

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

На правах рукописи

ФАЛАЛЕЕВА СВЕТЛАНА АЛЕКСЕЕВНА

**ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
МИЕЛОИДНЫХ И ПЛАЗМОЦИТОИДНЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК
БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ.**

14.03.09 – “Клиническая иммунология, аллергология”

Диссертация на соискание учёной степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

Д.м.н., профессор С.В.Сенников

Новосибирск

2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
ВВЕДЕНИЕ	4
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1 Патогенетические изменения регуляции иммунных реакций при ревматоидном артрите	11
1.2 Роль дендритных клеток в регуляции иммунных процессов	18
1.2.1. Характеристика дендритных клеток у больных ревматоидным артритом.....	24
1.3. Применение дендритных клеток в терапии аутоиммунных заболеваний.....	31
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	38
3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	51
3.1. Фенотипическая и функциональная характеристика дендритных клеток в периферической крови, больных ревматоидным артритом и условно здоровых доноров.....	51
3.2. Изучение продукции внутриклеточных цитокинов миелоидными и плазмцитотидными дендритными клетками периферической крови у больных ревматоидным артритом и условно здоровых доноров.....	57
3.3 Характеристика индуцированных миелоидных и плазмцитотидных дендритных клеток.....	62
4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	75
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	83
ВЫВОДЫ.....	86
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	88

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДК – дендритные клетки

мДК – миелоидные дендритные клетки

пДК – плазмоцитоидные дендритные клетки

тол.ДК – толлерогенные дендритные клетки

РА – ревматоидный артрит

КИА – коллаген индуцированный артрит

АГ – антиген

МНК – мононуклеарные клетки

Treg – Т-регуляторные клетки

IFN – интерферон

IL – интерлейкин

GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
роста

TNF – фактор некроза опухоли

FCS – эмбриональная телячья сыворотка

Dex – дексаметазон

СII – коллаген второго типа

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность

Дендритные клетки (ДК) являются антиген-презентирующими клетками костномозгового происхождения, способными инициировать и регулировать как первичный, так и вторичный Т- и В- клеточный иммунный ответ [112]. Дендритные клетки играют важную роль в процессах нарушения естественной толерантности тканей и запуске аутоагрессии в отношении собственных клеток и тканей организма при ревматоидном артрите. Это обусловлено измененной функциональной активностью дендритных клеток, нарушением их способности поддерживать невосприимчивость Т-лимфоцитов и NK- клеток к собственным тканям организма и активацией клеточного и гуморального провоспалительного иммунного ответа [26].

В периферической крови выделяют два основных подтипа ДК, которые несут на своей поверхности специфические маркеры: миелоидных и плазмоцитоидных ДК. Незрелые дендритные клетки, независимо от подтипа имеют фенотип, характеризующийся низким уровнем экспрессии CD80, CD83, CD86 [114]. Миелоидные ДК имеют мощный потенциал для захвата и презентации антигенов, что позволяет им эффективно стимулировать Т-клетки [108]. Плазмоцитоидные ДК обладают уникальным свойством продуцировать большое количество IFN- α/β при воздействии на них вирусными компонентами [88].

Благодаря своей ключевой роли в развитии и поддержании воспалительных процессов, ДК являются объектом для пристального изучения при ряде заболеваний. Большинство исследований, посвященных дендритным клеткам у больных ревматоидным артритом, указывают на то, что ДК играют важную роль в инициации и поддержании воспалительного процесса при острых и хронических воспалительных заболеваниях различной этиологии посредством презентации антигенов аутореактивным Т-клеткам [144,68]. Одним из механизмов, позволяющим ДК регулировать аутоиммунный процесс при ревматоидном артрите (РА), является продукция ряда цитокинов, от которых зависит дифференцировка Т-хелперных клеток. Подтипы ДК продуцируют как воспалительные, так и противовоспалительные цитокины, которые по-разному воздействуют на течение аутоиммунного заболевания, что может определять характер и степень нарушений иммунной регуляции при РА.

Поскольку ДК активно участвуют в развитии аутоиммунного воспаления, исследователи рассматривают их как в качестве клеток-мишеней для таргетных подходов терапии ревматоидного артрита, так и в качестве клеткок-кандидатов для разработки клеточных технологий в лечении аутоиммунных заболеваний [123]. Подтипы дендритных клеток характеризуются различным фенотипом, свойствами и преимущественным участием в регуляции иммунологических процессов. Однако, вклад миелоидных и плазмоцитоподобных субпопуляций в воспалительные процессы

различной этиологии мало изучены. Для разработки различных стратегий лечения необходимо всестороннее исследование количественных и качественных показателей подтипов дендритных клеток (миелоидных и плазмоцитоидных) *ex vivo* у больных ревматоидным артритом и в условиях *in vitro* для оценки возможности индукции функционально полноценных ДК при РА.

Цель работы:

Изучить содержание и функциональные свойства субпопуляций дендритных клеток и эффективность их индукции из клеток-предшественников периферической крови у больных ревматоидным артритом

Для достижения поставленной цели были определены следующие задачи:

1. Оценить относительное количество миелоидных и плазмоцитоидных дендритных клеток в периферической крови больных ревматоидным артритом в период обострения заболевания.
2. Изучить содержание в периферической крови больных РА дендритных клеток с разным фенотипом.
3. Изучить относительное количество IL-12, IL-10, IL-4, IFN- α позитивных дендритных клеток у больных ревматоидном артритом.
4. Охарактеризовать фенотип и функциональные свойства дендритных клеток генерированных из клеток предшественников периферической крови

Научная новизна работы.

Впервые было показано, что у больных ревматоидным артритом происходит изменение соотношения субпопуляций ДК за счет значительного снижения относительного количества циркулирующих в периферической крови плазмоцитоидных дендритных клеток. У больных ревматоидным артритом выявлено увеличение миграционного потенциала незрелых пДК по сравнению с условно здоровыми донорами. Установлено, что у больных ревматоидным артритом происходит снижение продукции цитокинов IL-4 IL-10 и увеличение IL-12, IFN- α обеими субпопуляциями дендритных клеток по сравнению с условно здоровыми донорами.

Впервые было показано, что у больных ревматоидным артритом возможна целенаправленная индукция функционально полноценных дендритных клеток с миелоидным и плазмоцитоидным фенотипом из мононуклеарных клеток периферической крови.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Представленные результаты по относительному содержанию миелоидных и плазмоцитоидных дендритных клеток периферической крови у больных ревматоидным артритом в сравнении со здоровыми донорами и по отличиям их функциональных и фенотипических характеристик расширяют представления о вовлеченности дендритных клеток разных субпопуляций в аутоиммунный процесс.

Выявленное снижение относительного количества CD80, CD83-позитивных дендритных клеток указывает на их незрелый фенотип у больных ревматоидным артритом в отличие от здоровых доноров, наряду с этим повышение экспрессии хемокинового рецептора CCR7 свидетельствует об их более высоком миграционном потенциале, а выявленное изменение профиля синтезируемых цитокинов подтверждает вовлеченность дендритных клеток в иммунопатологические реакции. Установленные фенотипические и функциональные отличия ДК больных РА указывают на перспективы их использования в разработке методов диагностики и прогнозирования заболеваний с воспалительным патогенезом.

Полученные данные по генерации незрелых и зрелых дендритных клеток демонстрируют возможность индукции функционально полноценных дендритных клеток из мононуклеарных клеток периферической крови у больных ревматоидным артритом, что может явиться основой для дальнейшего применения их в клеточной иммунотерапии аутоиммунных заболеваний.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. В периферической крови больных ревматоидным артритом наблюдается изменение фенотипических характеристик и функциональных свойств обеих субпопуляций дендритных клеток по сравнению со здоровыми донорами. Наибольшее изменения наблюдаются среди популяции плазмоцитоподобных дендритных клеток за

счет снижения их относительного количества, при этом они характеризуются незрелым фенотипом, но обладают высокой миграционной активностью, а так же увеличенной продукцией IL-12, IFN- α .

2. В условиях нарушенных свойств циркулирующих дендритных клеток у больных ревматоидным артритом из мононуклеарного пула периферической крови *in vitro* возможна индукция полноценных дендритных клеток с фенотипическими характеристиками миелоидных и плазмцитоидных субпопуляций.

Апробация материалов диссертации.

Материалы диссертации доложены и обсуждены на:

1. Семинарах экспериментального отдела ФГБУ НИИКИ СО РАМН (Новосибирск, 2011, 2012, 2013).
2. «VI конференции по дендритным клеткам и их роли при норме и патологии» в рамках Объединенного иммунологического форума - 2013 (Нижний Новгород, 30 июня-05 июля 2013 года)
3. Международной конференции «XV международном конгрессе по иммунологии» (Италия, Милан, 22-27 августа 2013 года)
4. Международной конференции «Достижения фундаментальных наук и персонализированной медицины в решении проблем системного и аутовоспаления» (Москва 5-7 июня 2014 г.)

5. Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Дни иммунологии в Сибири» и научном симпозиуме «Молекулярно-клеточные механизмы перепрограммирования иммунных реакций в норме и при патологии. Цитокины и иммунокомпетентные клетки» (г. Новосибирск 27-29 августа 2015 г.)

6. Международной конференции «Cytokines» conference - конференция «Цитокины» (11-14 октября 2015 г., Германия, г.Бамберг)

По теме диссертации опубликовано 10 работ, в том числе 2 статья в издании, рекомендованном ВАК.

Результаты, представленные в данной работе, получены лично автором на базе лаборатории молекулярной иммунологии НИИФКИ.

Большую признательность автор выражает научному руководителю работы профессору, д.м.н. С.В. Сенникову за подробное конструктивное обсуждение полученных результатов, а также всем сотрудникам лаборатории молекулярной иммунологии за благожелательное отношение в ходе выполнения работы.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Патогенетические изменения регуляции иммунных реакций при ревматоидном артрите

Ревматоидный артрит (РА) относится к категории общих деструктивных артропатий неизвестной этиологии. Это заболевание поражает 1-2% населения во всём мире, чаще всего им страдают женщины среднего возраста [25]. Аутоиммунное воспаление при РА имеет системный характер, но максимально затрагивает синовиальную оболочку суставов. При этом ведущий морфологический признак ревматоидного воспаления - формирование очага гиперплазии синовиальной ткани, инвазивный рост которой приводит к разрушению суставного хряща и костной ткани и формированию паннуса [4]. Этот процесс обусловлен совокупностью иммунопатологических факторов, включающих в себя как нарушения в клеточном звене иммунитета, так и отклонения в цитокиновом статусе [5]. Среди клеток иммунной системы в патогенезе ревматоидного артрита значительную роль играют дендритные клетки и, как следствие, способность их к изменению дифференцировки субпопуляционного состава Т-клеток. Среди растворимых факторов особое внимание следует обратить как на дисбаланс цитокинов по классической модели Th1/Th2 в сторону Th 1, так и на недавно доказанную важную роль Th17-клеток и продуцируемых ими цитокинов [25]. Данные нарушения находят отражения и в дисбалансе на

местном уровне: в очаге воспаления инфильтрирующие клетки представлены главным образом Т-клетками, макрофагами и дендритными клетками. В синовиальной же жидкости содержится избыточное количество нейтрофилов, иммунных комплексов и провоспалительных цитокинов.

Избыток провоспалительных цитокинов и относительный дефицит противовоспалительных медиаторов приводит к дисбалансу Th1/Th2 [92], который встречается при многих аутоиммунных заболеваниях. Этот дисбаланс осуществляется преимущественно за счет гиперпродукции цитокинов макрофагальной природы, таких как TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, которые запускают каскад иммунопатологических реакций, приводящих к хронизации воспаления и разрушению костной и хрящевой ткани, и сниженной секреции противовоспалительных цитокинов (IL-4, IL-10) [121,26]

Однако в настоящее время высказываются предположения о существовании еще одного механизма нарушения цитокинового баланса при РА – а именно, за счет активации Th17 [82, 83]. Функциональные характеристики Th17 и Th1 имеют ряд схожих черт. Они выполняют хелперную функцию в отношении В-лимфоцитов, обладающих низкой цитотоксичностью и практически не чувствительных к супрессорному действию FoxP3⁺-Т-регуляторных клеток [1]. Хотя Th17 и играют важную роль во многих иммунопатогенетических процессах, но в настоящее время данные клетки привлекают особое внимание именно своим участием в патогенезе ряда аутоиммунных заболеваний [124]. Th17 клетки

характеризуются продукцией IL-17, который оказывает провоспалительный эффект как самостоятельно, так и в сочетании с TNF- α и IL-4, при этом вызывая синтез других провоспалительных медиаторов [3], которые опосредуют инфильтрацию тканей и способствуют усилению воспалительного процесса. При этом максимальная концентрация данного цитокина обнаружена в синовиальной жидкости [102], [82]. Th17 продуцируют два представителя семейства IL-17: IL-17A и IL-17F. Основным, участвующим в воспалительных реакциях у больных ревматоидным артритом, является IL-17A. IL-17A в значительных количествах присутствует в синовии и синовиальной жидкости пациентов с ревматоидным артритом и вызывает синтез сопутствующих провоспалительных факторов. IL-17 *in vitro* стимулирует способность макрофагов из фракции мононуклеаров периферической крови к синтезу TNF- α и IL-1. Кроме того, IL-17 может напрямую участвовать в разрушении хрящевой ткани, вызывая увеличение продукции оксида азота хондроцитами. Он так же участвует в эрозии костной ткани за счёт усиления дифференцировки остеокластов посредством различных остеокластогенных факторов [5].

Как было описано ранее, Th17-клетки играют значимую роль в развитии аутоиммунных заболеваний путем секреции большого спектра цитокинов, в то время как Treg клетки (Т-регуляторные клетки) выполняют немаловажную роль в поддержании периферийной иммунной толерантности

путем регуляции активности эффекторных Т-клеток, нарушение которой крайне важно для патогенеза аутоиммунных процессов.

Присутствующие в организме аутореактивные Т-клетки должны находиться под контролем регуляторных клеток. Эту функцию контроля выполняют Treg тимусного происхождения, подавляющие их пролиферацию. Роль Treg при РА была убедительно показана на моделях экспериментальных артритов, индуцированных коллагеном и другими аутоантигенами [96,59,43]. Введение антител к CD25, приводящее к активации пула Treg, непосредственно перед иммунизацией мышей коллагеном типа II подавляло развитие артрита на фоне снижения количества активированных эффекторных Т-клеток. Напротив, введение таких антител задолго до иммунизации способствовало прогрессированию заболевания. При этом спленоциты подопытных животных отвечали усиленной пролиферацией на стимуляцию коллагеном типа II *in vitro*. Клинический эффект истощения Treg обратим и может быть восстановлен введением таких клеток от интактных мышей [96].

Было показано, что, как и Th17 клетки, Foxp3⁺ CD4⁺ CD25⁺ Treg клетки являются ключевыми элементами иммунной системы в формировании воспалительных процессов при аутоиммунных заболеваниях [2]. Treg клетки оказывают свою регуляторную функцию путём секреции противовоспалительных цитокинов, в том числе TGF-β1, за счет чего они играют важную роль в поддержании иммунного гомеостаза. Показано, что

TGF β - это своеобразный полиактиватор синтеза других факторов роста. Их концентрация существенно повышается при РА, особенно в синовиальной жидкости [126]. Факторы роста фибробластов, хондроцитов, остеобластов стимулируют избыточную пролиферацию соединительной ткани в пораженных суставах, а сосудистый эндотелиальный ростовой фактор создает условия для дополнительного дренирования их сосудами. Это приводит к повышению проницаемости гистогематологических барьеров, что увеличивает темпы поступления аутоантител и цитотоксических лимфоцитов в периферическую кровь [25]. TGF β регулирует продукцию хемокинов пролиферирующими синовиоцитами, что приводит у больных РА к активной миграции Т-клеток в очаг воспаления, задержке их там и распределению периваскулярно в пределах синовиальной оболочки. Эти же хемокины принимают участие в активации синовиоцитов суставов в результате аутокринного и паракринного влияния [45]. Функциональные дефекты или снижение числа Treg клеток могут служить причинами нарушения толерантности как при РА [37,8,136], так и при многих других аутоиммунных заболеваниях. У больных РА количество Foxp3⁺ CD4⁺ CD25⁺ Treg клеток в периферической крови, и, как следствие, уровень TGF- β 1, значительно снижены, что ещё раз подтверждает, что Treg и противовоспалительный цитокин TGF- β 1 имеют потенциальный защитный эффект для стабилизации состояния при прогрессировании РА [102].

У пациентов с РА относительное количество $CD4^{+} CD25^{+}$ Т-клеток в синовиальной жидкости существенно выше, чем в периферической крови. Сравнение субпопуляций этих клеток у больных с активной формой заболевания по сравнению с ремиссией показало значительное увеличение в синовиальной жидкости Treg клеток, экспрессирующих хемокиновые рецепторы CCR4, CCR5, и CXCR4, которые связаны с миграцией клеток к воспалённым участкам [20, 36].

Показано также, что при аутоиммунных артритах содержание $CD4^{+} CD25^{+}$ Т-клеток в периферической крови и синовиальной жидкости коррелирует с тяжестью воспалительного процесса. Снижение числа $CD4^{+} CD25^{bright}$ Т-клеток было наиболее ярко выраженным при полиартрите и гораздо меньшим - при олигоартрите. В синовиальной жидкости больных обеих групп содержание $CD4^{+} CD25^{bright}$ Т-клеток значительно превышало их число в периферической крови [36]. Treg-клетки, выделенные из синовиальной жидкости и периферической крови, подавляют продукцию как провоспалительных (IFN- γ , TNF- α), так и противовоспалительных (IL-10) цитокинов [79]. До 40-50% $CD4^{+} CD25^{+}$ Т-клеток синовиальной жидкости обладают фенотипом активированных Т-клеток и проявляют более выраженную супрессирующую активность, чем клетки периферической крови того же больного [131]. У отдельных больных РА, если и не обнаруживалось значительного снижения числа $CD4^{+} CD25^{+}$ Т-клеток (примерно 5-10% от общей популяции $CD4^{+}$ клеток), то наблюдалось

существенное нарушение их функций. Так, субпопуляция Treg-клеток больных в активной стадии заболевания эффективно подавляла пролиферацию нормальных $CD4^{+} CD25^{-}$ Т-клеток, но не продукцию ими провоспалительных цитокинов –IL-1, IFN- γ , TNF- α [36].

Таким образом, различные субпопуляции Т-клеток активно вовлечены в патогенез аутоиммунных заболеваний и, в частности, ревматоидного артрита на разных его стадиях. Однако, на начальной стадии заболевания для активации всех пулов Т-клеток необходимы антигенпрезентирующие клетки, обладающие мощным потенциалом активации иммунных реакций. Среди таких клеток при ревматоидном артрите особо выделяются дендритные клетки.

1.2 Роль дендритных клеток в регуляции иммунных процессов

Дендритные клетки (ДК) являются антиген-презентирующими клетками костномозгового происхождения, локализованными во всех лимфоидных органах, включая лимфатические узлы и селезёнку, обладающими способностью инициировать и регулировать как первичный, так и вторичный Т- и В-клеточный иммунный ответ [78]. Уникальность ДК заключается в том, что они способны активировать «наивные» Т-лимфоциты при первом их контакте с антигеном (АГ) [101]

Условно принято разделять ДК на незрелые и зрелые формы. Такое разделение основано на различии в функциональных свойствах и способности к стимулированию Т-лимфоцитов. Незрелые ДК локализуются в периферических органах иммунной системы и на поверхности слизистых оболочек, где постоянно контролируют наличие чужеродных антигенов, при этом они обладают слабой стимулирующей активностью в отношении Т-лимфоцитов по сравнению со зрелыми ДК [42].

Незрелые ДК эффективно интернализируют антиген посредством фагоцитоза, рецептор-опосредованного эндоцитоза и макропиноцитоза. Способ захвата будет зависеть от размера частицы и участия в этом процессе клеточных рецепторов. Так, на ДК были обнаружены разнообразные С-лектиновые рецепторы (CLR), участвующие в рецептор-

опосредованном эндоцитозе, такие как DC-SIGN (CD209), DEC-205 (CD205), лангерин (CD207), дектин, манозный рецептор (CD206), BDCA-2. С-ликтиновые рецепторы участвуют в клеточной адгезии и регуляции сигнала (например BDCA-2), а так же в миграции и хоуминге, захвате и представлении антигена с помощью МНСII и дальнейшей презентации Т-клеткам, а так же толерантности к аутоантигенам [134]. Как только антиген захвачен, он обрабатывается либо экзогенным путём с помощью эндосом, либо эндогенным с помощью протеосом. При участии молекул МНС I класса происходит презентация антигена для стимуляции $CD8^+$ Т-клеток, антигена, фагоцитозного белка или рецепторов эндоцитоза в цитозоле. Далее антигены поступают в цитозоль через протеосомы и эндоплазматический ретикулум, где пептиды связываются с вновь синтезированными молекулами МНС первого класса для представления на поверхности клетки. Презентация антигена на молекулах МНС II класса происходит при стимуляции $CD4^+$ Th клетки, при этом антиген поглощается путём фагоцитоза или рецептор опосредованного эндоцитоза в эндосомы, где происходит протеолиз. Пептиды проникают в везикулу, содержащую МНС класса II, комплекс которых после взаимодействия транспортируется к поверхности клетки [39].

В незрелом состоянии, ДК эффективно захватывают антигены, но их способность стимулировать Т-клетки ограничена. Комплексный процесс, приводящий к терминальной дифференцировке ДК, превращающей их в

клетки с высокой способностью к стимуляции Т-клеток, называется созреванием ДК. Процесс созревания индуцируется собственными воспалительными молекулами, такими как лиганд CD40 (CD40L), TNF- α , IL-1, IL-6, IFN- α , продуктами деятельности микроорганизмов и повреждением тканей, что стимулирует Toll-like рецепторы (TLR) [24]. По мере созревания ДК на них появляются ко-стимулирующие молекулы. На ранних стадиях созревания начинает экспрессироваться CD86, в то время как экспрессия CD80 (CD83) характерна для более зрелых ДК. Так же во время созревания дендритных клеток на их поверхности начинает экспрессироваться хемокиновый рецептор - CCR7 [6], который обуславливает миграцию зрелых ДК в лимфатический узел, на незрелых ДК данный рецептор отсутствует [24, 69, 50]. После созревания ДК теряют способность к захвату антигенов, при этом их иммуностимулирующая активность резко возрастает.

В периферической крови выделяют две популяции ДК, отличающиеся между собой рядом признаков. Так, ДК с поверхностным фенотипом CD11c⁺CD123^{low} имеют моноцитарное происхождение и относят к миелоидным ДК, в то время как клетки с фенотипом CD11c⁻CD123^{hi} морфологически подобны плазматическим клеткам и обозначаются как плазмоцитоидные ДК [19].

Миелоидные ДК нуждаются в GM-CSF для роста и развития, способны к захвату антигена и активации Т-клеток, секреции IL-12 и IL-18 [78]. *In vivo* мДК находятся в циркулирующей крови, вторичных лимфоидных органах и

коже. В свою очередь мДК кожи делятся на клетки Лангерганса и интерстициальные ДК [130]. Эпидермальные клетки Лангерганса экспрессируют CD1c, лангерин и Е-кадгерин, в то время как на интерстициальных ДК экспрессируется DC-SIGN, CD11b, фактор XIIIa, и CD14 [129,91]. Антиген-презентирующие клетки экспрессируют на своей поверхности высокий уровень МНС II и интегрин CD11c, а так же ряд других адгезивных молекул таких как LFA (CD11a), LFA-3 (DC58), ICAM-1 (CD54), ICAM-3 (CD102). Созревание мДК сопровождается потерей большей части С-лектиновых рецепторов и одновременным снижением эндоцитозной активности. Зрелые мДК характеризуются высокой экспрессией CD11b и CD11c и генерируются *in vitro* путём стимуляции мононуклеарных клеток с использованием GM-CSF и IL-4.[115,135]

Плазмоцитоидным ДК для дифференцировки из CD11c⁻ предшественников в периферической крови необходим IL-3, они характеризуются низкой экспрессией рецептора к GM-CSF, отсутствием миелоидных маркеров CD14, CD13, и CD33, отсутствием маннозных рецепторов и экспрессией CD123 [78]. Они отличаются низкой экспрессией МНСII (по сравнению с мДК) и слабой способностью к стимуляции Т-лимфоцитов [7]. Плазмоцитоидные дендритные клетки встречаются в лимфоидной ткани и некоторых периферических тканях [103]. В очагах воспаления, например при таких заболеваниях, как системная красная волчанка, псориаз, ревматоидный артрит, и при неопластических процессах

[140]. Несмотря на то, что их содержание в периферической крови менее 1%, они играют заметную роль в формировании иммунного ответа. Плазмоцитоидные ДК крови экспрессируют L-селектин (CD62L), что позволяет им проникать через кровеносные сосуды в лимфатические узлы, селезёнку, лимфоидную ткань и тимус [60]. В лимфатических узлах пДК располагаются в непосредственной близости от Т-клеточной области и могут взаимодействовать с клетками высокого эндотелия венул [60]. Отличительной особенностью пДК является то, что в ответ на вирусные компоненты они начинают секретировать большое количество IFN α и IFN β , синтез которых запускается в ответ на распознавание TLR специфического паттерна[134]. Это определило их альтернативное название как интерферон-продуцирующие клетки. Они секретируют большое количество этих цитокинов преимущественно в первые сутки после стимуляции вирусными нуклеиновыми кислотами [115].

На миелоидных и плазмоцитоидных дендритных клетках экспрессируются различные TLR. Для миелодных ДК характерны TLR 1, 2, 3, 4, 5, и 8 типа, тогда как на пДК экспрессируются TLR7 и TLR9, после воздействия на них агонистов, например таких, как R848 (резиквимод) или CpG ODN, происходит созревание ДК, что влечёт за собой увеличение ко-стимулирующих молекул CD80, CD86, CD83 и рецептора CCR7 [65,49].

Таким образом, дендритные клетки обладают уникальными свойствами, которые позволяют участвовать им во всех типах иммунных реакций и

контролировать процессы роста, развития и активации Т-клеток, в формировании иммунного ответа в ответ на вирусные и прочие патогенные компоненты.

1.2.1. Характеристика дендритных клеток у больных ревматоидным артритом

В аутоиммунных заболеваниях участвует три параллельных, но имеющих взаимосвязанные компоненты процесса: развитие аутоотолерантности, развитие хронического воспаления в одном или нескольких органах, и, если воспаление «приобретает» хроническую форму, разрушение ткани, которые ведет за собой и другие неблагоприятные последствия [85]. Ключевое значение в активации иммунитета у больных такой аутоиммунной патологией, как ревматоидный артрит, принадлежит антигенпрезентирующим клеткам. Наиболее мощным стимулятором иммунных реакций организма из них являются дендритные клетки [21],[139]. ДК способны распознавать и представлять антигены в комплексе с молекулами HLA первого и второго типа Т- и В-лимфоцитам. При этом экспрессия HLA обоих классов на ДК очень высока [48], так же как и экспрессия костимуляторных молекул (CD80, CD86) [38,87]. ДК играют ключевую роль в индукции и поддержании активности Т-клеточного иммунитета [51], т.к. они способны стимулировать «наивные» Т-клетки, что отличает их от других АПК [73]. Наряду с медуллярными эпителиальными клетками тимуса, ДК тимуса способствуют центральной толерантности и формируют фенотип Т-клеток, представляя Т-клеткам ауто антиген и удаляя

клоны Т-клеток обладающие сильной аутореактивностью [29]. На периферии покаящиеся ДК тоже удаляют аутореактивные лимфоциты и увеличивают популяцию Т регуляторных клеток [44,72]. Поэтому ДК обладают способностью поддерживать толерантность в норме, что представляет собой потенциал для использования в терапевтических целях при аутоиммунных заболеваниях [85] .

Большинство исследований, проведённых с дендритными клетками у больных ревматоидным артритом, указывают на то, что ДК играют определённую роль в инициации и поддержании воспалительного процесса посредством презентации антигенов аутореактивным Т-клеткам [139,85].

Важность роли ДК при РА доказывается фенотипическим и функциональными исследованиями клеточных популяций периферической крови и клеток, находящихся в очаге воспаления. В частности показано, что соотношения субпопуляций ДК в периферической крови, синовиальной жидкости и оболочке значительно отличаются [34]. Основная масса исследований сфокусирована на выявлении функций ДК внутри суставной жидкости, однако ее клеточный состав и характеристики определяются именно свойствами ДК, циркулирующими в периферической крови, откуда они мигрируют в очаг при воспалении. Поэтому изучение именно разных подтипов ДК, циркулирующих в периферической крови, в норме и при патологии может позволить оценить влияние соотношения этих подклассов на формирования местного и системного воспалительного ответа. В

частности, в периферической крови больных РА количество циркулирующих как мДК, так и пДК заметно снижено, при этом они характеризуются слабой экспрессией костимулирующих молекул, в отличие от условно здоровых людей [57], что может быть обусловлено рядом патологических механизмов. Многие исследователи связывают данный феномен с тем, что при прогрессировании воспалительного процесса в синовиальной оболочке, ДК в большей степени активируют собственные миграционные свойства, что влечёт за собой их миграцию из кровяного русла в очаг воспаления [68,30]

Синовиальная оболочка является основной мишенью воспалительного процесса при РА [70,125]. При воспалительных процессах она становится более проницаемой для клеток иммунной системы и иммунных комплексов, миграция и адгезия которых происходит из-за изменений эндотелиальных клеток стенки венулы [93]. Это способствует миграции Т-клеток и ДК в синовиальную оболочку (в нормальной синовиальной оболочке ДК практически отсутствуют) [114]. Установлено, что у больных ревматоидным артритом наблюдается массивная инфильтрация синовиальной оболочки как зрелыми, так и незрелыми ДК [105], окружёнными Т-лимфоцитами, при этом их количество значительно больше, чем в периферической крови [22].

Дендритные клетки экспрессируют IL-12 [9], что способствует активации Т-хелперов первого типа. В свою очередь Т-хелперы первого типа способны выделять большое количество провоспалительных цитокинов (IL-1, TNF, IL-6), которые способствуют обострению заболевания, что в

дальнейшем приводит к хронизации воспалительного процесса [112]. Роль пДК в патогенезе РА двойственна: с одной стороны, в синовиальной ткани пДК секретируют интерфероны I типа, которые способствуют усугублению местного воспаления (хотя и в меньшей степени по сравнению с мДК) [106], а с другой стороны, пДК могут играть определенную роль в активации В-клеток с помощью экспрессии В-клеточного фактора активации [71], что приводит к продукции антител, которые также поддерживают воспалительные процессы в пораженном суставе [12].

Дендритные клетки, находящиеся в синовиальной жидкости больных ревматоидным артритом, обладают фенотипом и функциональной активностью, соответствующими стадии зрелых ДК: высокий уровень молекул МНС II класса, а так же способность стимулировать Т-клетки, благодаря активной экспрессии различных лигандов для рецепторов костимулирующих молекул на Т-клетках, таких как CD 58, CD54, CD40, а так же CD80/B7 [16]. Зрелые ДК, инфильтрирующие синовиальную оболочку, характеризуются высоким уровнем экспрессии CD83, DC-LAMP, и CCR7 хемокиновых рецепторов. Последние из перечисленных могут быть ответственны за изменение локализации этих ДК в ответ на действие хемокинов CCL 19 и CCL 21, которые продуцируются клетками других областей синовиальной оболочки [104]. При сравнении основных костимулирующих молекул в очаге воспалительного процесса было показано, что такая молекула как CD80 отсутствует или слабо

экспрессируется на ДК, находящихся в синовиальной жидкости или непосредственно в пораженной ткани [16], в то время как CD86 экспрессируется намного сильнее. Кроме того, экспрессия CD86 увеличивается *in vitro*, и является функционально выраженной при стимуляции Т-клеток дендритными клетками [113]. В частности в синовиальной жидкости больных РА наблюдается феномен «окружения» мДК большим количеством Т-клеток, при этом первые продуцируют такие провоспалительные цитокины как IL-12p70 и IL-23p19 что, несомненно, важно в индукции Th1 и Th17. Несколько исследований, проведенных *in vitro*, с использованием CD1c⁺ мДК, взятых у больных РА, позволили более детально исследовать их роль при РА. Одно из таких исследований показало, что в отличие от мДК периферической крови, CD1c⁺ мДК, полученные из синовиальной жидкости больных РА, были устойчивы к иммуносупрессивному эффекту IL-10 *in vitro* [15]. Из этих данных следует, что CD1c⁺ мДК в синовиальной оболочке могут поддерживать воспаление, даже в присутствии противовоспалительных цитокинов, таким образом, способствуя воспалению синовиальной оболочки при РА.

Взаимодействие между ДК и Т-лимфоцитами происходит как напрямую через различные рецепторы, так и через секрецию цитокинов и хемокинов. Как уже было сказано, для индукции Th1 дендритные клетки должны секретировать соответствующие цитокины, в частности IL-12 и IL-23 [14]. Цитокин IL-12 представляет собой растворимый фактор, используемый ДК,

чтобы направлять дифференцировку наивных Т-клеток в Th1 для развития цитотоксических или воспалительных процессов [109].

Ряд исследований показывают, что IL-12 связан с аутоиммунными патологиями, такими как артрит [98], сахарный диабет [117], рассеянный склероз [46], а так же тиреоидит [63]. Дендритные клетки мышей с нокаутированным геном IL-12p35 реагировали на введение специфических антигенов коллагена II индуцированием Th2-смещенного ответа, а так же подавлением патологических процессов в модели КИА [76].

Напротив, при отсутствии воспалительных сигналов, «полузрелые» ДК продуцируют IL-10, который участвуют в формировании регуляторный Т-клеточный ответ [74]. Основной противовоспалительный эффект IL-10 реализуется через подавление активности макрофагов и Т-лимфоцитов (особенно Th1 и Th17) – прежде всего, снижение активности или ингибирование синтеза этими клетками провоспалительных цитокинов. IL-10 способствует развитию гуморального иммунного ответа; он служит синергистом IL-4 при действии на В-клетки, защищая их от апоптоза [27]. IL-10 играет важную роль в гомеостатической регуляции аутореактивных Т-клеток [13, 41]. Уменьшение экспрессии IL-10 на CD4⁺ Т-клетках при РА связано с увеличением числа Th1 клеток и более тяжелым течением заболевания [144]. Moore с соавторами [95] показали, что IL-10 ингибирует продукцию провоспалительных цитокинов и хемокинов активированными моноцитами / макрофагами [47].

Таким образом, показано, что как фенотипические, так и функциональные свойства ДК в основных органах-мишенях при РА обладают значительными отличиями. При этом если местное воздействие ДК и их особенности изучены достаточно подробно, то характеристики интактных ДК в периферической крови исследованы недостаточно. Однако, они важны для понимания потенциала миграционных способностей ДК, баланса протективных и аутоагрессивных свойств ДК, поддержания толерантности к собственным клеткам организма, участию в формировании, стабилизации и усугубления аутоиммунного процесса при РА.

Вовлеченность ДК в различные механизмы обеспечения нормального функционирования иммунной системы и широкий спектр возможных нарушений в их системе при различных патологиях позволяют рассматривать их как потенциальную мишень для разработки новых направлений в терапии иммунопатологических процессов.

1.3. Применение дендритных клеток в терапии аутоиммунных заболеваний.

В настоящее время в экспериментальных исследованиях РА наиболее активно используются различные модели аутоиммунных артритов. Наиболее часто используемой моделью для РА является коллаген-индуцированный артрит (КИА). Как и ревматоидный артрит, КИА характеризуется деградацией фибрин содержащих хрящей, мононуклеарной инфильтрацией, гиперплазией синовиальных клеток, образованием паннуса, и, в конечном итоге, анкилозом одного или нескольких суставов [75]. В ряде работ на разных моделях показано активное участие ДК в формировании РА у мышей. Дендритные клетки могут играть двойственную роль в формировании и развитии иммунного ответа: с одной стороны они учувствуют в индукции воспаления, затрагивающего синовиальную оболочку [75], а с другой стороны они могут использоваться в подавлении аутоиммунного ответа в качестве вакцины или лекарственного средства.

Практически во всех экспериментах по моделированию артрита, исследования иммунокомпетентных органов и тканей на предмет выявления особенностей ДК в них проводят уже после завершения инициальных воспалительных процессов, однако при этом остаётся малоизученной ещё одна возможная функция ДК как непосредственных участников

формирования очагов воспаления при артрите на ранних стадиях аутоиммунного процесса.

В работе Leung В.Р. исследовалась способность зрелых дендритных клеток, нагруженных коллагеном II типа (СII), вызывать ревматоидный артрит у мышей линии DBA/1[75]. В экспериментальных условиях было показано, что после введения зрелых ДК, нагруженных коллагеном II типа, в задние лапки мышей через несколько дней наблюдались симптомы, характерные для РА, такие как отёк, эритема, а так же снижение двигательной функции поражённой конечности. Было отмечено, что в данной модели РА не наблюдается деструкции по типу полиартрита, то есть повреждение затрагивало только ту конечность, куда непосредственно вводили специфические ДК. Этот эксперимент показывает, что индукция активации ДК коллагеновыми пептидами достаточна для индукции артрита у таких мышей. В обычных же условиях созревание ДК включает в себя ряд фенотипических изменений, которые необходимы для Т-клеточной активации, а также модуляции хемокиновых рецепторов, в результате чего ДК приобретают способность мигрировать в местные лимфатические узлы [110]. В условиях эксперимента при использовании коллаген-индуцированных ДК их локализация наблюдалась в Т-клеточной области подколенных и паховых лимфатических узлов через 2 дня после введения, при этом происходила активация CD4 клеток. Таким образом, в данной

модели РА наблюдается, активная роль ДК в индуктивной фазе, что включает в себя активацию Т-клеток в местных лимфатических узлах [75].

Поскольку показана сильная взаимосвязь между изменением фенотипа ДК, как в периферической крови, так и в месте поражения (и установлены различия между этими субпопуляциями ДК), в качестве таргетной терапии РА было бы перспективно использовать направленное воздействие на восстановление нормального функционирования ДК. Эта проблема очень важна, так как на данный момент стандартно проводимое лечение РА включает в себя использование иммуносупрессивных препаратов, таких как антагонисты цитокинов, В-клеток, разрушающие антитела и блокаторы CTLA-4. Данные препараты могут облегчить симптомы заболевания у некоторых пациентов, но такое лечение редко приводит к стойкой ремиссии и отказу от медикаментозных терапий [118]. Кроме того, эти препараты могут вызывать общую иммуносупрессию, тем самым принося ущерб всей иммунной системе, тогда как «препараты» на основе ДК, возможно, будут оказывать целенаправленное воздействие на пораженный сустав, не принося вреда иммунной системе в целом.

Было проведено множество исследований для определения участия и изучения потенциальной роли дендритных клеток в терапевтическом подходе при ревматоидном артрите. В том числе было показано, что при ревматоидном артрите нестероидные противовоспалительные препараты ингибируют дифференцировку ДК локализованных в синовиальной

оболочке, а так же снижают потенциал макрофагов полученных из синовиальной жидкости, чтобы стимулировать аллогенные Т-клетки [64]. Лечение с помощью моноклональных антител к противовоспалительной терапии (например, анти-TNF -альфа препаратами) доказало свою эффективность в лечении пациентов с ревматоидным артритом [127]. Анализ фенотипа циркулирующих дендритных клеток у больных РА после лечения инфликсимабом показал, что количество циркулирующих CD11c⁺ мДК уменьшалось, и в меньшей степени снижалось количество CD123 пДК. Экспрессия маркера CD83, который характерен для активации ДК, снижалась после терапии инфликсимабом через 24 часа. После 6 месяцев лечения у всех пациентов наблюдались клинические улучшения, а экспрессия CD83 оставалась низкой. Таким образом, TNF- α блокирует созревание циркулирующих ДК и сокращает экспрессию маркёров активации [71].

В связи с этим желательно разработать терапевтический подход для безопасного лечения. Одна из новых стратегий связана с ДК и их функцией индуцировать иммунологическую толерантность. В свете данных проблем одним из перспективных направлений при разработке вакцин является восстановление иммунной толерантности с помощью вакцинации аутологичными дендритными клетками, способными ее вызывать. Эти толлерогенные ДК (тол.ДК) могут быть получены *ex vivo* и их терапевтическое действие может быть проверено на животных моделях коллаген индуцированного артрита [123].

Существует несколько подходов для получения тол.ДК. Генерация ДК *in vitro* с цитокинами в том числе с IL-10, TNF является относительно простой схемой индукции толДК. Так же толлерогенные ДК могут быть выделены *in vitro* с помощью NF-κB, BAY 11-7085, дексаметозона (Dex) и/или витамина D3 [90,75,100,142]. Полученные таким образом клетки характеризуются незрелым или «полузрелым» фенотипом, а так же сниженной способностью стимулировать Т-клетки [142,132,133]. КИА можно «предотвратить» с помощью вакцины на основе ДК, сокультивированных с TNF, IL-10 или Dex [133,143]. Применение TNF-ДК для лечения КИА было показано в различных исследованиях, однако в каждом таком исследовании был предложен разный механизм действия TNF-тол.ДК *in vivo*: было показано что TNF-ДК способствует Th2-поляризации клеточного ответа [133], экспрессии CD49b⁺ Treg клеток [31], или индукции FoxP3⁺ Treg [77]. Комбинация Dex+vitD3+ДК снижала «проявления» РА на модели КИА [122]. Следует отметить, что клиническое улучшение после лечения DexD3-ДК было связано со снижением СП специфической Т-клеточной пролиферации и сокращением числа Th17-клеток [122]. Таким образом, можно предположить, что способ получения толДК определяет различные иммунорегуляторные эффекты *in vivo*.

Функциональная активность ДК может быть модифицирована с помощью трансдукции генов иммунорегуляторных цитокинов или с помощью молекул, индуцирующих клеточную смерть. Например, IL-4

трансдуцированные ДК переключают Т-клеточный ответ на фенотип Th2, при этом увеличивается продукция IFN- γ [61,97] и снижается IL-17, продуцируемый Т-клетками *in vitro*. Эти IL-4 трансдуцированные ДК способны предотвратить начало КИА [97], или моделировать его тяжесть [61], тогда как IL-10-трансдуцированные ДК были не способны влиять на течение артрита [61]. Дополнительным преимуществом лечения IL-4-трансдуцированных ДК может быть то, что IL-4 непосредственно подавляет деструкцию хрящевой и костной ткани [58]. «Киллерные ДК» которые генетически модифицированы чтобы экспрессировать Fas лиганд или TRAIL подавляют патогенный ответ Т-клеток путём удаления аутореактивных Т-клеток [62,81]. Такой подход был успешным в «подавлении» развития КИА у мышей [62] иммунизированных СП [81].

Обобщая приведенные выше данные литературы, можно заключить, что проблема ревматоидного артрита обладает высокой социальной значимостью. При этом причины возникновения данной патологии до настоящего времени точно не известны, а методы лечения, используемые при РА, нуждаются в модернизации, поскольку применяемые сейчас препараты оказывают множество серьезных побочных эффектов, в том числе, нарушая функционирование иммунной системы. Ключевым звеном в решении задачи поиска новой щадящей таргетной терапии могли бы стать антигенпрезентирующие клетки, а именно дендритные, являющиеся мощными стимуляторами иммунной системы. Для выделения важных

механизмов регуляции и управления процессами иммунного воспаления дендритными клетками очень важно знать фенотипические и функциональные характеристики разных подтипов ДК в разных отделах иммунной системы, а также методы активации разных свойств разных субпопуляций ДК. Это позволит узнать, каким образом нарушается функция миелоидных и плазмоцитоидных ДК при РА, и в дальнейшем позволит использовать полученные данные для понимания причины возникновения данной патологии и разработки препаратов на основе ДК.

2.МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования

В исследовании использовалась гепаринизированная венозная кровь пациентов, больных ревматоидным артритом, выборка состояла из 35 (6 мужчин и 29 женщина) человек (в возрасте 54,7 (34-75) лет), на момент поступления в клинику ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН. Диагноз ревматоидного артрита верифицирован в соответствии с критериями ACR 2010 г. (Американская Коллегия Ревматологов). Клиническая оценка включала индекс активности болезни с 28-суставным счетом (disease activity score with 28 joint count, DAS 28), определялась с помощью подсчета количества болезненных и припухших суставов из 28, определения СОЭ, оценки пациентом общего состояния здоровья по ВАШ (визуальной аналоговой шкале от 0 до 100мм) и последующего вычисления индекса DAS28. Все пациенты на момент поступления в клинику иммунопатологии НИИФКИ имели высокую активность заболевания ($DAS28 > 5,1$). Перед включением в исследование все пациенты подписали форму добровольного информированного согласия. Протоколы исследования были одобрены локальным этическим комитетом НИИКИ СО РАМН. Работа была выполнена с использованием оборудования ЦКП НИИФКИ.

В работе использовалась периферическая кровь условно здоровых доноров 22 человека (4 мужчины и 18 женщин, в возрасте 46,7 (30-59) лет)

полученная в пункте заготовки крови №1 ГБУЗ НСО «Новосибирского центра крови». Доноры контрольной и опытной групп сопоставимы по полу и возрасту, статистически значимые отличия между группами по демографическим характеристикам отсутствуют ($p>0.1$).

Изучение миелоидных и плазмоцитоидных дендритных клеток периферической крови

Оценка фенотипической и функциональной характеристики дендритных клеток в цельной периферической крови

Оценка фенотипической и функциональной характеристик ДК производилась в два этапа:

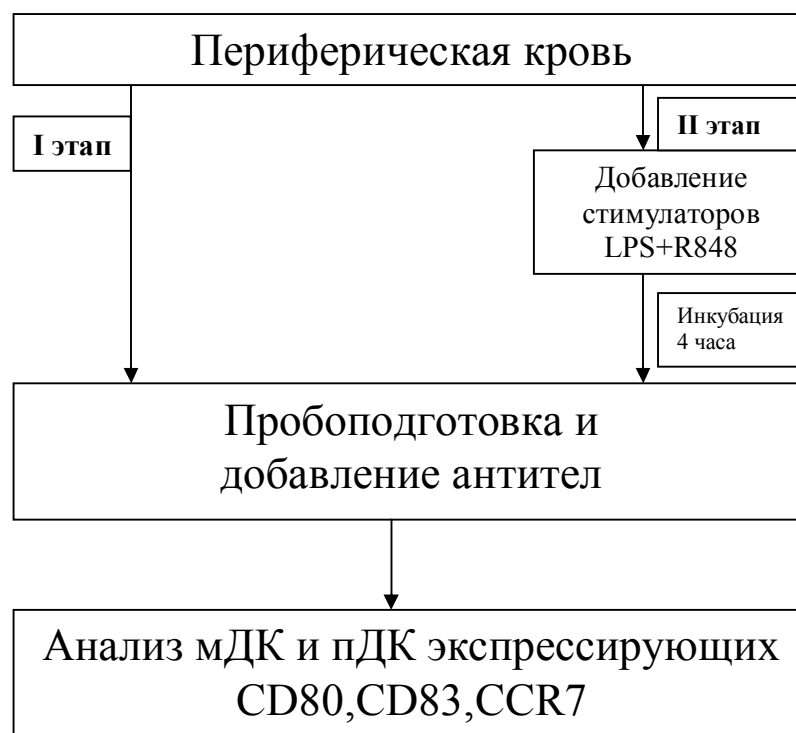


Схема 1. Дизайн исследования дендритных клеток периферической крови

- На первом этапе подготовка пробы цельной крови для анализа на проточном цитофлюориметре заключалась в предварительном мечении соответствующими антителами к поверхностным маркерам CD3- FITC, CD14-FITC, CD19-FITC («Сорбент», Москва), HLA-DR- PerCp, CD11c- PE Cy7, CD123- APC, CD83- PE Cy5, CD80- PE Cy5 («BD Biosciences», США), CCR7- PerCp-Cy5.5 в течение 20 мин. при комнатной температуре в темном месте. После инкубации кровь лизировали с помощью коммерческого буфера BD FACS Lysing Solution («BD Biosciences», США) после чего центрифугировали в течение 10 мин. После чего отмывали два раза с помощью PBS, содержащим 0,02% ЭДТА и 1% азида натрия (раствор 1), затем центрифугировали. Анализ содержания целевых популяций миелоидных и плазмцитотидных дендритных клеток проводили с помощью проточного цитофлюориметра «BD FACS Aria» и программного обеспечения «FACS Diva».
- На втором этапе для оценки способности к индукции экспрессии маркеров созревания (CD83, CD80, CCR7) на миелоидных и плазмцитотидных дендритных клетках использовали агонисты специфических толл-подобных рецепторов (TLR) - R848 (Resiquimod («BioVision», США)) и LPS (E.coli 0114:B4 («Sigma», США)). R848 - селективный лиганд для TLR7/8, который наряду с LPS (TLR4) стимулирует увеличение экспрессии CD80, CD83 и CCR7 [3].

После добавления стимуляторов (R848 20 нг/млн. лейкоцитов крови, LPS 25 нг/млн. лейкоцитов крови) пробы цельной крови инкубировали в течение 4 часов в атмосфере 5% CO₂ при температуре 37⁰С. Затем оценивали экспрессию поверхностных маркеров на миелоидных и плазмодитоидных ДК аналогично, как и до стимуляции.

Подтипы дендритных клеток периферической крови характеризовали следующим фенотипом: миелоидные дендритные клетки (CD3-CD14-CD19-HLA-DR+CD11c+CD123-), плазмодитоидные дендритные клетки (CD3-CD14-CD19-HLA-DR+CD11c-CD123+).

Определение относительного процента клеток, экспрессирующих IL-4, IL-10 среди миелоидных и плазмоцитоидных дендритных клеток в цельной периферической крови

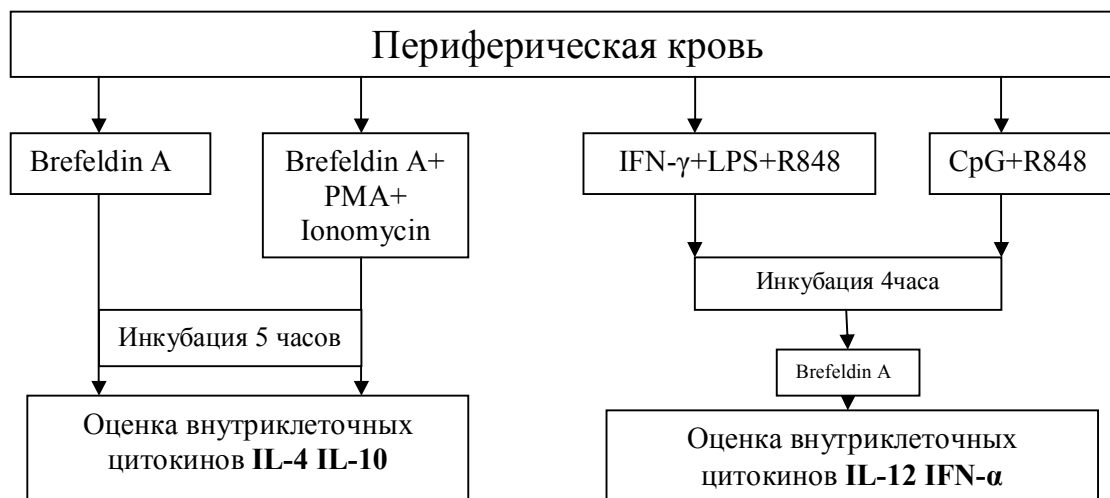


Схема 2. Дизайн исследования дендритных клеток периферической крови продуцирующих внутриклеточные цитокины IL-4, IL-10, IL-12, IFN- α .

Для оценки популяций миелоидных и плазмоцитоидных дендритных клеток, экспрессирующих IL-4, IL-10, цельную кровь разводили в 2 раза в среде RPMI-1640, после чего к части крови добавляли только Brefeldin A (4нг/ млн. лейкоцитов крови BFA («Sigma», США), а к другой части с BFA, Ionomycin (500нг/ млн. лейкоцитов крови «Sigma», США) и PMA (5нг/ млн. лейкоцитов крови (phorbol 12-myristate 13-acetate) («Sigma», США)). Затем клетки инкубировали в течение 5 часов в атмосфере 5% CO₂ при температуре 37⁰С. После инкубации клетки метили поверхностным маркерам CD3- FITC, CD14- FITC, CD19-FITC («Сорбент», Москва), HLA-DR- PerCp, CD11c- PEcy7, CD123- APC, в течении 20 минут. После инкубации кровь лизировали с

помощью коммерческого буфера BD FACS Lysing Solution («BD Biosciences», США) и центрифугировали. Далее проводили две отмывки с помощью PBS, содержащим 0,02% ЭДТА и 1% азида натрия (раствор 1), затем центрифугировали. Далее клетки фиксировали в растворе 1 с 0,1 % параформальдегида, 20 минут при комнатной температуре. После чего добавляли холодный раствор 1 и центрифугировали. Затем клетки фиксировали в растворе 0,1 % Tween 20 в течении 20 минут при комнатной температуре. После фиксации проводили отмывку с использованием раствора 1. Далее клетки инкубировали с внутриклеточными маркерами IL-4- PE, IL-10-PE («BD Biosciences», США) в течении 30 минут при комнатной температуре в темноте, затем отмывали с помощью раствора 1. Определения относительного процента клеток экспрессирующих IL-4, IL-10 среди миелоидных и плазмоцитоидных дендритных клеток в цельной периферической крови проводили с помощью проточного цитометра.

Определение относительного процента клеток экспрессирующих IL-12, IFN-α среди миелоидных и плазмоцитоидных дендритных клеток в цельной периферической крови

С целью изучения количества IL-12 и IFN-α к цельной крови добавляли следующие стимуляторы (Схема 2): IFN-γ (10 нг/млн. лейкоцитов крови (ООО «Иммунофарм», Россия)), LPS (100нг/млн. лейкоцитов крови E.coli 055:B5 («Sigma», США)), R848 (Resiquimod («BioVision», США)) и CpG (5 мкг/млн. лейкоцитов крови ООО «Биосан», Россия), R848 соответственно, затем все пробы инкубировали в течении 2 часов в атмосфере 5% CO₂ при температуре 37⁰С, после чего добавляли BFA (4нг/млн. лейкоцитов крови BFA («Sigma», США)) и оставляли на 22 часа в при температуре +4⁰С в темноте. После инкубации клетки метили поверхностным маркерам CD3-FITC, CD14-FITC, CD19-FITC («Сорбент», Москва), HLA-DR- PerCp, CD11c- PE Cy7, CD123- APC, в течение 20 минут. После инкубации кровь лизировали с помощью коммерческого буфера BD FACS Lysing Solution («BD Biosciences», США) и центрифугировали. Далее проводили две отмывки с помощью PBS, содержащим 0,02% ЭДТА и 1% азида натрия (раствор 1), затем центрифугировали. Далее клетки фиксировали в растворе 1 с 0,1 % параформальдегида, 20 минут при комнатной температуре. После чего добавляли холодный раствор 1 и центрифугировали. Затем клетки фиксировали в растворе 0,1 % Сапонина в течение 20 минут при комнатной температуре. После фиксации проводили отмывку с использованием

раствора 1. Далее клетки инкубировали с внутриклеточными маркерами IL-12p70-PE и IFN- α [2b] -PE («BD Biosciences», США) в течение 30 минут при комнатной температуре в темноте, после чего отмывали с помощью раствора 1. Затем клетки так же исследовали с помощью проточного цитофлуориметра.

Индукция миелоидных и плазмоцитоидных дендритных клеток

Получение незрелых и зрелых дендритных клеток

Мононуклеарные клетки (МНК) периферической крови больных ревматоидным артритом и условно здоровых доноров выделяли стандартным методом на градиенте плотности фиколл-урографина ($\rho=1,077$) [28]. Для этого кровь разводили в 2 раза в среде RPMI-1640, 27 мл разведенной крови наслаивали на 15 мл фиколл-урографина и центрифугировали 40 минут при 1500 об/мин. Клетки интерфазного кольца собирали, дважды отмывали в среде RPMI-1640 и инкубировали 2 ч. в атмосфере, содержащей 5% CO₂ при 37⁰C для выделения клеток с повышенной адгезивной способностью. Среду с неприлипшими и прилипшими клетками, осаждали путем центрифугирования и культивировали в 48-луночной планшете (Greiner bio-one, Германия) для дальнейшего использования в концентрации 1млн/мл в объеме 1мл в полной среде RPMI-1640, содержащей 10% FCS (Hyclone, Австрия), 2 mM L-глутамина (ООО «Биолот», Санкт-Петербург), 10 mM

буфера HEPES (Sigma), $5 \cdot 10^{-4}$ М 2-меркаптоэтанола (Sigma), 80 мкг/мл гентамицина (KRKA), 100 мкг/мл бензилпенициллина (ОАО «Биосинтез», Пенза). Для индукции миелоидных дендритных клеток к прилипшей фракции МНК добавлялись 50 нг/мл rhGM-CSF, 100 нг/мл rhIL-4 (Peprotech, США) на срок 48ч для получения незрелых ДК. Далее для созревания мДК в культуру добавляли rhTNF- α (25 нг/мл) (Peprotech, США) и инкубировали в течение 24 часов. Для индукции плазмоцитоидных дендритных клеток к прилипшей фракции МНК добавляли 20мкг/мл rhIL-3 (BioVision, США) и 20 нг/мл R848 и инкубировали в течение 24 часов. После к незрелым пДК добавляли 25нг/мл LPS (E.coli 0114:B4 («Sigma», США)) и инкубировали в течение 48 часов.

Фенотипическая оценка незрелых и зрелых индуцированных миелоидных и плазмоцитоидных дендритных клеток

Предварительная пробоподготовка индуцированных дендритных клеток заключалась в добавлении PBS, содержащим 0,02% ЭДТА, без азида (раствор 2) и центрифугированием 10 мин при 1500 об/мин. После ресуспензирования осадка к клеткам добавляли специфические маркёры CD3- FITC, CD14-FITC, CD19-FITC («Сорбент», Москва), HLA-DR- PerCp, CD11c- PE Cy7, CD123- APC, CD83-PE, CD80-V450, CCR7-PE («BD Biosciences», США), инкубировали в течение 15 минут, затем отмывали в растворе 2. Анализ

клеточной популяции проводили с помощью проточного цитофлюориметра «BD FACSVersе» и программного обеспечения «BD FACSuite»

Определение относительного процента клеток экспрессирующих IL-10 среди индуцированных миелоидных и плазмоцитоидных дендритных клеток

Предварительная пробоподготовка индуцированных дендритных клеток заключалась в добавлении PBS, содержащим 0,02% ЭДТА, без азида (раствор 2) и цинтрефугированием 10 мин при 1500 об/мин. С целью изучения количества IL-10 в пробы добавляли следующие стимуляторы: после чего к части клеток добавляли только Brefeldin A (4нг/ млн. лейкоцитов крови BFA («Sigma», США), а к другой части с Brefeldin A, Ionomycin (500нг/ млн. лейкоцитов крови «Sigma», США) и PMA (5нг/ млн. лейкоцитов крови (phorbol 12-myristate 13-acetate) («Sigma», США)). Затем клетки инкубировали в течение 5 часов в атмосфере 5% CO₂ при температуре 37⁰С. После инкубации клетки собирали (по 250тыс.клеток на пробу) и метили поверхностным маркерам CD3- FITC, CD14-FITC, CD19-FITC («Сорбент», Москва), HLA-DR- PerCp, CD11c- PE Cy7, CD123- APC, в течении 20 минут. Далее проводилась отмывка с помощью PBS, содержащим 0,02% ЭДТА и 1% азида натрия (раствор 1), затем центрифугировали. Далее клетки фиксировали в растворе 1 с 0,1 % параформальдегида, 20 минут при

комнатной температуре. После чего добавляли холодный раствор 1 и центрифугировали. 0,1 % Tween 20 в течении 20 минут при комнатной температуре. После фиксации проводили отмывку с использованием раствора 1. Далее клетки инкубировали с внутриклеточными маркерами IL-10-PE («BD Biosciences», США) в течении 30 минут при комнатной температуре в темноте, затем отмывали с помощью раствора 1. Определения относительного процента клеток экспрессирующих IL-10 среди миелоидных и плазмцитоидных дендритных клеток в цельной периферической крови проводили с помощью проточного цитометра.

Определение относительного процента клеток экспрессирующих IL-12, IFN-α среди индуцированных миелоидных и плазмцитоидных дендритных клеток

Предварительная пробоподготовка индуцированных дендритных клеток заключалась в добавлении PBS, содержащим 0,02% ЭДТА, без азида (раствор 2) и центрифугированием 10 мин при 1500 об/мин. С целью изучения количества IL-12 и IFN-α в лунки добавляли следующие стимуляторы: IFN-γ (10 нг/мл (ООО «Иммунофарм», Россия)), LPS (100нг/мл E.coli 055:B5 («Sigma», США)), R848 (Resiquimod («BioVision», США)) и CpG (5 μg/ мл. ООО «Биосан», Россия), R848 соответственно, затем все пробы инкубировали в течении 2 часов в атмосфере 5% CO₂ при температуре 37⁰C,

после чего добавляли BFA (4нг/мл. BFA («Sigma», США)) и оставляли на 22 часа в при температуре +4⁰С в темноте. После инкубации клетки собирали (по 250тыс.клеток на пробу) метили поверхностным маркерам CD3- FITC, CD14-FITC, CD19-FITC («Сорбент», Москва), HLA-DR- PerCp, CD11c- PEcy7, CD123- APC, в течении 20 минут. Далее проводилась отмывка с помощью PBS, содержащим 0,02% ЭДТА и 1% азида натрия (раствор 1), затем центрифугировали. Далее клетки фиксировали в растворе 1 с 0,1 % параформальдегида, 20 минут при комнатной температуре. После чего добавляли холодный раствор 1 и центрифугировали. Затем клетки фиксировали в растворе 0,1 % Сапонина в течение 20 минут при комнатной температуре. После фиксации проводили отмывку с использованием раствора 1. Далее клетки инкубировали с внутриклеточными маркёрами IL-12p70-PE и IFN-а [2b] -PE («BD Biosciences», США) в течение 30 минут при комнатной температуре в темноте, после чего отмывали с помощью раствора 1. Затем клетки так же исследовали с помощью проточного цитомитра.

Статистическая обработка данных

Статистическая обработка результатов производилась с помощью программы «Statistica 7.0». При ненормальном распределении выборки для статистической проверки использовались непараметрические критерии Манна-Уитни и Уилкоксона, данные представлялись в виде медианы и

квартильного диапазона значений (25% и 75%). В пояснениях к иллюстрациям количество лиц в группе обозначено n .

3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Фенотипическая и функциональная характеристика дендритных клеток в периферической крови, больных ревматоидным артритом и условно здоровых доноров

Для изучения фенотипических характеристик дендритных клеток периферической крови, а так же их потенциала для созревания и миграционной активности, часть ДК (интактные ДК) исследовалась сразу же, а часть культивировалась как в присутствии, так и в отсутствии специфических стимуляторов созревания. Способность клеток по-разному реагировать на воздействие таких медиаторов экспрессией соответствующих маркёров позволила оценить их миграционный потенциал и степень зрелости клеток субпопуляций, циркулирующих в крови здоровых и больных доноров.

Определение общего относительного количества дендритных клеток периферической крови (миелоидные и плазмцитотидные ДК) в группах условно-здоровых доноров и больных РА не выявило значимых различий (1,73% vs 1,12%). Наряду с этим, были выявлены существенные изменения в соотношении подтипов ДК у больных РА по сравнению с контролем. Так, соотношение миелоидных и плазмцитотидных ДК статистически значимо превышало таковое в контрольной группе в 6,18 раз (в группе условно-здоровых доноров и больных РА соотношение составляло соответственно

1,65 и 10,2), что указывает на существенный количественный дисбаланс подтипов ДК в периферической крови больных РА. При анализе в разных группах относительного количества миелоидных и плазмоцитоидных ДК было установлено, что выявленное изменение соотношения подтипов ДК обусловлено преимущественно значительным снижением уровня плазмоцитоидных ДК в периферической крови больных РА (в 6,3 раза по сравнению с контролем) (рис.1).

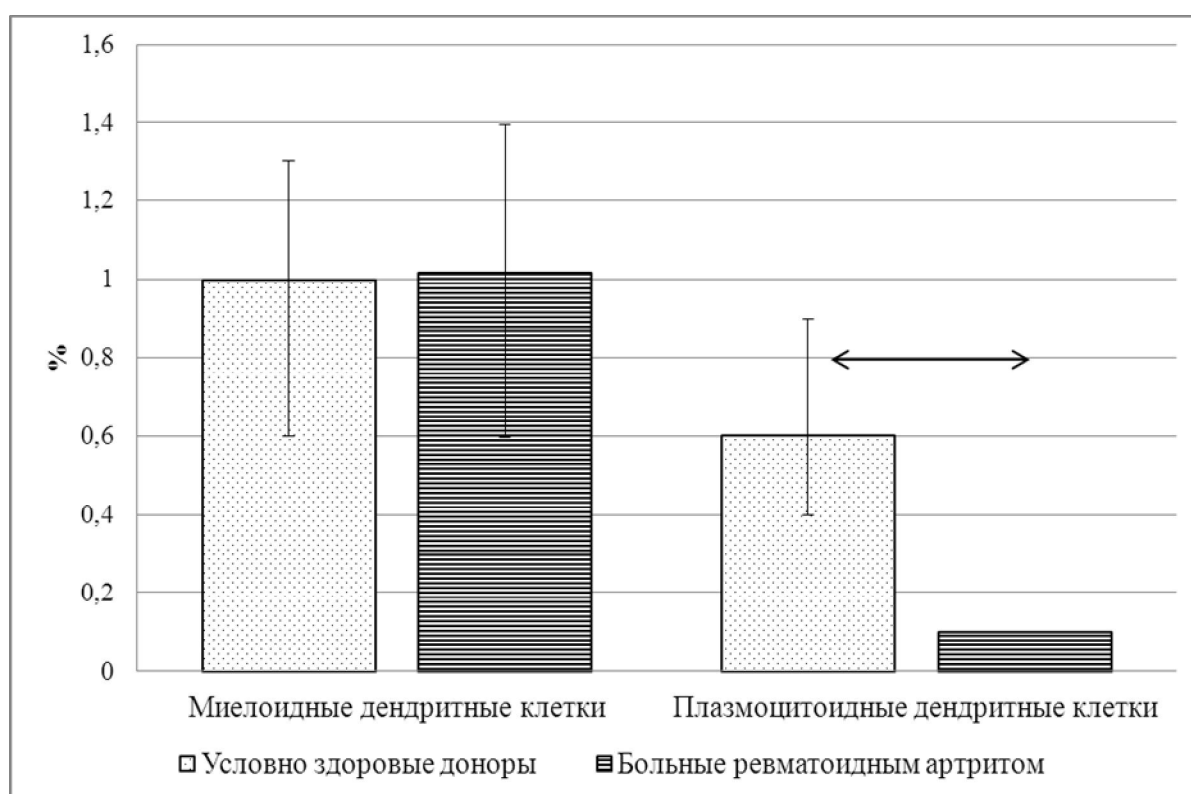


Рисунок 1. Относительное количество миелоидных и плазмоцитоидных дендритных клеток в периферической крови условно-здоровых доноров (n=12) и больных ревматоидным артритом (n=12). Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала. Стрелкой указано статистически значимое отличие ($p < 0,05$).

Для оценки способности к созреванию ДК в периферической крови исследовались показатели не только интактных клеток, но и специфически

стимулированных LPS и R848 в течение четырёх часов. Несмотря на отсутствие достоверных различий по относительному количеству миелоидных дендритных клеток между больными РА и условно-здоровыми донорами, миелоидные ДК из периферической крови больных РА характеризовались статистически значимо более низким уровнем экспрессии CD83 и CD80, что указывает на менее зрелое состояние циркулирующих миелоидных ДК у больных РА. Плазмоцитоидные ДК больных РА также имеет более низкую экспрессию CD83 и CD80 на клеточной мембране по сравнению с контрольной группой. Кроме того, процент плазмоцитоидных ДК, экспрессирующих рецептор CCR7, был статистически значимо выше по сравнению с условно-здоровыми донорами (рис.2-4), что свидетельствует об их повышенном миграционном потенциале.

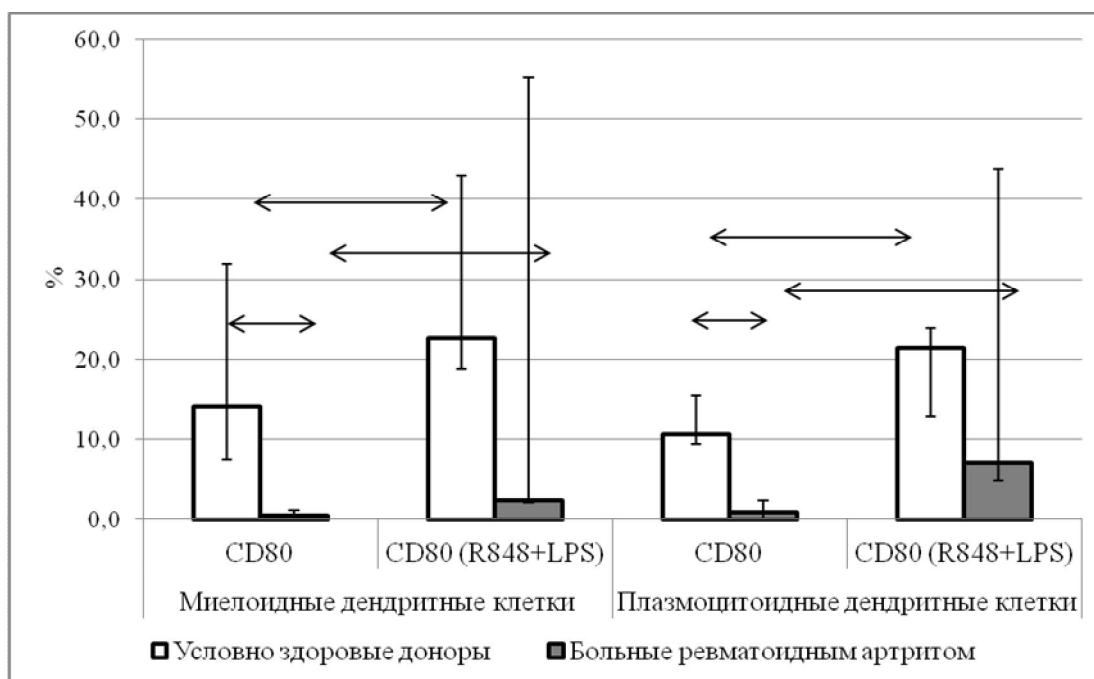


Рисунок 2 Относительное количество миелоидных и плазмоцитоподобных дендритных клеток, экспрессирующих маркер CD80 . Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала, условно-здоровых доноров (n=15) и больных ревматоидным артритом (n=12). Стрелками указаны статистически значимые различия ($p < 0,05$)

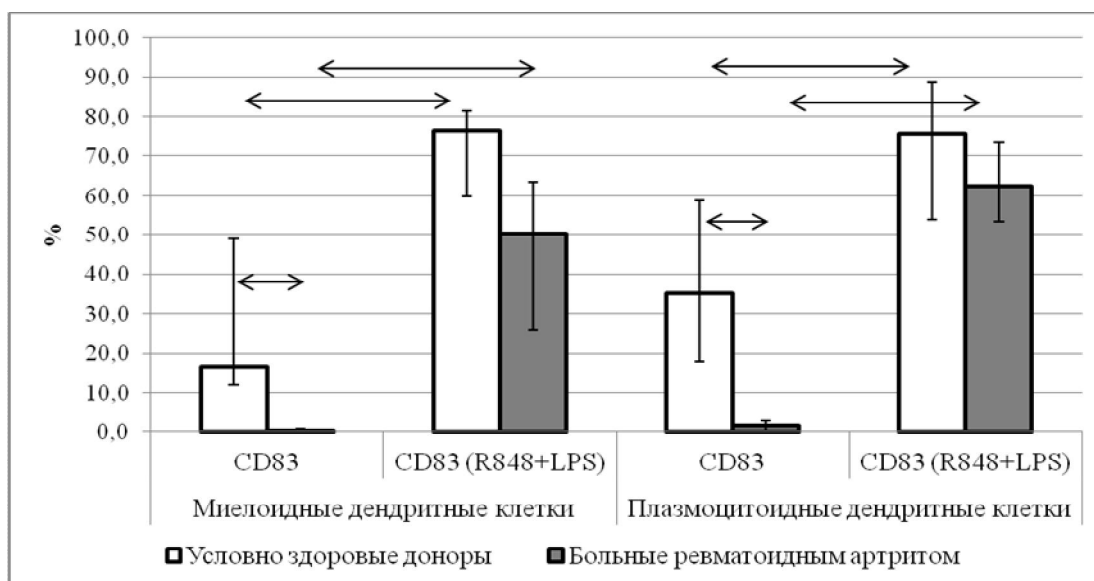


Рисунок 3 Относительное количество миелоидных и плазмоцитоподобных дендритных клеток, экспрессирующих маркер CD83 . Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала, условно-здоровых доноров (n=15) и больных ревматоидным артритом (n=12). Стрелками указаны статистически значимые различия ($p < 0,05$).

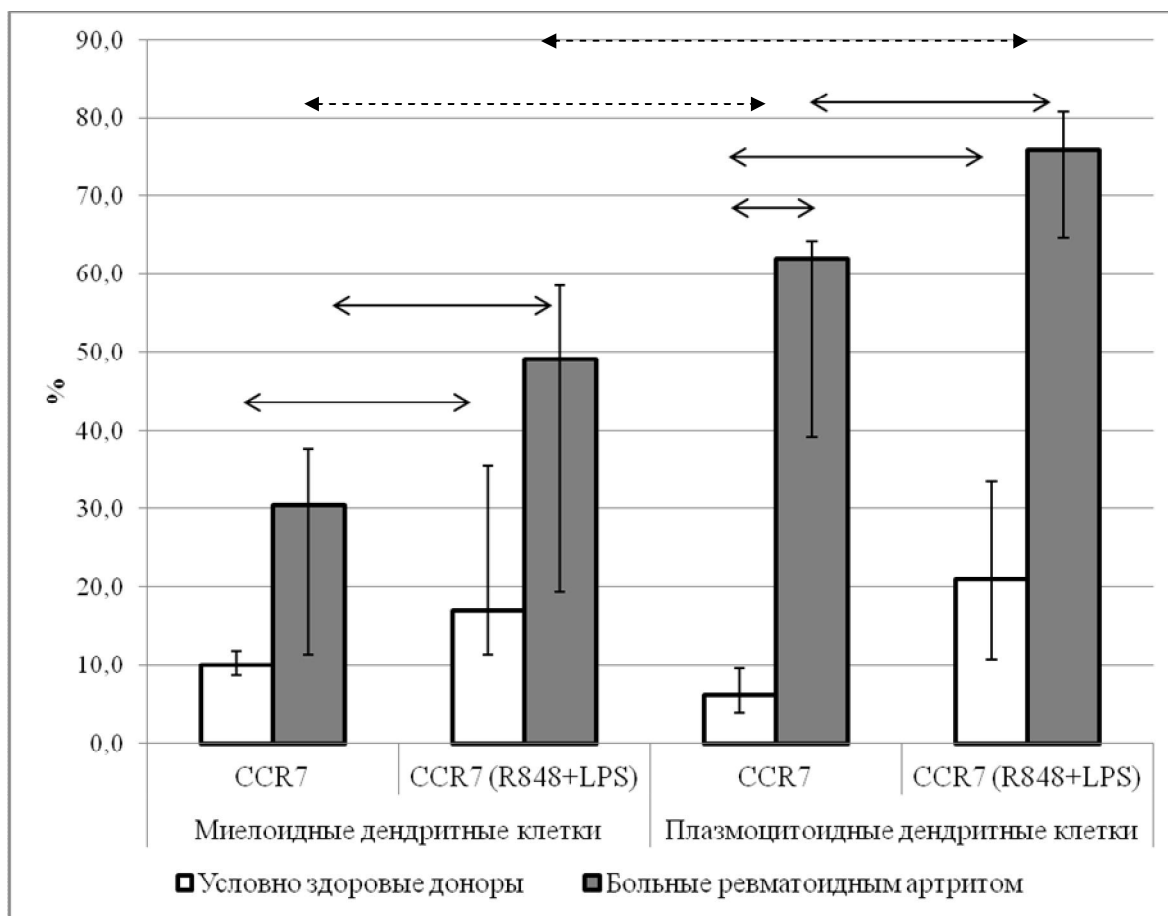


Рисунок 4 Относительное количество миелоидных и плазмоцитоподобных дендритных клеток, экспрессирующих маркер CCR7. Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала, условно-здоровых доноров (n=15) и больных ревматоидным артритом (n=12). Стрелками указаны статистически значимые различия ($p < 0,05$).

Таким образом, в периферической крови больных РА циркулируют менее зрелые как миелоидные, так и плазмоцитоподобные дендритные клетки по сравнению с клетками здоровых доноров, но при этом их миграционный потенциал находится на высоком уровне.

Известно, что при развитии патологических процессов регуляторная активность дендритных клеток может изменяться как в сторону подавления,

так и в сторону активации иммунных реакций. В связи с этим, чтобы оценить способность миелоидных и плазмоцитоидных дендритных клеток реагировать на стимуляторы, которые индуцируют их созревание, использовались агонисты TLR. В проведенном эксперименте индуцировали созревание миелоидных и плазмоцитоидных ДК периферической крови через совместное культивирование с агонистами TLR 4 (LPS, преимущественно воздействующим мДК) и TLR 7, TLR 8 (R848, преимущественно воздействующим пДК). Было показано на образцах крови условно-здоровых доноров, что после инкубации со стимуляторами статистически значимо увеличивается процент миелоидных и плазмоцитоидных дендритных клеток, экспрессирующих CD83, CD80 и CCR7, по сравнению с пробами без стимуляции. Это демонстрирует адекватность выбранных стимуляторов и их дозировки для индукции созревания подтипов дендритных клеток в периферической крови. При проведении аналогичного теста в пробах крови больных РА, было обнаружено статистически значимое увеличение относительного количества миелоидных и плазмоцитоидных ДК, экспрессирующих CD83, CD80 и CCR7 по сравнению с образцами без стимуляции. Уровень экспрессии CD83 и CD80 на миелоидных и плазмоцитоидных ДК больных РА после стимуляции не имел достоверных различий по сравнению с аналогичной группой условно-здоровых доноров. Было отмечено, что в ответ на стимуляцию количество плазмоцитоидных ДК в образцах крови больных РА, экспрессирующих хемокиновый рецептор

(CCR7), было статистически значимо больше по сравнению с аналогичной группой условно-здоровых доноров.

3.2. Изучение продукции внутриклеточных цитокинов миелоидными и плазмоцитоидными дендритными клетками периферической крови у больных ревматоидным артритом и условно здоровых доноров

Поскольку ДК являются мощными антиген-презентирующими клетками, они способны изменять направленность иммунного ответа путем активации дифференцировки Т-лимфоцитов по Th1 или Th2 пути. Эта способность ДК регулируется ими за счет экспрессии тех или иных цитокинов. С этой целью нам было важно оценить, какие медиаторы экспрессируются разными подтипами дендритных клеток в норме и при патологии. С помощью методов проточной цитометрии изучалась внутриклеточная продукция разными подтипами ДК как про-, так и противовоспалительных цитокинов: IL-4, IL-10 и IL-12, IFN- α соответственно.

Для IL-4 (Рис.5) и IL-10 (Рис.6) оценивалась как спонтанная продукция, так и в ответ на воздействие стимуляторов, обеспечивающих ускоренную активацию клеток, с целью установления не только текущего функционального состояния клеток, но и их потенциальной активности. Во

всех пробах была заблокирована секреция за счёт добавления брефелдина

А.

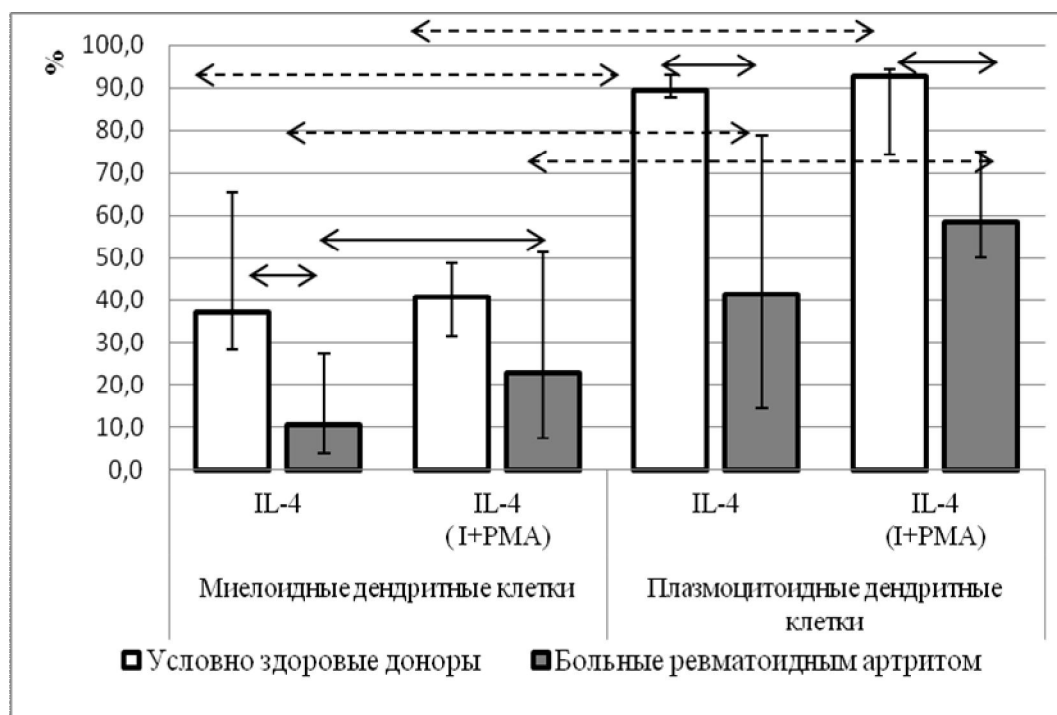


Рисунок 5 Относительное количество миелоидных и плазмоцитоидных дендритных клеток, продуцирующих IL-4. Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала, условно-здоровых доноров (n=15) и больных ревматоидным артритом (n=14). Стрелками указаны статистически значимые различия ($p < 0,05$)

При определении показателей внутриклеточной продукции IL-4, было показано, что плазмоцитоидная субпопуляция как у здоровых доноров, так и у больных РА демонстрирует статистически значимо более высокий процент IL-4-продуцирующих клеток по сравнению с миелоидной субпопуляцией. При этом среди дендритных клеток больных РА показатели статистически значимо ниже по сравнению со здоровыми донорами. У больных РА мДК увеличивали продукцию IL-4 в ответ на добавление специфических стимуляторов.

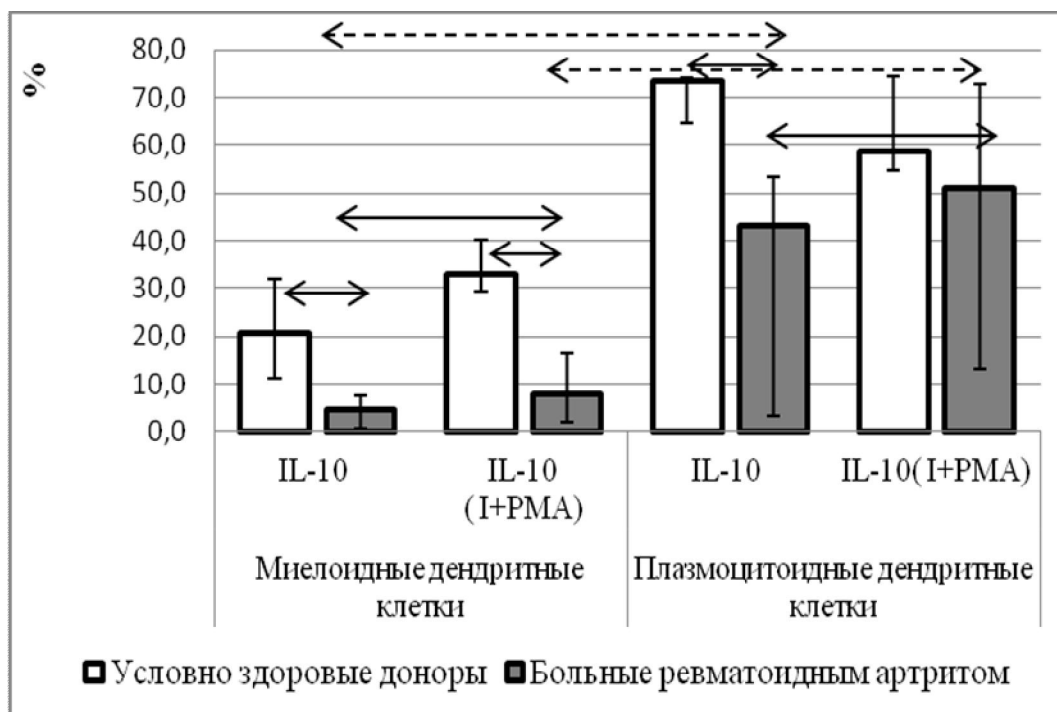


Рисунок 6 Относительное количество миелоидных и плазмоцитонидных дендритных клеток, продуцирующих IL-10. Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала, условно-здоровых доноров (n=15) и больных ревматоидным артритом (n=14). Стрелками указаны статистически значимые различия ($p < 0,05$)

При исследовании продукции IL-10 дендритными клетками, было обнаружено, что ДК как у больных РА так и здоровых доноров продуцируют данный цитокин, однако более высокая продукция наблюдалось у пДК по сравнению с мДК в обеих исследуемых группах, причем как в пробах со стимуляцией, так и без нее. При изучении экспрессии IL-10 было показано, что как среди мДК, так и среди пДК при всех условиях культивирования дендритные клетки больных РА показывали более низкий уровень экспрессии IL-10 (Рис.6) по сравнению со здоровыми донорами. Кроме того,

статистически значимое увеличение IL-10- продуцирующих клеток в ответ на стимуляцию наблюдалось только в группе больных РА.

Таким образом, уровень продукции IL-4, IL-10 дендритными клетками позволяет предположить, что несмотря на снижение относительного количества пДК в периферической крови у больных РА по сравнению со здоровыми донорами способность продуцировать внутриклеточные цитокины у них находится на статистически значимо более высоком уровне как по сравнению с миелоидной субпопуляцией, что может указывать на большую вовлеченность пДК в воспалительном процессе.

Для оценки потенциала ДК моделировать исход дифференцировки Т-хелперных клеток нами изучалась экспрессия IL-12 различными субпопуляциями ДК.

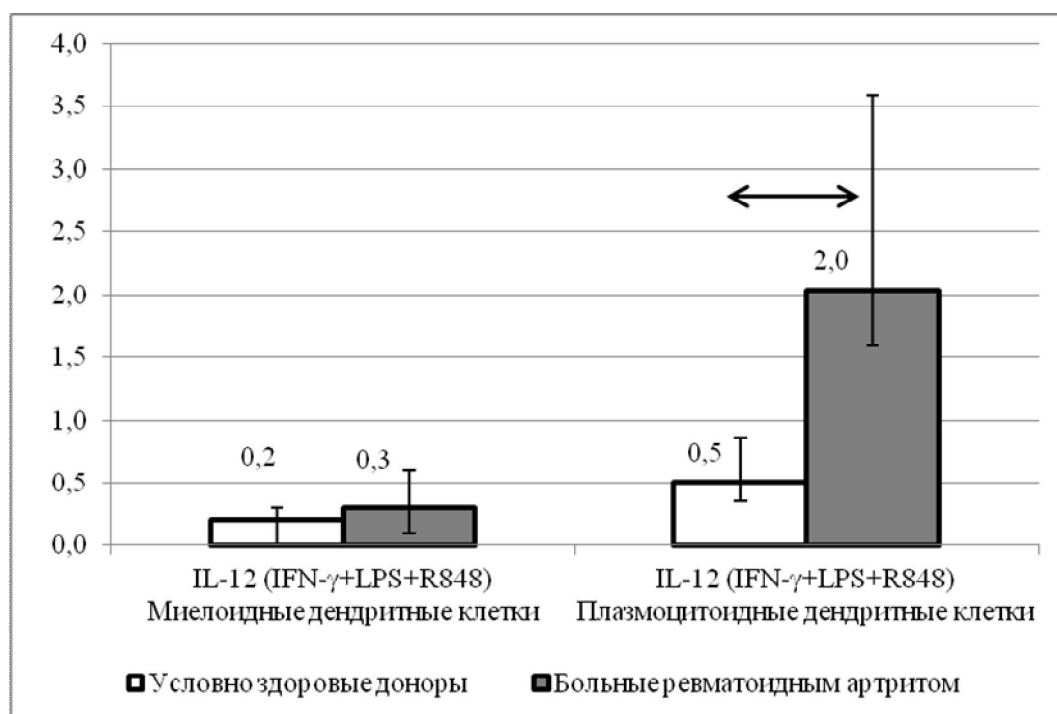


Рисунок 7 Относительное количество миелоидных и плазмоцитоидных дендритных клеток, продуцирующих IL-12. Данные представлены в виде медианы и межквартильного

интервала, условно-здоровых доноров (n=15) и больных ревматоидным артритом (n=9). Стрелками указаны статистически значимые различия ($p < 0,05$)

Анализ относительного количества мДК и пДК, продуцирующих внутриклеточный IL-12 (рис.7) показал, что у здоровых доноров в периферической крови не обнаружено ДК, продуцирующих данный цитокин. При этом у больных РА наблюдалось статистически значимое увеличение содержания IL-12 продуцирующих пДК.

Принято считать, что дисбаланс некоторых провоспалительных цитокинов (например, TNF- α и IFN- α) оказывается наиболее критичным для развития АИЗ, и основным продуцентом IFN- α являются плазмоцитоидные предшественники дендритных клеток.

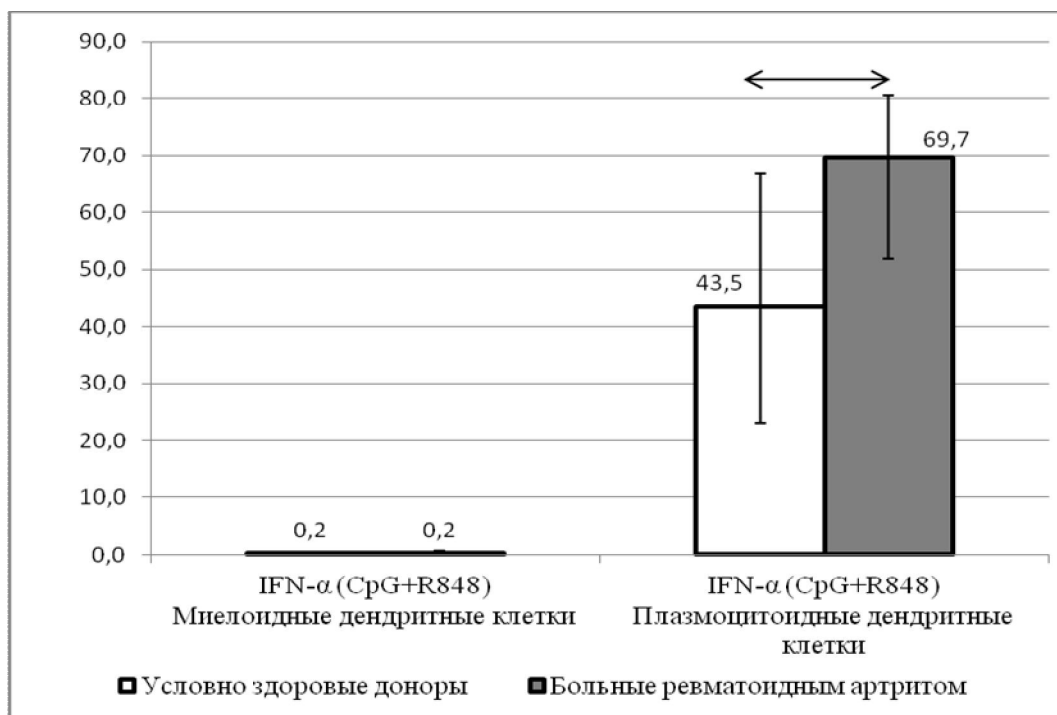


Рисунок 8 Относительное количество миелоидных и плазмоцитоидных дендритных клеток, продуцирующих IFN- α . Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала, условно-здоровых доноров (n=15) и больных ревматоидным артритом (n=9). Стрелками указаны статистически значимые различия ($p < 0,05$)

При изучении экспрессии на разных субпопуляциях дендритных клеток внутриклеточного цитокина IFN- α (Рис.8) нами было установлено, что мДК данный цитокин не продуцируется, в то время как плазмоцитоидные ДК показывают высокий уровень продукции данного цитокина. При этом среди пДК больных РА отмечено статистически значимо большее содержание IFN- α -продуцирующих дендритных клеток, нежели у условно здоровых доноров, что вместе с высокой экспрессией CCR7 свидетельствует о возможной задействованности сигнальных путей TLR7/8, через которые активируют процессы созревания и миграции

3.3 Характеристика индуцированных миелоидных и плазмоцитоидных дендритных клеток

Изучение функциональной активности и фенотипических свойств разных субпопуляций дендритных клеток в периферической крови имеет важное значение для понимания формирования воспалительного процесса у больных РА, однако важно не только знать, в каком именно состоянии

находятся ДК в данный момент, но и есть ли возможность получить ДК по функциям и фенотипу не отличающиеся от клеток здоровых доноров, поскольку это важно для применения ДК в терапевтических подходах лечения РА.

Поскольку ДК как и отдельные их субпопуляции представляют значительный интерес для дальнейшего практического применения, но их процент среди клеток периферической крови (как наиболее доступного биоматериала) крайне низок, то для дальнейшего использования необходимо их генерировать в значительном объеме. Однако, методы получения полноценных ДК с разным фенотипом неоптимизированы и значительно различаются для разных подтипов (по времени индукции, способам сепарации и др.), поэтому актуальной задачей является получение разных субпопуляций дендритных клеток в схожих условиях и за идентичный промежуток времени.

Мы использовали прилипающую фракцию моноклеарных клеток периферической крови больных ревматоидным артритом и условно здоровых доноров в присутствии разных иммунорегуляторных и ростовых факторов: rhGM-CSF (50нг/мл) , rhIL-4 (100нг/мл) и rhTNF- α (25нг/мл) для получения дендритных клеток с фенотипом (Lin⁻HLA-DR⁺CD123⁻CD11c⁺), rhIL-3 (20мкг/мл), R848 (20нг/мл) и LPS(25 нг/мл) для получения дендритных клеток с фенотипом (Lin⁻HLA-DR⁺CD123⁺CD11c⁻). На разных этапах

дифференцировки мы оценивали фенотип клеток и цитокиновую продукцию у полученных нами ДК как у больных так и у здоровых доноров.

3.3.1. Индукция дендритных клеток с фенотипом

Lin-HLA-DR+CD123-CD11c+

Для генерации незрелых ДК, сходных по фенотипическим характеристикам с миелоидными ДК, клетки инкубировались с цитокинами IL-4 + GM-CSF в течении 48 ч., после чего еще на 24 часа добавлялся TNF в качестве созревающего стимула. После созревания оценивалась экспрессия поверхностных маркеров. Было установлено, что ДК условно здоровых доноров и больных РА, индуцированные по данному протоколу, экспрессируют CD80 (Рис.9.), CD83 (Рис.10) и CCR7 (Рис.11) практически на одном уровне для каждого из этапов оценки созревания. Статистически значимое увеличение экспрессии поверхностных маркеров CD80, CD83 на позитивных мДК в ответ на стимуляцию TNF происходит как у здоровых доноров, так и больных РА, что указывает на способность к созреванию полученных дендритных клеток с миелоидным фенотипом в обеих исследуемых группах.

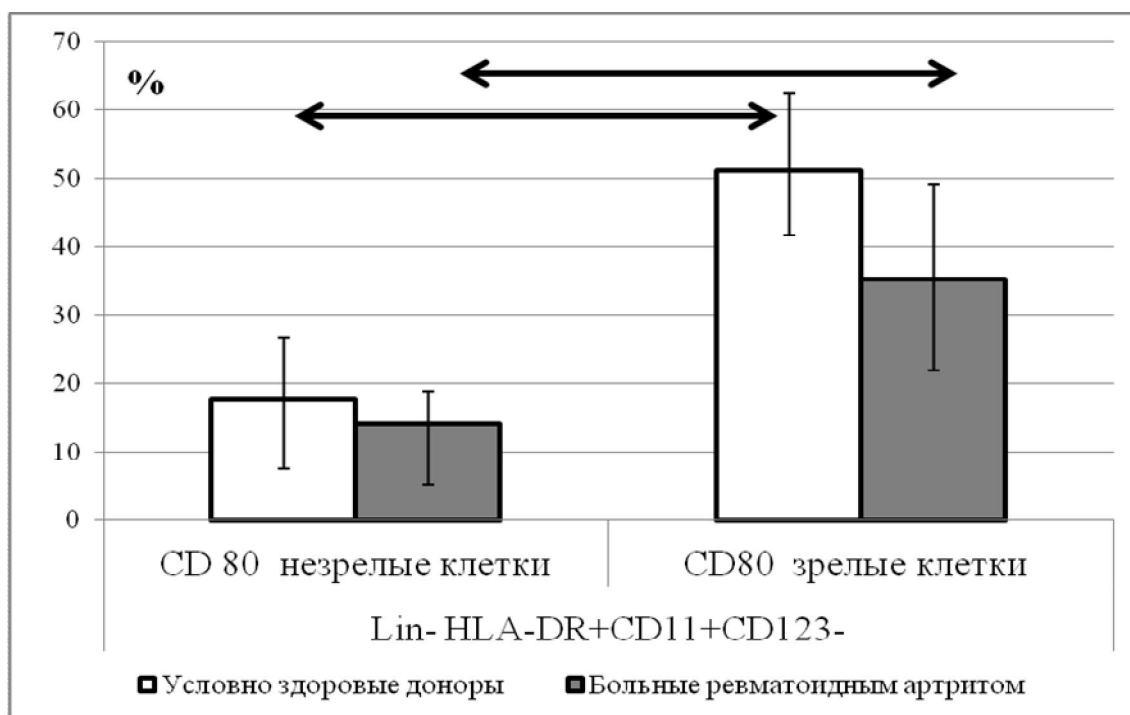


Рис.9 Относительное количество миелоидных дендритных клеток культивированных *in vitro* из мононуклеарных клеток условно-здоровых доноров (n=10) и больных ревматоидным артритом (n=15), экспрессирующих маркер CD80 . Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала. Стрелками указаны статистически значимые различия ($p < 0,05$).

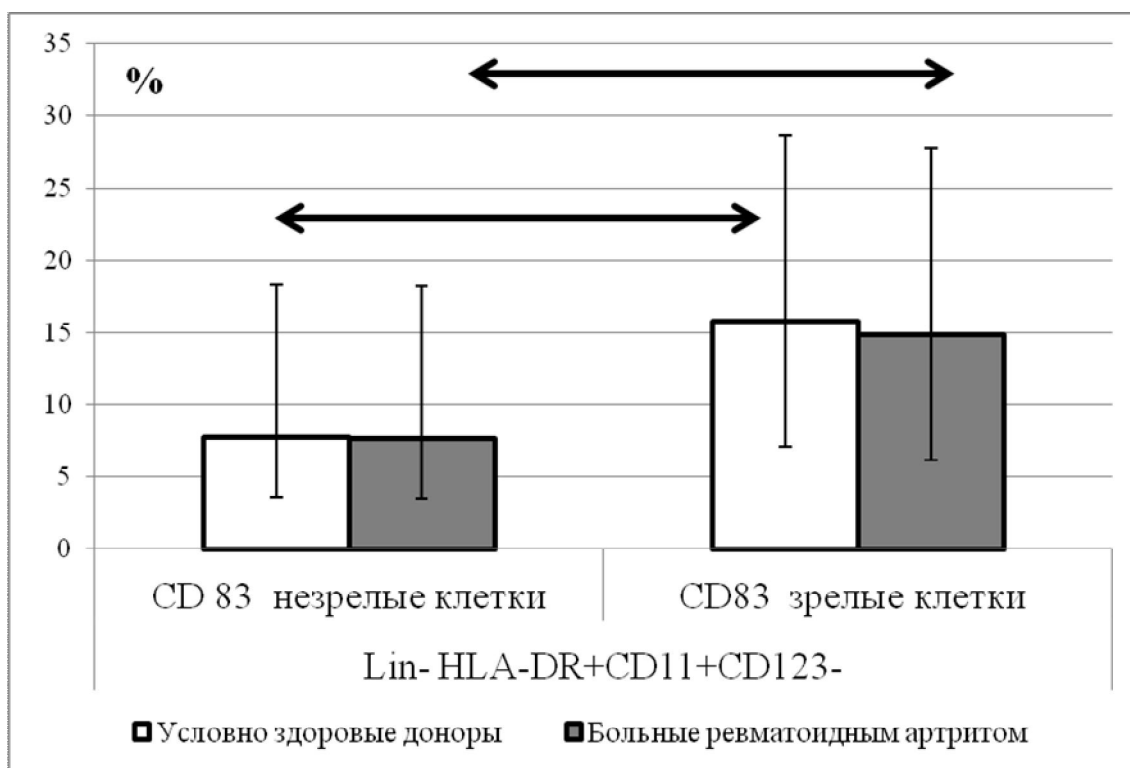


Рис.10 Относительное количество миелоидных дендритных клеток культивированных *in vitro* из мононуклеарных клеток условно-здоровых доноров (n=10) и больных ревматоидным артритом (n=15), экспрессирующих маркер CD83 . Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала. Стрелками указаны статистически значимые различия ($p < 0,05$).

Уровень экспрессии CCR7 (Рис.11) и у больных, и у здоровых на незрелых мДК крайне низкий, при этом после добавлении TNF он повышается в обоих исследуемых группах.

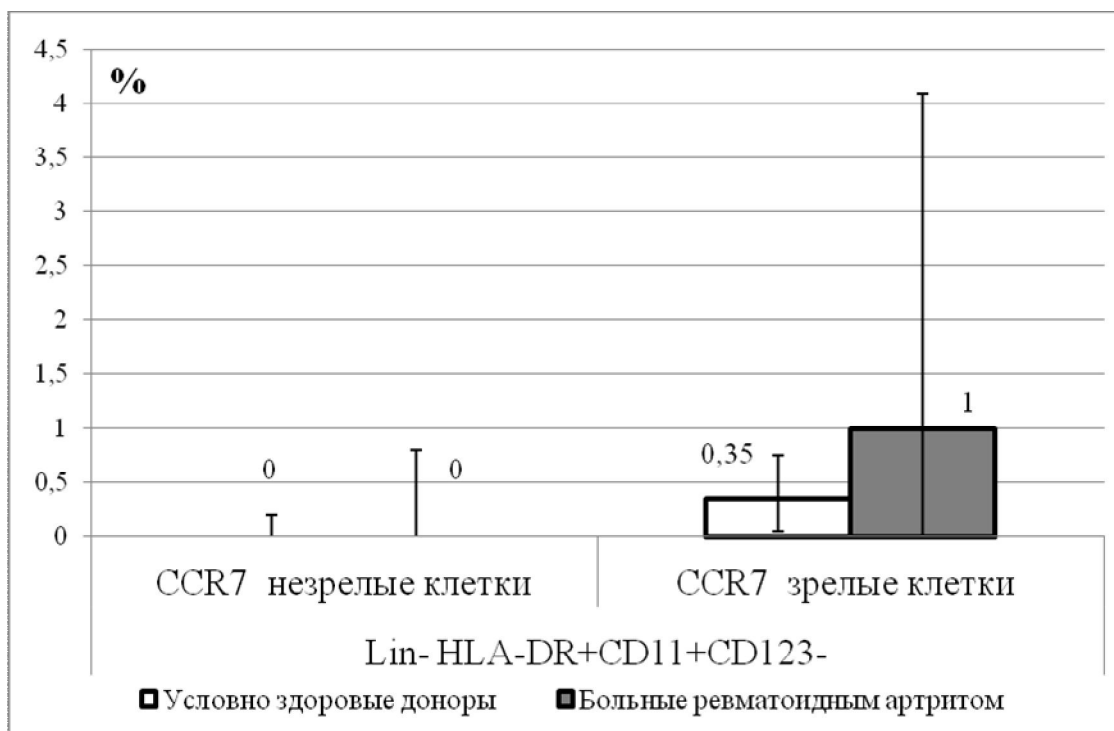


Рис.11 Относительное количество миелоидных дендритных клеток культивированных *in vitro* из мононуклеарных клеток условно-здоровых доноров (n=10) и больных ревматоидным артритом (n=15), экспрессирующих маркер CCR7. Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала. Стрелками указаны статистически значимые различия ($p < 0,05$).

Изучение цитокин-продуцирующей (Рис.12) активности, (IL-10, IL-12, IFN- α), полученными дендритными клетками больных и здоровых продемонстрировало, что зрелые индуцированные ДК при добавлении специфических стимуляторов способны продуцировать цитокины, но при этом клетки больных РА не показали достоверных отличий по сравнению со здоровыми донорами IL-10, IL-12, IFN- α .

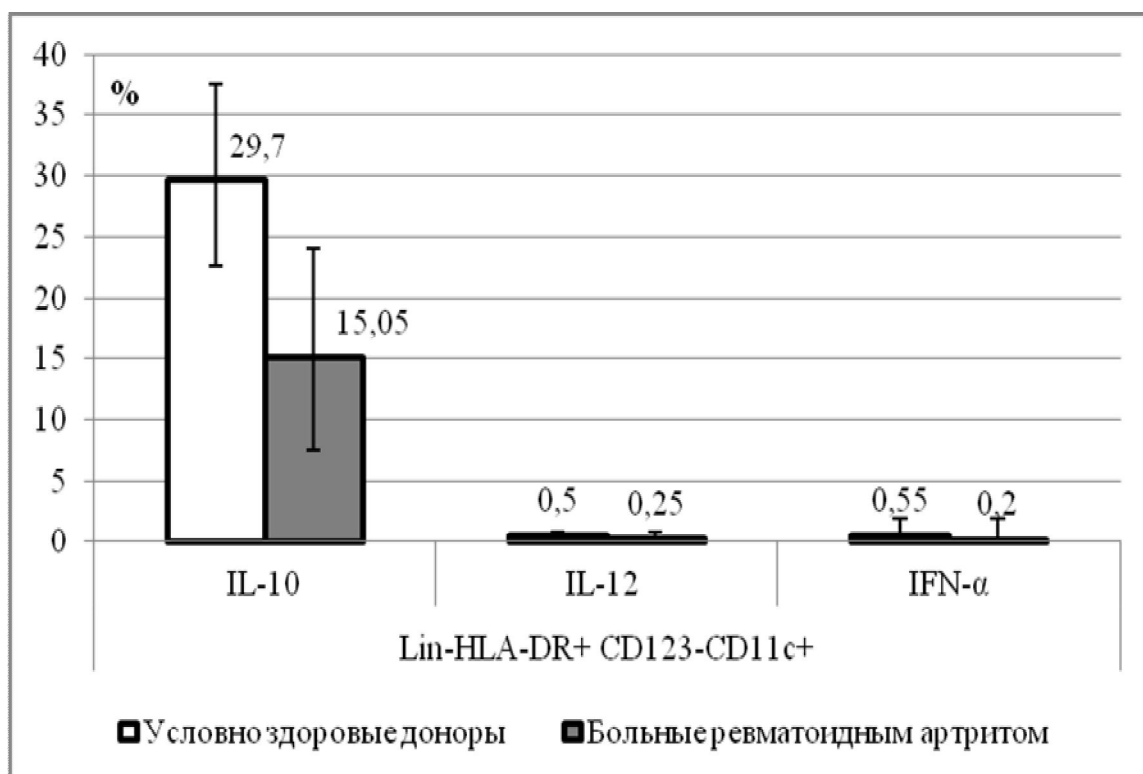


Рис. 12 Относительное количество миелоидных дендритных клеток культивированных *in vitro* из мононуклеарных клеток условно-здоровых доноров (n=10) и больных ревматоидным артритом (n=15), продуцирующих IL-10, IL-12, IFN- α . Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала.

3.3.2. Индукция дендритных клеток с фенотипом $\text{Lin}^- \text{HLA-DR}^+ \text{CD123}^+ \text{CD11c}^-$

Для генерации незрелых дендритных клеток с плазмоцитоидными фенотипическими характеристиками, моноклеарные клетки инкубировались с IL-3+R848 в течении 24 ч., после чего еще на 48 часа добавлялся LPS (E.coli 0114:B4) в качестве созревающего стимула.

Показано, что при данных условиях культивирования и при использовании IL-3, R848, LPS в качестве стимулирующих факторов, происходило статистически значимое увеличение уровня экспрессии маркеров CD80 (Рис.13) и CD83 (Рис.14) после созревания в обеих исследуемых группах.

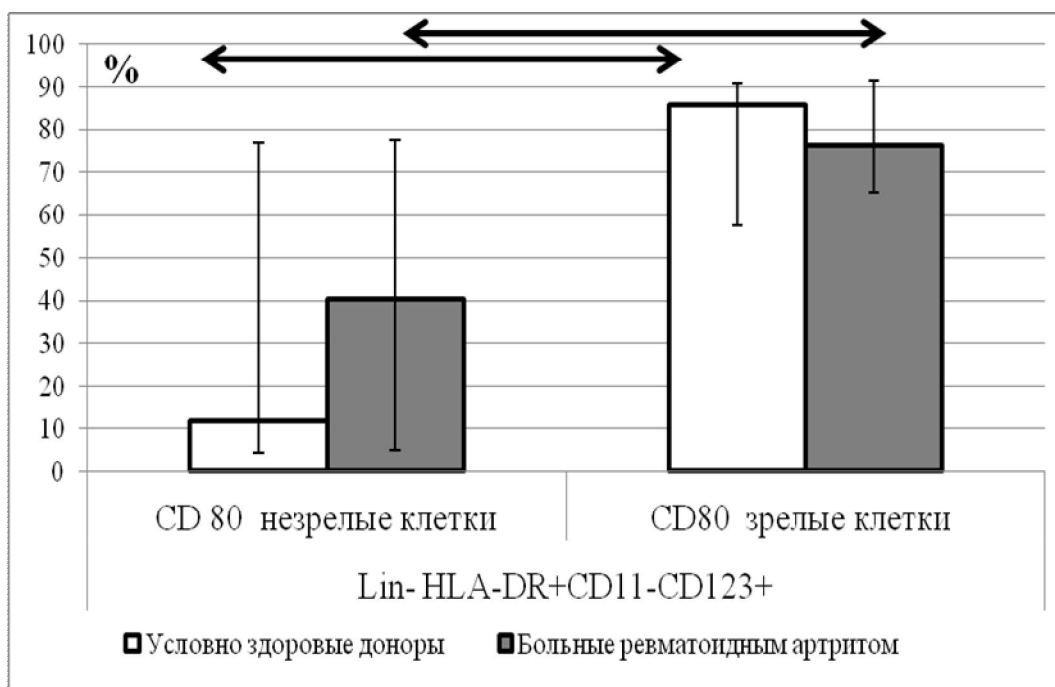


Рис.13 Относительное количество плазмцитоидных дендритных клеток культивированных *in vitro* из мононуклеарных клеток условно-здоровых доноров (n=10) и больных ревматоидным артритом (n=15), экспрессирующих маркер CD80 . Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала. Стрелками указаны статистически значимые различия ($p < 0,05$).

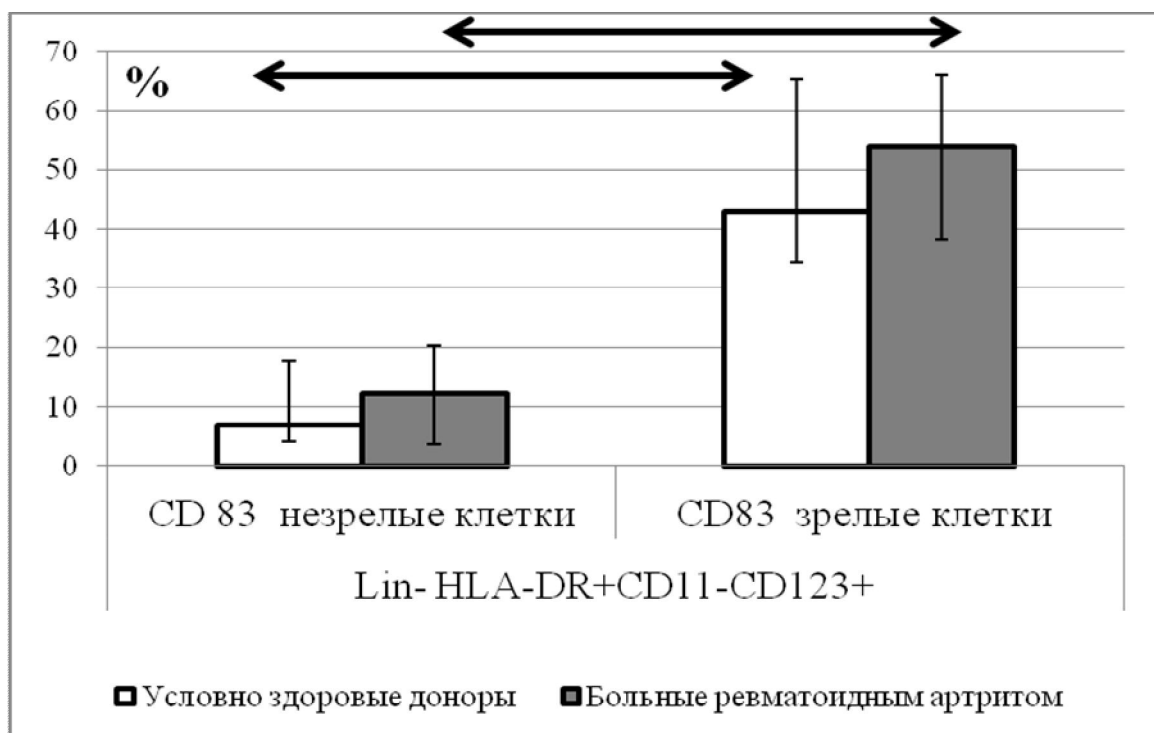


Рис.14 Относительное количество плазмцитоподобных дендритных клеток культивированных *in vitro* из мононуклеарных клеток условно-здоровых доноров (n=10) и больных ревматоидным артритом (n=15), экспрессирующих маркер CD83. Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала. Стрелками указаны статистически значимые различия ($p < 0,05$).

При этом процесс созревания ДК сопровождался одновременным усилением экспрессии CCR7(Рис.15): на пДК в ответ на стимуляцию LPS статистически значимо увеличивается экспрессия CCR7 как у больных РА, так и у здоровых. Было показано, что на всех этапах созревания пДК уровень экспрессии CD80, CD83, CCR7 между РА и здоровыми донорами статистически значимо не отличался.

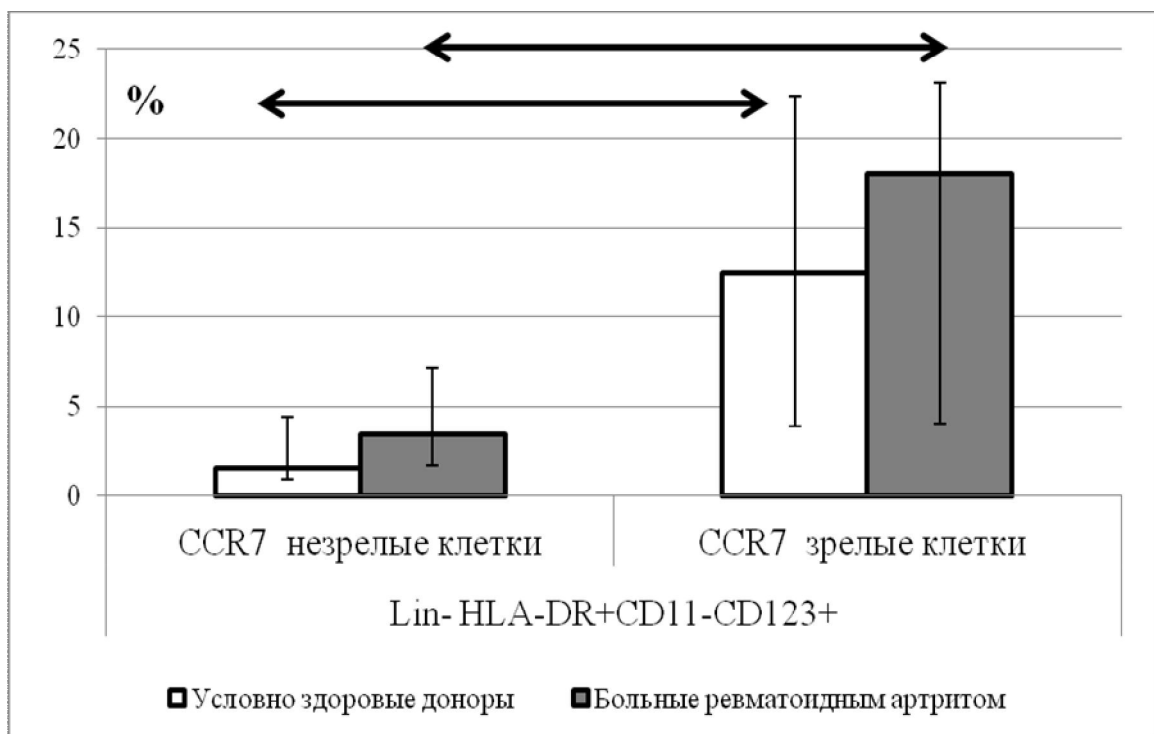


Рис.15 Относительное количество плазмоцитоподобных дендритных клеток культивированных *in vitro* из мононуклеарных клеток условно-здоровых доноров (n=10) и больных ревматоидным артритом (n=15), экспрессирующих маркер CCR7. Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала. Стрелками указаны статистически значимые различия ($p < 0,05$).

Различий по продукции (Рис.16) IL-10 и IL-12 зрелыми плазмоцитоподобными ДК между исследуемыми группами не наблюдалось, однако, по продукции IFN- α пДК больных ревматоидным артритом демонстрируют статистически значимо более высокую продукцию данного цитокина по сравнению с клетками условно здоровых доноров.

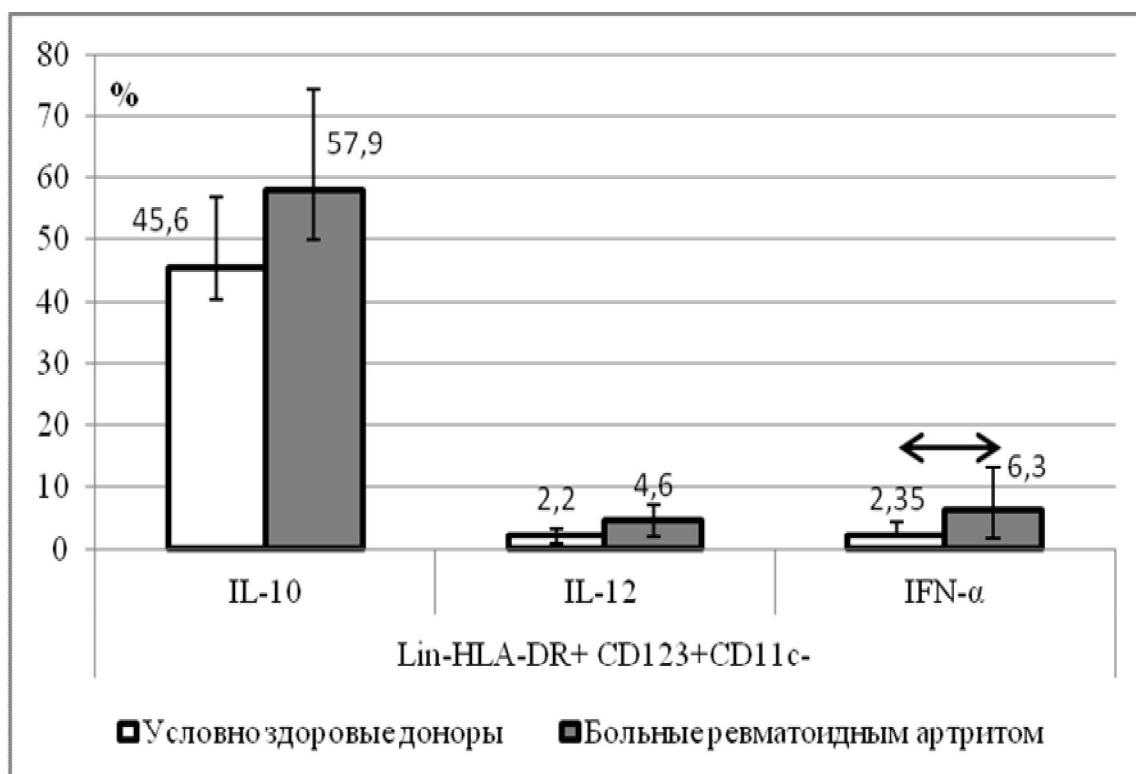


Рис.16 Относительное количество плазматоидных дендритных клеток культивированных *in vitro* из мононуклеарных клеток условно-здоровых доноров (n=10) и больных ревматоидным артритом (n=15), продуцирующих IL-10, IL-12, IFN- α . Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала. Стрелками указаны статистически значимые различия ($p < 0,05$).

4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Дендритные клетки, являясь основными участниками иммунного ответа, играют ключевую роль в развитии ревматоидного артрита. При данном заболевании происходит нарушение многих функций дендритных клеток [138], в результате чего они вовлекаются в разные стадии развития патологического процесса и участвуют в формировании цитокинового дисбаланса (проявляющегося в запуске и хронизации воспаления, а также системных провоспалительных эффектах), нарушения толерантности (приводящее, в том числе, к развитию аутоиммунного синдрома), миграции в очаги воспаления с последующим привлечением туда других провоспалительных агентов (обеспечивающих повреждение на местном уровне и усугубление симптомов заболевания), изменении функциональных характеристик Т-хелперных клеток (нарушение процессов цитотоксичности против поврежденных клеток, инфильтрация тканей, усугубление воспаления, прямое разрушение хряща и костной ткани). Для оценки роли ДК во всех перечисленных механизмах нарушений иммунной системы, важно оценить потенциал циркулирующих ДК и изучить более подробно их свойства.

В результате проведенных исследований было обнаружено значительное снижение относительного количества плазмцитоподобных ДК периферической

крови у больных РА, что свидетельствует о формировании при данной патологии дисбаланса между субпопуляциями ДК. Ранее показано, что у здоровых индивидуумов соотношение миелоидных и плазмоцитоидных ДК в периферической крови составляет 1,5-2 [56], что было подтверждено в нашем исследовании. В работах ряда исследователей было показано уменьшение количества ДК в периферической крови больных РА за счет уменьшения пула как миелоидных, так и плазмоцитоидных ДК [56,89]. Нами же было установлено, что у больных РА в периферической крови изменяется соотношение миелоидных и плазмоцитоидных ДК преимущественно за счет уменьшения количества плазмоцитоидных ДК, в 6,18 раз. Такое уменьшение только одной из субпопуляций ДК может иметь патогенетическое значение.

Полученные данные по изменению соотношения подтипов ДК и низкой экспрессии маркеров CD83, CD80 на них у больных РА демонстрируют, что ДК при данном заболевании характеризуются менее зрелым фенотипом по сравнению со здоровыми донорами. При этом показано, что статистически значимо низкое значение количества плазмоцитоидных ДК в периферической крови у больных РА сочетается со статистически значимым увеличением плазмоцитоидных ДК, экспрессирующих CCR7, что может указывать на более активную миграционную активность плазмоцитоидных ДК и их вовлеченность в развитии патологического иммунного процесса у больных РА. Можно предположить, что наличие дендритных клеток с подобными характеристиками и низкое их содержание в системном

кровоотоке объясняется происходящим на данном этапе воспаления процессом поступления из костного мозга в циркуляцию дендритных клеток с «незрелым» фенотипом, которые мигрируют в лимфоузлы и в регион активного воспалительного процесса [135].

Результаты оценки созревания дендритных клеток больных РА в ответ на агонисты TLR указывают на сохранную способность исходно менее зрелых миелоидных и плазмоцитоидных ДК реагировать на факторы созревания. Статистически значимое увеличение количества плазмоцитоидных ДК, экспрессирующих CCR7, в образцах крови больных РА под действием стимуляторов созревания, по сравнению со здоровыми донорами свидетельствует о более высокой миграционной способности как исходных плазмоцитоидных ДК, так и в ответ на факторы дифференцировки. Учитывая полученные данные и результаты исследований количества плазмоцитоидных ДК в синовиальной жидкости у больных РА [30], можно предположить, что плазмоцитоидные ДК периферической крови, с высокой экспрессией фактора миграции и сохранной способностью к созреванию, активно поступают в лимфоузлы и очаг воспаления (синовиальная оболочка и синовиальная жидкость) [71]. Плазмоцитоидные ДК могут во многом определять специфику аутоиммунного воспалительного процесса (инфильтрация синовиальной оболочки CD8⁺лимфоцитами и NK-клетками, выраженный экссудативный процесс), увеличение циркулирующих антител к компонентам соединительной ткани) [108,111,86].

Для оценки влияния дендритных клеток на формирование цитокинового баланса, как в норме, так и при ревматоидном артрите, в нашей работе была произведена оценка внутриклеточной продукции миелоидными и плазмоцитоидными дендритными клетками ряда цитокинов. В зависимости от продукции миелоидными и плазмоцитоидными дендритными клетками циркулирующими в периферической крови IL-4, IL-10, IL-12, IFN- α могут определяться различия процесса дифференцировки распознавших антиген Т-лимфоцитов, а в дальнейшем и тип иммунного ответа. В большинстве работ внутриклеточную продукцию цитокинов оценивали только кондиционной среде после добавления специфических стимуляторов к дендритным клеткам, генерированным из моноцитов [107, 99], в то время как для полноценной оценки функционального потенциала ДК и для развития тех или иных клеточных реакций необходимо оценивать данные показатели и на клетках цельной крови учитывая внутриклеточную продукцию.

Установленная низкая экспрессия IL-4 у больных РА подтверждает гипотезу о сдвиге иммунного ответа в сторону Th1 пути в патогенезе данного заболевания, так как IL-4 является одним из ключевых цитокинов Th2 пути. IL-10 является цитокином, выступающим в качестве супрессорного медиатора в отношении воспалительных процессов и адаптивных иммунных реакций клеточного типа, которые существенно нарушаются при развитии данного заболевания[33].

Дендритные клетки продуцируют IL-12. IL-12 играет большую роль при

дифференцировке наивных Т клеток в Th1 и может вызвать чрезмерную активацию клеточно-опосредованного иммунного ответа с развитием аутоиммунной патологии и. В обеих исследуемых группах внутриклеточная продукция IL-12 определялась только у плазмцитоподобных дендритных клеток больных ревматоидным артритом, что свидетельствует об их активной вовлеченности и участии в патологическом процессе.

Исследование субпопуляций дендритных клеток периферической крови по внутриклеточной продукции IFN- α показало что плазмцитоподобные дендритные клетки показывают высокий уровень продукции данного цитокина, что согласуется с литературными данными о том что именно эти клетки являются основными IFN продуцирующими клетками. А установленный статистически значимо более высокий процент у больных ревматоидным артритом клеток, продуцирующих данный цитокин, по сравнению со здоровыми донорами, так же подтверждает наличие цитокинового дисбаланса поскольку IFN- α играет важную иммунорегуляторную роль в усилении Th1 клеточного иммунитета.

Таким образом, полученные данные о снижении внутриклеточной продукции IL-4, IL-10 обеими субпопуляциями ДК больных РА по сравнению со здоровыми донорами подтверждают участие ДК в смещении цитокинового дисбаланса в сторону Th1 [18], а одновременное с этим увеличение внутриклеточной продукции провоспалительных цитокинов только плазмцитоподобными дендритными клетками свидетельствует об их

большей вовлеченности в регуляцию данного процесса.

Хотя ДК присутствуют в большинстве тканей, их абсолютное количество относительно мало – в частности, среди мононуклеарных клеток периферической крови ДК составляет меньше чем 1% [89]. Дендритные клетки представляют собой гетерогенную клеточную популяцию, происходящую из костомозговых предшественников и характеризующуюся высокой экспрессией МНС II [88]. Выделяют два основных подтипа ДК, значительно различающиеся по своим фенотипическим и функциональным характеристикам, а также по вовлеченности в различные иммунные реакции при патологических процессах: плазмцитоподобные и миелоидные ДК. Функциональный потенциал обоих типов ДК зависит не только от их происхождения, но и от цитокинов и клеток микроокружения, с которыми они взаимодействуют в процессе развития [141]. Плазмцитоподобные ДК экспрессируют TLR-7 и TLR-9 и распознают вирусные компоненты, секретируют большие количества интерферона I типа, IFN- α [17], стимулируют Т-зависимую и Т-независимую дифференцировку В-клеток в плазматические клетки [71]. Для миелоидных ДК факторами дифференцировки и созревания являются GM-CSF, TNF- α , IL-4, TGF- β . МДК экспрессируют TLR-2 и TLR-4, которые распознают бактериальные компоненты [128], что позволяет им участвовать в индукции различных типов Т-клеточного ответа [17,134].

Подобные отличия в свойствах и функциональных характеристиках

разных субпопуляций дендритных клеток обуславливают их разную вовлечённость в иммунопатологические процессы. В связи с их высоким терапевтическим потенциалом необходимо подробное изучение их фенотипических характеристик при конкретных патологиях для установления их способности регулировать иммунные механизмы. Поэтому для применения дендритных клеток в клеточной терапии нужно оценивать способность их к индукции функционально полноценных дендритных клеток из моноклеарных клеток.

Для оценки возможностей использования ДК в качестве клеток-кандидатов для клеточной терапии необходимо более подробное изучение как отдельных субпопуляций ДК циркулирующих в периферической крови, так и возможность их генерации из клеток предшественников.

Показано, что уровень экспрессии на индуцированных миелоидных и плазмцитоидных ДК CD80, CD83, CCR7 на всех стадиях созревания не отличался у больных и здоровых. При этом для миелоидной субпопуляции полученные зрелые мДК от больных РА сохраняют способность продуцировать цитокины IL-10, IL-12, IFN- α , как и ДК полученные от условно здоровых доноров, что свидетельствует о возможности получения *in vitro* функционально полноценных ДК. В то же время как для плазмцитоидной субпопуляции пДК больных РА и здоровых доноров имеют одинаковые уровни продукции таких цитокинов как IL-10, IL-12, но в ответ на стимуляцию R848 и CpG наблюдалось статистически значимое

увеличение продукции IFN- α ДК больных РА по сравнению со здоровыми донорами.

В результате проведенных исследований было показано, что в периферической крови больных РА мДК и пДК обладают незрелым фенотипом, при этом значительное снижение относительного количества пДК периферической крови у больных РА, что свидетельствует о формировании при данной патологии дисбаланса между субпопуляциями ДК. Одновременно с этим, пДК больных РА характеризуются более высокой экспрессией CCR7.

Полученные данные о снижении внутриклеточной продукции цитокинов IL-4 и IL-10 обеими субпопуляциями ДК больных РА и одновременное с этим увеличение внутриклеточной продукции медиаторов IL-12 и IFN α пДК по сравнению со здоровыми донорами свидетельствуют о вовлеченности ДК в патогенез заболевания и подтверждают участие ДК в смещении баланса в сторону иммунных реакций Th1 типа. В целом эти данные (незрелый фенотип, повышение маркера миграции и сдвиг внутриклеточной продукции медиаторов в пользу цитокинов Th1 типа) позволяют рассматривать ДК как клетки-мишени для таргетной терапии при ревматоидном артрите. Данные по индукции функционально полноценных миелоидных и плазмоцитоидных ДК (за исключением внутриклеточной продукции IFN α pDC) указывают на возможность их использования в качестве клеток-кандидатов для разработки клеточных технологий иммунотерапии РА.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обобщая полученные данные, можно заключить, что, как для здоровых доноров, так и больных ревматоидным артритом, установлено определенное соотношение подтипов дендритных клеток периферической крови, статистически значимое изменяющееся при патологии за счет уменьшения количества циркулирующих плазмоцитоидных ДК. Кроме того, показаны различия по функциональным и фенотипическим характеристикам ДК между исследуемыми группами, что говорит об участии разных субпопуляций дендритных клеток в воспалительном процессе.

У больных ревматоидным артритом как миелоидные, так и плазмоцитоидные ДК характеризовались статистически значимо менее зрелым фенотипом по сравнению с клетками условно здоровых доноров, однако обладали сохранной способностью к созреванию под действием специфических стимуляторов, а именно при добавлении R848 и LPS наблюдалось увеличение экспрессии CD80 и CD83 на позитивных дендритных клетках больных ревматоидным артритом.

Для больных ревматоидным артритом показано меньшее относительное количество плазмоцитоидных ДК, но при этом дендритные клетки обеих субпопуляций при патологии демонстрируют статистически значимо более

высокий миграционный потенциал, выраженный в увеличение экспрессии поверхностного маркера CCR7, по сравнению с показателями здоровых доноров.

Показано снижение внутриклеточной продукции противовоспалительных цитокинов (IL-4, IL-10) клетками обеих субпопуляций ДК больных ревматоидным артритом по сравнению со здоровыми донорами одновременно с увеличением плазмоцитоидными ДК внутриклеточной продукции провоспалительных цитокинов (IL-12, IFN- α), что свидетельствует об их активном участии в дисрегуляции цитокинового баланса.

Полученные данные о генерации дендритных клеток от больных ревматоидным артритом с миелоидным и плазмоцитоидным фенотипом имеют аналогичные по уровню экспрессии поверхностных маркеров и внутриклеточных цитокинов характеристики по сравнению с дендритными клетками условно здоровых доноров. Это свидетельствует о функциональной полноценности и потенциальной возможности применения их в качестве терапевтического агента.

Таким образом, было показано, что выявленные характеристики субпопуляций циркулирующих ДК периферической крови и эффективность индукции функционально полноценных миелоидных и плазмоцитоидных дендритных клеток у больных ревматоидным артритом статистически значимо отличаются по сравнению с условно здоровыми

донорами. А применяемый подход показал возможность индуцировать у больных ревматоидным артритом полноценные ДК обладающие фенотипом миелоидных и плазмоцитоидных ДК.

ВЫВОДЫ

1. У больных ревматоидным артритом по сравнению со здоровыми донорами в периферической крови не меняется содержание миелоидных и достоверно снижается количество плазмоцитоидных дендритных клеток, что свидетельствует о формировании дисбаланса между субпопуляциями дендритных клеток.
2. Дендритные клетки больных ревматоидным артритом характеризуются низким уровнем экспрессии CD80 CD83 как на миелоидных, так и на плазмоцитоидных ДК, что указывает на менее зрелое состояние циркулирующих дендритных клеток.
3. У больных ревматоидным артритом наблюдается более высокий процент CCR7- позитивных плазмоцитоидных дендритных клеток по сравнению со здоровыми донорами, что свидетельствует о более высоком миграционном потенциале плазмоцитоидных ДК периферической крови при данной патологии.
4. В периферической крови больных ревматоидным артритом по сравнению с показателями у здоровых доноров наблюдается снижением процента как миелоидных, так и плазмоцитоидных дендритных клеток, продуцирующих IL-4 и IL-10, при этом в популяции плазмоцитоидных дендритных клеток наблюдается повышение процента клеток продуцирующих IL-12, IFN- α , что

свидетельствует о смещении баланса цитокинов в пользу медиаторов, стимулирующих клеточные реакции.

5. Индуцированные миелоидные и плазмоцитоидные дендритные клетки из клеток крови больных ревматоидным артритом не отличаются по своим фенотипическим характеристикам (CD80, CD83, CCR7) и способности к продукции цитокинов (IL-10, IL-12) от аналогичных клеток, индуцированных из клеток крови здоровых доноров, что свидетельствует о возможности индукции функционально полноценных дендритных клеток.
6. Полученные результаты по достоверному изменению как количества дендритных клеток в периферической крови, так и их фенотипических и функциональных характеристик (маркеры дифференцировки, маркеры миграции и экспрессия IL-4, IL-10, IL-12) свидетельствуют о вовлеченности дендритных клеток в формирование иммунопатологического процесса при ревматоидном артрите.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кетлинский С.А. Th17- новая линия дифференцировки Т хелперов: обзор данных // Цитокины и воспаление. - 2009. - Т.8. - №2. - С. 3-15.
2. Кологривова И.В., Кологривова Е. Н., Суслова Т. Е. Молекулярные аспекты функционирования Т-хелперов 17-го типа. // Бюллетень сибирской медицины. – 2011. – Т. 4. – С. 93-99.
3. Кологривова И.В., Кологривова Е.Н. Молекулярные аспекты функционирования Т-хелперов 17-го типа. // Бюллетень сибирской медицины. - 2011. - №4. - С. 93-99.
4. Мазуров В.И., Беляева И.Б., Октябрьская И.В. Современная стратегия лечения раннего ревматоидного артрита. // Доктор.Ру. - 2014. – Т. 7. - №95. - С.28-32.
5. Новиков А.А., Александрова Е.Н., Диатроптова М.А., Насонов Е.Л. Роль цитокинов в патогенезе ревматоидного артрита. // Научно-практическая ревматология. - 2010. - №2. - С.71-82.
6. Талаев В. Ю. Механизмы управления миграцией миелоидных дендритных клеток и клеток Лангерганса.// Иммунология. – 2012. – №2. – С.104-112.
7. Хоченков Д. А. Биология дендритных клеток. Биологические мембраны.// Иммунология. – 2008. –Т. 25. - №.6. – С. 403-419.

8. Abdulahad W.H., Stegeman C.A., Geld Y.M., Doornbos-van der Meer B., Limburg P.C., Kallenberg C.G. Functional defect of circulating regulatory CD4+ T cells in patients with Wegener's granulomatosis in remission. // *Arthritis Rheum.* – 2007.- Vol.56(6) .- P.2080-91.
9. Agaugué S., Marcenaro E., Ferranti B., Moretta L., Moretta A. Human natural killer cells exposed to IL-2, IL-12, IL-18, or IL-4 differently modulate priming of naive T cells by monocyte-derived dendritic cells. // *Blood.*- 2008.- Vol.112(5) .- P.1776-83.
- 10.Akbari O., Freeman G.J., Meyer E.H., Greenfield E.A., Chang T.T., Sharpe A.H., Berry G., DeKruyff R.H., Umetsu D.T. Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. // *Nat Med.*- 2002.- Vol.8(9) .- P.1024-32.
- 11.Alvarez D., Vollmann E. H., von Andrian U.H. Mechanisms and consequences of dendritic cell migration // *Immunity.* – 2008. – Vol. 29, № 3. – P. 325.
- 12.Amodio G, Gregori S. Dendritic cells a double-edge sword in autoimmune responses. // *Front Immunol.*- 2012.- Vol.3.- P.233.
- 13.Anderson AC, Reddy J, Nazareno R, Sobel RA, Nicholson LB, Kuchroo VK. IL-10 plays an important role in the homeostatic regulation of the autoreactive repertoire in naive mice. // *J Immunol.* – 2004. – Vol. 15 . – P. 828-34.

14. Appel H, Maier R, Bleil J, Hempfing A, Loddenkemper C, Schlichting U, Syrbe U, Sieper J. In situ analysis of interleukin-23- and interleukin-12-positive cells in the spine of patients with ankylosing spondylitis. // *Arthritis Rheum.* – 2013. – Vol. 65(6) . – P. 1522-9.
15. Asseman C., Powrie F. Interleukin 10 is a growth factor for a population of regulatory T cells. // *Gut.* - 1998.- Vol. 42(2) . – P. 157-8.
16. Balanescu A., E. Radu, R. Nat, T. Regalia, V. Bojinca, V. Predescu, D. Predeteanu: Co-stimulatory and adhesion molecules of dendritic cells in rheumatoid arthritis. // *J Cell Mol Med.*-2002.- Vol. 6. – P. 415-425
17. Banchereau J, Klechevsky E, Schmitt N, Morita R, Palucka K, Ueno H. Harnessing human dendritic cell subsets to design novel vaccines. // *Ann N Y Acad Sci.*- 2009.- Vol.1174.- P.24–32.
18. Banchereau J., Briere F., Caux C., Davoust J., Lebecque S., Liu Y.J., Pulendran B., Palucka A.K. Immunobiology of dendritic cells. // *Annu. Rev. Immunol.*- 2000.- Vol.18.- P.767-811.
19. Belz GT, Nutt SL. Transcriptional programming of the dendritic cell network. // *Nat Rev Immunol.* -2012.- Vol.12(2) .- P.101-13.
20. Berg L, Rönnelid J, Klareskog L, Bucht A. Down-regulation of the T cell receptor CD3 zeta chain in rheumatoid arthritis (RA) and its influence on T cell responsiveness. // *Clin Exp Immunol.* -2000.- Vol.120(1) .- P.174-82.
21. Bernard P. Leung, Margaret Conacher, David Hunter, Iain B. McInnes, Foo Y. Liew, and James M. Brewer A Novel Dendritic Cell-Induced Model of

- Erosive Inflammatory Arthritis: Distinct Roles for Dendritic Cells in T Cell Activation and Induction of Local Inflammation. // The Journal of Immunology.- 2002.- Vol. 169.- P. 7071–7077.
22. Bernard P. Leung, Margaret Conacher, David Hunter, Iain B. McInnes, Foo Y. Liew, and James M. Brewer A Novel Dendritic Cell-Induced Model of Erosive Inflammatory Arthritis: Distinct Roles for Dendritic Cells in T Cell Activation and Induction of Local Inflammation. // The Journal of Immunology .-2002.- Vol. 169. – P. 7071–7077.
23. Bianco N.R., Kim S.H., Ruffner M.A., Robbins P.D. Therapeutic effect of exosomes from indoleamine 2,3-dioxygenase-positive dendritic cells in collagen-induced arthritis and delayed-type hypersensitivity disease models. // Arthritis Rheum. -2009.-Vol. 60(2).- P. 380-9.
24. Blanco P, Palucka AK, Pascual V, Banchereau J. Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. // Cytokine Growth Factor Rev. -2008.- Vol.19(1) . – P. 41-52.
25. Boissier M.C., Semerano L., Challal S., Saldenber-Kermanac'h N., Falgarone G. Rheumatoid arthritis: from autoimmunity to synovitis and joint destruction. // J Autoimmun. – 2012.- Vol.39(3) . – P. 222-8.
26. Boissier M.C., Assier E, Falgarone G, Bessis N. Shifting the imbalance from Th1/Th2 to Th17/treg: the changing rheumatoid arthritis paradigm. // Joint Bone Spine.- 2008.- Vol.75(4) . – P. 373-5.

27. Boks M.A., Kager-Groenland J.R., Haasjes M.S., Zwaginga J.J., van Ham SM, ten Brinke A. IL-10-generated tolerogenic dendritic cells are optimal for functional regulatory T cell induction--a comparative study of human clinical-applicable DC. // Clin Immunol. – 2012.- Vol.142(3). – P. 332-42.
28. Boyum A. Separation of leucocytes from blood and bone marrow // Scand J Clin Lab Invest. -1968. - Vol. 21. - P. 97.
29. Brocker T.S. Survival of mature CD4 T lymphocytes is dependent on major histocompatibility complex class II-expressing dendritic cells. // J Exp Med. – 1997. - Vol. 20.- P.1223-32.
30. Cavanagh L.L., Boyce A., Smith L. et al. Rheumatoid arthritis synovium contains plasmacytoid dendritic cells. // Arthritis Res. Ther.- 2005.- Vol.7.- R.230-240.
31. Charbonnier L.M., van Duivenvoorde L.M., Apparailly F., Cantos C., Han W.G., Noël D., Duperray C., Huizinga T.W., Toes R.E., Jorgensen C., Louis-Pence P. Immature dendritic cells suppress collagen-induced arthritis by in vivo expansion of CD49b⁺ regulatory T cells. // J. Immunol.-2006.- Vol.177(6).- P. 3806-3813.
32. Chiang E.Y., Kolumam G.A., Yu X., Francesco M., Ivelja S., Peng I., Gribling P., Shu J., Lee W.P., Refino C.J., Balazs M., Paller-Martinez A., Nguyen A., Young J., Barck K.H., Carano R.A., Ferrando R., Diehl L., Chatterjea D., Grogan J.L. Targeted depletion of lymphotoxin-alpha-expressing TH1 and TH17 cells inhibits autoimmune disease. // Nat. Med.- 2009.- Vol.15(7).- P.766-773.

33. Cox K., North M., Burke M., Singhal H., Renton S., Aqel N., Islam S., Knight S.C. Plasmacytoid dendritic cells (PDC) are the major DC subset innately producing cytokines in human lymph nodes. // J Leukoc Biol. – 2005.- Vol.78(5) – P. 1142-52
34. Cravens P.D., Lipsky P.E. Dendritic cells, chemokine receptors and autoimmune inflammatory diseases. // Immunol Cell Biol. – 2002. – Vol. 80(5). – P. 497-505.
35. de Heer H.J., Hammad H., Soullié T., Hijdra D., Vos N., Willart M.A., Hoogsteden H.C., Lambrecht B.N. Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen. // J. Exp Med.- 2004.- Vol. 5.- P.89-98.
36. De Kleer I.M., Wedderburn L.R., Taams L.S CD4⁺ CD25^{bright} regulatory T cells actively regulate inflammation in the joints of patients with the remitting form of juvenile idiopathic arthritis. // J. Immunol. – 2004. – Vol. 172– P. 6435-6443.
37. Eastaff-Leung N., Mabarrack N., Barbour A., Cummins A., Barry S. Foxp3⁺ regulatory T cells, Th17 effector cells, and cytokine environment in inflammatory bowel disease. // J. Clin. Immunol.- 2010.– Vol.30(1) . – P. 80-9.
38. Eleanor C. Tsark, Wei W., Yu-Chin T., Daniel A., George R. D., Susan K. Differential MHC Class II-Mediated Presentation of Rheumatoid Arthritis

- Autoantigens by Human Dendritic Cells and Macrophages. // J. Immunol.- 2002. – Vol. 169. – P. 6625-6633
39. Eric Wieder . Dendritic Cells: A Basic Review. // J. Immunol.- 2003. – Vol. 169. – P. 6652-6660
40. Fallarino F., Grohmann U., You S., McGrath B.C., Cavener D.R., Vacca C., Orabona C., Bianchi R., Belladonna M.L., Volpi C., Fioretti M.C., Puccetti P. Tryptophan catabolism generates autoimmune-preventive regulatory T cells. // Transpl. Immunol.-2006.-Vol. 17(1).- P. 58-60.
41. Finnegan A., Kaplan C.D., Cao Y., Eibel H., Glant T.T., Zhang J. Collagen-induced arthritis is exacerbated in IL-10-deficient mice. // Arthritis Res Ther. – 2003. – Vol. 5(1). – P.18-24.
42. Frances S.S., Prachi A., Sean L., Steven E. C. Dendritic cells in rheumatoid arthritis: progenitor cell and soluble factors contained in rheumatoid arthritis synovial fluid yield a subset of myeloid dendritic cells that preferentially activate Th1 inflammatory- type responses. // J. Immunol. -2001. – Vol. 167. – P.1758-1768.
43. Frey O., Petrow P. K., Gajda M. The role of regulatory T cells in antigen-induced arthritis: aggravation of arthritis after depletion and amelioration after transfer of CD4⁺CD25⁺ T cells. // Arthr. Res. Ther. -2005. – Vol. 7. – P. 291-301.
44. Georgia F. Matthias G. von Herrath A novel vicious cycle in rheumatoid arthritis. // Blood . - 2006– Vol. 10. – P. 291-301.

45. Gonzalo-Gil E., Criado G., Santiago B., Dotor J., Pablos J.L., Galindo M.
TGF-beta signalling is increased in rheumatoid synovium but TGF-beta blockade does not modify experimental arthritis. // Clin. Exp. Immunol. – 2013. – Vol. 19.- P. 1625-31.
46. Gran B., Zhang G.X., Rostami A. Role of the IL-12/IL-23 system in the regulation of T-cell responses in central nervous system inflammatory demyelination. // Crit. Rev. Immunol. – 2004. – Vol. 24. – P.111–128.
47. Guichelaar T., ten Brink C.B., van Kooten P.J., Berlo S.E., Broeren C.P., van Eden W., Broere F. Autoantigen-specific IL-10-transduced T cells suppress chronic arthritis by promoting the endogenous regulatory IL-10 response. // J. Immunol. – 2008. – Vol.180(3) . – P.1373-81.
48. Guillaume P., Serge L., Pierre M. Anatomic Localization of Immature and Mature Dendritic Cells in an Ectopic Lymphoid Organ: Correlation with Selective Chemokine Expression in Rheumatoid Synovium. // The Journal of Immunology.- 2002.- Vol. 168.- P. 5333–5341.
49. Hemmi, H., T. Kaisho, O. Takeuchi, S. Sato, H. Sanjo, K. Hoshino, T. Horiuchi, H. Tomizawa, K. Takeda, and S. Akira. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. // Nat. Immunol. -2002.- Vol. 3.- P.196-200.
50. Hock B.D., O'Donnell J.L., Taylor K., Steinkasserer A., McKenzie J.L., Rothwell A.G., Summers K.L. Levels of the soluble forms of CD80, CD86,

and CD83 are elevated in the synovial fluid of rheumatoid arthritis patients.

// Tissue Antigens. -2006.- Vol.67(1) .- P.57-60.

51. Hongmei Li., Guang-Xian Z., Youhai C., Hui X., Denise C. Fitzgerald, Zhao Zhao, and Abdolmohamad Rostami CD11c_CD11b_ Dendritic Cells Play an Important Role in Intravenous Tolerance and the Suppression of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. // J. Immunol. – 2008.- Vol.181.- P.2483-2493.
52. Huh J.C., Strickland D.H., Jahnsen F.L., Turner D.J., Thomas J.A., Napoli S., Tobagus I., Stumbles P.A., Sly P.D., Holt P.G. Bidirectional interactions between antigen-bearing respiratory tract dendritic cells (DCs) and T cells precede the late phase reaction in experimental asthma: DC activation occurs in the airway mucosa but not in the lung parenchyma. // J. Exp. Med.- 2003. – Vol. 7. – P.19-30.
53. Ito T., Wang Y.H., Duramad O., Hori T., Delespesse G.J., Watanabe N., Qin F.X., Yao Z., Cao W., Liu Y.J. TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand. // J. Exp. Med. – 2005.– Vol.7. – P.1213-23.
54. Ito T., Yang M., Wang Y.H., Lande R., Gregorio J., Perng O.A., Qin X.F., Liu Y.J., Gilliet M. Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. // J. Exp. Med. 2007.- Vol.7 . – P.22105-15.

55. Johnson L. A., Jackson D. G. Cell traffic and the lymphatic endothelium // Ann. N. Y. Acad. Sci. -2008. – Vol. 1131.- P. 119- 133.
56. Jongbloed S.L., Lebre M.C., Fraser A.R., Gracie J.A., Sturrock R.D., Tak P.P., McInnes I.B. Enumeration and phenotypical analysis of distinct dendritic cell subsets in psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis. // Arthritis Res. Ther.- 2006.- Vol.8.- P.15.
57. Jongbloed S.L., Lebre M.C., Fraser A.R., Gracie J.A., Sturrock R.D., Tak P.P., McInnes I.B. Enumeration and phenotypical analysis of distinct dendritic cell subsets in psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis. // Arthritis Res Ther. -2006.- Vol.8(1).- P.15.
58. Joosten L.A., Lubberts E., Helsen M.M., Saxne T., Coenen-de Roo C.J., Heinegård D., van den Berg W.B. Protection against cartilage and bone destruction by systemic interleukin-4 treatment in established murine type II collagen-induced arthritis. // Arthritis Res.-1999.- Vol.1(1).- P. 81-91.
59. Kelchtermans H., De Klerck B., Mitera T Defective CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell functioning in collagen-induced arthritis: an important factor in pathogenesis, counter- regulated by endogenous IFN-gamma. // Arthr. Res. Ther. 2005.- Vol.7.- P.402-415.
60. Kenna K., Beignon A.S., Bhardwaj N.. Plasmacytoid Dendritic Cells: Linking Innate and Adaptive Immunity. // Journal of virology. 2005.- Vol.5 .- P.17–27.

61. Kim S.H., Kim S., Evans C.H., Ghivizzani S.C., Oligino T., Robbins P.D.
Effective treatment of established murine collagen-induced arthritis by systemic administration of dendritic cells genetically modified to express IL-4. // J Immunol.- 2001.- Vol.166.- P.3499-3505.
62. Kim S.H., Kim S., Oligino T.J., Robbins P.D. Effective treatment of established mouse collagen-induced arthritis by systemic administration of dendritic cells genetically modified to express FasL. // Mol. Ther.- 2002.- Vol.6.- P.584-590.
63. Kimura H., Tzou S.C., Rocchi R., Kimura M., Suzuki K., Parlow A.F., Rose N.R., Caturegli P. Interleukin (IL)-12-driven primary hypothyroidism: the contrasting roles of two Th1 cytokines (IL-12 and interferon-gamma). // Endocrinol.- 2005.- Vol.146.- P.3642-3651.
64. Komi J., Mottonen M., Luukkainen R., Lassila O. Non-steroidal anti-oestrogens inhibit the differentiation of synovial macrophages into dendritic cells. // Rheumatology (Oxford).- 2001.- Vol.40.- P.185-191.
65. Krug, A., Towarowski A., Britsch S., Rothenfusser S., Hornung V., Bals R., Giese T., Engelmann H., Endres S., Krieg A. M., Hartmann G.. Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. // Eur. J. Immunol.- 2001.- Vol.31.- P.3026-3037.
66. Kurabayashi A., Furihata M., Matsumoto M., Hayashi H., Ohtsuki Y.
Distribution of tumor-infiltrating dendritic cells in human nonsmall cell lung

- carcinoma in relation to apoptosis //Pathology International. - 2004. - Vol. 54. - P. 302-310
- 67.Lambrecht BN, Hammad H. Taking our breath away: dendritic cells in the pathogenesis of asthma. // Nat. Rev. Immunol. -2003.- Vol. 3(12). - P. 994-1003.
- 68.Lande R, Giacomini E, Serafini B, Rosicarelli B, Sebastiani GD, Minisola G, Tarantino U, Riccieri V, Valesini G, Coccia EM: Characterization and recruitment of plasmacytoid dendritic cells in synovial fluid and tissue of patients with chronic inflammatory arthritis. // J. Immunol. – 2004.- Vol. 173.- P. 2815-2824.
- 69.Lau C.M., Broughton C., Tabor A.S., Akira S., Flavell R.A., Mamula M.J., RNA associated autoantigens activate B cells by combined B cell antigen receptor/toll-like receptor 7 engagement. // J. Exp. Med. – 2005.- Vol. 202.- P. 1171–7.
- 70.Lebre M.C., Tak P.P. Dendritic cell subsets: their roles in rheumatoid arthritis. Acta Reumatol Port. 2008 Jan-Mar;33(1):35-45.
- 71.Lebre M.C., Tak P.P. Dendritic cells in rheumatoid arthritis: which subset should be used as a tool to induce tolerance? // Hum. Immunol.- 2009.
- 72.Leonie M. van Duivenvoorde, Wanda G. H. Han, Aleida M. Bakker, Pascale Louis-Plence, Louis-Marie Charbonnier, Florence Apparailly, Ellen I. H. van der Voort, Christian Jorgensen, Tom W. J. Huizinga, and Rene. E. M. Toes. Immunomodulatory Dendritic Cells Inhibit Th1 Responses and

- Arthritis via Different Mechanisms. // J. Immunol.- 2007.- Vol.179.- P.1506-1515
73. Leonie M. van Duivenvoorde, Geertje J.D. van Mierlo, Zita F.H.M. Boonmanb, Rene. E.M. Toes Dendritic cells: Vehicles for tolerance induction and prevention of autoimmune diseases. // Immunobiology.-2006.- Vol. 211.- P.627–632.
74. Leukotriene C4 prevents the complete maturation of murine dendritic cells and modifies interleukin-12/interleukin-23 balance. // Immunology. – 2011.- Vol. 134(2).- P.185–197.
75. Leung B.P., Conacher M., Hunter D., McInnes I.B., Liew F.Y., Brewer J.M. A novel dendritic cell-induced model of erosive inflammatory arthritis: distinct roles for dendritic cells in T cell activation and induction of local inflammation. // The Journal of Immunology.- 2002.- Vol.169.- P.7071-7077.
76. Li R, Zheng X, Popov I, Zhang X, Wang H, Suzuki M, Necochea-Campion RD, French PW, Chen D, Siu L, Koos D, Inman RD, Min WP. Gene silencing of IL-12 in dendritic cells inhibits autoimmune arthritis. // J. Transl. Med. – 2012.- Vol.31.- P.10-19.
77. Lim D.S., Kang M.S., Jeong J.A., Bae Y.S. Semi-mature DC are immunogenic and not tolerogenic when inoculated at a high dose in collagen-induced arthritis mice. // Eur. J. Immunol.- 2009.- Vol.39(5).- P.1334-43.

78. Lipscomb M.F., Masten B.J. Dendritic cells: immune regulators in health and disease. // *Physiol. Rev.* - 2002.- Vol.82(1) .- P.97-130.
- 79.Liu M. F., Wang C. R., Fung L.L. The presence of cytokine- suppressive CD4⁺ CD25⁺ T cells in the peripheral blood and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. // *Scand. J. Immunol.* -2005.- Vol.62.- P.312-317.
- 80.Liu Y.J., Soumelis V., Watanabe N., Ito T., Wang Y.H., Malefyt Rde W., Omori M., Zhou B., Ziegler S.F.. TSLP: an epithelial cell cytokine that regulates T cell differentiation by conditioning dendritic cell maturation. // *Annu. Rev. Immunol.* – 2007.- Vol.25.- P.193-219.
- 81.Liu Z., Xu X., Hsu H.C., Tousson A., Yang P.A., Wu Q., Liu C., Yu S., Zhang H.G., Mountz J.D. CII-DC-AdTRAIL cell gene therapy inhibits infiltration of CII-reactive T cells and CII-induced arthritis. // *J. Clin. Invest.*- 2003.- Vol.112(9).- P. 1332-41.
- 82.Lubberts E. IL-17/Th17 targeting: on the road to prevent chronic destructive arthritis? // *Cytokine.*- 2008.- Vol.41(2) .- P. 84-91.
- 83.Lubberts E. Th17 cytokines and arthritis. // *Semin. Immunopathol.*- 2010.- Vol.32(1) .- P. 43-53.
- 84.Luross J.A., Williams N.A. The genetic and immunopathological processes underlying collagen-induced arthritis. // *Clinical & Experimental Immunology.*-2009.- Vol.157.- P.350-358.
- 85.Lutzky V., Hannawi S., Thomas R. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Dendritic cells. // *Arthritis Res. Ther.*- 2007.- Vol.9(4) .- P.219.

86. Lutzky V., Hannawi S., Thomas R. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Dendritic cells. Arthritis. // Res. Ther.- 2007.- Vol.9.- P.219.
87. Lebre M. C., Jongbloed L., Sander W. T., Smeets J.M., McInnes I. B., P. Tak P. Rheumatoid Arthritis Synovium Contains Two Subsets of CD83_DC-LAMP_ Dendritic Cells with Distinct Cytokine Profiles. // Am. J. Pathol. – 2008.- Vol.172.- P.940 – 950;
88. MacDonald K.P., Munster D.J, Clark G.J., Dzionek A., Schmitz J., Hart D.N. Characterization of human blood dendritic cell subsets. // Blood.- 2002.- Vol.100(13) .- P.4512–20.
89. Maraskovsky E., Daro E., Roux E., Teepe M., Maliszewski C.R., Hoek J In vivo generation of human dendritic cell subsets by Flt3 ligand. // Blood.- 2000.- Vol.96(3) .- 878– 84.
90. Martin E., Capini C., Duggan E., Lutzky V.P., Stumbles P., Pettit A.R., O'Sullivan B., Thomas R. Antigen-specific suppression of established arthritis in mice by dendritic cells deficient in NF-kappaB. // Arthritis Rheum.-2007.- Vol.56(7).- P. 2255-2266.
91. Mayumi N., Watanabe E., Norose Y., Watari E., Kawana S., Geijtenbeek T.B., Takahashi H. E-cadherin interactions are required for Langerhans cell differentiation. // Eur. J. Immunol. – 2013.- Vol.43(1) .- P. 270-80.
92. McInnes I. B., Schett G., Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. // Nat. Rev. Immunol.- 2007.- Vol.7.- P. 429-42.

93. Miossec P. Dynamic interactions between T cells and dendritic cells and their derived cytokines/chemokines in the rheumatoid synovium. // *Arthritis Res. Ther.* – 2008.- Vol.10.- P. 530-42.
94. Mohamadzadeh M., Berard F., Essert G., Chalouni C., Pulendran B., Davoust J., Bridges G., Palucka A.K., Banchereau J. Interleukin 15 skews monocyte differentiation into dendritic cells with features of Langerhans cells. // *J. Exp. Med.*- 2001.- Vol.194.- P. 1013–1020.
95. Moore K.W., de Waal Malefyt R., Coffman R.L., O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. // *Annu. Rev. Immunol.*- 2001.- Vol.19.- P. 683-765.
96. Morgan M. E., Suttmüller R.P., Witteveen H. J. CD25⁺ cell depletion hastens the onset of severe disease in collagen-induced arthritis. // *Arthr. And Rheum.* – 2003.- Vol. 48.- P. 1452-1460.
97. Morita Y., Yang J., Gupta R., Shimizu K., Shelden E.A., Endres J., Mulé J.J., Mc Donagh K.T., Fox D.A. Dendritic cells genetically engineered to express IL-4 inhibit murine collagen-induced arthritis.// *J. Clin. Invest.*- 2001.- Vol.107(10) .- P.1275-84.
98. Murphy C.A., Langrish C.L., Chen Y., Blumenschein W., McClanahan T., Kastelein R.A., Sedgwick J.D., Cua D.J. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. // *J. Exp. Med.* – 2003.- Vol.198.- P.1951–1957.

99. Murphy C.A., Langrish C.L., Chen Y., Blumenschein W., McClanahan T., Kastelein R.A. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. // J. Exp. Med. – 2003. - Vol.198.- P.1951-7.
100. Nickdel M.B., Conigliaro P., Valesini G., Hutchison S., Benson R., Bundick R.V., Leishman A.J., McInnes I.B., Brewer J.M., Garside P. Dissecting the contribution of innate and antigen-specific pathways to the breach of self-tolerance observed in a murine model of arthritis.// Ann Rheum Dis.- 2009.- Vol.68(6).- P.1059-1066.
101. Nishikawa Y., Sato H., Oka T., Yoshino T., Takahashi K. Immunohistochemical discrimination of plasmacytoid dendritic cells from myeloid dendritic cells in human pathological tissues. // J. Clin. Exp. Hematop.- 2009.- Vol.49(1).- P.23-31.
102. Niu Q., Cai B., Huang Z.C., Shi Y.Y., Wang L.L. Disturbed Th17/Treg balance in patients with rheumatoid arthritis. // Rheumatol. Int. – 2012. - Vol. 32(9).- P.2731-6.
103. O'Doherty U., Peng M., Gezelter S., Swiggard W. J., Betjes M., Bhardwaj N., Steinman R. M. Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature, and the other immature. // Immunology. – 1994. - Vol. 82.- P.487-493.
104. Page G., Lebecque S., Miossec P. Anatomic localization of immature and mature dendritic cells in an ectopic lymphoid organ: Correlation with

- selective chemokines expression in rheumatoid synovium. // J. Immunol. - 2002.- Vol.168. - P.5333-5341.
105. Peter G. A. Steenbakkers, Dominique Baeten, Eric Rovers, Eric M. Veys, Antonius W. M. Rijnders, Jan Meijerink, Filip De Keyser, and Annemieke M. H. Boots Localization of MHC Class II/Human Cartilage Glycoprotein-39 Complexes in Synovia of Rheumatoid Arthritis Patients Using Complex Specific Monoclonal Antibodies. // The Journal of Immunology. – 2003.- Vol.170. - P.5719–5727
 106. Pettit A.R., MacDonald K.P., O’Sullivan B, Thomas R: Differentiated dendritic cells expressing nuclear RelB are predominantly located in rheumatoid synovial tissue perivascular mononuclear cell aggregates. // Arthritis. Rheum. – 2000.- Vol.43. - P.791-800.
 107. Prevosto C., Goodall J.C., Hill Gaston J.S. Cytokine secretion by pathogen recognition receptor-stimulated dendritic cells in rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. // J. Rheumatol. – 2012.- Vol.39(10) . - P.1918-28.
 108. Radstake T.R., van Lent P.L., Pesman G.J., Blom A.B., Sweep F.G., Ronnelid J., Adema G.J., Barrera P., van den Berg W.B. High production of proinflammatory and Th1 cytokine by dendritic cells from patients with rheumatoid arthritis, and down regulation upon FcγR triggering. // Ann. Rheum. Dis.- 2004.- Vol.63.- P.696-702.

109. Rosengren A.T., Nyman T.A., Lahesmaa R. Proteome profiling of interleukin-12 treated human T helper cells. // *Proteomics*. – 2005.- Vol.5.- P.3137–3141.
110. Saeki H., Moore A.M., Brown M.J., Hwang S.T. Cutting edge: secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes. // *J. Immunol.* – 1999.- Vol.162.- P. 2472 - 5.
111. Sakaguchi N., Takahashi T., Hata H. Altered thymic T-cell selection due to a maturation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. // *Nature*.- 2003.- Vol.426.- P.454-460.
112. Santiago-Schwarz F., Anand P., Liu S., Carsons S.E. Dendritic cells (DCs) in rheumatoid arthritis (RA): progenitor cells and soluble factors contained in RA synovial fluid yield a subset of myeloid DCs that preferentially activate Th1 inflammatory-type responses. // *J. Immunol.* – 2001.- Vol.167.- P.1758-68.
113. Santiago-Schwarz F., Anand P., Liu S., Carsons S.E.: Dendritic cells (DCs) in rheumatoid arthritis (RA): Progenitor cells and soluble factors contained in RA synovial fluid yield a subset of myeloid DCs that preferentially activate Th1 inflammatory-type responses. // *J. Immunol.*- 2001.- Vol. 167.- P.1758-1768.

114. Sarkar S., Fox D.A. Dendritic cells in rheumatoid arthritis. // Front Biosci. -2005.- Vol.10.- P.656-65.
115. Schmidt S.V., Nino-Castro A.C., Schultze J.L. Regulatory dendritic cells: there is more than just immune activation. // Front. Immunol. – 2012.- Vol.3.- P.274.
116. Shi J., Ikeda K., Maeda Y., Shinagawa K., Ohtsuka A., Yamamura H., Tanimoto M. Identification of CD123+ myeloid dendritic cells as an early-stage immature subset with strong tumorigenic potential. // Cancer Lett. – 2008.- Vol. 270(1) .- P.19-29.
117. Simpson P.B., Mistry M.S., Maki R.A., Yang W., Schwarz D.A., Johnson E.B., Lio F.M., Alleva D.G. Cutting edge: diabetes-associated quantitative trait locus, Idd4, is responsible for the IL-12p40 overexpression defect in nonobese diabetic (NOD) mice. // J. Immunol. – 2003.- Vol.171.- P. 3333–3337.
118. Singh J.A., Christensen R., Wells G.A., Suarez-Almazor M.E., Buchbinder R., Lopez-Olivo M.A., Ghogomu E.T., Tugwell P. Biologics for rheumatoid arthritis: an overview of Cochrane reviews. //Sao Paulo Medical Journal.- 2010.- Vol.128.- P. 309-310.
119. Skalova K., Mollova K., Michalek J. Human myeloid dendritic cells for cancer therapy: Does maturation matter? // Vaccine. – 2010.- Vol.52.- P. 45-52.

120. Soumelis V., Reche P.A., Kanzler H., Yuan W., Edward G., Homey B., Gilliet M., Ho S., Antonenko S., Lauerma A., Smith K., Gorman D., Zurawski S., Abrams J., Menon S., McClanahan T., de Waal-Malefyt R., Bazan F., Kastelein R.A., Liu Y.J. Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. // Nat. Immunol. – 2002.- Vol.3(7) .- P. 673-80.
121. Steinman L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. // Nat. Med. – 2007.- Vol.13(2) .- P. 139-45.
122. Stoop J.N., Harry R.A., von Delwig A., Isaacs J.D., Robinson J.H., Hilkens C.M. Therapeutic effect of tolerogenic dendritic cells in established collagen-induced arthritis is associated with a reduction in Th17 responses. // Arthritis Rheum.-2010.- Vol.62(12) .- P. 3656-65.
123. Stoop J.N., Robinson J.H., Hilkens C.M. Developing tolerogenic dendritic cell therapy for rheumatoid arthritis: what can we learn from mouse models? // Ann. Rheum. Dis. – 2011.- Vol.70(9) .- P. 1526-33.
124. Tesmer L.A., Lunday K., Sarkar S., Fox D.A. Th17 cells in human disease // Immunological Reviews.- 2008.- Vol. 223 .- P. 87-113.
125. Thomas R., Davis L.S., Lipsky P.E. Rheumatoid synovium is enriched in mature antigen-presenting dendritic cells. // J. Immunol. – 1994.- Vol. 152(5) .- P. 2613-23.

126. Torchinsky M. B. Innate immune recognition of infected apoptic cells directs T(H) 17 cell differentiation // *Nature*. - 2009.- Vol. 458.- P. 78-82
127. Tracey D., Klareskog L., Sasso E.H., Salfeld J.G., Tak P.P. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. // *Pharmacol. Ther.*- 2008.- Vol. 117 (2).- P. 244-79.
128. Trinchieri G. Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity. // *Adv. Immunol.* – 1998.- Vol.70.- P. 83–243.
129. Ueno H., Klechevsky E., Morita R., Asford C., Cao T., Matsui T., Di Pucchio T., Connolly J., Fay J.W., Pascual V., Palucka A.K., Banchereau J. Dendritic cell subsets in health and disease. // *Immunol. Rev.* -.- Vol.219.- P. 118-42.
130. Valladeau J., Saeland S.. Cutaneous dendritic cells. // *Semin. Immunol.* – 2005.- Vol.17(4) .- P. 273-83.
131. Van Amelsfort J. M., Jacobs K. M., Bijlsma J. W. CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid. // *Arthr. And Rheum.* – 2004.- Vol.50.- P. 2775-2785.
132. van Duivenvoorde L.M., Han W.G., Bakker A.M., Louis-Plence P., Charbonnier L.M., Apparailly F., van der Voort E.I., Jorgensen C., Huizinga T.W., Toes R.E. Immunomodulatory dendritic cells inhibit Th1 responses and arthritis via different mechanisms. // *J. Immunol.*- 2007.- Vol.179(3) .- P.1506-1515.

133. van Duivenvoorde L.M., Louis-Plence P., Apparailly F., van der Voort E.I., Huizinga T.W., Jorgensen C., Toes R.E. Antigen-specific immunomodulation of collagen-induced arthritis with tumor necrosis factor-stimulated dendritic cells. // *Arthritis Rheum.*-2004.- Vol.50(10) .- P.3354-3364.
134. van Kooyk Y., Geijtenbeek T. B. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. // *Nat. Rev. Immunol.* – 2003.- Vol.3.- P.697-709.
135. Van Krinks C.H., Matyszak M.K., Gaston J.S. Characterization of plasmacytoid dendritic cells in inflammatory arthritis synovial fluid. // *Rheumatology (Oxford).*- 2004.- Vol.43.- №4.- P.453-460.
136. Venken K, Hellings N, Liblau R, Stinissen P. Disturbed regulatory T cell homeostasis in multiple sclerosis. // *Trends. Mol. Med.* – 2010.- Vol.16(2) .- P.58-68.
137. Wang Y.H., Ito T., Wang Y.H., Homey B., Watanabe N., Martin R., Barnes C.J., McIntyre B.W., Gillet M., Kumar R., Yao Z., Liu Y.J. Maintenance and polarization of human TH2 central memory T cells by thymic stromal lymphopoietin-activated dendritic cells. // *Immunity.* – 2006.- Vol.24(6).- P.827-38.
138. Wenink M.H., Han W., Toes R.E., Radstake T.R. Dendritic cells and their potential implication in pathology and treatment of rheumatoid arthritis. // *Handb. Exp. Pharmacol.*- 2009.- Vol.188.- P.81-98.

139. Weyand C.M. New insights into the pathogenesis of rheumatoid arthritis. // *Rheumatology*.- 2000.- Vol.39.- P.3-8.
140. Wollenberg, A., M. Wagner, S. Gunther, A. Towarowski, E. Tuma, M. Moderer, S. Rothenfusser, S. Wetzel, S. Endres, and G. Hartmann Plasmacytoid dendritic cells: a new cutaneous dendritic cell subset with distinct role in inflammatory skin diseases. // *J. Investig. Dermatol.*- 2002. - Vol.119.- P.1096-1102.
141. Wu L, Liu YJ. Development of dendritic-cell lineages. // *Immunity*. – 2007.- Vol.26(6) .- P.741–50.
142. Xing N., Maldonado M.L., Bachman L.A., Mc Kean D.J., Kumar R., Griffin M.D. Distinctive dendritic cell modulation by vitamin D(3) and glucocorticoid pathways. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*-2002.- Vol.297(3).- P. 645-652.
143. Xystrakis E., Kusumakar S., Boswell S., Peek E., Urry Z., Richards D.F., Adikibi T., Pridgeon C., Dallman M., Loke T.K., Robinson D.S., Barrat F.J., O'Garra A., Lavender P., Lee T.H., Corrigan C., Hawrylowicz C.M. Reversing the defective induction of IL-10-secreting regulatory T cells in glucocorticoid-resistant asthma patients. // *J. Clin Invest.*-2006.- Vol. 116(1) .- P. 146-155.
144. Yudoh K., Matsuno H., Nakazawa F., Yonezawa T., Kimura T. Reduced expression of the regulatory CD4⁺ T cell subset is related to

Th1/Th2 balance and disease severity in rheumatoid arthritis. // Arthritis.
Rheum. – 2000.- Vol.43(3) .- P. 617-27.