индукции толерантности //Медицинская иммунология. – 2017. – Т. 19. – №. 4. – С. 359-374.
59. Фишер М. С., Сенников С. В. Клеточные технологии в иммунотерапии аутоиммунных заболеваний //Иммунология. – 2023. – Т. 44. – №. 6. – С. 813-824.
60. Hasegawa H., Matsumoto T. Mechanisms of tolerance induction by dendritic cells in vivo //Frontiers in immunology. – 2018. – Т. 9. – С. 318281.
61. Hawiger D. et al. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo //The Journal of experimental medicine. – 2001. – Т. 194. – №. 6. – С. 769-780.
62. Stallone G. et al. Rapamycin induces ILT3highILT4high dendritic cells promoting a new immunoregulatory pathway //Kidney International. – 2014. – Т. 85. – №. 4. – С. 888-897.
63. Chang C. C. et al. Tolerization of dendritic cells by TS cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4 //Nature immunology. – 2002. – Т. 3. – №. 3. – С. 237-243.
64. Bohana-Kashtan O., Civin C. I. Fas ligand as a tool for immunosuppression and generation of immune tolerance //Stem Cells. – 2004. – Т. 22. – №. 6. – С. 908-924.
65. Del Rio M. L. et al. PD-1/PD-L1, PD-1/PD-L2, and other co-inhibitory signaling pathways in transplantation //Transplant International. – 2008. – Т. 21. – №. 11. – С. 1015-1028.

66. Prins J. R. et al. Unstable Foxp3⁺ regulatory T cells and altered dendritic cells are associated with lipopolysaccharide-induced fetal loss in pregnant interleukin 10-deficient mice //Biology of reproduction. – 2015. – Т. 93. – №. 4. – С. 95, 1-14.
67. Sanjabi S., Oh S. A., Li M. O. Regulation of the immune response by TGF- β : from conception to autoimmunity and infection //Cold Spring Harbor perspectives in biology. – 2017. – Т. 9. – №. 6. – С. a022236.
68. Mellor A. L., Munn D. H. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism //Nature Reviews Immunology. – 2004. – Т. 4. – №. 10. – С. 762-774.
69. Wong T. H. et al. Heme oxygenase-1-expressing dendritic cells promote Foxp3⁺ regulatory T cell differentiation and induce less severe airway inflammation in murine models //PloS one. – 2016. – Т. 11. – №. 12. – С. e0168919.
70. Marin E. et al. Human tolerogenic dendritic cells regulate immune responses through lactate synthesis //Cell metabolism. – 2019. – Т. 30. – №. 6. – С. 1075-1090. e8.
71. Сенников С. В., Облеухова И. А. Методы индукции толерогенных дендритных клеток у животных и человека //Иммунология. – 2016. – Т. 37. – №. 5. – С. 291-296.
72. Ip W. K., Lau Y. L. Distinct maturation of, but not migration between, human monocyte-derived dendritic cells upon ingestion of apoptotic cells of early or late phases //The Journal of Immunology. – 2004. – Т. 173. – №. 1. – С. 189-196.
73. Akbari O. et al. DNA vaccination: transfection and activation of dendritic cells as key events for immunity //The Journal of experimental medicine. – 1999. – Т. 189. – №. 1. – С. 169-178.
74. Pappalardo J. S. et al. In vitro transfection of bone marrow-derived dendritic cells with TATp-liposomes //International journal of nanomedicine. – 2014. – С. 963-973.
75. Moreau A. et al. A Phase I/IIa study of autologous tolerogenic dendritic cells immunotherapy in kidney transplant recipients //Kidney International. – 2023. – Т. 103. – №. 3. – С. 627-637.
76. Zubizarreta I. et al. Immune tolerance in multiple sclerosis and neuromyelitis optica with peptide-loaded tolerogenic dendritic cells in a phase 1b trial //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2019. – Т. 116. – №. 17. – С. 8463-8470.

77. Ferreira G. B. et al. Vitamin D3 induces tolerance in human dendritic cells by activation of intracellular metabolic pathways //Cell reports. – 2015. – T. 10. – №. 5. – C. 711-725.
78. Hilkens C. M. U., Isaacs J. D., Thomson A. W. Development of dendritic cell-based immunotherapy for autoimmunity //International reviews of immunology. – 2010. – T. 29. – №. 2. – C. 156-183.
79. Schmetterer K. G., Neunkirchner A., Pickl W. F. Naturally occurring regulatory T cells: markers, mechanisms, and manipulation //The FASEB Journal. – 2012. – T. 26. – №. 6. – C. 2253-2276.
80. Yuan X., Cheng G., Malek T. R. The importance of regulatory T-cell heterogeneity in maintaining self-tolerance //Immunological reviews. – 2014. – T. 259. – №. 1. – C. 103-114.
81. Brincks E. L. et al. Antigen-specific memory regulatory CD4⁺ Foxp3⁺ T cells control memory responses to influenza virus infection //The Journal of Immunology. – 2013. – T. 190. – №. 7. – C. 3438-3446.
82. Liesz A. et al. Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke //Nature medicine. – 2009. – T. 15. – №. 2. – C. 192-199.
83. Sanchez A. M. et al. The development and function of memory regulatory T cells after acute viral infections //The Journal of immunology. – 2012. – T. 189. – №. 6. – C. 2805-2814.
84. Zhang R., Miao J., Zhu P. Regulatory T cell heterogeneity and therapy in autoimmune diseases //Autoimmunity reviews. – 2021. – T. 20. – №. 5. – C. 102715.
85. Shevyrev D., Tereshchenko V. Treg heterogeneity, function, and homeostasis //Frontiers in immunology. – 2020. – T. 10. – C. 495736.
86. Josefowicz S. Z., Lu L. F., Rudensky A. Y. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function //Annual review of immunology. – 2012. – T. 30. – C. 531-564.
87. Bilate A. M., Lafaille J. J. Induced CD4⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells in immune tolerance //Annual review of immunology. – 2012. – T. 30. – C. 733-758.

88. Сенников С. В., Хантакова Ю. Н., Кнауэр Н. Ю. Клеточная Т-регуляторная терапия в трансплантологии: от получения до клинического применения //Бюллетень сибирской медицины. – 2018. – Т. 17. – №. 1. – С. 199-210.
89. Read S., Malmström V., Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25⁺ CD4⁺ regulatory cells that control intestinal inflammation //The Journal of experimental medicine. – 2000. – Т. 192. – №. 2. – С. 295-302.
90. Gorelik L., Constant S., Flavell R. A. Mechanism of transforming growth factor β -induced inhibition of T helper type 1 differentiation //The Journal of experimental medicine. – 2002. – Т. 195. – №. 11. – С. 1499-1505.
91. Collison L. W. et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function //Nature. – 2007. – Т. 450. – №. 7169. – С. 566-569.
92. Deaglio S. et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression //The Journal of experimental medicine. – 2007. – Т. 204. – №. 6. – С. 1257-1265.
93. Fan M. Y. et al. Differential roles of IL-2 signaling in developing versus mature Tregs //Cell reports. – 2018. – Т. 25. – №. 5. – С. 1204-1213. e4.
94. Sakaguchi S. et al. Regulatory T cells and immune tolerance //cell. – 2008. – Т. 133. – №. 5. – С. 775-787.
95. Vignali D. A. A., Collison L. W., Workman C. J. How regulatory T cells work //Nature reviews immunology. – 2008. – Т. 8. – №. 7. – С. 523-532.
96. Gotot J. et al. Regulatory T cells use programmed death 1 ligands to directly suppress autoreactive B cells in vivo //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2012. – Т. 109. – №. 26. – С. 10468-10473.
97. Trzonkowski P. et al. First-in-man clinical results of the treatment of patients with graft versus host disease with human ex vivo expanded CD4⁺ CD25⁺ CD127⁻ T regulatory cells //Clinical immunology. – 2009. – Т. 133. – №. 1. – С. 22-26.
98. Desreumaux P. et al. Safety and efficacy of antigen-specific regulatory T-cell therapy for patients with refractory Crohn's disease //Gastroenterology. – 2012. – Т. 143. – №. 5. – С. 1207-1217. e2.

99. Marek-Trzonkowska N. et al. Therapy of type 1 diabetes with CD4+CD25highCD127-regulatory T cells prolongs survival of pancreatic islets—Results of one year follow-up //Clinical immunology. – 2014. – Т. 153. – №. 1. – С. 23-30.
100. Marek-Trzonkowska N. et al. Factors affecting long-term efficacy of T regulatory cell-based therapy in type 1 diabetes //Journal of translational medicine. – 2016. – Т. 14. – С. 1-11.
101. Bluestone J. A. et al. Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells //Science translational medicine. – 2015. – Т. 7. – №. 315. – С. 315ra189-315ra189.
102. Dall'Era M. et al. Adoptive Treg cell therapy in a patient with systemic lupus erythematosus //Arthritis & Rheumatology. – 2019. – Т. 71. – №. 3. – С. 431-440.
103. Baeten P. et al. Improving the efficacy of regulatory T cell therapy //Clinical reviews in allergy & immunology. – 2021. – С. 1-19.
104. Булыгин А.С., Хантакова Ю.Н., Фишер М.С., Терещенко В.П., Курилин В.В., Шкаруба Н.С., Сенников С.В. Получение стабильных антиген-специфических Т-регуляторных клеток с помощью блокаторов циклин-зависимых киназ //Иммунология. – 2023. – Т. 44. – №. 2. – С. 147-156.
105. Raffin C., Vo L. T., Bluestone J. A. Treg cell-based therapies: challenges and perspectives //Nature Reviews Immunology. – 2020. – Т. 20. – №. 3. – С. 158-172.
106. Bittner S., Hehlhans T., Feuerer M. Engineered Treg cells as putative therapeutics against inflammatory diseases and beyond //Trends in Immunology. – 2023.
107. 43. Fransson M. et al. CAR/FoxP3-engineered T regulatory cells target the CNS and suppress EAE upon intranasal delivery //Journal of neuroinflammation. – 2012. – Т. 9. – С. 1-12.
108. Boulougoura A. et al. Journal Club: Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy for Refractory Systemic Lupus Erythematosus. – 2023.
109. Müller F. et al. CD19 CAR T-Cell Therapy in Autoimmune Disease—A Case Series with Follow-up //New England Journal of Medicine. – 2024. – Т. 390. – №. 8. – С. 687-700.

110. Maldini C. R., Ellis G. I., Riley J. L. CAR T cells for infection, autoimmunity and allotransplantation //Nature Reviews Immunology. – 2018. – T. 18. – №. 10. – C. 605-616.
111. Amini L. et al. CRISPR-Cas9-edited tacrolimus-resistant antiviral T cells for advanced adoptive immunotherapy in transplant recipients //Molecular Therapy. – 2021. – T. 29. – №. 1. – C. 32-46.
112. Amini L. et al. Super-Treg: toward a new era of adoptive Treg therapy enabled by genetic modifications //Frontiers in Immunology. – 2021. – T. 11. – C. 611638.
113. Chasov V. et al. Immunotherapy Strategy for Systemic Autoimmune Diseases: Betting on CAR-T Cells and Antibodies //Antibodies. – 2024. – T. 13. – №. 1. – C. 10.
114. Li Y. J., Chen Z. Cell-based therapies for rheumatoid arthritis: opportunities and challenges //Therapeutic advances in musculoskeletal disease. – 2022. – T. 14. – C.
115. Tenspolde M. et al. Regulatory T cells engineered with a novel insulin-specific chimeric antigen receptor as a candidate immunotherapy for type 1 diabetes //Journal of Autoimmunity. – 2019. – T. 103. – C. 102289.
116. Zmievskaia E. et al. Application of CAR-T cell therapy beyond oncology: autoimmune diseases and viral infections //Biomedicines. – 2021. – T. 9. – №. 1. – C. 59.
117. Boroughs A. C. et al. Chimeric antigen receptor costimulation domains modulate human regulatory T cell function //JCI insight. – 2019. – T. 4. – №. 8.
118. Bao L. et al. Engineered T cells and their therapeutic applications in autoimmune diseases //Zoological Research. – 2022. – T. 43. – №. 2. – C. 150.
119. Koristka S. et al. Engrafting human regulatory T cells with a flexible modular chimeric antigen receptor technology //Journal of Autoimmunity. – 2018. – T. 90. – C. 116-131.
120. Feldmann A. et al. Retargeting of T lymphocytes to PSCA-or PSMA positive prostate cancer cells using the novel modular chimeric antigen receptor platform technology “UniCAR” //Oncotarget. – 2017. – T. 8. – №. 19. – C. 31368.
121. Cartellieri M. et al. Switching CAR T cells on and off: a novel modular platform for retargeting of T cells to AML blasts //Blood cancer journal. – 2016. – T. 6. – №. 8. – C. e458-e458.

122. Bachmann D. et al. Retargeting of UniCAR T cells with an in vivo synthesized target module directed against CD19 positive tumor cells //Oncotarget. – 2017. – T. 9. – №. 7. – C. 7487.
123. Feldmann A. et al. Retargeting of T cells to prostate stem cell antigen expressing tumor cells: comparison of different antibody formats //The Prostate. – 2011. – T. 71. – №. 9. – C. 998-1011.
124. Mitwasi N. et al. Development of novel target modules for retargeting of UniCAR T cells to GD2 positive tumor cells //Oncotarget. – 2017. – T. 8. – №. 65. – C. 108584.
125. Pishesha N., Harmand T. J., Ploegh H. L. A guide to antigen processing and presentation //Nature Reviews Immunology. – 2022. – T. 22. – №. 12. – C. 751-764.
126. Kim Y. C. et al. Engineered MBP-specific human Tregs ameliorate MOG-induced EAE through IL-2-triggered inhibition of effector T cells //Journal of autoimmunity. – 2018. – T. 92. – C. 77-86.
127. Malviya M. et al. Treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis with engineered bi-specific Foxp3⁺ regulatory CD4⁺ T cells //Journal of Autoimmunity. – 2020. – T. 108. – C. 102401.
128. Wright G. P. et al. Adoptive therapy with redirected primary regulatory T cells results in antigen-specific suppression of arthritis //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2009. – T. 106. – №. 45. – C. 19078-19083.
129. Yang S. J. et al. Pancreatic islet-specific engineered Tregs exhibit robust antigen-specific and bystander immune suppression in type 1 diabetes models //Science Translational Medicine. – 2022. – T. 14. – №. 665. – C. eabn1716.
130. Wang G. C. et al. T cell receptor $\alpha\beta$ diversity inversely correlates with pathogen-specific antibody levels in human cytomegalovirus infection //Science translational medicine. – 2012. – T. 4. – №. 128. – C. 128ra42-128ra42.
131. Legut M. et al. CRISPR-mediated TCR replacement generates superior anticancer transgenic T cells //Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2018. – T. 131. – №. 3. – C. 311-322.

132. Zhao Y. et al. High-affinity TCRs generated by phage display provide CD4⁺ T cells with the ability to recognize and kill tumor cell lines //The Journal of Immunology. – 2007. – T. 179. – №. 9. – C. 5845-5854.
133. Brusko T. M. et al. Human antigen-specific regulatory T cells generated by T cell receptor gene transfer //PloS one. – 2010. – T. 5. – №. 7. – C. e11726.
134. Plesa G. et al. TCR affinity and specificity requirements for human regulatory T-cell function //Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2012. – T. 119. – №. 15. – C. 3420-3430.
135. Oliveira V. G. et al. Sub-optimal CD4⁺ T-cell activation triggers autonomous TGF- β -dependent conversion to Foxp3⁺ regulatory T cells //European journal of immunology. – 2011. – T. 41. – №. 5. – C. 1249-1255.
136. Caplazi P. et al. Mouse models of rheumatoid arthritis //Veterinary pathology. – 2015. – T. 52. – №. 5. – C. 819-826.
137. Sakaguchi S. et al. T-cell receptor signaling and the pathogenesis of autoimmune arthritis: insights from mouse and man //Immunology and cell biology. – 2012. – T. 90. – №. 3. – C. 277-287.
138. Cordova K. N. et al. A citrullinated fibrinogen-specific T cell line enhances autoimmune arthritis in a mouse model of rheumatoid arthritis //The Journal of Immunology. – 2013. – T. 190. – №. 4. – C. 1457-1465.
139. Kidd B. A. et al. Epitope spreading to citrullinated antigens in mouse models of autoimmune arthritis and demyelination //Arthritis research & therapy. – 2008. – T. 10. – C. 1-12.
140. Kuhn K. A. et al. Antibodies against citrullinated proteins enhance tissue injury in experimental autoimmune arthritis //The Journal of clinical investigation. – 2006. – T. 116. – №. 4. – C. 961-973.
141. Dwivedi N., Radic M. Citrullination of autoantigens implicates NETosis in the induction of autoimmunity //Annals of the rheumatic diseases. – 2014. – T. 73. – №. 3. – C. 483-491.

142. Wright H. L., Moots R. J., Edwards S. W. The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis //Nature Reviews Rheumatology. – 2014. – T. 10. – №. 10. – C. 593-601.
143. Bolon B. et al. Rodent preclinical models for developing novel antiarthritic molecules: comparative biology and preferred methods for evaluating efficacy //BioMed Research International. – 2011. – T. 2011.
144. Vincent T. L. et al. Mapping pathogenesis of arthritis through small animal models //Rheumatology. – 2012. – T. 51. – №. 11. – C. 1931-1941.
145. Asquith D. L. et al. Animal models of rheumatoid arthritis //European journal of immunology. – 2009. – T. 39. – №. 8. – C. 2040-2044.
146. Yoshitomi H. et al. A role for fungal β -glucans and their receptor Dectin-1 in the induction of autoimmune arthritis in genetically susceptible mice //The Journal of experimental medicine. – 2005. – T. 201. – №. 6. – C. 949-960.
147. Kouskoff V. et al. Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity //Cell. – 1996. – T. 87. – №. 5. – C. 811-822.
148. Inglis J. J. et al. Collagen-induced arthritis in C57BL/6 mice is associated with a robust and sustained T-cell response to type II collagen //Arthritis research & therapy. – 2007. – T. 9. – C. 1-8.
149. Luan J. et al. Applicability and implementation of the collagen-induced arthritis mouse model, including protocols //Experimental and Therapeutic Medicine. – 2021. – T. 22. – №. 3. – C. 1-10.
150. Holmdahl R. et al. Collagen induced arthritis as an experimental model for rheumatoid arthritis: immunogenetics, pathogenesis and autoimmunity //Apmis. – 1989. – T. 97. – №. 7-12. – C. 575-584.
151. Bessis N. et al. Arthritis models: usefulness and interpretation //Seminars in immunopathology. – Springer Berlin Heidelberg, 2017. – T. 39. – C. 469-486.
152. Joosten L. A. B. et al. T cell dependence of chronic destructive murine arthritis induced by repeated local activation of Toll-like receptor-driven pathways: crucial role of both interleukin-1 β and interleukin-17 //Arthritis & Rheumatism. – 2008. – T. 58. – №. 1. – C. 98-108.

153. Patten C. et al. Characterization of pristane-induced arthritis, a murine model of chronic disease: response to antirheumatic agents, expression of joint cytokines, and immunopathology //Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology. – 2004. – T. 50. – №. 10. – C. 3334-3345.
154. Bendele A. Animal models of rheumatoid arthritis //J Musculoskelet Neuronal Interact. – 2001. – T. 1. – №. 4. – C. 377-85.
155. Choudhary N., Bhatt L. K., Prabhavalkar K. S. Experimental animal models for rheumatoid arthritis //Immunopharmacology and immunotoxicology. – 2018. – T. 40. – №. 3. – C. 193-200.
156. Baddack U. et al. A chronic model of arthritis supported by a strain-specific periarticular lymph node in BALB/c mice //Nature communications. – 2013. – T. 4. – №. 1. – C. 1644.
157. Devi K. S. P., Anandasabapathy N. The origin of DCs and capacity for immunologic tolerance in central and peripheral tissues //Seminars in immunopathology. – Springer Berlin Heidelberg, 2017. – T. 39. – C. 137-152.
158. Sennikov S. V. et al. Molecular and cellular mechanisms mediated by dendritic cells involved in the induction of tolerance //Medical Immunology (Russia). – 2017. – T. 19. – №. 4. – C. 359-374.
159. Belkaid Y., Oldenhove G. Tuning microenvironments: induction of regulatory T cells by dendritic cells //Immunity. – 2008. – T. 29. – №. 3. – C. 362-371.
160. Gregori S., Roncarolo M. G., Bacchetta R. Methods for in vitro generation of human type 1 regulatory T cells //Suppression and Regulation of Immune Responses: Methods and Protocols. – 2011. – C. 31-46.
161. Gregori S. et al. Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway //Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2010. – T. 116. – №. 6. – C. 935-944.
162. Wan J. et al. Interleukin-10 gene-modified dendritic cell-induced type 1 regulatory T cells induce transplant-tolerance and impede graft versus host disease after allogeneic stem cell transplantation //Cellular Physiology and Biochemistry. – 2017. – T. 43. – №. 1. – C. 353-366.

163. Drakes M. L., Stiff P. J., Blanchard T. G. Inverse relationship between dendritic cell CCR9 expression and maturation state //Immunology. – 2009. – T. 127. – №. 4. – C. 466-476.
164. Pathak M. et al. CCR9 signaling in dendritic cells drives the differentiation of Foxp3⁺ Tregs and suppresses the allergic IgE response in the gut //European Journal of Immunology. – 2020. – T. 50. – №. 3. – C. 404-417.
165. Liberman R. et al. Regulated assembly of vacuolar ATPase is increased during cluster disruption-induced maturation of dendritic cells through a phosphatidylinositol 3-kinase/mTOR-dependent pathway //Journal of Biological Chemistry. – 2014. – T. 289. – №. 3. – C. 1355-1363.
166. Lee H. C., Ziegler S. F. Inducible expression of the proallergic cytokine thymic stromal lymphopoietin in airway epithelial cells is controlled by NFκB //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2007. – T. 104. – №. 3. – C. 914-919.
167. Aubry C. et al. Protective effect of TSLP delivered at the gut mucosa level by recombinant lactic acid bacteria in DSS-induced colitis mouse model //Microbial cell factories. – 2015. – T. 14. – C. 1-10.
168. Pathak M., Lal G. The regulatory function of CCR9⁺ dendritic cells in inflammation and autoimmunity //Frontiers in immunology. – 2020. – T. 11. – C. 536326.
169. Akbari O. et al. DNA vaccination: transfection and activation of dendritic cells as key events for immunity //The Journal of experimental medicine. – 1999. – T. 189. – №. 1. – C. 169-178.
170. Steimle A. et al. Molecular mechanisms of induction of tolerant and tolerogenic intestinal dendritic cells in mice //Journal of immunology research. – 2016. – T. 2016.
171. Wang J., Zhao X., Wan Y. Y. Intricacies of TGF-β signaling in Treg and Th17 cell biology //Cellular & Molecular Immunology. – 2023. – T. 20. – №. 9. – C. 1002-1022.
172. Sanjabi S. et al. Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF-β, IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity //Current opinion in pharmacology. – 2009. – T. 9. – №. 4. – C. 447-453.

173. Jin Y. et al. Regulation of anti-inflammatory cytokines IL-10 and TGF- β in mouse dendritic cells through treatment with *Clonorchis sinensis* crude antigen //Experimental & Molecular Medicine. – 2014. – Т. 46. – №. 1. – С. e74-e74.
174. Shimabukuro-Vornhagen A. et al. The immunosuppressive factors IL-10, TGF- β , and VEGF do not affect the antigen-presenting function of CD40-activated B cells //Journal of Experimental & Clinical Cancer Research. – 2012. – Т. 31. – С. 1-7.
175. Komai T. et al. Transforming growth factor- β and interleukin-10 synergistically regulate humoral immunity via modulating metabolic signals //Frontiers in immunology. – 2018. – Т. 9. – С. 1364.
176. Фишер М. С. и др. Экспериментальная модель антиген-и коллаген-индуцированного артрита у мышей //Иммунология. – 2022. – Т. 43. – №. 2. – С. 157-165.