

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

На правах рукописи

КУРОЧКИНА ЮЛИЯ ДМИТРИЕВНА

14.03.09 – «Клиническая иммунология, аллергология»

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

диссертация на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
профессор,
член-корреспондент РАН
Е.Р. Черных

Новосибирск 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1 .ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
1.1. Введение.....	11
1.2. Иммунопатогенетическое обоснование современных подходов к терапии ревматоидного артрита.....	11
1.3. Дендритные клетки в иммунном ответе и поддержании толерантности.....	17
1.3.1. Гетерогенность дендритных клеток.....	17
1.3.2. Роль дендритных клеток в стимуляции иммунного ответа	18
1.3.3. Дендритные клетки и индукция иммунологической толерантности	19
1.3.4. Генерация толерогенных дендритных клеток <i>in vitro</i>	21
1.3.5. Характеристика дендритных клеток, генерируемых в присутствии дексаметазона.....	24
1.3.6. Особенности дендритных клеток, дифференцированных из моноцитов в присутствии интерферона- α	26
1.4. Дендритные клетки в патогенезе ревматоидного артрита.....	29
1.4.1. Роль дендритных клеток в развитии и прогрессии ревматоидного артрита.....	29
1.4.2. Синовиальные дендритные клетки у больных ревматоидным артритом.....	30
1.4.3. Характеристика дендритных клеток периферической крови и дендритных клеток моноцитарного происхождения у больных ревматоидным артритом.....	33
1.5. Дендритные клетки в качестве новой терапевтической мишени при ревматоидном артрите	34
1.5.1. Влияние медикаментозной терапии на дендритные клетки при аутоиммунной патологии.....	34
1.5.2. Характеристика толерогенных дендритных клеток у больных ревматоидным артритом.....	36

1.5.3. Терапевтический потенциал толерогенных дендритных клеток при ревматоидном артрите	38
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	41
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	49
3.1. Влияние дексаметазона на дифференцировку моноцитов в дендритные клетки у здоровых доноров.....	49
3.2. Сравнительная характеристика дексаметазон-модифицированных дендритных клеток, генерируемых из моноцитов в присутствии IFN- α и IL-4	58
3.3. Характеристика интерферон- α -индуцированных дендритных клеток больных ревматоидным артритом и исследование влияния дексаметазона на созревание и функции интерферон- α -индуцированных дендритных клеток пациентов.....	68
3.4. Исследование влияния и механизмов толерогенного действия дексаметазон-модифицированных интерферон- α -индуцированных дендритных клеток больных ревматоидным артритом на функции аутологичных Т-клеток в культуре <i>in vitro</i>	80
3.5 Исследование влияния пульс-терапии глюкокортикоидами на фенотип и функции интерферон- α -индуцированных дендритных клеток и структуру циркулирующих моноцитов у больных ревматоидным артритом	89
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	103
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	114
ВЫВОДЫ.....	116
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	118
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	120

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Дендритные клетки (ДК) являются профессиональными антигенпрезентирующими клетками, которые наряду со стимулирующей активностью могут ингибировать иммунный ответ, играя важную роль в поддержании периферической толерантности. Толерогенные ДК (тДК) характеризуются сниженной ко-стимуляторной активностью и повышенной экспрессией ко-ингибиторных молекул, противовоспалительным профилем секретируемых цитокинов и способны индуцировать клональную деплецию и/или анергию аутореактивных Т-клеток, а также индуцировать регуляторные Т-клетки (Трег) [45, 129]. Учитывая способность тДК подавлять функции аутореактивных Т-лимфоцитов [194], восстановление иммунологической толерантности с помощью генерируемых *in vitro* тДК или индукция толерогенной активности ДК *in vivo* рассматриваются в качестве новой стратегии лечения аутоиммунных заболеваний (АИЗ) [80, 206]. Толерогенные свойства ДК, описанные первоначально для незрелых ДК [180], могут быть индуцированы многими стимулами: противовоспалительными цитокинами, иммуносупрессорными лекарственными препаратами, витамином D3 и др. [39, 61, 136]. Глюкокортикоиды, как индукторы толерогенной активности ДК, привлекают особое внимание, поскольку являются важнейшими эндогенными регуляторами и широко используются в клинической практике. У человека толерогенные эффекты глюкокортикоидов наиболее детально исследованы в культурах ДК, генерируемых из моноцитов в присутствии гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) и интерлейкина-4 (IL-4; ИЛ4-ДК) [67, 104, 138]. В то же время важным фактором дифференцировки моноцитов в ДК и их созревания является интерферон-α (IFN-α) [154, 155]. Генерируемые в присутствии IFN-α ДК (ИФН-ДК) отличаются от ИЛ4-ДК сигнальными путями

активации, спектром экспрессируемых генов и обладают целым рядом функциональных особенностей: более высокой миграционной и проапоптогенной активностью, большей стабильностью, сохраняют после активации менее зрелый фенотип [11, 55, 90, 132, 167]. Тем не менее, исследование эффектов дексаметазона на дифференцировку и созревание ИФН-ДК, а также сравнение толерогенных свойств дексаметазон-модифицированных ИЛ4-ДК и ИФН-ДК, не проводились.

Ревматоидный артрит (РА) является одной из наиболее распространенных форм АИЗ, характеризуется хроническим прогрессирующим течением и высокой инвалидизацией [1]. Патогенез РА связан с аутоиммунным воспалением, вызывающим поражение синовиальной и костной ткани суставов, и опосредованным аутореактивными Т-лимфоцитами, продуцирующими интерферон- γ (IFN γ) и интерлейкин-17 (IL-17) [34]. Современное лечение РА сводится к продолжительной неспецифической иммуносупрессивной терапии, которая эффективна не во всех случаях и повышает риск развития онкологических и инфекционных заболеваний [60]. С этой точки зрения, использование тДК представляется более безопасным и целенаправленным воздействием. Экспериментальные исследования показали безопасность и эффективность тДК в моделях артрита [68, 182] и послужили обоснованием для клинической апробации дексаметазон-индуцированных ИЛ4-ДК [2, 129]. Однако свойства дексаметазон-модифицированных ИФН-ДК больных в качестве новой потенциальной клеточной платформы тДК не изучались.

Учитывая способность ДК при АИЗ презентировать хрящевые антигены, продуцировать провоспалительные цитокины и активировать Th1 и Th17 ответ [80, 94, 206], не менее важным остается вопрос, влияет ли глюкокортикоидная терапия на функции ИФН-ДК у больных РА *in vivo*. Многие АИЗ ассоциированы с повышенным уровнем интерферонов I типа, а терапия интерферонами часто сопровождается развитием аутоиммунных осложнений [154, 155]. Таким образом, IFN- α при АИЗ может играть важную роль в дифференцировке моноцитов в ДК и

поддержании активированного статуса циркулирующих ДК [15, 57]. При этом влияние терапии глюкокортикоидами на свойства ИФН-ДК у больных РА остается неисследованным.

Учитывая вышеизложенное, была сформулирована **цель исследования**: изучить влияние дексаметазона на интерферон-альфа-индуцированную дифференцировку моноцитов в дендритные клетки и охарактеризовать свойства модифицированных глюкокортикоидами дендритных клеток у здоровых доноров и больных ревматоидным артритом.

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

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

Научная новизна

Впервые показано, что дексаметазон в культурах ИФН-ДК доноров повышает долю CD14⁺ ДК и снижает содержание CD83⁺ и CD86⁺ ДК; увеличивает содержание TLR2⁺ и PD-L1⁺ ДК, ингибирует продукцию TNF- α , а также

индуцирует способность ИФН-ДК подавлять пролиферацию аллогенных Т-лимфоцитов и продукцию цитокинов в аллогенной смешанной культуре лейкоцитов (алло-СКЛ) со смещением баланса в сторону Th2-ответа. При этом пролиферативный ответ в алло-СКЛ, индуцируемый ИФН-ДКдекс, прямо коррелирует с содержанием CD83⁺ ДК и обратно – с количеством TLR2⁺ ДК. Установлено, что генерируемые в присутствии дексаметазона ИФН-ДК по сравнению с дексаметазон-модифицированными ИЛ4-ДК (ИЛ4-ДКдекс) характеризуются более высоким содержанием CD14⁺ и TLR2⁺ ДК, более высокой продукцией IL-10, более выраженным ингибирующим действием на пролиферацию аллогенных Т-клеток и подавляют продукцию Th1/провоспалительных цитокинов (IL-1 β , TNF- α , IL-2, IFN- γ) в отсутствие супрессорного эффекта на Th2 цитокины (IL-4 и IL-13). Показано, что ИФН-ДК больных РА отличаются меньшим содержанием CD83⁺ и большей долей CD14⁺ и PD-L1⁺ ДК и умеренным снижением аллостимуляторной активности, сохраняя при этом чувствительность к толерогенному действию дексаметазона. Впервые продемонстрировано, что ингибирующий эффект ИФН-ДКдекс больных РА на пролиферацию Т-клеток в аутологичной смешанной культуре лейкоцитов (ауто-СКЛ) ассоциирован с блокированием клеточного цикла CD4⁺ Т-лимфоцитов, подавлением продукции Th1 (IFN- γ), Th17 (IL-17) и в меньшей степени Th2 (IL-13 и IL-4) цитокинов; индукцией апоптоза CD3⁺Т-лимфоцитов и генерацией регуляторных CD4⁺Т-клеток, секретирующих IL-10 (Tr1). Проведение пульс-терапии глюкокортикоидами у больных РА сопровождается изменением структуры циркулирующих моноцитов (снижением доли CD14⁺CD16⁺⁺ моноцитов и возрастанием доли CD14⁺CD16⁻ моноцитов), а также усилением экспрессии PD-L1 и снижением аллостимуляторной активности генерируемых ИФН-ДК.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные результаты расширяют представления о свойствах ИФН-ДК, в частности, демонстрируют их чувствительность к толерогенному действию

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

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

Положения, выносимые на защиту

1. Дексаметазон индуцирует толерогенные свойства ДК доноров и больных РА, генерируемых из моноцитов в присутствии интерферона-альфа.
2. Дексаметазон-модифицированные ИФН-ДК доноров отличаются от дексаметазон-модифицированных ИЛ4-ДК менее зрелым фенотипом, более выраженным ингибирующим эффектом на пролиферацию Т-клеток и

подавляют продукцию Th1/провоспалительных цитокинов, не влияя на продукцию Th2-цитокинов.

3. Дексаметазон-модифицированные ИФН-ДК больных РА ингибируют пролиферацию аутологичных Т-клеток посредством индукции анергии, усиления апоптоза и генерации регуляторных CD4⁺ Т-клеток, секретирующих IL-10.

Объем и структура диссертации

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

Апробация работы

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на Всероссийском конгрессе с международным участием «Дни ревматологии в Санкт-Петербурге 2016» (15-17 сентября 2016, г. Санкт-Петербург), на IX отчетной научной сессии НИИФКИ "Фундаментальные и клинические аспекты иммунологии" (16-17 июня 2016, г. Новосибирск), на Европейском конгрессе ревматологов EULAR 2017 (14-17 июня 2017 г., г. Мадрид, Испания), на Европейском конгрессе ревматологов EULAR 2018 (13-16 июня 2018 г., г. Амстердам, Нидерланды). Апробация диссертации состоялась 14 марта 2019 г. на семинаре Клинического отдела НИИФКИ (протокол №11).

Публикации

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

Степень достоверности, апробация результатов и личное участие автора

Достоверность полученных результатов подтверждается логично выстроенным алгоритмом работы, достаточной выборкой исследования, использованием современных иммунологических методов и адекватных методов статистической обработки. Основные положения работы доложены и обсуждены на международных и российских конгрессах. Автор участвовал в разработке идеи и дизайна всех экспериментов. Результаты, представленные в работе, получены автором лично, либо при непосредственном его участии на базе лаборатории клеточной иммунотерапии НИИФКИ. Все процедуры сепарации моноклеарных клеток, генерации ДК и оценки их функций проведены непосредственно автором. Автор лично участвовал в введении больных РА и заполнении медицинской документации на базе ревматологического отделения НИИФКИ. Автором проведена статистическая обработка результатов и интерпретация экспериментальных данных. Подготовка основных публикаций по выполненной работе проведена при непосредственном участии автора.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Введение

Ревматоидный артрит (РА) представляет аутоиммунное ревматическое заболевание неизвестной этиологии, характеризующееся хроническим эрозивным артритом (синовитом) и системным поражением внутренних органов, которое в отсутствие лечения приводит к инвалидизации [1, 84]. РА занимает одно из ведущих мест в ряду ревматических болезней. Частота встречаемости данной патологии в популяции составляет 0,5-1% [49, 126]. По данным статистики, в России зарегистрировано около 200 тысяч пациентов с ревматоидным артритом, при этом, по данным эпидемиологического исследования, РА страдают более 700 тысяч человек. Заболевание характеризуется хроническим прогрессирующим течением, ранней потерей трудоспособности и высоким процентом инвалидизации. Течение заболевания сопровождается высоким уровнем болевых ощущений, функциональными и психоэмоциональными нарушениями, что значительно ухудшает качество жизни пациентов. При отсутствии соответствующего лечения у большинства больных в первые годы заболевания развиваются стойкие деформации. Кроме того, у пациентов с РА наблюдается высокий риск развития сопутствующей патологии, такой как остеопороз, сердечно-сосудистые заболевания, тяжелые инфекции.

1.2. Иммунопатогенетическое обоснование современных подходов к терапии ревматоидного артрита

Этиология РА до конца не ясна, РА признается мультифакториальной патологией. При этом важную роль отводят влиянию внешних факторов и генетической предрасположенности. Например, носительство HLADR1 и

HLADR4 сопряжено с более высоким риском развития РА. К другим предрасполагающим факторам относят курение, женский пол, прием оральных контрацептивов.

Патогенез РА связан с аутоиммунным воспалением, локализованным в синовиальной оболочке суставов, и опосредуемым с участием аутореактивных Т-клеток и В-лимфоцитов. В свете современных представлений развитие аутоиммунного воспаления является результатом сложных взаимодействий генетических факторов и факторов внешней среды, которые приводят к aberrантной активации врожденного и адаптивного иммунитета, срыву иммунологической толерантности, презентации аутоантигенов с последующей активацией антигенспецифических Т- и В-лимфоцитов и патологической продукции цитокинов. Каскад этих реакций приводит к развитию синовита, пролиферации клеточных элементов синовиальной и хрящевой ткани и деструкции субхондральной костной ткани [24].

Ведущая роль в патогенезе РА отводится аутореактивным Т-клеткам. Как известно, Т-клетки, распознающие аутоантигены, элиминируются еще на этапе внутри тимического развития. Согласно одной из гипотез, присутствие аутореактивных Т-клеток на периферии является результатом избегания аутореактивными Т-клетками апоптоза в результате дефекта Т-клеточного развития в тимусе [41]. Согласно этой гипотезе РА может возникать в результате презентации аутоантигенов, высвобождающихся при воспалительных и инфекционных процессах.

Согласно другой, более популярной гипотезе, Т-клетки во время внутри тимического развития распознают не нативные, а измененные формы собственных белков и в силу этого не элиминируются как аутореактивные Т-лимфоциты. Согласно этой гипотезе РА возникает в результате распознавания измененных собственных антигенов в условиях воспалительного микроокружения [41].

Развитие аутоиммунного воспаления связывают с появлением аутореактивных Т-лимфоцитов с провоспалительным фенотипом. Ранее считалось, что РА является Th-1-опосредованным заболеванием. Однако в настоящее время предполагается, что аутоиммунное воспаление опосредуется с участием как Th1, так и Th17 клеток. Th1 клетки секретируют провоспалительный цитокин интерферон-гамма ($IFN\gamma$), а Th17 клетки – провоспалительные цитокины: фактор некроза опухоли альфа ($TNF\alpha$), интерлейкин-17 (IL-17), IL-21, IL-22, которые активируют макрофаги, нейтрофилы и В-клетки, оказывают деструктивное действие на хондроциты и через стимуляцию остеокластов вызывают разрушение костной ткани [44, 71], а также подавляют процессы репарации хряща [16, 49, 105].

Активация Th1 и Th17 происходит в результате презентации Т-клеткам артритогенных пептидов дендритными клетками (ДК), В-клетками и макрофагами. Следует отметить, что у человека локализованные в синовиуме иммунные клетки в достаточной степени не охарактеризованы. В биоптатах синовиальной ткани на самых ранних этапах выявляется экспансия Т-клеточных клонов, обогащенных аутореактивными (или распознающими измененные аутопептиды) Т-лимфоцитами. Однако по мере прогрессии заболевания численность этих клонов снижается на фоне возрастания вторично рекрутируемых поликлональных Т-клеток памяти [83]. И, если в исследованиях на мышах, дифференцировочный статус патогенных Т-клеток идентифицируется как Th1 и Th17 [96], то у человека оценка Т-клеток на ранних этапах процесса затруднена. Тем не менее, в одном из исследований, авторам удалось проанализировать продукцию цитокинов в синовиальной жидкости на очень ранней стадии РА и показать парадоксальное возрастание IL-4, IL-13 и IL-15. В то же время в развернутой стадии заболевания Т-клетки несли признаки Th1 и Th17 [148]. Недавно при оценке цитрулинированных тетрамеров было показано, что большинство Т-клеток, распознающих цитрулинированные белки, имеют Th1 фенотип [177].

Активность Th1 и Th17 находится под негативным контролем регуляторных Т-клеток (Трег), которые представляют гетерогенную популяцию и обладают иммуносупрессорной активностью. Среди них выделяют естественные и индуцированные Трег. Естественные Трег, экспрессирующие фенотип $CD4^+CD25^+Foxp3^+$, реализуют ингибирующий эффект через контактные взаимодействия с Т-клетками, который опосредуется рядом поверхностных коингибиторных молекул, в том числе молекулой CTLA-4, конкурирующей за ко-стимуляторные молекулы на Т-лимфоцитах [13]. Индуцированные Трег подавляют функции активированных Т-лимфоцитов через продукцию IL-10 и трансформирующего фактора роста- β (TGF β) [70, 94]. При РА происходит значительное уменьшение количества Трег или нарушение их функции и возрастание Th-1 и Th-17, поддерживающих выраженное воспаление в синовиальной оболочке [117]. Соответственно, баланс между Th-1/Th-17 и Трег играет определяющую роль в исходе аутоиммунного воспаления.

Наряду с Т-клетками, В-лимфоциты также вовлечены в патогенез РА. Роль В-клеток при аутоиммунной патологии может заключаться в антигенной презентации, образовании и продукции аутоантител и цитокинов. Участие В-клеток в патогенезе РА подтверждается продукцией аутоантител и наличием в синовиуме В-клеток различной степени зрелости: от незрелых В-клеток до зрелых плазматических клеток. Микроокружение синовиума содержит различные цитокины, обеспечивающие выживание В-клеток, индуцируя экспрессию BAFF, APRIL, а также продукцию IL-6. Характерной особенностью РА является наличие эктопических лимфоидных структур, присутствие которых ассоциировано с более быстрым прогрессированием заболевания. В этих образованиях в В-клетках происходит антиген-индуцированная селекция, дифференцировка, соматическая гипермутация и класс-специфическое переключение [139]. Недавние исследования показали, что синовиальные В-клетки представлены аутореактивными клетками, распознающими цитрулинированные гистоны H2A и H2B и некоторые другие цитрулинированные формы собственных пептидов [40].

В развитии и поддержании воспалительного процесса важную роль играют цитокины, которые продуцируются не только активированными Т-хелперными клетками, но также мигрирующими в зону воспаления макрофагами, дендритными клетками и эффекторными $CD8^+$ Т-лимфоцитами. Цитокины выполняют множество биологических функций, таких как рост, пролиферация и дифференцировка клеток, воспаление, репарация тканей и регуляция иммунного ответа. При РА воспаление связано с доминированием провоспалительных цитокинов. Среди различных провоспалительных цитокинов ключевую роль в поддержании хронического воспаления отводят TNF α : пациенты с РА характеризуются высоким уровнем TNF α в сыворотке крови [46]. TNF α стимулирует пролиферацию и дифференцировку Т-, В-лимфоцитов и натуральных киллеров (NK-клеток), а также индуцирует продукцию IL-1, IL-6, IL-8. В сыворотке крови больных РА также обнаруживается высокий уровень IL-6. Данный цитокин за счет активации нейтрофилов к секреции протеолитических ферментов также играет важную роль в разрушении хряща и образовании эрозий [43]. Провоспалительный эффект IL-6 реализуется также через активацию остеокластов через RANKL-зависимый и RANKL-независимый пути [212]. Кроме того, высокие уровни IL-6 при РА причастны к развитию гипоальбуминемии, гиперкоагуляции, и даже развитию инфаркта миокарда [212].

Постоянное расширение знаний о патогенезе РА, в том числе о цитокин-опосредованных механизмах, поддерживающих хроническое воспаление в синовиальной оболочке, послужило основой для пересмотра подходов к лечению данной патологии и созданию принципиально новых биологических препаратов.

С 2010 г. принята концепция treat to target (T2T, лечение до достижения цели) [175], включающая 10 рекомендаций по лечению РА, целью которой является достижение ремиссии. Последние обновленные рекомендации EULAR 2016 [176] уже включают в себя 12 пунктов по лечению РА. Лекарственные препараты, используемые в лечении РА, включают:

- обычные синтетические болезнь-модифицирующие препараты (conventional synthetic disease-modifying antirheumatic drugs; csDMARDs): метотрексат, лефлуномид, сульфасалазин;

- биологические препараты (оригинальные и биосимиляры). К ним относят «анти-ФНО α » препараты (инфликсимаб, адалимумаб, голимумаб, цертолизумаб-пегол, этанерцепт), «анти-ИЛ-6» препараты (тоцилизумаб, сарилумаб), ингибитор ко-стимуляции (абатацепт);

- таргетные синтетические препараты (target synthetic disease-modifying antirheumatic drugs; tsDMARD) - ингибитор янус-киназ (тофацитиниб).

Согласно рекомендациям, терапия РА должна начинаться с приема метотрексата с быстрой эскалацией дозы до 25 мг/нед., (при невозможности приема метотрексата – прием сульфасалазина или лефлуномида, или их комбинация) с оценкой эффекта через 3 и 6 месяцев. Через 6 месяцев при отсутствии неблагоприятных прогностических факторов целесообразно добавить еще один обычный синтетический противоревматический препарат. При наличии неблагоприятных факторов либо отсутствии эффекта от комбинации нескольких csDMARD необходимо добавить к терапии анти-ФНО препарат либо ингибитор янус-киназ. При появлении нежелательных явлений либо ускользании эффекта целесообразно перейти на биологический препарат с другим механизмом действия, либо на другой анти-ФНО препарат. Глюкокортикоиды также присутствуют в рекомендациях по лечению, однако их назначение должно быть в наименьшей возможной дозе и на максимально короткий срок [176].

Несмотря на четкие рекомендации по лечению и достаточно широкий выбор препаратов, достичь ремиссии удастся не всегда. Часто прием биологических агентов ограничен по экономическим причинам либо вследствие ускользания эффекта, или же развития нежелательных явлений. Одним из серьезных нежелательных явлений на фоне приема противоревматических препаратов является развитие тяжелых инфекций, особенно туберкулеза. Риск развития туберкулеза значительно выше при приеме анти-ФНО препаратов [6, 27,

160, 196]. Для тоцилизумаба и абатацепта показан невысокий риск развития туберкулезной инфекции [85, 205], в то время как для тофацитиниба наблюдается некоторая эндемичность [207]. В связи с этим проблема поиска новых методов лечения РА остается чрезвычайно актуальной.

1.3. Дендритные клетки в иммунном ответе и поддержании толерантности

Дендритные клетки (ДК) были открыты Р. Стейнманом и З. Кохом в 70-х гг. XX века [179], однако, впервые эти клетки были описаны П. Лангергансом еще в 1868 г. [172]. На сегодняшний день известно, что ДК — это гетерогенная популяция антигенпрезентирующих клеток (АПК), специализирующихся на презентации антигенов и регуляции иммунного ответа. ДК происходят из костномозговых предшественников и присутствуют во всех слизистых оболочках, а также коже, внутренних органах, во всей лимфоидной ткани и костном мозге.

1.3.1. Гетерогенность дендритных клеток

ДК представлены гетерогенной популяцией клеток, которые различаются целым рядом признаков: локализацией, происхождением и функциями. ДК дифференцируются из костномозговых предшественников, которые дают начало резидентным и циркулирующим ДК. Резидентные ДК локализованы в лимфатической ткани и их функции связаны с захватом и презентацией Т-клеткам антигенов, содержащихся в крови и лимфе. Тканевые антигены презентуются Т-клеткам ДК нелимфоидных тканей, которые мигрируют из тканей в лимфоузлы.

Циркулирующие ДК разделяют на 2 популяции: миелоидные и плазмцитоидные ДК. Ранее считалось, что эти две популяции имеют различное происхождение: миелоидные ДК дифференцируются из общего миелоидного предшественника, а плазмцитоидные ДК — из общего лимфоидного

предшественника. Однако недавние исследования позволяют полагать, что источником обеих популяций ДК являются общие миелоидные предшественники [109, 171].

Миелоидные или «обычные» (conventional) ДК (мДК) в свою очередь разделяются на две субпопуляции: мДК-1, экспрессирующие CD11c и BDCA-1, и мДК-2, несущие на своей поверхности CD141 и BDCA-3. Плазмацитоидные ДК (пДК) несут на своей поверхности BDCA-2 и BDCA-4 [36]. Указанные субпопуляции, помимо кровотока, также присутствуют в селезенке и миндалинах [17, 215].

ДК также могут дифференцироваться из моноцитов. Такие ДК, обозначенные как «неклассические» мДК, или ДК моноцитарного происхождения (мо-ДК), экспрессируют CD11c и более похожи на моноциты и макрофаги, чем классические мДК-1 и мДК-2. ДК моноцитарного происхождения возникают из «классических» $CD14^{+}CD16^{-}$ моноцитов, и их доля существенно возрастает при инфекции и воспалении [36].

1.3.2. Роль дендритных клеток в стимуляции иммунного ответа

ДК играют важную роль в индукции и регуляции иммунного ответа. После захвата антигена незрелыми ДК, начинается процесс его деградации (процессинг), завершающийся презентацией процессированных пептидов на поверхности ДК вместе с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС) [106]. Сигналы «опасности» через паттерн-распознающие рецепторы в присутствии провоспалительных цитокинов запускают процесс созревания ДК. Процесс созревания заключается в фенотипических и функциональных изменениях, связанных с изменением экспрессии различных генов, в частности активацией ядерного фактора каппа В (NFκ-B) [110]. В процессе созревания антигены МНС перемещаются из внутриклеточного компартмента на клеточную поверхность, а ДК при этом приобретают максимальную способность к презентации антигена

[106, 201]. Кроме того, наблюдается усиление экспрессии ко-стимуляторных молекул дендритными клетками таких, как CD40, CD80, CD86, и продукции провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18) [106]. Процесс созревания ДК сопровождается также увеличением экспрессии хемокинового рецептора CCR7, связанного с миграционной способностью ДК в лимфатические узлы. Зрелые ДК презентруют антигенные пептиды вместе с молекулами МНС II класса наивным CD4⁺ Т-лимфоцитам, которые распознают комплекс пептид-МНС через Т-клеточный рецептор (TCR). После процесса презентации и распознавания при участии ко-стимуляторных молекул, наивные Т-лимфоциты дифференцируются в хелперные и эффекторные CD4⁺ Т-лимфоциты. Кроме того, ДК способны презентировать чужеродные антигены CD8⁺ Т-лимфоцитам с участием МНС I типа. Так запускается цитотоксический ответ. Более того, кроме антигенспецифической активации Т-лимфоцитов, ДК способны влиять на функции других клеток иммунной системы [74]. Показано, что ДК играют важную роль в активации В-лимфоцитов и их дифференцировке в плазматические клетки [141], а также в пролиферации NK и NKT-клеток [69].

1.3.3. Дендритные клетки и индукция иммунологической толерантности

ДК участвуют не только в генерации Т-клеточного иммунного ответа, но и способны поддерживать иммунологическую толерантность. Свойства ДК индуцировать толерантность изначально были продемонстрированы для незрелых ДК лимфоидной ткани [179]. В естественных условиях незрелые ДК способны захватывать апоптотические тельца, образующиеся в результате естественной клеточной гибели, и после миграции в дренирующие лимфатические узлы презентировать собственные антигены аутореактивным Т-лимфоцитам [180]. Кроме того, было показано, что иммунологическая толерантность может поддерживаться ДК промежуточной степени зрелости, локализованными в подслизистых оболочках пищеварительного и респираторного тракта. Такие

толерогенные ДК (тДК) участвуют в поддержании периферической толерантности против комменсалов, антигенов, содержащихся в пищевых продуктах и воздушных массах.

Толерогенное действие ДК на Т-лимфоциты реализуется путем индукции анергии и апоптоза Т-клеток, а также путем подавления функциональной активности Т-клеток иммуносупрессивными цитокинами и генерации регуляторных Т-клеток (Трег) [123, 197].

Толерогенные ДК характеризуются сниженной экспрессией ко-стимуляторных молекул (CD40, CD80, CD86), сниженной продукцией IL-12 и повышенной секрецией IL-10 [180] совместно со сниженной способностью индуцировать пролиферацию Т-лимфоцитов. Наряду с этим, они обладают способностью индуцировать Трег. Толерогенные эффекты ДК могут быть обусловлены различными молекулярными механизмами:

- 1) презентацией антигена в условиях недостаточной ко-стимуляции (сниженной экспрессии ко-стимуляторных молекул CD40, CD80, CD86) [180];
- 2) презентацией низких доз антигена, что вызывает дифференцировку Трег [137];
- 3) изменением баланса про- и противовоспалительных цитокинов (уменьшением продукции IL-12 и возрастанием секреции IL-10 и TGF- β). Показано, что присутствие IL-10 способствует дифференцировке регуляторных Т-клеток 1 типа (Tr1) [99];
- 4) синтезом ретиноевой кислоты (метаболита витамина А), индуцирующей дифференцировку CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Трег [29];
- 5) экспрессией проапоптогенных молекул, индуцирующих делецию аутореактивных клонов. Например, ДК способны экспрессировать FasL, PD-L1, взаимодействие которых с соответствующими рецепторами на Т-клетках вызывает апоптоз Т-лимфоцитов;
- 6) экспрессией индолеамин-2,3-диоксигеназы (IDO) и гемоксигеназы-1 (HO-1). IDO – фермент, участвующий в метаболизме триптофана. Дефицит триптофана, а

также образование его токсичных метаболитов (кинуренин и др.) подавляют пролиферацию Т-клеток [107, 189]. Ингибирующий эффект НО-1 обусловлен подавлением созревания ДК, а также активацией $CD4^+CD25^+$ Трег. При этом ДК способны продуцировать высокий уровень IL-10 [21, 31, 115];

7) экспрессией ингибиторных рецепторов ILT3 и ILT4, плотность которых увеличивается на ДК под воздействием IL-10. Связываясь со своим рецептором HLA-G на поверхности ДК, они тем самым ингибируют созревание ДК [101].

Важно отметить, что взаимосвязь функциональной активности (толерогенные или иммуногенные) со зрелостью ДК не является абсолютной. Так, незрелые, полу-зрелые и даже зрелые ДК способны обладать толерогенными свойствами, а также индуцировать дифференцировку Трег [98, 108, 211].

1.3.4. Генерация толерогенных дендритных клеток *in vitro*

Учитывая низкое содержание ДК в циркулирующей крови (около 1%), *in vitro* обычно используются ДК, генерированные из костного мозга или моноцитов периферической крови. С тех пор как Sallusto F. с коллегами [163] разработал протокол генерации ДК из моноцитов, данный подход широко используется для получения большого количества ДК. Для дифференцировки моноцитов в ДК обычно используется гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) и интерлейкин-4 (IL-4). GM-CSF необходим для поддержания выживаемости и дифференцировки моноцитов в ДК как у человека, так и у мышей [38]. Низкие концентрации GM-CSF поддерживают выживаемость клеток, в то время как высокие концентрации способствуют их дифференцировке и активации [37]. Чтобы предотвратить дифференцировку моноцитов в сторону макрофагов, GM-CSF используется в комбинации с IL-4 [163].

Для генерации тДК существует несколько подходов: использование противовоспалительных цитокинов, иммуносупрессорных лекарственных препаратов, генная модификация и др. Так, толерогенные свойства ДК могут быть

индуцированы путем генерации ДК в присутствии IL-10. Такие ДК сохраняют незрелый фенотип даже в присутствии дозревающих стимулов [39] и способны индуцировать Трег [78]. Супрессорные свойства IL-10-индуцированных тДК показаны при реакции отторжения трансплантата, аллергических заболеваниях и др. [99]. Другим биодериватом, способным индуцировать толерогенный потенциал ДК, является активный метаболит витамина Д - 1,25-дигидроксивитамин D3 (VitD3). Показано, что VitD3 индуцирует в ДК экспрессию генов, продуктами которых являются IDO, CCL2, IL-10, TGF β [161, 186].

Широко распространенным подходом к генерации тДК является использование лекарственных препаратов с иммуносупрессивными свойствами, поскольку эти препараты включены в стандарты лечения аутоиммунных заболеваний. Блокирование NF-kB под действием иммуносупрессантов приводит к снижению продукции провоспалительных цитокинов ДК (IL-1 β , IL-6, TNF α) и возрастанию продукции IL-10 [61, 72, 116]. Исходя из этого, иммуносупрессивные препараты способны эффективно модулировать свойства ДК как *in vitro*, так и *in vivo* при различных патологиях [61, 136].

Первыми препаратами с иммуносупрессивными свойствами, которые были использованы для индукции тДК в клинической практике, были глюкокортикостероиды (ГКС) [91]. Обработка мышинных ДК преднизолоном или дексаметазоном индуцирует их толерогенные свойства, а также способствует генерации Трег [5, 197]. Связываясь со своим рецептором, ГКС регулируют функцию ДК, блокируя классический путь активации NF-kB, и, тем самым, продукцию провоспалительных цитокинов, хемокинов и ко-стимуляторных молекул. При этом, подавляя созревание ДК, дексаметазон активирует гены, ответственные за синтез IL-10, IDO, GITRL, MCP1, CCL8, CCR2, CCL9 [59].

Также в клинических исследованиях для генерации ДК, как упоминалось выше, используется VitD3. Будучи по химической структуре секостероидным гормоном, VitD3 регулирует кальциевый обмен в организме, а также выполняет

ряд регуляторных функций [157]. Биологические эффекты VitD3 опосредуются через витамин D-клеточный рецептор (VDR), который функционирует как транскрипционный фактор для ряда генов [28]. Агонисты VDR, воздействуя на ДК, изменяют их фенотип в сторону клеток с промежуточной степенью зрелости. Эти изменения заключаются в снижении экспрессии MHC II, CD40, CD80, CD86, уменьшении продукции IL-12 и возрастании способности секретировать IL-10. Индуцированные VitD3 тДК устойчивы к дифференцировке в зрелые ДК даже при стимуляции провоспалительными цитокинами [134, 136].

Методы генной инженерии, использующиеся для генерации тДК, включают в себя применение ретровирусов, сконструированных для высокой продукции IL-10. Такие клетки характеризуются низкой способностью стимулировать пролиферацию Т-лимфоцитов в аллогенной смешанной культуре лейкоцитов (алло-СКЛ) [188]. Для индукции толерогенной активности ДК могут быть трансфицированы ДНК, кодирующей CTLA4-IgG. Такие ДК характеризуются сниженной экспрессией ко-стимуляторных молекул при сохранном уровне молекул главного комплекса гистосовместимости и обладают сниженной способностью индуцировать антигенспецифический ответ [95]. Трансфекция конструкций, кодирующих IDO или FasL, также индуцирует толерогенные свойства ДК [14, 81].

В целом, тДК, генерируемые в присутствии различных толерогенных стимулов, обладают рядом общих характеристик, в частности сниженным уровнем экспрессии ко-стимуляторных молекул (CD80/CD86), продукции провоспалительных цитокинов и аллостимуляторной активности. При этом ДК, генерируемые в присутствии различных толерогенных стимулов, имеют свои фенотипические и функциональные особенности.

1.3.5. Характеристика дендритных клеток, генерируемых в присутствии дексаметазона

Среди различных лекарственных препаратов с иммуносупрессивными свойствами дексаметазон, как потенциальный индуктор толерогенных свойств ДК, вызывает особый интерес, поскольку является лекарственным препаратом и широко используется в клинической практике в лечении аутоиммунных и аллергических заболеваний как препарат с выраженными противовоспалительными свойствами. Ранее предполагалось, что иммуносупрессивный эффект ГКС связан с ингибированием пролиферативной и цитокин-секреторной активности Т-лимфоцитов [7, 51, 209]. Однако впоследствии стало очевидно, что толерогенный эффект дексаметазона во многом опосредован ингибирующим влиянием ГКС на продукцию моноцитами и макрофагами провоспалительных цитокинов, включая IL-1 β , IL-6, TNF α и MIP1- α [3].

Показано, что дексаметазон частично ингибирует созревание и дифференцировку моноцитов в ДК. В экспериментах на мышах продемонстрировано, что однократная инъекция дексаметазона вызывает дозозависимое снижение количества селезеночных ДК и реципрокное увеличение популяции макрофагов [121]. Генерируемые в присутствии дексаметазона ДК (ДКдекс) характеризуются сниженной экспрессией CD1a и повышенной экспрессией CD14, CD16. Также Moser M. с соавт. показали, что дексаметазон нарушает созревание мышиных ДК, ингибируя экспрессию CD80/CD86.

У человека эффект дексаметазона исследован в основном в популяции ДК моноцитарного происхождения, полученных при культивировании моноцитов с GM-CSF и IL-4 (ИЛ4-ДК). Так, Piemonti L. с соавторами генерировали ИЛ4-ДК в присутствии дексаметазона (10^{-8} М) в течение 7 суток [138]. Полученные клетки характеризовались менее зрелым фенотипом, сниженной экспрессией CD14, CD40, CD86. Garsia-Gonzalez P. показали возможность генерации тДК,

индуцированных к созреванию монофосфорил-липидом А, в коротком (5-суточном) протоколе [52]. ДК экспрессировали в значимо меньшем количестве ко-стимуляторные молекулы, молекулы главного комплекса гистосовместимости, а также характеризовались сниженной продукцией провоспалительных цитокинов и сниженной аллостимуляторной активностью. Кроме того, эти ДК характеризовались высокой экспрессией CCR7 и CXCR4, что свидетельствовало о способности дексаметазон-модифицированных ДК (ДКдекс) мигрировать в лимфатические узлы. В данной работе авторы также описали высокую экспрессию TLR2 на тДК в качестве оптимального маркера качества толерогенных ДК [52]. Другими авторами также описана роль молекулы TLR2 в качестве маркера дексаметазон-индуцированных ИЛ4-ДК [30, 102]. Высокую экспрессию TLR2 на ДК связывают со сниженной продукцией ИЛ-12, высоким содержанием ИЛ-10 и TGFβ [30, 124] и индуцированной этими цитокинами активацией Трег. Как известно, основная функция Трег заключается в поддержании периферической толерантности [162], предотвращающей развитие аутоиммунных заболеваний, а также ограничении иммунного ответа [100]. Супрессорная функция индуцированных Трег осуществляется через продукцию ИЛ-10 и TGFβ. Кроме того, Niedbala W. с соавт. показал, что Трег продуцируют высокий уровень ИЛ-35, способного подавлять активность коллаген-индуцированного артрита у мышей за счет подавления пролиферации Th17 [125]. У человека, согласно литературным данным, тДК способны индуцировать Трег, причем эта способность связана с экспрессией PD-L1 [197]. Авторы показали, что способность активировать Трег в большей степени характерна для VitD3-индуцированных ДК. Тем не менее, ДКдекс также способны индуцировать Трег, активируя преимущественно Tr1. Данный тип Трег представлен CD4⁺ ИЛ-10-продуцирующими Т клетками, которые участвуют в поддержании иммунологической толерантности не только за счет продукции ИЛ-10, но и индукции тДК [58].

Еще одним механизмом, обеспечивающим поддержание периферической толерантности, является апоптоз Т-клеток. При аутоиммунной патологии посредством апоптоза обеспечивается делеция аутореактивных клонов. У мышей показано, что толерогенные ДК, полученные из клеток селезенки, индуцируют апоптоз аллогенных Т-лимфоцитов [92]. Встречающиеся в литературе данные о способности различных типов толерогенных ДК человека индуцировать апоптоз Т-лимфоцитов немногочисленны. Narahgo-Gomez М. с соавт. сравнили толерогенные свойства ДК, полученных с использованием различных толерогенных стимулов (дексаметазон, рапамицин, vitD3). Все три типа тДК обладали толерогенными свойствами (менее зрелый фенотип, сниженные продукция провоспалительных цитокинов и аллостимуляторная активность ДК). При этом ни один тип ДК не стимулировал апоптоз [123]. Следует подчеркнуть, что все проведенные исследования относительно способности тДК индуцировать апоптоз, проводились с использованием ИЛ4-ДК.

Также важной функциональной характеристикой ДК является их способность стимулировать пролиферацию аллогенных Т-лимфоцитов. Аллостимуляторная активность является одним из интегральных показателей ДК. Снижение данного показателя является характерным признаком тДК и может быть обусловлено изменением баланса ко-стимуляторных и ко-ингибиторных молекул (со сдвигом в сторону последних), а также снижением соотношения про- и противовоспалительных цитокинов. Согласно данным литературы, ДКдекс характеризуются сниженной аллостимуляторной активностью [52, 123].

1.3.6. Особенности дендритных клеток, дифференцированных из моноцитов в присутствии интерферона-альфа

В настоящее время клеточной платформой для получения тДК *in vitro* являются мо-ДК, генерируемые путем культивирования моноцитов с GM-CSF и ИЛ-4. Данный тип клеток является витральным аналогом воспалительных ДК и

достаточно хорошо исследован. Незрелые ИЛ4-ДК обладают высокой способностью к захвату антигена, и после активации дозревающими стимулами (TNF α , IL-1, LPS, CD40L) дифференцируются в зрелые ДК с высокой иммуностимулирующей способностью. Тем не менее, поскольку IL-4 подавляет экспрессию молекул адгезии и хемотаксических факторов, генерированные ИЛ4-ДК характеризуются низкой миграционной активностью. Кроме того, ИЛ4-ДК обладают недостаточно высокой стабильностью и в отсутствии цитокинов могут претерпевать обратное развитие в моноциты [193]. Наряду с GM-CSF (в комбинации с IL-4) мощными индукторами созревания моноцитов в ДК являются интерфероны I типа [55], которые также поддерживают активированный статус ДК [15, 57]. IFN- α стимулирует моноциты посредством взаимодействия с классическим гетеродимерным рецептором, который включает рецептор-ассоциированную тирозинкиназу I типа и тирозинкиназу II типа [114, 133, 170]. Указанные киназы запускают активацию соответственно STAT-1 и STAT-4, индуцируя дифференцировку моноцитов периферической крови в сторону полноценных антигенпрезентирующих ДК. Через трое суток культивирования моноцитов с GM-CSF и IFN- α клетки теряют адгезивность к пластику и приобретают типичные морфологические и фенотипические свойства ДК. При этом 3-суточные ИФН-ДК обладают более зрелым фенотипом, чем незрелые IL-4-ДК [166, 170]. Созревание ИФН-ДК сопровождается возрастанием экспрессии МНС I и МНС II, ко-стимуляторных молекул CD80 и CD86, CD40-лиганда и молекул адгезии ICAM-1 (CD54) [11, 131, 133]. Сравнение двух типов мо-ДК показало, что генерируемые с IFN- α ДК имеют ряд особенностей. ИФН-ДК фенотипически характеризуют как промежуточные по степени зрелости ДК с относительно высоким уровнем экспрессии молекул активации, таких как CD25 и CD83. Эти клетки практически не несут на своей поверхности молекулу CD1a. Низкая экспрессия CD1a не влияет на антигенпрезентирующую функцию ДК, но ассоциирована с низкой продукцией IL-12 p70 [167]. Тем не менее, ИФН-ДК способны поляризовать дифференцировку Т-лимфоцитов в сторону Th1 ответа

[11], и высокая Th1-поляризующая активность ИФН-ДК поддерживается большим количеством синтезируемого IFN- α [153].

Отличительной особенностью ИФН-ДК является их более высокая миграционная активность [133]. ИФН-ДК экспрессируют как CCR7, так и его естественный лиганд MIP-3 β , хемокин, регулирующий перемещение ДК во вторичные лимфоидные органы и играющий важную роль в привлечении наивных Т-клеток [169].

Кроме того, ИФН-ДК отличаются большей стабильностью в условиях депривации [169, 170]. Эти данные свидетельствуют о том, что ИФН-ДК могут рассматриваться в качестве новой клеточной платформы для генерации тДК, однако чувствительность ИФН-ДК к действию дексаметазона и свойства дексаметазон-модифицированных ДК остаются не исследованными.

Другим аспектом, обуславливающим интерес к изучению ИФН-ДК и их чувствительности к дексаметазону, является тот факт, что при аутоиммунной патологии уровень IFN- α , IFN- β и экспрессия регулируемых ими генов повышены. Это свидетельствует о важной роли интерферонов I в патогенезе аутоиммунного воспаления [154, 155]. Учитывая также низкое содержание IL-4 в синовиальной жидкости и сыворотке крови у больных РА [33, 113], можно полагать, что в данных условиях созревание моноцитов в ДК в значительной степени контролируется IFN- α . В этом случае изучение ИФН-ДК в качестве мишени гормональной терапии представляется патогенетически более обоснованным, а эффект глюкокортикоидов на ИФН-ДК может более адекватно отражать ответ на терапию глюкокортикоидами. Наконец, исследование функций ИФН-ДК может быть полезным в плане изучения роли ДК в опосредовании действия различных биологических препаратов с иммуномодулирующей активностью.

1.4. Дендритные клетки в патогенезе ревматоидного артрита

1.4.1. Роль дендритных клеток в развитии и прогрессии ревматоидного артрита

Дендритным клеткам при РА отводится важная роль, как непосредственно в патогенезе аутоиммунного артрита [213], так и ускоренном развитии атеросклероза и тромбозов при данной патологии [20, 161]. Вовлеченность ДК в патогенез ревматоидного артрита (РА) связывают со способностью ДК презентировать хрящевые гликопротеины [195], продуцировать провоспалительные цитокины [206], активировать Т-клетки к продукции Th1 и Th17 цитокинов и ингибировать генерацию Трег [80, 94]. ДК имеют непосредственную причастность к разрушению костной ткани, поскольку являются предшественниками остеокластов, гигантских многоядерных остеорезорбирующих клеток, получивших название GMICs (giant myeloid inflammatory cells). Недавние исследования показали, что длительная выживаемость мДК и их способность к слиянию обусловлена повышенной экспрессией анти-апоптотических генов BCL2A1 и MCL1 и контролируется IL-17A [128]. Участие ДК в развитии атеросклероза на ранних этапах связано со способностью миелоидных ДК активировать макрофаги и Th1 проатерогенный ответ. На более продвинутых стадиях атеросклероза в сформированных атеросклеротических бляшках накапливаются плазмоцитоидные ДК, вызывающие нестабильность бляшек и повреждение эндотелия [79].

1.4.2. Синовиальные дендритные клетки у больных ревматоидным артритом

Хронический воспалительный процесс в синовиальной ткани при РА во многом определяется взаимодействием резидентных клеток с клетками врожденного иммунитета. Патофизиологическая роль ДК в этом процессе является недостаточно изученной. Не ясно, причастны ли ДК к возникновению РА. Тем не менее, поскольку патологическая презентация аутоантигенов является неотъемлемым условием в запуске и поддержании аутоиммунных реакций, и число ДК в синовиальной ткани при РА существенно возрастает, участие ДК в поддержании патологического процесса не вызывает сомнений.

Центральная роль в развитии и прогрессии РА отводится миелоидным ДК, способным более эффективно презентировать экзогенные антигены по сравнению с плазмцитоидными ДК [35]. Поскольку патогенез РА связывают с активацией Т-клеток, распознающих собственные или измененные собственные пептиды, патогенную активность связывают со зрелыми миелоидными ДК.

Значительное количество ДК, часто локализованных в центре Т-клеточных кластеров, было выявлено в синовиальной жидкости больных РА еще в 1999 г. [191]. Позднее присутствие в синовиуме ДК, включая миелоидные и плазмцитоидные ДК, было описано и другими авторами [89, 187]. Более того, было показано, что число ДК в синовиуме пациентов РА в сравнении с пациентами остеоартритом повышено [112, 152].

Исследования фенотипа и функциональной активности синовиальных ДК показало, что миелоидные ДК имеют фенотип зрелых активированных ДК, экспрессирующих молекулы МНС II класса, ко-стимуляторные молекулы, молекулы адгезии, хемокиновые рецепторы и стимулируют преимущественно Th1/провоспалительный ответ [33, 164]. Так, синовиальные ДК характеризуются повышенным уровнем активационных маркеров и более эффективно стимулируют пролиферацию Т-клеток, а также продукцию Т-клетками IFN γ , IL-4 и IL-17 [117]. Кроме того, в синовиальной жидкости присутствуют клетки с

фенотипом воспалительных ДК: с повышенной секрецией IL-23, который вызывает дифференцировку Th17 клеток [174]. Синовиальные ДК продуцируют повышенные концентрации хемокинов CCL17, CXCL9, и CXCL10, обладая способностью рекрутировать как эффекторные Т-клетки, так и Трег [117]. Таким образом, синовиальные ДК за счет способности активировать и рекрутировать Т-лимфоциты могут поддерживать локальное воспаление и участвовать в развитии эктопической лимфоидной ткани.

Важно отметить, что в отличие от синовиальных ДК, имеющих сходство с ДК моноцитарного происхождения [75], описанных как воспалительные ДК [35], присутствующие в синовиуме, плазмцитоидные ДК предположительно предотвращают активацию наивных Т-клеток, индуцированную миелоидными ДК [76].

Миелоидные ДК могут попадать в синовиальную жидкость/ткань путем миграции из периферической крови и активироваться под действием цитокинов синовиальной жидкости (IL-1, IL-6, TNF α , GM-CSF, IL-8) и коллагена [32, 33]. Кроме того, ДК могут дифференцироваться из локализованных в синовиальной ткани ранних миелоидных предшественников [164]. Существенным источником тканевых ДК в нелимфоидных органах являются моноциты [142].

Одной из причин накопления и активации синовиальных ДК может быть повышенная концентрация цитокинов и хемокинов в синовиальной жидкости пациентов РА по сравнению с таковой у пациентов с остеоартритом [62]. Действительно, терапевтический эффект биологических препаратов, блокирующих TNF α , IL-1 и IL-6, может быть связан со способностью указанных цитокинов индуцировать созревание ДК. Недавние исследования также показали, что провоспалительный фенотип синовиальных ДК может поддерживаться повышенной продукцией CD4⁺ Т-клетками GM-CSF [150]. Кроме того, изменения функционального фенотипа синовиальных ДК могут быть обусловлены повышенными концентрациями тимического стромального липопротейна (TSLP) [118] и IL-7 [156], а также влиянием повышенных концентраций коллагена [173].

Синовиальные ДК при РА характеризуются повышенной экспрессией рецепторов к TSLP и при взаимодействии с этим цитокином способны активировать пролиферацию Т-клеток и их дифференцировку в Th1, Th17 и Th2 клетки. Учитывая сходство синовиальных ДК и TSLP-активированных ДК периферической крови, можно полагать, что активированный статус синовиальных ДК у больных РА обусловлен повышенной концентрацией TSLP в синовиуме [117, 118]. Согласно данным литературы, TSLP способен оказывать стимулирующий и ингибирующий эффекты на ДК, однако на фоне высокого уровня IL-7 в синовиуме больных РА доминирует стимулирующий эффект, поскольку IL-7 подавляет экспрессию PD-L1 [119]. Активирующее действие TSLP на ДК также связано со способностью данного цитокина усиливать секрецию хемокинов CCL17 и CCL3, обеспечивая рекрутирование эффекторных Т-клеток и Трег [118].

Негативная регуляция, предотвращающая в синовиуме гиперактивацию ДК, помимо PD-1 и PD-L1 может опосредоваться CXCL12-γ – сплайс-вариантом CXCL12 [165]. Хемокин CXCL12 является лигандом для рецептора CXCR4 на Т-клетках и, соответственно, способен вызывать рекрутирование Т-клеток. CXCL12-γ, обладая низкой способностью связываться с CXCR4, нарушает эффективность взаимодействия ДК с Т-лимфоцитами и снижает стимуляторную активность ДК [165]. Еще одним feed-back регулятором ДК могут быть белки теплового шока (HSPs), присутствующие в синовиальной жидкости больных РА в повышенных концентрациях, способные подавлять созревание ДК и индуцировать экспрессию IDO [178]. Так, HSP70 снижает стимуляторную активность ДК и повышает их способность индуцировать Трег [181].

1.4.3. Характеристика дендритных клеток периферической крови и дендритных клеток моноцитарного происхождения у больных ревматоидным артритом

Данные о свойствах ДК периферической крови при РА немногочисленны. В отличие от повышенного содержания ДК в синовиуме, количество миелоидных ДК в периферической крови при РА снижено. Также показано, что по сравнению с синовиальными ДК циркулирующие ДК обладают менее выраженным провоспалительным потенциалом [77, 151]. Мо-ДК у больных РА характеризуются повышенной продукцией Th1/провоспалительных цитокинов и хемокинов [143–145]. Кроме того, для мо-ДК больных РА характерна повышенная продукция IL-6 и IL-23 (которые стимулируют дифференцировку CD4⁺ Т-клеток в Th17), и, соответственно, повышенная способность индуцировать Th17 [47, 140]. В то же время мо-ДК дефектны по способности индуцировать Foxp3⁺Treg [47]. Кроме того, в отличие от мо-ДК доноров, ДК больных обладают резистентностью к некоторым ингибиторным сигналам. Так, при индукции толерогенных свойств ИЛ4-ДК через активацию гликопротеинового лиганда Р-селектина 1 (PSGL-1) селектином Р, ДК не способны индуцировать CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Трег, тогда как при индукции IL-10 – сохраняют такую способность [47]. Также показано, что в отличие от ДК доноров, стимуляция ИЛ4-ДК больных IL-13 не приводит к усилению Fc-γIRb, проводящего ингибирующий сигнал в отношении продукции провоспалительных цитокинов ДК [143, 145]. Способность мо-ДК больных смещать дифференцировку Т-клеток в сторону Th17 является, по-видимому, важной причиной повышенного содержания Th17 у пациентов с РА [47]. По сравнению с ДК доноров мо-ДК больных РА обладают большей способностью к рекрутированию макрофагов, нейтрофилов и моноцитов в силу повышенной продукции хемокинов CXCL8 и CCL3 [152]. В результате мо-ДК пациентов могут усиливать лейкоцитарную инфильтрацию синовиума и поддерживать воспаление.

С другой стороны, мо-ДК пациентов отличаются повышенной экспрессией PSGL-1 и лиганда к рецептору программированной смерти PD-1 (PD-L1), т.е. мембранных белков, обладающих противовоспалительной активностью [47]. Сигналинг через PSGL-1 переводит ДК в состояние толерантности, в частности, ДК приобретают способность индуцировать дифференцировку Т-клеток в Трег [198]. Однако такие свойства мо-ДК больных при активации данного сигнального пути менее выражены по сравнению с ДК доноров [47]. Связывание PD-L1 на ДК с PD-1 на Т-клетках подавляет созревание ДК [88] и ингибирует пролиферацию Т-клеток [119]. Гиперэкспрессия PSGL-1 и PD-L1, возможно, отражает механизм негативной регуляции функциональной активности ДК по принципу обратной связи.

1.5. Дендритные клетки в качестве новой мишени в терапии ревматоидного артрита

1.5.1. Влияние медикаментозной терапии на дендритные клетки при аутоиммунной патологии

Поскольку дендритным клеткам отводится важная патогенетическая роль в развитии аутоиммунного артрита, а также прогрессии атеросклероза и усилении тромбообразования при РА, подавление стимулирующей активности и индукция толерогенного фенотипа ДК обсуждаются в качестве нового перспективного подхода к лечению не только аутоиммунного процесса, но и сопутствующих осложнений [206]. В этом плане следует отметить, что многие препараты, входящие в стандарты лечения АИЗ, обладают способностью индуцировать толерогенные свойства ДК. Так, глюкокортикоиды подавляют дифференцировку моноцитов в ДК и созревание последних [53, 210]. В 1999 г Van den Heuvel M. M.

с соавт. исследовали влияние дексаметазона на функции ДК у больных с бронхиальной астмой, получавших ингаляционные ГКС, и показали, что ДК пациентов, получивших терапию ГКС, обладали сниженной аллостимуляторной активностью по сравнению с ДК пациентов, не получавших терапию ГКС [65]. Аналогичные данные были получены у пациентов с миастенией гравис. ДК, генерированные от предлеченных преднизолоном пациентов, характеризовались более выраженными толерогенными свойствами по сравнению с ДК пациентов, не получавших преднизолон, в частности, обладали сниженной аллостимуляторной активностью и характеризовались более высокой продукцией IL-10 и TGF β [97]. Показано, что терапия тоцилизумабом (анти-IL6R) у пациентов с РА уменьшает количество циркулирующих ДК [151]. Сходные данные получены также в отношении анти-ФНО-препаратов, применяющихся в лечении РА. Показано, что ДК пациентов, получавших анти-ФНО препараты, характеризовались сниженной экспрессией CD80/CD86 и аллостимуляторной активностью [9]. Моноклональные антитела против TNF α при РА также блокируют созревание ДК периферической крови, судя по подавлению экспрессии CD83 [8]. Влияние метотрексата на ДК по данным литературы менее однозначно. В модели овалбумин-иммунизированных мышей метотрексат в комбинации с циклофосфамидом подавляет созревание ДК, что сопровождается уменьшением Th17 и возрастанием Трег [214]. С другой стороны, имеются данные и об отсутствии ингибирующего эффекта метотрексата на стимуляторную активность ДК периферической крови [204].

Представленные выше данные свидетельствуют о том, что супрессивные препараты могут оказывать ингибирующее действие на стимуляторную активность ДК и индуцировать толерогенный фенотип ДК, однако эффекты различных препаратов на количественные и функциональные показатели ДК при РА остаются малоизученными. Между тем, изменение свойств ДК на фоне терапии может выступать в роли нового иммунологического биомаркера и являться предиктором ответа на терапию.

1.5.2. Характеристика толерогенных дендритных клеток у больных ревматоидным артритом

Поскольку тДК играют важную роль в восстановлении иммунологической толерантности и рассматриваются в качестве нового терапевтического подхода к лечению различных аутоиммунных заболеваний (ревматоидный артрит, сахарный диабет 1 типа, рассеянный склероз и др.), возможность генерации таких клеток у пациентов и характеристика их свойств представляет большой интерес. Harry R. A. с соавт. изучили свойства тДК, генерированных в присутствии дексаметазона и VitD3 у пациентов с ревматоидным артритом, и сравнили их со свойствами тДК здоровых доноров. Авторы показали, что тДК больных РА характеризуются сниженной экспрессией ко-стимуляторных молекул, молекул главного комплекса гистосовместимости, сниженной продукцией провоспалительных цитокинов и не отличаются от тДК здоровых доноров [63]. Кроме того, было показано, что тДК больных подавляют антигенспецифический иммунный ответ, а также ингибируют пролиферацию аутологичных Т-лимфоцитов, стимулированных зрелыми ДК, т.е., обладают иммуносупрессивной активностью. Учитывая провоспалительное микроокружение, важным моментом является стабильность генерируемых ДК у пациентов с РА. Harry R.A. с соавт. показали, что обработка тДК провоспалительным коктейлем (IL-1 β , TNF α , IL-6, IFN γ) или LPS не вызывала изменений фенотипа, свидетельствующих о созревании и активации ДК. Таким образом, тДК в условиях воздействия воспалительных стимулов оставались стабильными [63].

В другом исследовании также была показана возможность генерации у больных РА с помощью дексаметазона ДК с фенотипическими и функциональными свойствами толерогенных ДК [53]. Авторы сравнили экспрессию болезнь-ассоциированных генов в дексаметазон-модифицированных и контрольных ДК, генерированных из моноцитов больных РА. В анализ вошли 12 генов, ассоциированных с ревматоидным артритом: гены, участвующие в

активации NF- κ B (BCL10, MAP3K7/TAK1, MAPK1/ERK), воспалении (ALOX15, MAPK1/ERK, ATG3, ATXN3, VCL), индукции дифференцировки и созревания Th17 (BCL10, CD200R1), а также хемотаксисе и рекрутировании в синовиальную оболочку иммунокомпетентных клеток (CCR2, CD200R1, SPN/CD43). Уровень транскрипции этих генов исходно в контрольных ДК больных РА был высоким. При обработке ДК дексаметазоном и GMP-сертифицированным иммуномодулятором монофосфорилем липида А (MPLA) уровень экспрессии снижался до значений здоровых доноров. Авторы заключили, что обработка ДК дексаметазоном восстанавливает «нормальный» уровень транскрипции генов. Таким образом, ДК, генерируемые в присутствии дексаметазона у больных РА, сходны по своим характеристикам с тДК здоровых доноров и функционально реализуют свои толерогенные свойства в отношении аллогенных Т-лимфоцитов.

Одним из важных остается вопрос о влиянии тДК на аутологичные Т-лимфоциты больных РА, поскольку функции Т-клеток у больных РА на фоне хронического аутоиммунного воспаления и проводимой терапии существенно изменены [53, 122]. Garsia-Gonzalez сравнили способность контрольных зрелых ДК и тДК у пациентов с РА стимулировать антигенспецифический иммунный ответ аутологичных Т-лимфоцитов. Зрелые ДК, обработанные аутологичной синовиальной жидкостью, стимулировали выраженную пролиферацию Т-лимфоцитов и продукцию ими IFN γ и IL-17. При этом, ДКдекс, преинкубированные с синовиальной жидкостью, обладали значимо меньшей стимуляторной активностью в отношении аутологичных Т-лимфоцитов. Результаты Harry R.A. с соавт, показавшие иммуносупрессивное воздействие ДК на аутологичные Т-лимфоциты [63], также доказывают сохраненную чувствительность Т-лимфоцитов больных к толерогенному воздействию аутологичных ДК.

1.5.3. Терапевтический потенциал толерогенных дендритных клеток при ревматоидном артрите

Патогенез аутоиммунного артрита связан со срывом толерантности и инфильтрацией синовиума аутореактивными $CD4^+$ Т клетками, которые продуцируют провоспалительные цитокины ($IFN\gamma$ и $IL-17$), разрушающие хрящевую и костную ткань [34]. Попытки подавить этот процесс с помощью биологических препаратов (антагонистов цитокинов или их рецепторов), уменьшает выраженность артрита, однако эффект непродолжителен, а риск развития побочных эффектов достаточно высок. Поэтому дальнейшие перспективы связывают с технологиями восстановления иммунологической толерантности, и использование тДК в ряду этих технологий привлекает большое внимание [2, 127].

Экспериментальные исследования продемонстрировали терапевтическую эффективность антигенспецифических тДК в модели коллаген-индуцированного артрита у мышей [111, 182].

Первое клиническое исследование тДК в лечении пациентов с РА (clinicaltrials.gov NCT00396812) было проведено австралийской группой из университета Квинсленда. Толерогенные ДК получали путем обработки мо-ДК ингибитором NF- κ B (BAY 11-7082). Полученные подобным образом ДК, нагруженные четырьмя цитрулинированными пептидами («Rheumavax»), не экспрессировали CD40, однако характеризовались высокой экспрессией CD86, что отличало фенотип этих ДК от других типов тДК [190]. Результаты 1-й фазы клинических исследований данной вакцины были опубликованы в 2015 г. [12]. Это исследование стало первым испытанием тДК при РА у человека [23]. В исследовании приняли участие 18 пациентов с длительностью РА менее 1 года, которые продемонстрировали хорошую переносимость терапии. Авторы расценили эффект вакцины как «многообещающий», поскольку наблюдали снижение $CD4^+CD25^+CD127^+$ эффекторных Т-клеток и возрастание

CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Трег через месяц после однократного введения вакцины, а также снижение активности заболевания по индексу DAS28 у части пациентов. Таким образом, однократное внутрикожное введение аутологичных тДК, нагруженных цитрулинированными пептидами, у больных РА является безопасным и эффективным [12].

Другой подход для получения тДК, пригодных для клинического использования у больных РА, был разработан Harry R.A. с соавт. в университете Ньюкасла [63]. ДК генерировали с использованием дексаметазона (1μM) и витамина D. В качестве аутоантигена использовали аутологичную синовиальную жидкость. ДК вводили в коленный сустав путем артроскопии в дозе 1×10⁶, 3×10⁶ или 10×10⁶ клеток. Для индукции созревания ДК использовался MPLA. Полученные таким образом антигенспецифические тДК («AutoDECRA») были апробированы (NCT01352858) в рандомизированном плацебо-контролируемом исследовании с эскалацией дозы ДК [68]. Интраартикулярное введение тДК не вызывало развития тяжелых нежелательных явлений и не сопровождалось усилением проявлений синовита. Авторы не выявили значимых изменений в содержании различных субпопуляций клеток (CD4⁺IL-10⁺, CD4⁺FoxP3⁺, CD4⁺IFNγ⁺, CD4⁺IL-17⁺) и уровне продукции цитокинов (IL-10, IFNγ, IL-17, IL-6, TNFα). Тем не менее, у пациентов, получавших более высокую дозу ДК, наблюдалось уменьшение выраженности синовита [10].

На настоящий момент накоплен большой объем информации о роли ДК в патогенезе аутоиммунной патологии, что позволяет рассматривать ДК в качестве терапевтических мишеней. При этом обсуждается два подхода: модуляция свойств ДК *in vivo*, в частности, индукция толерогенной активности ДК с помощью фармакологических средств, и применение генерируемых *ex vivo* толерогенных ДК. С этой точки зрения исследование эффектов различных

препаратов, входящих в стандарты лечения РА, на ДК и разработка новых протоколов генерации тДК при РА являются безусловно перспективным направлением. Следует отметить, что большинство этих исследований проводится с ДК, генерируемыми из моноцитов в присутствии GM-CSF и IL-4. Между тем, учитывая важную роль интерферонов 1 типа в индукции дифференцировки ДК, а также повышенный уровень IFN- α /IFN- β и экспрессии регулируемых ими генов при аутоиммунной патологии, можно полагать, что при РА ИФН-ДК являются более адекватной витральной моделью генерируемых *in vivo* воспалительных ДК. Соответственно, изучение чувствительности ИФН-ДК к действию толерогенных стимулов и свойств тДК, индуцированных на платформе IFN- α , представляется значимым как в фундаментальном, так и прикладном аспектах.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика больных, включенных в исследование

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

Иммунологические исследования

Мононуклеарные клетки (МНК) периферической крови выделяли центрифугированием цельной, гепаринизированной венозной крови в градиенте плотности фиколла-верографина ($\rho=1,078$; фиколл – Pharmacia Fine Chemicals, Швеция; верографин – Spofa, Чехия). Клетки в концентрации 3×10^6 на лунку культивировали 1,5 часа при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO_2 , в 6-луночных плоскодонных планшетах для получения прилипающей фракции моноцитов в полной культуральной среде, содержащей RPMI-1640 (Sigma, США).

Получение IFN- α -индуцированных дендритных клеток (ИФН-ДК) и супернатантов цельных культур

МНК из венозной гепаринизированной крови выделяли стандартным методом градиентного центрифугирования на фиколле-верографине. Для генерации ДК прилипающую фракцию МНК культивировали в течение 4 сут. при 37 С° в CO₂-инкубаторе в 6-луночных планшетах (Nuncloп, Дания) в среде RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 5мМ НЕРЕС-буфера, 100 мкг/мл гентамицина и 5% сыворотки плодов коровы (FCS, БиолоТ, Санкт-Петербург), в присутствии GM-CSF (40 нг/мл, Sigma-Aldrich) и IFN-α (1000 Ед/мл, Роферон-А, Roche, Швейцария). Для индукции созревания на 4 сут. вносили липополисахарид (LPS, 10 мкг/мл, LPS E.colli 0114:B4, Sigma-Aldrich) и продолжали культивирование в течение последующих 24 часов. Генерацию ИФН-ДК проводили в отсутствие (контрольные культуры) и в присутствии дексаметазона (10⁻⁶ М), который добавляли на 3 сутки. Клеточный выход составлял в среднем 0,19 × 10⁶/ 1 млн МНК.

Генерация IL-4-индуцированных ДК (ИЛ4-ДК)

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

Определение субпопуляций ДК методом проточной цитофлуориметрии

Приготовление образцов для определения относительного содержания субпопуляций ДК, экспрессирующих поверхностные CD-маркеры, проводили в соответствии с методикой Becton Dickinson с небольшими модификациями. Для

этого ДК (500 тыс.клеток/50 мкл) отмывали в растворе «А» (5% желатиноля, 0,1% азида натрия, 0,02% ЭДТА, 10% сыворотки доноров АВ (IV) группы в фосфат-буферном физиологическом растворе), помещали в цитометрические пробирки. К суспензии клеток добавляли рекомендуемое количество анти-CD14, анти-CD83, анти-CD16, анти-CD86, анти-HLA-DR, анти-PD-L1, анти-TLR2 моноклональных антител, меченных фикоэритрином (PE) или флуоресцеин изотиоцианатом (FITC) (BD Pharmingen, США), и инкубировали 30 мин при 4°C. Затем клетки отмывали от антител раствором «В» (0,1% азида натрия, 0,02% ЭДТА в фосфат-буферном физиологическом растворе), ресуспендировали и заливали 0,5 мл лизирующего раствора (FACSLyse, Becton Dickinson, США), что обеспечивало фиксацию с полным разрушением остаточных эритроцитов.

Для определения внутриклеточной экспрессии индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO) после отмывки раствором «А» ДК инкубировали 15 мин при комнатной температуре с 5 мкл FITC-меченных моноклональных анти-HLA-DR антител (BD Biosciences, США). Далее проводили фиксацию и пермеабиллизацию клеток с использованием коммерческого набора растворов для фиксации/пермеабиллизации Transcription Factor Buffer Set в соответствии с инструкцией производителя (BD Biosciences, США) и инкубировали их с моноклональными анти-IDO-антителами конъюгированными с PE (R&D Systems, США). Затем клетки ресуспендировали в 50 мкл раствора «А» и переносили в пробирки для цитофлуориметрического анализа, содержащие 0,4 мл лизирующего раствора. Подготовленные пробы подвергали исследованию на проточном цитометре FACSCalibur (Becton Dickinson, США) с использованием программы Cell Quest (Becton Dickinson, США). Процент позитивных клеток, экспрессирующих соответствующие CD-маркеры, рассчитывался на 10000 клеток в моноцитарном регионе. Помимо определения относительного содержания клеток, оценивали общее количество поверхностных маркеров (CD14, CD83, CD86, HLA-DR, TLR2, PD-L1) – в условных единицах по средней интенсивности свечения флуоресценции.

Оценка аллостимуляторной активности ИФН-ДК

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

Аутологичная смешанная культура лейкоцитов

ИФН-ДК больных РА, генерированные в отсутствие или в присутствии дексаметазона, культивировали с аутологичными МНК ($0,1 \times 10^6$ /лунку) в 96-луночных круглодонных планшетах в среде RPMI-1640 в присутствии 10% инактивированной сыворотки крови АВ (IV) группы при 37°C в CO_2 -инкубаторе в соотношении МНК: ДК=10:1. В отдельной серии экспериментов оценивали способность ДКдекс подавлять пролиферативный ответ аутологичных Т-клеток, индуцированный контрольными ДК. В этом случае в культуры МНК ($0,1 \times 10^6$ /лунку) больных РА одновременно добавляли контрДК и ДКдекс в соотношении МНК: ДК=10:1 для каждого типа ДК.

Пролиферативный ответ оценивали на 5 сут. радиометрически по включению ^3H -тимидина (1 мкКю/лунку), вносимого за 18 ч. до окончания

культивирования. Стимуляторную активность ДК в виде индекса влияния (ИВ) рассчитывали, как отношение пролиферативного ответа в ауто-СКЛ к уровню спонтанной пролиферации МНК.

Определение продукции цитокинов методом иммуноферментного анализа

Концентрацию продуцируемых цитокинов (IFN γ , TNF α , IL-6, IL-10) в супернатантах LPS-стимулированных ИФН-ДК определяли методом иммуноферментного анализа, используя соответствующие тест-системы производства «Вектор-Бест» (г. Новосибирск).

Оценка способности ИФН-ДК активировать Th1- и Th2-ответ

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

Мультиплексный анализ расширенного спектра цитокинов

Расширенный спектр цитокинов, включая про-/противовоспалительные цитокины (TNF α , IL-1b, IL1-ra, IL-10), иммунорегуляторные цитокины (IL-2, IFN γ , IL-12, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13, IL-15, IL-17), ростовые факторы (G-CSF, IL-7, FGF- β , PDGF, VEGF) и хемокины (IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1a, RANTES, Eotaxin), в культурах генерированных ИФН-ДК оценивали методом проточной

флюориметрии на двухлучевом лазерном автоматизированном анализаторе (Bio-Plex Protein Assay System, Bio-Rad, США) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

Содержание регуляторных Т-клеток

Содержание Трег определяли методом проточной цитометрии по количеству $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Т-клеток и $CD4^+IL-10^+$ (Tr1) в гейте $CD4^+$ лимфоцитов, используя анти-CD4 (PerCP или APC), анти-CD25 (FITC), анти-Foxp3 (PE), анти-IL-10 (PE) моноклональные антитела в соответствии с инструкциями производителя (BD Biosciences, США). Фиксацию и пермеабиллизацию МНК для оценки внутриклеточной экспрессии Foxp3 и IL-10 проводили после инкубации клеток с моноклональными антителами против поверхностных антигенов; использовали коммерческий набор растворов для фиксации/пермеабиллизации Transcription Factor Buffer Set в соответствии с инструкцией производителя (BD Biosciences, США). В тексте относительное содержание описываемых субпопуляций представлено в виде процента от $CD4^+$ Т-клеток

Клеточный цикл

Клеточный цикл $CD3^+CD4^+$ Т-лимфоцитов оценивали методом трехцветной проточной цитометрии. Для этого МНК (10^6 клеток) в объеме 25 мкл инкубировали в течение 45 мин при 4°C в темноте с 5 мкл FITC-конъюгированных анти-CD3 и 5 мкл PE-конъюгированных анти-CD4 моноклональных антител. После однократной отмывки клетки фиксировали 0,5% раствором параформальдегида, центрифугировали и метили 7-амино-актиномицином D (7-AAD, Calbiochem, Германия) в конечной концентрации 2

мкг/мл. Относительное содержание клеток с диплоидным (клетки в G0/G1 фазах клеточного цикла) и гипердиплоидным (клетки в S/G2/M фазах клеточного цикла) набором ДНК определяли в гейте CD3⁺CD4⁺ Т-лимфоцитов. Результаты выражали в виде процентного соотношения позитивных клеток к общему количеству CD3⁺CD4⁺ Т-лимфоцитов.

Уровень апоптоза

Уровень апоптоза оценивали с помощью окраски аннексином V (An) и пропидиума иодидом (PI), используя коммерческую тест-систему BD Pharmingen. Количество клеток в стадии раннего и позднего апоптоза определяли в гейте CD3⁺ Т-лимфоцитов по содержанию An⁺PI⁻ и An⁺PI⁺ клеток, соответственно.

Антигенспецифический ответ

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

Статистическая обработка полученных результатов

Статистическая обработка полученных результатов проводилась методами описательной и непараметрической статистики на персональном компьютере с

использованием программы «STATISTICA 6.0». Таблицы и рисунки содержат информацию в виде медианных значений и интерквартильных диапазонов, если не указано другого, в отдельных случаях представлены значения максимальных и минимальных значений. Для выявления значимых различий сравниваемых показателей использовали непараметрические критерии: критерий знаков и W-критерий Вилкоксона для связанных, парных выборок, и U-критерий Манна-Уитни – для несвязанных выборок. Корреляционный анализ проводили с помощью ранговой корреляции Спирмена (R_s). Различия считали статистически значимыми при уровне $p < 0,05$.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Влияние дексаметазона на дифференцировку моноцитов в дендритные клетки у здоровых доноров

Способность глюкокортикоидов индуцировать толерогенный фенотип ДК является известным феноменом, продемонстрированным как в экспериментальных исследованиях *in vitro*, так и *in vivo* [56, 63, 135]. Основные исследования толерогенных эффектов глюкокортикоидов на ДК человека, проведенные в культурах ДК, генерируемых из моноцитов в присутствии GM-CSF и IL-4 (ИЛ4-ДК), показали, что индукция толерогенного фенотипа связана с подавлением созревания ДК [67, 104, 138]. Между тем, важным фактором индукции дифференцировки моноцитов в ДК и их созревания является IFN- α , уровень которого повышен при аутоиммунной патологии [15, 55]. Генерируемые в присутствии IFN- α ДК (ИФН-ДК) отличаются от ИЛ4-ДК спектром экспрессируемых генов и характеризуются промежуточной степенью зрелости [166, 168, 170]. В то же время чувствительность этих ДК к действию дексаметазона до настоящего времени не оценена. Поэтому отправной точкой работы явилось исследование влияния дексаметазона на дифференцировку и созревание ИФН-ДК, генерируемых из моноцитов здоровых доноров

Известно, что одним из универсальных функциональных признаков толерогенных ДК является их низкая аллостимуляторная активность [208]. Поэтому для определения оптимальной дозы дексаметазона, обладающей наиболее выраженным эффектом в плане индукции толерогенной активности ДК при минимальной токсичности, исследовали влияние различных доз дексаметазона на способность ИФН-ДК стимулировать пролиферацию аллогенных Т-клеток в смешанной культуре лейкоцитов (алло-СКЛ).

Как видно из данных рисунка 3.1.1, ингибирующий эффект дексаметазона в культурах ИФН-ДК в диапазоне доз от 10^{-8} до 10^{-6} М характеризовался

дозозависимым эффектом, варьируя от 38 до 46%, и был наиболее выраженным в концентрации 10^{-6} М. Эта доза была выбрана оптимальной для последующих исследований. При этом выход клеток при добавлении изучаемых концентраций в культуры дексаметазона ИФН-ДК доноров был сопоставим ($0,08$, $0,1$ и $0,11 \times 10^6$ /МНК при 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} дексаметазона, соответственно), что свидетельствует об отсутствии цитотоксического эффекта дексаметазона на ДК.

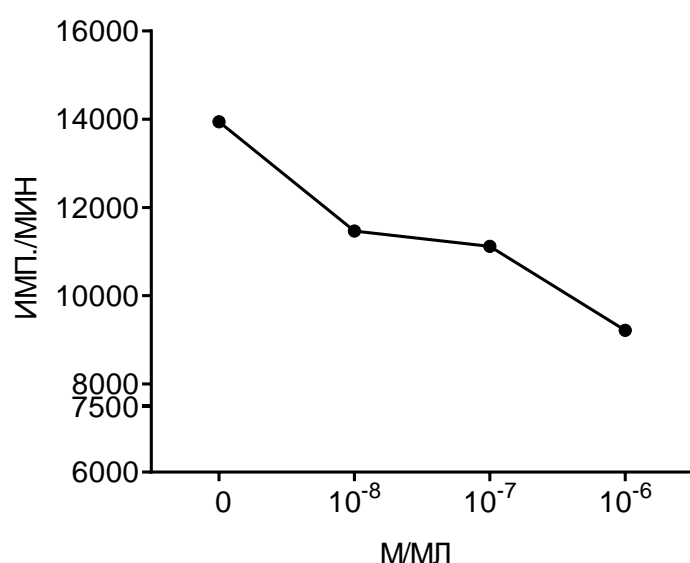


Рисунок 3.1.1. Дозозависимый характер ингибирующего влияния дексаметазона на аллостимуляторную активность ИФН-ДК. Представлены значения аллостимуляторной активности ИФН-ДК ($n=3$), генерируемых в отсутствие (0) или в присутствии различных доз дексаметазона ($10^{-8} - 10^{-6}$)

Известно, что глюкокортикоиды, блокируя NFkB, подавляют созревание ИЛ4-ДК, меняя фенотип в сторону менее зрелого [67, 104, 138]. Поэтому первоначально исследовали влияние дексаметазона на экспрессию поверхностных молекул, включая маркеры зрелости, а также антигены гистосовместимости, ко-стимуляторные и ко-ингибиторные молекулы (рисунок 3.1.2). Одной из особенностей ИФН-ДК по сравнению с ИЛ4-ДК является сохранение значительной частью этих клеток (даже после индукции их созревания) моноцитарного маркера CD14 [55]. Генерируемые в присутствии дексаметазона

ДК (ДКдекс) отличались от контрольных (контрДК) значимо более высоким содержанием $CD14^+$ клеток и меньшей долей $CD83^+$ и $CD86^+$ клеток, что свидетельствует о подавлении созревания ИФН-ДК под действием дексаметазона. Экспрессия HLA-DR значимо не менялась. В то же время ИФН-ДКдекс характеризовались повышенной экспрессией ко-ингибиторных молекул PD-L1 и молекулы TLR2, ассоциированной с толерогенной активностью ДК.

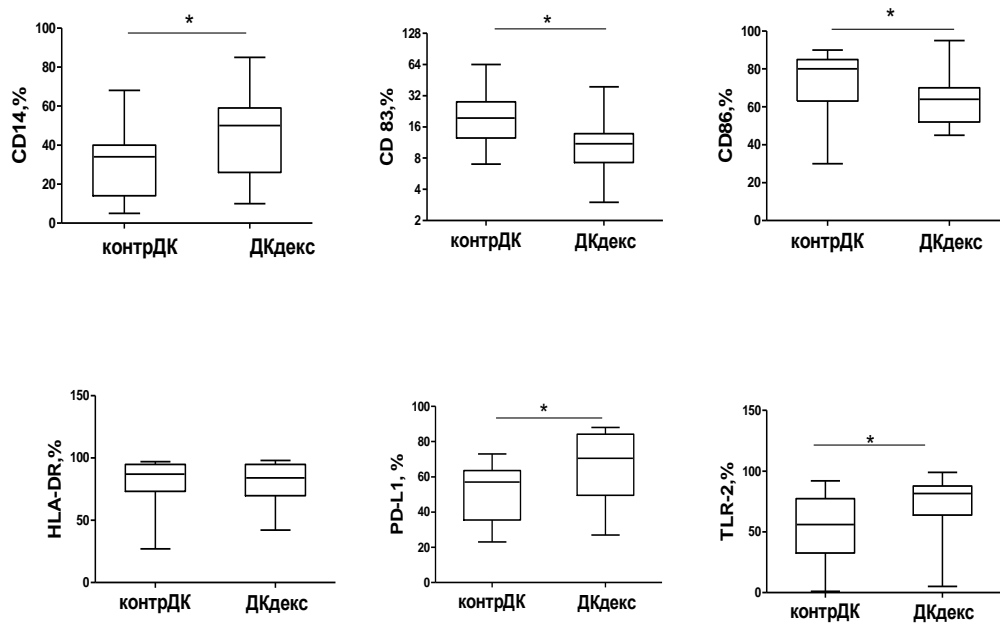


Рисунок 3.1.2. Влияние дексаметазона на фенотип ИФН-ДК (n=20). Представлены данные относительного содержания ДК, экспрессирующих различные поверхностные маркеры (медиана, интерквартильные диапазоны, минимум-максимум). * $p < 0,05$ по W-критерию Вилкоксона для парных выборок.

Поскольку созревание ДК индуцируется провоспалительными цитокинами (в первую очередь $TNF\alpha$), продукция которых усиливается при стимуляции LPS, ингибирующий эффект дексаметазона на ИФН-ДК мог быть обусловлен подавлением синтеза $TNF\alpha$. Действительно, из данных таблицы 3.1.1 видно, что в присутствии дексаметазона продукция $TNF\alpha$ снижалась в среднем с 3570 до 510 пг/мл ($pW=0,035$). При этом дексаметазон не оказывал значимого ингибирующего эффекта на секрецию IL-10. В результате индекс соотношения $TNF\alpha/IL-10$ в

культурах ДКдекс был в 6 раз ниже, чем в культурах контрольных ИФН-ДК (0,33 против 1,7 расч. ед., соответственно), что свидетельствовало о доминировании активности противовоспалительных цитокинов. Важно отметить, что выявленное снижение концентрации TNF α не было связано с токсическим действием дексаметазона на ИФН-ДК, поскольку выход клеток в культурах контрДК и ДКдекс значимо не различался, составляя в среднем $0,17$ и $0,19 \times 10^6$ / 1 млн МНК, соответственно ($pW=0,12$).

Таблица 3.1.1 - Влияние дексаметазона на продукцию TNF α и IL-10 в культурах ИФН-ДК

Цитокины	контрДК	ДКдекс	pW
TNF α (пг/мл)	3570 (1110 – 3960)	510 (230 – 2110)	0,035
IL-10 (пг/мл)	1834 (666–2224)	1020 (750–1538)	0,4
Индекс соотношения TNF α / IL-10 (расч.ед.)	1,7 (0,9–2,8)	0,33 (0,2–2,8)	0,04
Примечание: с помощью ИФА оценивали концентрацию цитокинов в супернатантах ИФН-ДК доноров (n=9), генерированных в отсутствие (контрДК) и в присутствии (ДКдекс) дексаметазона (10^{-6} М). pW – значимость различий по W-критерию Вилкоксона для парных выборок.			

Чтобы более полно охарактеризовать влияние дексаметазона на цитокиновый профиль ИФН-ДК, в отдельной серии экспериментов был проведен мультиплексный анализ 25 различных цитокинов, включая про-/противовоспалительные цитокины (TNF α , IL-1 β , IL-1-ra, IL-10), иммунорегуляторные цитокины (IL-2, IFN γ , IL-12, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13, IL-15, IL-17), ростовые факторы (G-CSF, IL-7, FGF- β , PDGF, VEGF) и хемокины (IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , RANTES, Eotaxin). Видно (таблица 3.1.2), что контрольные ИФН-ДК являются активными продуцентами широкого спектра цитокинов, интенсивность секреции которых отличается значительной вариабельностью. Так, часть цитокинов (TNF α , IL-6) и хемокинов (IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , RANTES) синтезируются на исключительно высоком уровне (>10000 пг/мл). Продукция относительно небольшой группы интерлейкинов (IL-4,

IL-5, IL-13 и IL-7) не превышает 100 пг/мл. Оставшаяся часть цитокинов, ростовых факторов и хемокинов детектируется в диапазоне от 100 до 10000 пг/мл. Среди них продукция IL1-га, IFN γ , IL-10, G-CSF, PDGF, VEGF и Eotaxin превышает 1000 пг/мл.

Таблица 3.1.2 - Влияние дексаметазона на цитокиновый профиль ИФН-ДК

Группы	Цитокины (пг/мл)	контрДК	ДКдекс
Про- и противовоспалительные	TNF α	64970 (36190–96750)	7003 (385–7240)*
	IL-1 β	610 (600–1120)	140 (100–160)8
	IL1-га	8730 (8620–11530)	7934 (5750–8050)
	IL-10	2215 (1030–3075)	2198 (735–2770)
Иммуно-регуляторные (Th1, Th2, Th9, Th17)	IL-2	190 (150–198)	32 (12–35)*
	IFN γ	4790 (3620–4970)	2292 (1480–3180)*
	IL-12(p70)	390 (210–460)	47 (40–85)*
	IL-4	61 (60–71)	41 (24–50)
	IL-5	5,6 (5–8,5)	5,6 (2,2–6,2)
	IL-6	19520 (18480–20960)	14940 (10080–19420)
	IL-9	104 (84–124)	64 (60–105)
	IL-13	85 (70–106)	64 (40–74)
	IL-15	213 (200–340)	247 (240–280)
	IL-17	530 (440–610)	447 (260–550)
Ростовые факторы	G-CSF	8079 (7580–12180)	4795 (2320–10220)
	IL-7	35 (35–40)	16 (13–60)
	FGF- β	145 (140–220)	78 (70–102)
	PDGF	3055 (2955–3630)	2510 (1835–2770)
	VEGF	1420 (1080–19210)	958 (950–960)*
СХС- и СС-хемокины	IL-8	155370 (144070–171170)	126670 (122350–152885)
	IP-10	170600 (134290–190320)	137640 (18990–168530)
	MCP-1	57430 (29180–74960)	33965 (5720–53560)
	MIP-1 α	77000 (76000–80000)	53561 (5710–75000)*
	RANTES	26160 (13260–48430)	2804 (1265–13560)*
	Eotaxin	880 (610–950)	385 (225–535)
Примечание: с помощью мультиплексного анализа оценивали концентрацию цитокинов в супернатантах ИФН-ДК доноров (n=5), генерированных в отсутствие (контрДК) и в присутствии дексаметазона (ДКдекс; 10 ⁻⁶ М). *pW <0,05, значимость различий по сравнению с контрДК (W-критерий Вилкоксона для парных выборок).			

В присутствии дексаметазона продукция не только TNF α , но и другого провоспалительного медиатора - IL-1 β , а также Th1-цитокинов (IFN γ , IL-2, IL-12)

значимо снижалась. Характерно, что при этом дексаметазон не оказывал заметного влияния на секрецию IL-10, IL-1-га, IL-4 и IL-13, смещая тем самым баланс в сторону противовоспалительных/Th2 медиаторов. ИФН-ДК, генерируемые в присутствии дексаметазона, отличались также более низкой продукцией хемокинов. Эти различия были статистически значимы в отношении MIP-1 α и RANTES и проявлялись в виде тенденции в отношении IP-10 и Eotaxin. Под влиянием дексаметазона регистрировался также отчетливый тренд к снижению продукции ростовых факторов (G-CSF, IL-7, FGF- β , PDGF), который в отношении VEGF достигал статистически значимого уровня.

Способность ДК стимулировать пролиферацию Т-клеток в ответ на аллоантигены в СКЛ является интегральным показателем функциональной активности ДК, которая во многом детерминирована экспрессией различных ко-стимуляторных или ко-ингибиторных молекул, а также балансом и уровнем продуцируемых цитокинов. Учитывая, что дексаметазон оказывал выраженный супрессорный эффект на созревание ИФН-ДК, а также на продукцию ими провоспалительных и Th1-цитокинов, представлялось важным оценить, влияние дексаметазона на аллостимуляторную активность ИФН-ДК в СКЛ. Из данных рисунка 3.1.3 видно, что ИФН-ДК, генерированные в присутствии дексаметазона, отличались 2-кратным снижением способности стимулировать пролиферативный ответ Т-клеток в алло-СКЛ по сравнению с контролем.

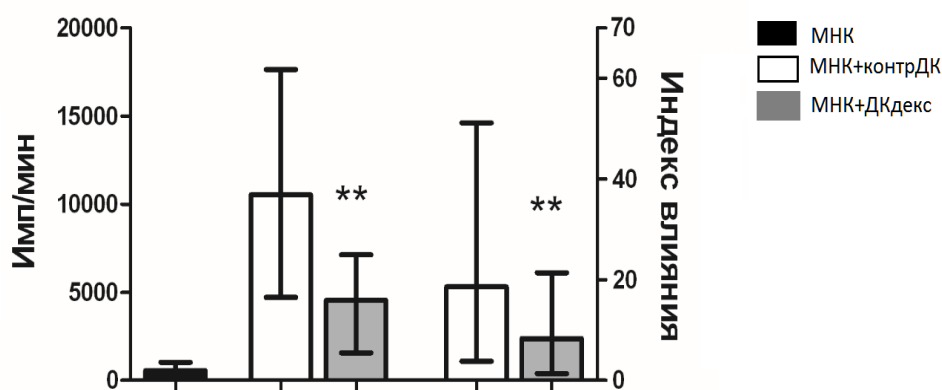


Рисунок 3.1.3. Супрессорный эффект дексаметазона на аллостимуляторную активность ИФН-ДК

Примечания: представлены данные (n=20) пролиферативной активности (имп/мин) МНК, культивируемых в отсутствие ДК, а также в алло-СКЛ в присутствии интактных ИФН-ДК, генерированных в стандартных условиях (МНК+контрДК) или с дексаметазоном в дозе 10^{-6} М (МНК+ДКдекс). По правой оси ординат представлены индексы влияния (расч. ед.) ИФН-ДК в алло-СКЛ. **p < 0,01 – значимость различий показателей по сравнению с контрольными ДК (W–критерий Вилкоксона для парных выборок).

Поскольку контрДК и ДКдекс у каждого из обследованных доноров были тестированы в идентичных условиях, т.е. в СКЛ с одними и теми же клетками-респондерами, то выявленное снижение аллостимуляторной активности ДКдекс не было связано с эффективностью распознавания $CD4^{+}$ Т-лимфоцитами аллоантигенов, представленных на HLA-DR⁺ ДК. В то же время, корреляционный анализ показал, что способность контрольных ИФН-ДКдекс стимулировать пролиферативный ответ Т-клеток в алло-СКЛ находится в прямой взаимосвязи с содержанием среди них $CD83^{+}$ клеток ($R_s=0,89$; $p=0,019$, $n=15$), и в обратной – с количеством TLR2⁺ клеток ($R_s=-0,69$; $p=0,012$, $n=12$). С этой точки зрения низкая аллостимуляторная активность ДКдекс во многом объясняется возрастанием среди них доли TLR2⁺ клеток и снижением относительного количества $CD83^{+}$ ДК.

В заключении, чтобы выяснить, влияет ли дексаметазон на способность ИФН-ДК активировать Th1 и Th2 клетки, оценили содержание Th1 (IFN γ) и Th2 (IL-6) цитокинов в супернатантах 5-суточной алло-СКЛ, индуцированной контрДК и ДКдекс (таблица 3.1.3).

Таблица 3.1.3 - Влияние дексаметазона на Th1- и Th2-стимулирующую активность ИФН-ДК в алло-СКЛ

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

Примечание: МНК культивировали в отсутствие («МНК») или в присутствии аллогенных ИФН-ДК доноров (n=13), генерированных в стандартных условиях («МНК+контрДК») или с дексаметазоном в дозе 10^{-6} М («МНК+ДКдекс»). Концентрацию IFN γ и IL-6 в 5-суточных супернатантах алло-СКЛ оценивали с помощью ИФА. *p < 0,05, **p < 0,01 – значимость различий показателей по сравнению с интактными ДК (W-критерий Вилкоксона для парных выборок).

Видно, что в культурах МНК в отсутствие стимуляции аллоантигенами продукция IL-6 существенно выше, чем уровень секреции IFN γ (индекс соотношения IL-6/IFN γ составляет в среднем 42 расч.ед.). ИФН-ДК доноров стимулировали аллогенные МНК к продукции как IL-6, так и IFN γ . Уровень продукции IFN γ в алло-СКЛ увеличивался в среднем в 39 раз, тогда как продукция IL-6 возрастала в среднем в 13 раз, что свидетельствовало о более выраженной Th1-стимуляторной активности ИФН-ДК. Под влиянием дексаметазона Th1-стимуляторная активность ИФН-ДК существенно снижалась, что проявлялось достоверным снижением концентрации IFN γ в алло-СКЛ в среднем на 93%. Супрессорный эффект дексаметазона в отношении Th2-стимуляторной активности ИФН-ДК был менее выраженным, поскольку продукция IL-6 снижалась только на 17%. В результате, индекс соотношения IL-6/IFN γ в культурах СКЛ, индуцированных ИФН-ДКдекс, возрастал практически в 15 раз (до 162 против 11 расч. ед., pW < 0,01), свидетельствуя о смещении баланса в сторону Th2-поляризующей активности ИФН-ДК под влиянием дексаметазона.

Таким образом, выявленные изменения фенотипа ИФН-ДК, генерируемых в присутствии дексаметазона, в частности, возрастание доли CD14⁺ ДК и снижение CD83⁺ ДК свидетельствует об ингибирующем действии дексаметазона на дифференцировку и созревание ИФН-ДК. На это же указывает и уменьшение доли CD 86⁺ ДК. С другой стороны, дексаметазон усиливает экспрессию на ДК TLR2 и PD-L1 ко-ингибиторных молекул, обуславливающих толлерогенную активность ДК. При этом генерируемые в присутствии дексаметазона ДК сохраняют экспрессию HLA-DR, что свидетельствует о сохранной антигенпрезентирующей функции этих клеток. Изменения функций ДК под

действием дексаметазона проявляются выраженным угнетением продукции цитокинов с провоспалительной и Th1-стимулирующей активностью (TNF α , IL-1 β , IL-2, IFN γ , IL-12), а также хемокинов (MIP-1 α , RANTES), подавлением аллостимуляторной активности ДК и выраженным снижением Th1-стимуляторной активности со смещением баланса в сторону доминирования Th2-стимулирующей активности ИФН-ДК.

Таким образом, генерируемые в присутствии дексаметазона ИФН-ДК приобретали не только фенотипические, но и функциональные свойства толерогенных ДК.

Глава 3.2. Сравнительная характеристика дексаметазон-модифицированных дендритных клеток, генерируемых из моноцитов в присутствии IFN- α и IL-4

Полученные в главе 3.1 данные продемонстрировали, что дексаметазон *in vitro* оказывает ингибирующий эффект на дифференцировку/созревание ДК, генерируемых из моноцитов в присутствии IFN- α , и индуцирует толерогенный фенотип ИФН-ДК. Это проявляется снижением экспрессии ко-стимуляторных молекул (CD86) и возрастанием толерогенных (TLR2) и ко-ингибиторных (PD-L1) молекул, снижением продукции провоспалительных цитокинов, а также угнетением способности ДК стимулировать пролиферацию и продукцию Th1 цитокинов в культурах аллогенных МНК.

Получение ДК с толерогенными свойствами представляет большой интерес в связи с перспективами использования тДК в лечении аутоиммунных заболеваний, аллергии и трансплантационных реакций [56, 67, 73]. Большинство клинических исследований проводится с использованием ДК, генерируемых из моноцитов периферической крови путем культивирования с GM-CSF и IL-4 (ИЛ4-ДК) в присутствии толерогенных стимулов. В качестве последних рядом исследователей используется дексаметазон [45, 67]. Интерес к дексаметазону обусловлен широким использованием глюкокортикоидов в качестве противовоспалительных и иммуносупрессивных препаратов. Толерогенные свойства дексаметазон-модифицированных ИЛ4-ДК описаны многими группами авторов [63, 67, 138, 149, 192]. Более того, дексаметазон-модифицированные ИЛ4-ДК, генерируемые в соответствии с требованиями Надлежащей производственной практики (good manufacturing practice, GMP), рекомендованы для клинической апробации при ревматоидном артрите [52, 63, 123].

Выявленная чувствительность ИФН-ДК к толерогенному действию дексаметазона позволяет предполагать, что эти клетки также могут использоваться для получения толерогенных ДК-вакцин. Причем, учитывая промежуточный (по степени зрелости) фенотип ИФН-ДК и особенности в паттерне экспрессируемых генов, модифицированные дексаметазоном ИФН-ДК

могут не уступать или даже превосходить по некоторым свойствам толерогенный потенциал дексаметазон-индуцированных ИЛ4-ДК. Поэтому следующий этап работы был посвящен сравнительной характеристике модифицированных дексаметазоном ИФН-ДК и ИЛ4-ДК.

Сравнительная оценка влияния дексаметазона на экспрессию поверхностных молекул в культурах ИФН-ДК и ИЛ-4-ДК

Сравнительное исследование влияния дексаметазона на фенотип ИФН-ДК и ИЛ4-ДК проводили путем оценки экспрессии поверхностных молекул, включая маркеры дифференцировки, зрелости, а также антигены гистосовместимости, ко-стимуляторные и ко-ингибиторные молекулы, в культурах ДК, генерируемых в отсутствие и в присутствии дексаметазона (таблица 3.2.1). МНК каждого донора использовались для генерации одновременно ИЛ4-ДК и ИФН-ДК.

Таблица 3.2.1 - Влияние дексаметазона на фенотип ИФН-ДК и ИЛ-4ДК

Маркеры	ИФН-ДК			ИЛ4-ДК		
	Контроль	Дексаметазон	ИБ	Контроль	Дексаметазон	ИБ
CD83, %	23,0 (20,5-29,5)	17,0 * (11,0-20,0)	0,57 (0,52-0,73)	39,5 (33,0-43,0)	18,5 * (16,5-20,0)	0,53 (0,46-0,67)
CD14, %	33,5 (23,5-43,5)	49,5* (42,5-60,5)	1,5 (1,1-1,65)	29,0 (27,5-33,5)	34,5* ** (17,5-48,0)	1,17 (0,88-1,21)
CD86, %	85,5 (70,0-91,0)	70,0 * (55,0-71,5)	0,82 (0,78-0,86)	83,0 (78,5-86,0)	45,5 * (39,5-56,5)	0,69 (0,46-0,77)
HLA-DR, %	95 (91,5-97,0)	94,0 (80,5-96,0)	0,97 (0,86-1,0)	91,0 (87,0-96,0)	90,0 (80,5-95,5)	1,0 (0,87-1,0)
PD-L1, %	59,0 (44,5-73,0)	70,0* (53,0-76,0)	1,2 (0,9-1,35)	57,0 (48,0-61,5)	72,5* (54,5-81,0)	1,15 (0,84-1,25)
TLR2, %	56,0 (45,0-75,0)	85,5 * (81,0-87,5)	1,12 (1,1-1,2)	39,5 (36,5-74,5)	79,0 * ** (62,5-83,0)	1,35 (1,1-1,98)

Примечание: относительное содержание клеток с экспрессией различных маркеров (%) исследовали в культурах ИФН-ДК и ИЛ4-ДК, генерированных от одних и тех же доноров (n=12) в отсутствие («контроль», контрДК) или в присутствии («дексаметазон», ДКдекс) дексаметазона (10^{-6} М). ИВ-индекс влияния - соотношение показателей в культурах ДК-декс/контрДК * $p_W < 0,05$ - значимость различий показателей в культурах контрДК и ДКдекс по W-критерию Вилкоксона для парных выборок. ** $p_U < 0,05$ – значимость различий в культурах ИФН-ДК и ИЛ4-ДК по U-критерию Манна-Уитни.

Генерируемые в присутствии дексаметазона ИФН-ДК (ИФН-ДКдекс) отличались от контрольных ИФН-ДК (контрИФН-ДК) значимо более высоким содержанием $CD14^+$ клеток и меньшей долей $CD83^+$ и $CD86^+$ клеток, что свидетельствовало о подавлении дифференцировки и созревания ИФН-ДК под действием дексаметазона. Экспрессия HLA-DR значимо не менялась. В то же время ИФН-ДКдекс характеризовались повышенной экспрессией ко-ингибиторных молекул PD-L1 и молекулы TLR2, ассоциированной с толерогенной активностью ДК. Аналогичные изменения наблюдались в культурах ИЛ4-ДК, генерируемых в присутствии дексаметазона (ИЛ4-ДКдекс). Генерация ИЛ4-ДК в присутствии дексаметазона сопровождалась значимым увеличением относительного содержания $CD14^+$ клеток, снижением доли $CD83^+$ и $CD86^+$ клеток и возрастанием доли ДК, несущих PD-L1 и TLR2. При этом следует отметить, что культуры ИФН-ДКдекс содержали значимо большее количество $TLR2^+$ ($p=0,012$) и $CD14^+$ клеток ($p=0,015$), чем культуры ИЛ4-ДКдекс.

Таким образом, модифицированные дексаметазоном ДК, генерируемые как в присутствии ИЛ-4, так и в присутствии IFN- α , обладают толерогенным фенотипом, о чем свидетельствует снижение числа клеток, несущих маркеры зрелости ($CD83$) и ко-стимуляторные молекулы ($CD86$), и увеличение числа клеток, несущих ко-ингибиторные молекулы (PD-L1 и TLR2). При этом ИФН-ДКдекс за счет значимо более высокого содержания клеток, экспрессирующих TLR2 и CD14, характеризуются более выраженным толерогенным фенотипом.

Добавление дексаметазона в культуры ИЛ4-ДК также приводило к значимому подавлению продукции TNF α , IL-6 и IL-10, при этом баланс продуцируемых цитокинов смещался в сторону Th2/противовоспалительных цитокинов. На это указывало снижение отношения TNF α /IL-10 - с 0,88 до 0,27 (pW=0,012).

Цитокины (пг/мл)	ИФН-ДК			ИЛ4-ДК		
	Контроль	Дексаме тазон	ИБ	Контроль	Дексаме тазон	ИБ
TNF α	406 (273-591)	189* (133-271)	0,51 (0,29-0,75)	458 (255-608)	118* # (76-129)	0,24 # (0,19-0,3)
IL-10	1652 (1508-1806)	1092 (952-1316)	0,63 (0,6-0,81)	489 (373-568)	430 # (287-459)	0,78 # (0,64-0,93)
IL-6	31307 (23988-37465)	15910* (14851-18491)	0,56 (0,48-0,63)	29165 (28464-32542)	11358* # (8596-12961)	0,34 # (0,29-0,42)
IL-8	23184 (19037-38061)	19773 (18041-21449)	0,81 (0,62-1,13)	20595 (16799-39265)	21288 (18613-41930)	1,05 (0,51-1,84)

Примечания: уровень цитокинов исследован с помощью мультиплексного анализа в супернатантах ИФН-ДК и ИЛ4-ДК (n=12), генерированных от одних и тех же доноров в отсутствие («Контроль».

контрДК) или в присутствии («Дексаметазон», ДКдекс) дексаметазона (10^{-6} М). ИВ - соотношение показателей в контрольных и дексаметазон-модифицированных культурах ДК. * $p_W < 0,05$ – различия между контрДК и ДКдекс по W-критерию Вилкоксона для парных выборок. # $p_U < 0,05$ – различия между ИФН-ДК и ИЛ4-ДК по U-критерию Манна-Уитни.

Характерно, что продукция IL-10 в культурах контрИФН-ДК была значимо выше, чем в культурах контрИЛ4-ДК (1092 против 489 пг/мл; $p_U = 0,0001$), и эти различия в секреции IL-10 сохранялись в культурах дексаметазон-модифицированных ДК (1092 vs 430 пг/мл, $p_U = 0,0036$). Кроме того различия в продукции IL-10 между дексаметазон-модифицированными ИФН-ДК и ИЛ4-ДК детерминировали меньшее отношение $TNF\alpha/IL-10$ в культурах ИФН-ДКдекс по сравнению с таковым в культурах ИЛ4-ДКдекс (0,18 против 0,27; $p_U = 0,018$).

Сравнительный анализ влияния дексаметазона на аллостимуляторную активность ИФН-ДК и ИЛ4-ДК здоровых доноров

Способность ДК стимулировать пролиферацию аллогенных Т-клеток в ответ на распознавание аллоантигенов является классической моделью антигенспецифического ответа *in vitro*. При этом низкая способность ДК индуцировать пролиферацию аллогенных Т-клеток доноров в алло-СКЛ согласно данным литературы является характерным витральным признаком толерогенной активности ИЛ4-ДК [123, 185]. Сравнение аллостимуляторной активности ИФН-ДК и ИЛ4-ДК (рисунок 3.2.1) показало, что указанные субпопуляции ДК одинаково эффективно индуцировали пролиферативный ответ МНК в алло-СКЛ. Генерация ДК в присутствии дексаметазона значимо снижала аллостимуляторную активность ДК. Характерно, что подавление аллостимуляторной активности ДК под действием дексаметазона в культурах ИФН-ДК было существенно более выраженным, чем в культурах ИЛ4-ДК.

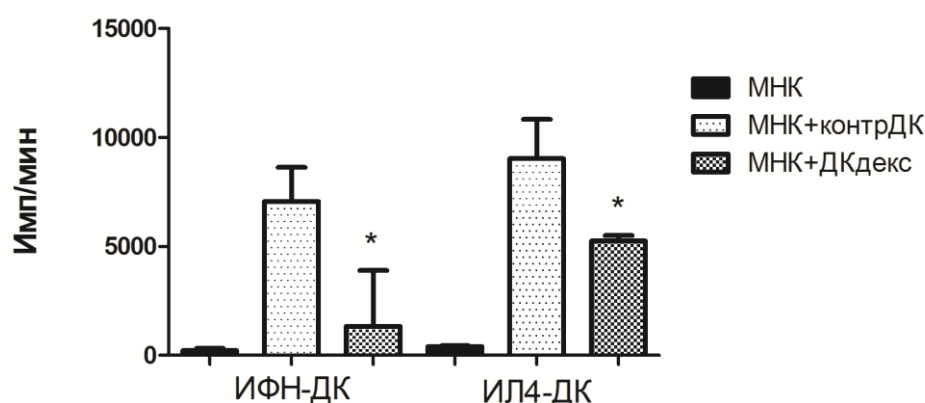


Рисунок 3.2.1. Аллостимуляторная активность ИФН-ДК и ИЛ4-ДК, генерированных в отсутствие (контрДК) и в присутствии дексаметазона (ДКдекс). Представлены данные (n=8) пролиферативной активности МНК, культивируемых в отсутствие ДК, а также в алло-СКЛ в присутствии интактных ИФН-ДК, генерированных в стандартных условиях (МНК+контрДК) или с дексаметазоном в дозе 10^{-6} М (МНК+ДКдекс). Данные представлены в виде медианы и верхней квантили. * $p < 0,01$ – значимость различий по сравнению с контрольными ДК.

Пролиферативный ответ в алло-СКЛ, индуцированной ИФН-ДКдекс, снижался на 80% по сравнению с таковым в культурах с контрольными ДК, в то время как обработка дексаметазоном ИЛ4-ДК ингибировала ответ в алло-СКЛ только на 36% ($p=0,016$). Соответственно, ИФН-ДКдекс обладали меньшей аллостимуляторной активностью, чем ИЛ4-ДКдекс (ИБ 7,0 против 9,6; $p=0,016$).

Ингибирующий эффект дексаметазона на способность ИФН-ДК и ИЛ4-ДК стимулировать продукцию цитокинов в культурах алло-СКЛ

В следующей серии экспериментов было проведено исследование влияния дексаметазона на способность ДК стимулировать Т-лимфоциты к продукции Th1/провоспалительных ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, $\text{IFN}\gamma$, IL-2), Th2/противовоспалительных и иммунорегуляторных (IL-4 , IL-5 , IL-6 , IL-13 , IL-10) цитокинов, а также ростовых факторов (G-CSF, G-CSF) и хемокинов (IL-8 , MCP-1, MIP-1 β). Для этого сравнили концентрацию указанных цитокинов в супернатантах 5-суточных культур алло-

СКЛ, индуцированных контрольными и дексаметазон-модифицированными ДК (таблица 3.2.3).

Таблица 3.2.3 - Влияние дексаметазона на способность ДК стимулировать продукцию цитокинов в культурах алло-СКЛ

Цито- кины	Продукция цитокинов (пг/мл)				
	0	ИФН-ДК		ИЛ4-ДК	
		Контроль	Дексаметазон	Контроль	Дексаметазон
IL-1 β	92 (65 – 113)	2289 (2195–3046) *	573 (388 – 853)*, **	762 (635 – 915)* #	157 (46–101)** #
TNF α	245 (107– 214)	768 (618 – 1390) *	306 (233 – 366)**	415 (341 – 499) #	92 (76–118)** #
IL-2	78 (57 – 127)	315 (297 – 370) *	210 (164 – 276)*, **	225 (199 – 258)* #	139 (123–164)** #
IFN γ	795 (545 –1515)	4759 (3601– 6946) *	2589 (1754 – 2930)*, **	17714 (4878–34466)*	1245 (1022–655)** #
IL-4	48 (33 – 63)	99 (94 – 122) *	91 (89 – 115)*	80 (76 – 81)#	56 (46–64)** #
IL-5	12 (6 – 18)	14 (14 – 16)	18 (10 – 35)	87 (55 – 130)* #	16 (10–27)**
IL-6	3234 (1793 – 4393)	31421 (22107–34367)*	12635 (11430–17892)*, **	27306 (23775–30822)*	9090 (6599–10008) *,** #
IL-13	95 (61 – 119)	156 (125 – 235) *	138 (111 – 200)*	252 (152 – 295)*	114 (102–159)**
IL-10	13 (7 – 30)	885 (815 – 1029)*	556 (469 – 659)*, **	208 (157 – 265)* #	155 (113–187)*#
G-CSF	328 (249 – 448)	9707 (9317 – 10965)*	13896 (12190–15193)*, **	8220 (5346–9507)* #	8945 (6417–12494)#
GM-CSF	121 (99 – 190)	766 (696 – 824)*	485 (460 – 557)*, **	579 (494 – 625)#	226 (160–332)** #
IL-8	26772 (24137– 33012)	37702 (26070 – 45241)	31694 (27999 – 43529)	38148 (29264 – 44539)	30641 (27056–36661)
MCP-1	11828 (11076 – 18029)	22217 (20040 – 29713)*	25292 (23396–27943)*	20997 (16820 – 26774)*	18731 (16404–21173)#
MIP-1 β	17659 (11231 – 19443)	63862 (58809–70930)*	64989 (53653–74312)*	35172 (26730–42078)* #	28905 (11417–30838)#
Примечания: аллогенные МНК культивировали в течение 5 суток в отсутствие (0) и присутствии ДК (ИФН-ДК или ИЛ4-ДК) генерированных от 12 доноров в отсутствие («Контроль») или в присутствии дексаметазона («Дексаметазон»). Концентрацию цитокинов в супернатантах алло-СКЛ оценивали методом мультиплексного анализа. *pW < 0,05 – различия с культурами МНК (0). **pW < 0.05 – различия между контрДК и ДКдекс. # pU< 0,01 – различия между контрИФН-ДК и контрИЛ4-ДК, а также ИФН-ДКдекс и ИЛ4-ДКдекс.					

Концентрация $IFN\gamma$, $TNF\alpha$ и $IL-1\beta$ в культурах аллогенных МНК, стимулированных ИФН-ДКдекс, была значимо ниже, чем в алло-СКЛ, индуцированной контрИФН-ДК. Медианные значения супрессии указанных цитокинов в культурах аллогенных МНК, стимулированных дексаметазон-модифицированными ИФН-ДК, составили для $IL-1\beta$ – 73%, $TNF\alpha$ – 70% и $IFN\gamma$ – 50%. Способность ИФН-ДК индуцировать продукцию $IL-6$ и $IL-10$ ингибировалась в меньшей степени – на 35% и 43%, соответственно. При этом дексаметазон не подавлял $Th2$ -стимуляторную активность ИФН-ДК, поскольку уровень продукции $IL-4$, $IL-5$ $IL-13$ в алло-СКЛ, стимулированной контрольными и дексаметазон-модифицированными ИФН-ДК, значимо не различался. Таким образом, ингибирующий эффект ИФН-ДКдекс был преимущественно направлен на подавление продукции Т-клетками $Th1$ /провоспалительных цитокинов. Действительно, отношения $TNF\alpha /IL-10$ и $IFN\gamma /IL-4$ в супернатантах алло-СКЛ, индуцированной ИФН-ДКдекс, были гораздо ниже по сравнению с таковыми в алло-СКЛ, активированной контрИФН-ДК (0,18 против 0,25; $p=0,0018$, и 17,1 против 34,5; $p=0,004$, соответственно). Обработка дексаметазоном также влияла на стимулирующий эффект ИФН-ДК в отношении ростовых факторов. Аллогенные МНК, стимулированные дексаметазон-модифицированными ИФН-ДК, продуцировали значимо меньшие концентрации GM-CSF (снижение на 32%), но более высокие уровни G-CSF (на 40%).

Обработанные дексаметазоном ИЛ4-ДК также подавляли продукцию $Th1$ /провоспалительных цитокинов в алло-СКЛ. Концентрация $IFN\gamma$ снижалась на 91%. Кроме того, отмечалось существенное снижение уровней продукции $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ и $IL-2$ (соответственно, на 75%, 87%, 41%). Важно отметить, что дексаметазон подавлял не только $Th1$ - но и $Th2$ -стимулирующую активность ИЛ4-ДК, на что указывало значимое снижение концентрации $IL-4$, $IL-5$, $IL-6$, $IL-10$ и $IL-13$ (соответственно на 31%, 77%, 68%, 31% и 46%). Кроме того, в культурах алло-СКЛ, индуцированной ИЛ4-ДКдекс, отмечалось снижение продукции GM-CSF (медиана супрессии – 58%).

Полученные данные означают, что ИФН-ДКдекс, так же, как и ИЛ4-ДКдекс, обладают толерогенными свойствами, существенно подавляя продукцию провоспалительных ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$) и Th1 ($\text{IFN}\gamma$, IL-2) цитокинов аллогенными МНК в СКЛ. Однако в отличие от ИЛ4-ДКдекс, которые ингибируют продукцию как Th1/провоспалительных, так и Th2/противовоспалительных цитокинов, ИФН-ДКдекс подавляли преимущественно Th1/провоспалительный ответ аллогенных МНК, смещая баланс в сторону Th2 ответа. Другая особенность ИФН-ДКдекс заключается в способности этих клеток усиливать продукцию G-CSF аллогенными МНК.

В целом, полученные данные демонстрируют, что толерогенные эффекты дексаметазона в культурах ИФН-ДК во многом схожи с таковыми в культурах ИЛ4-ДК. Так, общими проявлениями толерогенных свойств дексаметазон-модифицированных ИФН-ДК и ИЛ4-ДК являются уменьшение ДК, несущих маркеры зрелости (CD83) и ко-стимуляторные молекулы (CD86), и увеличение клеток с экспрессией ко-ингибиторных молекул (PD-L1 и TLR2). Как ИФН-ДКдекс, так и ИЛ4-ДКдекс характеризуются существенным снижением продукции цитокинов с Th1/провоспалительной активностью. Кроме того, обе субпопуляции дексаметазон-модифицированных ДК ингибируют пролиферацию и продукцию Th1/провоспалительных цитокинов, а также подавляют секрецию GM-CSF в культурах аллогенных МНК. При этом ИФН-ДКдекс имеют ряд особенностей, в частности, отличаются от ИЛ4-ДКдекс более высоким содержанием CD14^+ и TLR2^+ клеток, более высоким уровнем продукции IL-10 и меньшим индексом отношения продуцируемых $\text{TNF}\alpha/\text{IL-10}$, а также более выраженным ингибирующим действием на пролиферацию Т-клеток в ответ на стимуляцию аллоантигенами в алло-СКЛ. В отличие от ИЛ4-ДКдекс, подавляющих в алло-СКЛ продукцию Th2 цитокинов, ИФН-ДКдекс не оказывают ингибирующего действия на продукцию IL-4 , IL-5 и IL-13 , и в меньшей степени подавляют продукцию IL-6 , обуславливая смещение цитокинового баланса в сторону Th2 ответа. Наконец, ИФН-ДКдекс усиливают в культурах аллогенных

МНК продукцию G-CSF, также способного индуцировать толерогенные свойства ДК и подавлять функции Т-клеток. Таким образом, дексаметазон-модифицированные ИФН-ДК по ряду параметров обладают более выраженным толерогенным потенциалом, что обосновывает возможность их использования в качестве новой клеточной платформы для получения толерогенных ДК-вакцин.

Глава 3.3. Характеристика интерферон- α -индуцированных дендритных клеток больных ревматоидным артритом и исследование влияния дексаметазона на созревание и функции интерферон- α -индуцированных дендритных клеток пациентов

Полученные в предыдущих разделах данные показали, что ИФН-ДК доноров под действием дексаметазона приобретают толерогенные свойства, сравнимые, а по ряду параметров превышающие таковые у дексаметазон-модифицированных ИЛ4-ДК. Эти результаты являются обоснованием для использования ИФН-ДКдекс в качестве новой платформы для получения тДК и применения их в лечении аутоиммунных заболеваний и, в частности, РА. Тем не менее, ИФН-ДК у больных РА и их чувствительность к дексаметазону до настоящего времени не охарактеризованы. Поэтому следующий раздел работы был посвящен изучению фенотипических и функциональных свойств ИФН-ДК у больных РА и оценке влияния дексаметазона на дифференцировку/созревание и функциональную активность ИФН-ДК пациентов.

Сравнительное исследование фенотипа ИФН-ДК, полученных от больных РА и здоровых доноров, показало (таблица 3.3.1), что у доноров активированные LPS ИФН-ДК характеризуются промежуточной степенью зрелости. Так, наряду с достаточно высокой экспрессией CD86 и HLA-DR антигенов, а также наличием на части ИФН-ДК CD83, значительная часть ИФН-ДК сохраняет экспрессию CD14. ИФН-ДК больных РА отличались еще более высокой экспрессией CD14 и меньшей экспрессией CD83, что проявлялось значимым увеличением доли CD14⁺ клеток и средней интенсивности флуоресценции CD14 (СИФ) и значимым снижением доли CD83⁺ клеток. Одновременная оценка экспрессии CD14 и CD83 молекул показала, что у доноров преобладающая часть CD14⁺ клеток не несет CD83 так же, как и основная часть CD83⁺ клеток не экспрессирует CD14.

Таблица 3.3.1 - Сравнительная оценка экспрессии поверхностных маркеров ИФН-ДК больных РА и здоровых доноров

Маркер	Количество клеток (%)		pU	СИФ (ед. фл.)		pU
	Доноры (n=13-20)	Больные РА (n=13-24)		Доноры (n=13)	Больные РА (n=7-10)	
CD14 ⁺	34 (15-51)	65 (44-83)	0,002	52 (45-66)	170 (123-178)	0,01
CD83 ⁺	16 (12-20)	8 (6-23)	0,037	52 (23-93)	46 (32-59)	0,49
CD14 ⁺ CD83 ⁻	21 (9-43)	70 (49-79)	0,01			
CD14 ⁺ CD83 ⁺	5,5 (3-11)	11 (6-17)	0,1			
CD14 ⁻ CD83 ⁺	9,5 (8-17)	1,0 (0,35-2)	0,003			
CD 86 ⁺	60 (16-74)	40 (33-56)	0,2	86 (67-145)	97 (68-158)	0,79
HLA-DR ⁺	77 (72-91)	80 (58-92)	0,8	135 (61-511)	129 (62-334)	0,9
TLR2 ⁺	35 (12-51)	51 (26-73)	0,2	71 (36-106)	60 (47-66)	0,71
PD-L1 ⁺	57 (39-64)	79 (72-88)	0,01	109 (41-127)	107 (46-516)	0,72
Примечания: представлены данные относительного содержания клеток и средней интенсивности флюоресценции (СИФ) поверхностных маркеров. pU –значимость различий по U-критерию Манна-Уитни.						

Соответственно, ДК с ко-экспрессией CD14 и CD83 составляют минорную популяцию (медиана 5,5%). У больных РА численность этой субпопуляции не меняется, а изменения экспрессии CD14 и CD83 связаны с возрастанием субпопуляции CD14⁺CD83⁻ клеток и уменьшением CD14⁻CD83⁺ клеток, что свидетельствует о нарушении дифференцировки/созревания ДК. ИФН-ДК больных отличались также повышенным содержанием клеток, несущих молекулы TLR2 и PD-L1, ассоциированные с толерогенной активностью. Причем в отношении PD-L1⁺ ДК изменения были статистически значимыми. Вместе с тем,

по экспрессии ко-стимуляторных (CD86) и антигенпрезентирующих (HLA-DR) молекул ДК больных были схожи с таковыми у доноров.

Чтобы выяснить, сказывались ли изменения фенотипа на функциях ДК, далее исследовали цитокин-секреторную активность ИФН-ДК. Оценка продукции про- и противовоспалительных цитокинов не выявила различий в концентрациях $\text{TNF}\alpha$, IL-6 и IL-10, а также соотношениях $\text{TNF}\alpha/\text{IL-10}$ в супернатантах ИФН-ДК больных РА и доноров (рисунок 3.3.1).

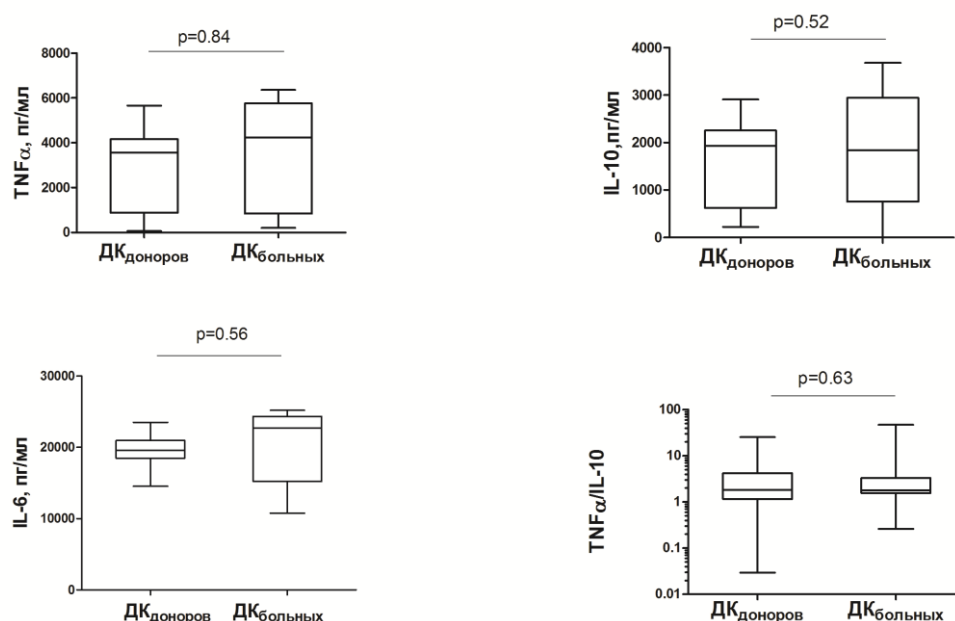


Рисунок 3.3.1. Сравнительная оценка продукции цитокинов ИФН-ДК больных РА (n=13) и здоровых доноров (n=9). Представлены данные продукции цитокинов (пг/мл), а также соотношения $\text{TNF}\alpha/\text{IL-10}$ (расч.ед) в виде медиан, интерквартильных диапазонов, диапазонов минимальных и максимальных значений. Значимость различий – по U-критерию Манна-Уитни.

При этом следует отметить, что больные РА были сопоставимы с донорами по количеству генерируемых ДК: выход ДК из 1 млн МНК составил для здоровых доноров $0,08 \times 10^6$, для больных РА - $0,10 \times 10^6$ ($pU=0,3$).

Сравнительный анализ аллостимуляторной активности ИФН-ДК больных и доноров проводили в алло-СКЛ с использованием в качестве отвечающих клеток аллогенные МНК доноров. Как следует из данных рисунка 3.3.2, уровень пролиферативного ответа в алло-СКЛ, индуцированной ИФН-ДК больных, был

значимо ниже, чем ответ, индуцированный ИФН-ДК доноров ($p=0,046$). При этом различия индексов влияния ИФН-ДК в алло-СКЛ, стимулированной ИФН-ДК пациентов и доноров, носили характер тренда ($pU=0,3$). При анализе индивидуальных данных обращала на себя внимание выраженная гетерогенность больных РА по аллостимуляторной активности ДК. Так, в 44% случаев аллостимуляторная активность ИФН-ДК была снижена (пролиферативный ответ Т-клеток в алло-СКЛ выходил за границу нормативного квартильного диапазона).

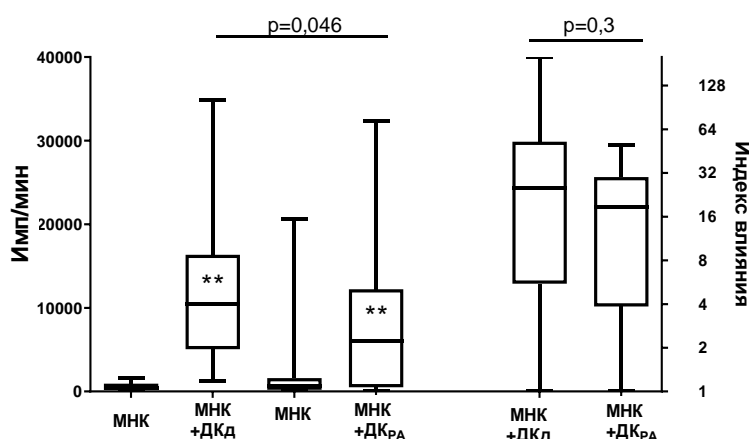


Рисунок 3.3.2. Аллостимуляторная активность ИФН-ДК больных РА ($n=18$) в сравнении с таковой у доноров ($n=20$). Представлены данные пролиферации (имп/мин) аллогенных МНК доноров в отсутствие, а также в присутствии ИФН-ДК больных РА («МНК+ДКРА») и здоровых доноров («МНК+ДКд») в виде медиан, интерквартильных диапазонов, диапазонов минимальных и максимальных значений. В каждом случае ДК больных РА тестировали против двух доноров МНК. По правой оси ординат представлены индексы влияния (расч. ед.) ИФН-ДК в алло-СКЛ. ** $p < 0,01$ – значимость различий с уровнем пролиферации не стимулированных МНК (в отсутствие ИФН-ДК) по U–критерию Манна-Уитни.

Чтобы выяснить, отличаются ли ИФН-ДК больных РА по способности активировать Th1 и Th2 клетки, было исследовано содержание Th1 (IFN γ) и Th2 (IL-6) цитокинов в супернатантах 5-суточной алло-СКЛ, индуцированной ДК больных РА, в сравнении с ДК доноров (таблица 3.3.2).

Таблица 3.3.2 - Способность ИФН-ДК больных РА активировать продукцию Th1 и Th2 цитокинов в алло-СКЛ

Цитокин	Продукция цитокинов в алло-СКЛ (пг/мл)		p _U	Индекс влияния (расч. ед)		p _U
	ИФН-ДК доноров	ИФН-ДК больных РА		ИФН-ДК доноров	ИФН-ДК Больных РА	
IFN γ	1280 (710-1500)	960 (590-1740)	0,87	134 (75-158)	101 (62-182)	0,45
IL-6	9920 (9280–10690)	8560 (6780-9280)	0,053	42 (39-46)	37 (29-40)	0,62
Примечания: представлены концентрации цитокинов в супернатантах алло-СКЛ, индуцированных ИФН-ДК больных РА (n=12) и здоровых доноров (n=13). p _U – значимость различий по U-критерию Манна-Уитни.						

ИФН-ДК доноров эффективно стимулировали продукцию как Th1, так и Th2 цитокинов, что проявлялось возрастанием уровня IFN γ (в среднем с 10 до 1280 пг/мл, p_U <0,001) и IL-6 (в среднем, с 230 до 9920 пг/мл, p_U <0,001), по сравнению с культурами МНК в отсутствие ДК. Медианные значения индексов влияния ДК для IFN γ и IL-6 составляли соответственно 134 и 42 расч.ед., свидетельствуя о более выраженной Th1-стимулирующей активности ИФН-ДК здоровых доноров (p_W=0,017). ИФН-ДК больных РА также эффективно стимулировали секрецию Th1/Th2 цитокинов в алло-СКЛ, поскольку индексы влияния ДК больных на продукцию IFN γ и IL-6 значимо не отличались от донорских значений. Тем не менее, средний уровень определяемых цитокинов был несколько ниже: 960 против 1280 пг/мл для IFN γ (\downarrow на 25%, p_U= 0,87) и 8560 против 9920 пг/мл для IL-6 (\downarrow на 14%, p_U= 0,053). Но поскольку индекс влияния ДК больных РА на продукцию IFN γ почти в 3 раза превышал таковой для IL-6 (101 против 37 расч.ед., p_W=0,015), можно заключить, что ИФН-ДК у больных РА, так же как и у здоровых доноров, характеризовались преобладающей Th1-стимулирующей активностью.

Далее была исследована чувствительность ДК больных РА к ингибирующему действию дексаметазона (таблица 3.3.3).

Таблица 3.3.3 – Влияние дексаметазона на фенотип и функции ИФН-ДК больных РА

Параметр	ИФН-ДК больных РА						pW
	контрДК			ДКдекс			
	Me	LQ – UQ	n	Me	LQ – UQ	n	
Фенотип (%)							
CD14 ⁺	65	44 – 83	24	81	62 – 92	24	0,03
CD83 ⁺	8,5	6 – 23	13	7,9	4 – 18	13	0,02
CD86 ⁺	40	33 – 56	13	36	16 – 52	13	0,1
HLA-DR ⁺	80	58 – 92	22	88	63-92	22	0,6
TLR2 ⁺	51	26 – 73	13	75	64 – 87	13	0,08
PD-L1 ⁺	79	72 – 88	17	71	56 – 83	19	0,13
Продукция цитокинов (пг/мл)							
TNFα	4230	850 – 5550	13	900	170 – 1810	13	0,001
IL-6	22800	16960–24660	11	18220	9900–20480	11	0,005
IL-10	1992	1110 – 3174	11	1886	1596-2724	11	0,3
TNFα/IL-10	1,8	1,57 – 3,25	10	0,59	0,17–1,14	10	0,005
Стимуляторная активность в алло-СКЛ							
Пролиферация (имп/мин)	7980	4204 -13205	22	2005	809-9753	18	0,0002
ИБ (расч.ед.)	23,3	6,8 – 43	22	9,7	2,2 – 23	21	0,0003
Th1/Th2–стимулирующая активность в алло-СКЛ							
IFNγ (пг/мл)	960	590 –1740	12	60	30 – 270	12	0,001
ИБ (расч. ед.)	101	62–182	12	6,0	3,4 – 28	12	0,001
IL-6 (пг/мл)	8560	6780– 9280	12	7710	6260 – 9610	12	0,31
ИБ (расч. ед.)	37	29 – 40	12	33	27 – 41	12	0,31
IL-6/IFNγ (расч.ед.)	7,9	2,5 – 15	12	93	28 – 275	12	0,023
Примечание: p _W – значимость различий по W-критерию Вилкоксона.							

Генерация ИФН-ДК больных в присутствии дексаметазона сопровождалась значимым снижением относительного содержания CD83⁺ клеток и трендом к снижению доли CD86⁺ клеток (pW=0,1). Кроме того, отмечалось значимое возрастание CD14⁺ и выраженный тренд в отношении TLR2⁺ клеток (pW=0.08). Экспрессия PD-L1 и HLA-DR молекул под действием дексаметазона не менялась.

Дексаметазон также значительно подавлял цитокин-секреторную и аллостимуляторную активность ИФН-ДК больных РА. Так, под влиянием дексаметазона способность ДК продуцировать TNFα снижалась в 5 раз (с 4230 до

900 пг/мл, $pW=0,001$), а IL-6 - в 1,3 раза (с 22800 до 18220 пг/мл, $pW=0,005$). В то же время, присутствие в культурах ИФН-ДК больных дексаметазона не оказывало значимого эффекта на продукцию IL-10. В результате соотношение $TNF\alpha/IL-10$ в культурах ДК больных снижалось в 3 раза (с 1,8 до 0,59 расч.ед.), свидетельствуя о смещении баланса в сторону более выраженной продукции ИФН-ДКдекс противовоспалительных цитокинов.

Генерация ИФН-ДК больных в присутствии дексаметазона сопровождалась подавлением их аллостимуляторной активности, что проявлялось 4-кратным снижением пролиферативного ответа Т-клеток в алло-СКЛ в присутствии ИФН-ДКдекс по сравнению с контрИФН-ДК. Кроме того, корреляционный анализ выявил наличие отрицательной взаимосвязи между способностью ДКдекс стимулировать пролиферацию аллогенных Т-клеток и экспрессией TLR2 ($R_s=-0,7$, $p=0.01$, $n=11$).

Наконец, обработка ИФН-ДК больных РА дексаметазоном приводила к выраженному угнетению Th1-стимулирующей активности в алло-СКЛ. Так, концентрация IFN γ и ИВ ДКдекс на секрецию IFN γ в культурах МНК, стимулированных ДКдекс, были в 16 раз ниже, чем в культурах с контрДК. В то же время, обработка дексаметазоном не влияла на Th2-стимулирующую активность ДК больных, поскольку концентрация IL-6 в культурах МНК, стимулированных ДКдекс и контрДК, значимо не различалась. Соответственно, соотношение IL-6/IFN γ при культивировании МНК с ИФН-ДКдекс было более чем в 10 раз выше, чем в культурах с контрДК. Таким образом, ИФН-ДК больных изменяли баланс продуцируемых Т-клетками цитокинов в сторону Th2 ответа, главным образом, за счет угнетения активности Th1-клеток, а не вследствие активации Th2-клеток.

Одними из важных параметров при исследовании и характеристике тДК является их стабильность. Для изучения стабильности ДКдекс, т.е. способности не отвечать активацией на провоспалительные стимулы и сохранять толерогенный фенотип, модифицированные дексаметазоном ИФН-ДК после

отмывки подвергали последующему дополнительному культивированию в течение 24 часов в отсутствие (ДКдекс0) и присутствии LPS (ДКдексLPS), после чего сравнивали аллостимуляторную активность прекультивированных ИФН-ДКдекс (рисунок 3.3.3).

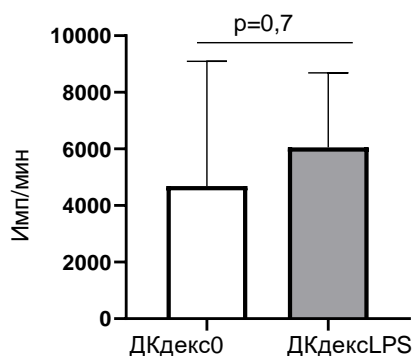


Рисунок 3.3.3. Аллостимуляторная активность ИФН-ДКдекс больных РА (n=6) после дополнительной стимуляции LPS. Представлены данные пролиферации (имп/мин) аллогенных МНК доноров в присутствии ДКдекс без дополнительной стимуляции LPS («ДКдекс0») и после стимуляции LPS («ДКдексLPS») в течение 24 ч. в виде медиан и верхних квартилей. Значимость различий – по W-критерию Вилкоксона для парных выборок.

Как видно интенсивность ответа аллогенных МНК при стимуляции ДКдекс пациентов, преинкубированных в отсутствие стимулов и присутствии LPS, значимо не различалась: 4692 (3766-7897) и 6053 (4207-8178) имп/мин, соответственно; $p=0,7$. Таким образом, стимуляция LPS ДКдекс больных не усиливала аллостимуляторной активности ДК, что свидетельствовало об их стабильности.

Чтобы проанализировать, с какими молекулами была ассоциирована толерогенная активность ДКдекс у больных РА, был проведен корреляционный анализ между аллостимуляторной активностью ДК и экспрессией ими различных молекул. ИВ_{ДК} в алло-СКЛ обратно коррелировал с количеством TLR2⁺ клеток ($R_s=-0,7$; $p=0,01$, $n=12$). С этой точки зрения сниженная аллостимуляторная активность ИФН-ДК у части больных может объясняться возрастанием доли TLR2⁺ клеток.

Также в отдельной серии экспериментов было исследовано внутриклеточное содержание фермента индолеамин-2,3-диоксигеназы (IDO) в ДК больных РА, функцию которой связывают с толерогенными свойствами ДК (рисунок 3.3.4).

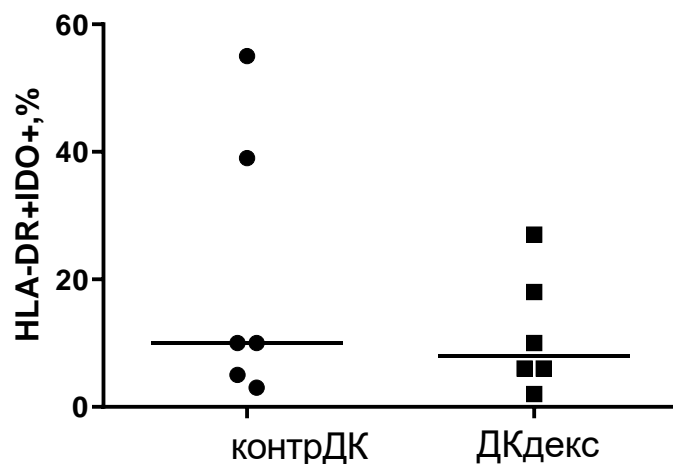


Рисунок 3.3.4. Внутриклеточное содержание IDO в культурах контрольных и обработанных дексаметазоном ДК. Представлены данные в виде индивидуальных значений HLA-DR⁺IDO⁺ клеток в культурах контрольных («контрДК») и обработанных дексаметазоном ДК («ДКдекс»), n=6.

Несмотря на то, что IDO рассматривается в качестве важного медиатора толерогенной активности ДК, созревание ИЛ4-ДК *in vitro* сопровождается возрастанием экспрессии IDO [22]. Учитывая при этом, что дексаметазон блокирует созревание ДК, представлялось, что генерация ДК в присутствии дексаметазона не будет сопровождаться усилением экспрессии IDO. Действительно, как видно из данных рисунка 3.3.4, в культурах контрольных ДК выявлялись ДК с внутриклеточным содержанием IDO. Однако различий в относительном содержании IDO⁺ ДК между контрольными и дексаметазон-модифицированными ДК не отмечалось. Т.е., генерация ИФН-ДК в присутствии дексаметазона не сопровождалась увеличением IDO⁺ ДК.

В заключение был проведен сравнительный анализ чувствительности ИФН-ДК больных РА и доноров к толерогенному действию дексаметазона (таблица 3.3.4).

Таблица 3.3.4 - Сравнительная чувствительность ИФН-ДК пациентов и доноров к толерогенному действию дексаметазона

Параметр	КонтрДК больных РА (1)	ДКдекс больных РА (2)	КонтрДК доноров (3)	ДКдекс доноров (4)
Продукция цитокинов				
TNFα (пг/мл)	4230 (850-5550)	900 (170-1810)	3660 (1495-4365)	510 (230-2110)
	P ₁₋₂ =0,001, n=13		P ₃₋₄ =0,049; n=9	
% супрессии*	71 (44-81)		50 (0-83)	
IL-10 (пг/мл)	1992 (1110-3174)	1886 (1596-2724)	1834 (666-2224)	1020 (750-1538)
	P ¹⁻² = 0,3, n=11		P ₃₋₄ =0,028; n=8	
% супрессии*	14 (1-19)		26 (15-34)	
индекс TNFα/IL-10	1,8 (1.57-3,25)	0,59 (0,17-1,14)	2,14 (1,1-5,5)	0,41 (0,22-2,8)
	P ₁₋₂ =0,005, n=10		P ₃₋₄ =0,023; n=8	
Ответ в СКЛ (имп/мин)	7980 (4204-13205)	2005 (809-9753)	10528 (5489-16006)	4540 (1954-6885)
	P ₁₋₂ =0,0002, n=18		P ₃₋₄ =0,00048; n=21	
% супрессии	50 (30-72)		64 (54-70)	
Примечания: продукцию цитокинов и аллостимуляторную активность оценивали для ДК, полученных от пациентов с РА, и здоровых доноров. *Супрессорный эффект дексаметазона на продукцию цитокинов (% супрессии) рассчитывали по формуле (1 - продукция цитокинов в культурах ДКдекс/продукция цитокинов в культурах контрДК) × 100%. Супрессорный эффект дексаметазона на аллостимуляторную активность ДК (% супрессии) рассчитывали по формуле (1- ответ в СКЛ, индуцированный ДКдекс / ответ в СКЛ, индуцированный контрДК) × 100% .P - значимость различий по критерию Вилкоксона для парных выборок.				

Ингибирующее действие дексаметазона на аллостимуляторную активность ИФН-ДК больных и доноров проявлялось в одинаковой степени. В то же время, подавление продукции TNF α в культурах ИФН-ДК больных РА в присутствии дексаметазона было более выраженным, чем в культурах ИФН-ДК доноров (медиана супрессии – 71% против 50%). Вместе с тем, умеренный супрессорный эффект дексаметазона на продукцию IL-10, выявляемый в культурах ИФН-ДК доноров, практически исчезал в культурах ИФН-ДК больных. В результате ИФН-ДКдекс больных РА отличались значимо более высокой продукцией IL-10 по сравнению с таковыми у доноров (1886 пг/мл против 1020 пг/мл у доноров, pU=0,02). Возможно, это было связано с более выраженным ингибирующим

эффектом дексаметазона на созревание ДК больных. Так, дексаметазон-модифицированные ИФН-ДК больных РА отличались тенденцией к более высокому содержанию $CD14^+$ клеток (81% против 57% у доноров, $pU=0,0007$). Таким образом, в целом, ИФН-ДК-больных РА были более чувствительны к толерогенному эффекту дексаметазона.

Суммируя полученные данные, можно сделать заключение об изменении ряда фенотипических и функциональных параметров ИФН-ДК у больных РА по сравнению с ИФН-ДК доноров и выраженной гетерогенности больных в отношении свойств генерируемых ИФН-ДК. В целом по группе больных, ИФН-ДК пациентов отличаются от таковых у доноров более высоким содержанием $CD14^+CD83^-$ и меньшим количеством $CD14^-CD83^+$ клеток, что указывает на задержку созревания ДК. Кроме того, для ИФН-ДК больных характерно более высокое содержание ДК, экспрессирующих ко-ингибиторную молекулу PD-L1, что в совокупности с меньшей аллостимуляторной активностью свидетельствует о проявлениях толерогенного фенотипа ИФН-ДК больных, возможно, обусловленных особенностями проводимой терапии. При этом анализ индивидуальных показателей аллостимуляторной активности ИФН-ДК, как интегрального маркера функциональной активности ДК, демонстрирует, что почти у половины пациентов отмечается снижение аллостимуляторной активности. Наличие толерогенных свойств ДК у значительной части пациентов позволяет полагать, что это может быть результатом проводимой терапии и свидетельствовать о том, что ДК могут являться мишенью используемых в лечении препаратов. Вторым существенным моментом является то, что ИФН-ДК больных чувствительны к толерогенному действию дексаметазона. Это подтверждается признаками задержки дифференцировки/созревания ИФН-ДК, генерируемых в присутствии дексаметазона (снижение доли $CD83^+$ ДК и выраженная тенденция к снижению $CD86^+$ ДК), а также существенным уменьшением продукции $TNF\alpha$ и способности ДК стимулировать пролиферацию Т-клеток и продукцию Th1 ($IFN\gamma$) цитокинов в алло-СКЛ. При этом дексаметазон-

модифицированные ИФН-ДК больных являются стабильными и сохраняют признаки толерогенности, в частности, сниженную аллостимуляторную активность, в условиях рестимуляции провоспалительными стимулами (LPS). Важно отметить, что снижение аллостимуляторной активности ИФН-ДК коррелирует с возрастанием $TLR2^+$ ДК, но не связано с повышением IDO^+ ДК. Наконец, сравнительный анализ влияния дексаметазона на ДК больных и доноров свидетельствует о том, что ИФН-ДК-больных РА более чувствительны к толерогенному эффекту глюкокортикоидов. Это подтверждается более выраженным ингибирующим действием дексаметазона на созревание ИФН-ДК больных и продукцию $TNF\alpha$ и меньшим (практически отсутствием) супрессорного эффекта на продукцию IL-10.

Глава 3.4. Исследование влияния и механизмов толерогенного действия дексаметазон-модифицированных интерферон- α -индуцированных ДК больных ревматоидным артритом на функции аутологичных Т-клеток в культуре *in vitro*

Полученные в предыдущей главе данные показали, что ИФН-ДК больных РА, аналогично таковым у доноров, приобретают под действием дексаметазона толерогенные свойства, в частности, характеризуются низкой аллостимуляторной активностью, что коррелирует с незрелым фенотипом и повышенной экспрессией TLR2 на ИФН-ДКдекс. Следует отметить, что функции ИФН-ДК больных оценивали в культурах СКЛ с использованием в качестве отвечающих клеток МНК доноров (а не больных РА), учитывая возможные нарушения Т-клеток больных вследствие аутоиммунной патологии и/или проводимого лечения. Поэтому вопрос, о том, будут ли ИФН-ДКдекс больных обладать толерогенным эффектом против аутологичных Т-клеток пациентов, остается открытым. Соответственно следующий этап был посвящен исследованию влияния дексаметазон-модифицированных ДК больных на функции аутологичных Т-лимфоцитов в культурах ауто-СКЛ. Второй важной задачей данного раздела являлось выяснение механизмов толерогенного влияния ИФН-ДКдекс больных на функции аутологичных Т-клеток. Механизмы подавления Т-клеточных функций под действием дексаметазон-модифицированных ИЛ4-ДК достаточно хорошо исследованы [19, 138, 197, 210]. Однако данные подобного рода в отношении ИФН-ДКдекс, тем более в культурах аутологичных Т-клеток больных РА, до настоящего времени отсутствуют. Ауто-СКЛ представляет хорошо известный витальный феномен, отражающий пролиферацию Т-лимфоцитов в ответ на стимуляцию аутологичными не-Т-клетками, среди которых наиболее эффективными стимуляторами являются ДК [86, 199]. Тот факт, что пролиферации подвержены Т-клетки с низкоаффинными Т-клеточными рецепторами, распознающими собственные антигены МНС в комплексе с

аутологичными пептидами или модифицированными нуклеогистонами апоптотических клеток [4, 184], позволяет рассматривать ауто-СКЛ в качестве реакции, отражающей гомеостатическую пролиферацию Т-лимфоцитов *in vivo* [184]. Данная реакция направлена на поддержание пула наивных Т-клеток. Однако, поскольку пролиферирующие Т-клетки распознают собственные антигены, то их накопление ослабляет поддержание Т-клеточной толерантности [66]. Учитывая также, что $CD4^+$ Т-клетки больных РА подвержены гомеостатической пролиферации, [203], полученные нами данные позволяют выяснить, способны ли ДК больных ограничивать *in vitro* репликацию аутореактивных Т-лимфоцитов, причастных к гомеостатической пролиферации.

Для оценки влияния ИФН-ДКдекс больных на пролиферацию аутологичных Т-клеток, был проведен сравнительный анализ пролиферативного ответа в ауто-СКЛ, индуцированного контрольными и дексаметазон-модифицированными ИФН-ДК, которые были получены от 17 пациентов с РА.

Таблица 3.4.1 - Влияние дексаметазон-модифицированных ИФН-ДК больных РА на пролиферативный ответ Т-клеток в ауто-СКЛ

Параметры	МНК	Ауто-СКЛ		pW
		+ контрДК	+ ДКдекс	
Пролиферация (имп/мин)	2340 (400-3380)	10550 (7250-15900)	4690 (1070-8350)	0,005
Индекс влияния ДК	—	6,0 (4,3-18,6)	1,9 (1,4-4,2)	0,005
Примечания: ИФН-ДК больных РА (n=17) были генерированы в отсутствие («контрДК») или в присутствии дексаметазона («ДКдекс»). ДК культивировали с аутологичными МНК в соотношении 1:10. Пролиферацию оценивали на 5 сут. pW – значимость различий эффекта дексаметазон-модифицированных ДК по сравнению с контрольными ДК по W-критерию Вилкоксона для парных выборок.				

Из данных таблицы 3.4.1 видно, что уровень пролиферации в культурах аутологичных МНК, индуцированных ДКдекс, был значительно ниже, чем при стимуляции контрольными ДК. Индексы влияния ДК снижались в среднем с 6,0 до 1,9 расч.ед. (pW = 0,005;), то есть практически в 3 раза после модификации

ИФН-ДК дексаметазоном. Таким образом, ДКдекс у больных РА вызывали состояние гипореактивности Т-клеток в культурах аутологичных МНК (отвечающих в ауто-СКЛ).

Поскольку снижение реактивности Т-клеток в ауто-СКЛ в присутствии ДКдекс могло быть обусловлено индукцией Т-клеточной анергии, далее был исследован клеточный цикл $CD4^+$ Т-лимфоцитов, активированных контрольными и дексаметазон-модифицированными ИФН-ДК (таблица 3.4.2).

Таблица 3.4.2 - Влияние дексаметазон-модифицированных ИФН-ДК больных РА на пролиферативный ответ $CD4^+$ Т-клеток в ауто-СКЛ

Параметр	Ауто-СКЛ		pW
	МНК+ контрДК	МНК+ ДКдекс	
Клеточный цикл, %			
$CD4^+$ Т-клетки в G0/G1	64 (56-87)	82 (82-86)	0,1
$CD4^+$ Т-клетки в S/G2+M	22,5 (6-30)	6,5 (4-8)	0,028
Соотношение клеток в G0/G1 и S/G2/M	2,5 (2,2-14,5)	13,7 (10,3-20,5)	0,028
Примечания: ИФН-ДК больных РА (n=6) были генерированы в отсутствие (контрДК) или в присутствии дексаметазона (ДКдекс). ДК культивировали с аутологичными МНК в соотношении 1:10. Показатели клеточного цикла оценивали через 48 ч. p _W – значимость различий эффекта дексаметазон-модифицированных ДК по сравнению с контрольными ДК по W-критерию Вилкоксона для парных выборок.			

Доля пролиферирующих $CD4^+$ Т-клеток в S/G2+M фазах клеточного цикла в культурах, стимулированных ДКдекс, была значимо ниже, а содержание покоящихся $CD4^+$ Т-клеток в G0/G1 фазах клеточного цикла выше, чем при стимуляции контрольными ДК. Как следствие, соотношение покоящихся/пролиферирующих $CD4^+$ Т-клеток в ауто-СКЛ в присутствии ДКдекс более чем в 5 раз превышало таковое в присутствии контрольных ДК (13,7 против 2,5 расч.ед., соответственно; p_W = 0,028).

Известно, что Т-клетки в состоянии анергии характеризуются не только низкой пролиферативной активностью, но и угнетением цитокин-секреторной функции. Чтобы выяснить, какие субпопуляции $CD4^+$ Т-лимфоцитов подвержены анергии, оценили содержание Th1($IFN\gamma$), Th17 (IL-17) и Th2 (IL-4, IL-13) цитокинов в 5-суточных супернатантах ауто-СКЛ.

Таблица 3.4.3 - Влияние дексаметазон-модифицированных ИФН-ДК больных РА на продукцию Th1 ($IFN\gamma$), Th17 (IL-17) и Th2 (IL-4, IL-13) цитокинов в ауто-СКЛ

Цитокины (пг/мл)	Ауто-СКЛ		pW	Супрессия (%)
	+ контрДК	+ ДКдекс		
$IFN\gamma$	1120 (834 – 8620)	660 (330 – 900)	0,017	85 (40 – 96)
IL-17	460 (355 – 610)	150 (140 – 260)	0,027	60 (57 – 72)
IL-4	49 (39 – 54)	37 (29 – 45)	0,04	42 (26 – 67)
IL-13	78 (62 – 199)	52 (44 – 58)	0,011	14 (11 – 39)
Примечания: ИФН-ДК больных РА (n=8), генерированные в отсутствие (контрДК) или в присутствии дексаметазона (ДКдекс), культивировали с аутологичными МНК в соотношении 1:10. Продукцию цитокинов оценивали на 5 сут. pW – значимость различий эффекта дексаметазон-модифицированных ДК по сравнению с контрольными ДК по W-критерию Вилкоксона для парных выборок. Процент супрессии рассчитывали по формуле $[1 - (ДКдекс/ДКконтр)] \times 100$.				

Из данных таблицы 3.4.3 видно, что ДКдекс больных РА в наибольшей степени подавляли продукцию $IFN\gamma$ и IL-17, тогда как снижение синтеза IL-4 и IL-13 было менее выраженным, хотя и статистически значимым. Таким образом, по сравнению с Th2 клетками, субпопуляции Th1 и Th17 были более чувствительны к супрессорному влиянию со стороны ДКдекс. Различный эффект ДКдекс на Th1 и Th2 клетки проявлялся снижением индексов соотношения $IFN\gamma/IL-4$ и $IFN\gamma/IL-13$: с 30 (15,3-89,5) до 17,8 (1,5-26,6); $p=0,024$, и с 19,4 (12-34) до 13 (6-18); $p=0,025$, соответственно.

Другой механизм снижения Т-клеточной реактивности мог быть связан со способностью ДКдекс индуцировать гибель Т-лимфоцитов. Поэтому далее исследовали (таблица 3.4.4) уровень апоптоза $CD3^+$ Т-клеток, оценка которого включала определение общего количества апоптотических клеток (An^+), а также клеток в стадии раннего (An^+PI^-) и позднего (An^+PI^+) апоптоза.

Таблица 3.4.4 – Влияние дексаметазон-модифицированных ИФН-ДК больных РА на уровень апоптоза $CD3^+$ Т-клеток в ауто-СКЛ

Параметры	МНК	Ауто-СКЛ		pW
		+ контрДК	+ ДКдекс	
$CD3^+ An^+$, %	9 (7-15)	22 (12-27)	27,5 (17-33)	0,017
$CD3^+ An^+PI^-$, %	7 (6-8)	11 (10-11)	12,5 (10-14)	0,028
$CD3^+ An^+PI^+$, %	2 (1-7)	11 (2-12)	17 (5-22)	0,018
Примечания: ИФН-ДК больных РА (n=7), генерированные в отсутствие (контрДК) или присутствии дексаметазона (ДКдекс), культивировали с аутологичными МНК в соотношении 1:10. Уровень апоптоза оценивали через 48 ч. pW – значимость различий эффекта дексаметазон-модифицированных ДК по сравнению с контрольными ДК по W-критерию Вилкоксона для парных выборок.				

Стимуляция МНК контрольными ДК сопровождалась возрастанием доли апоптотических Т-клеток, являясь отражением активационно-индуцированного апоптоза. Однако в присутствии ДКдекс относительное содержание апоптотических Т-клеток было значимо выше. При этом усиление апоптоза было обусловлено преимущественно за счет прироста $CD3^+$ Т-клеток в стадии позднего апоптоза. Таким образом, гипореактивность Т-клеток больных РА в ауто-СКЛ при стимуляции дексаметазон-модифицированными ДК была обусловлена как индукцией анергии, так и усилением апоптоза аутореактивных Т-лимфоцитов.

Гипореактивность Т-клеток больных РА в ауто-СКЛ могла быть связана не только с индукцией апоптоза/анергии, но также и с супрессорным эффектом дексаметазон-модифицированных ДК. Для проверки этого предположения,

исследовали способность ДКдекс подавлять пролиферативный ответ Т-клеток в ауто-СКЛ, индуцированной контрольными ДК (рисунок 3.4.1).

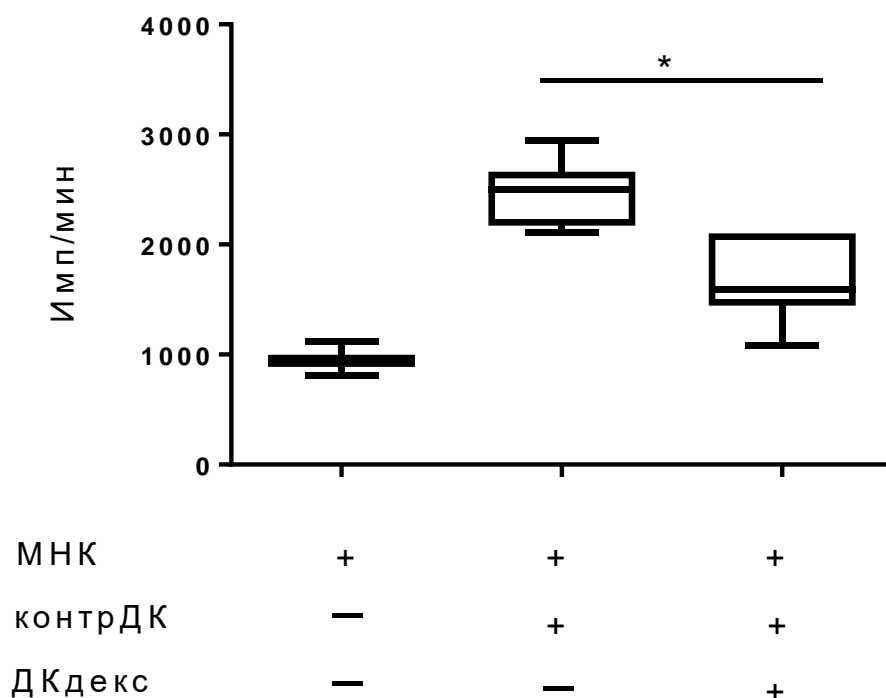


Рисунок 3.4.1. Супрессорный эффект ДКдекс на пролиферацию Т-клеток в ауто-СКЛ. Ауто-СКЛ индуцировали путем культивирования контрДК больных РА (n=6) с аутологичными МНК в соотношении 1:10 в отсутствие и в присутствии ДКдекс, соотношение ДКконтр к ДКдекс 1:1. Данные представлены в виде медиан, интерквартильных диапазонов, диапазонов минимальных и максимальных значений. * $pW < 0,05$ по W-критерию Вилкоксона для парных выборок.

Действительно, интенсивность пролиферативного ответа в ауто-СКЛ, индуцированного контрДК, при добавлении дексаметазон-модифицированных ДК значительно снижалась, в среднем на 30 % (25-40; $pW = 0,028$; n=6).

Чтобы выяснить, связан ли супрессорный эффект ДКдекс с индукцией Трег, исследовали содержание $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Трег и IL-10-продуцирующих Т-лимфоцитов (Tr1) в ауто-СКЛ (таблица 3.4.5). Относительное количество $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Трег в культурах, стимулированных контрДК и ДКдекс, было значимо выше, чем среди интактных МНК, однако между собой значимо не различались.

Таблица 3.4.5 - Влияние ДКдекс больных РА на содержание регуляторных Т-клеток в ауто-СКЛ

Показатель	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ Treg (n=9)		CD4 ⁺ IL10 ⁺ Tr1 (n=8)	
	% клеток	p _w	% клеток	p _W
МНК (1)	0,9 (0,7-1,1)	P1-2 = 0,007 P1-3 = 0,02 P2-3 = 0,21	4,0 (2,5-7,0)	P1-2= 0,176 P1-3= 0,013 P2-3= 0,012
МНК + контрДК (2)	1,7 (1,3-2,6)		6,5 (4,8-7,0)	
МНК + ДКдекс (3)	1,3 (1,2-2,0)		8,5 (6,0-9,6)	
Примечания: ИФН-ДК больных РА, генерированные в отсутствие (контрДК) или присутствии дексаметазона (ДКдекс), культивировали с аутологичными МНК в соотношении 1:10. Относительное содержание CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ и CD4 ⁺ IL10 ⁺ Т-клеток оценивали на 5 сут. p _W – значимость различий между показателями по W-критерию Вилкоксона для парных выборок.				

Стимуляция МНК ДКдекс также сопровождалась значимым возрастанием доли CD4⁺IL10⁺ Т-клеток. Однако в этом случае относительное содержание CD4⁺IL10⁺ Tr1 было значимо выше, чем при стимуляции контрольными ДК. Таким образом, супрессорная активность ДКдекс в ауто-СКЛ была сопряжена с индукцией IL-10-продуцирующих CD4⁺ Т-клеток.

Чтобы убедиться, что дексаметазон-модифицированные ДК больных РА способны ингибировать антигенспецифический ответ, также исследовали влияние ДКдекс на РРД-специфический пролиферативный ответ в культурах аутологичных Т-лимфоцитов.

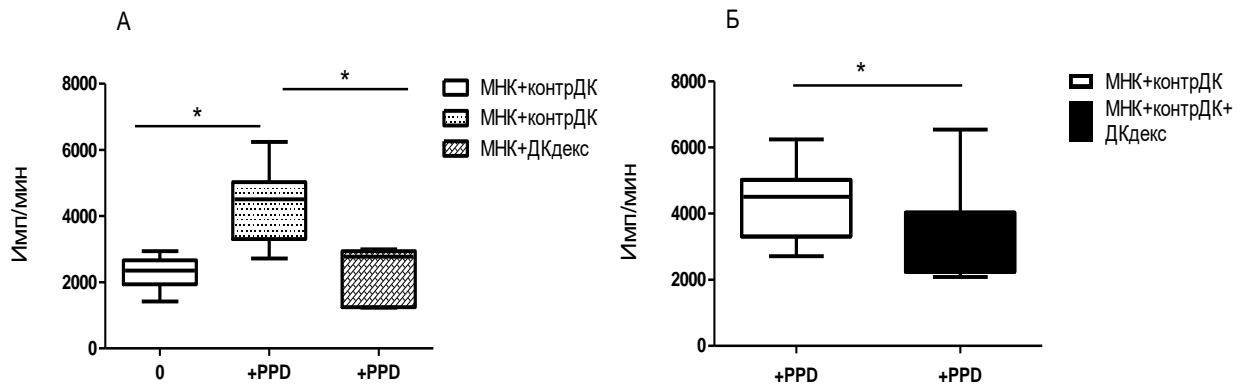


Рисунок 3.4.2 Влияние ИФН-ДКдекс больных РА (n=6) на PPD-специфический пролиферативный ответ. (А) Неприлипающую фракцию аутологичных МНК больных культивировали с контрольными ДК (МНК+контрДК), PPD-нагруженными контрольными ДК (+PPD), или дексаметазон-модифицированными ДК, нагруженными PPD (+PPD). (Б) Неприлипающую фракцию аутологичных МНК, стимулированных PPD-нагруженными контрольными ДК, культивировали в отсутствие или в присутствии нагруженных PPD ДКдекс (+PPD). * $p < 0,05$.

Как видно, (рис. 3.4.2 А) пролиферация аутологичных Т-клеток, стимулированных PPD-нагруженными контрольными ДК, 2-кратно превышала таковую в культурах, стимулированных не нагруженными антигеном ДК, что свидетельствовало об индукции PPD-специфического ответа. В то же время в присутствии ДКдекс, нагруженных PPD, ответ значительно снижался (с медианой супрессии 46 (36—55) %). Аналогичный эффект наблюдался при добавлении PPD-нагруженных ДКдекс в культуры Т-клеток, стимулированных PPD-нагруженными контрольными ДК (рис. 3.4.2 Б). Супрессорный эффект в этом случае составлял 35 (16—46) %.

Полученные в настоящем разделе результаты свидетельствуют, что дексаметазон-модифицированные ДК, генерируемые у больных РА из моноцитов в присутствии IFN- α , обладают толерогенным эффектом в культурах аутологичных Т-лимфоцитов и индуцируют состояние гипореактивности Т-клеток в ауто-СКЛ. Гипореактивность Т-клеток ассоциирована с блокированием клеточного цикла в популяции CD4⁺ Т-лимфоцитов и угнетением продукции Th1 (IFN γ), Th17 (IL-17) и Th2 (IL-13 и IL-4) цитокинов, что свидетельствует об

индукции анергии $CD4^+$ Т-клеток. При этом более выраженное ингибирование синтеза $IFN\gamma$ и IL-17 указывает на большую подверженность анергии Th1 и Th17 клеток. Снижение пролиферативного ответа в ауто-СКЛ ассоциировано также с усилением апоптоза Т-лимфоцитов. Кроме того, ДКдекс больных РА обладают супрессорным эффектом, в частности, подавляют пролиферацию аутологичных Т-клеток, стимулированных контрольными ДК. Данный эффект сопряжен с возрастанием в ауто-СКЛ доли $CD4^+$ Т-клеток, секретирующих IL-10, и свидетельствует о способности ДКдекс индуцировать конверсию $CD4^+$ Т-лимфоцитов в Tr1 регуляторные клетки.

Глава 3.5. Исследование влияния пульс-терапии глюкокортикоидами на фенотип и функции интерферон- α -индуцированных дендритных клеток и структуру циркулирующих моноцитов у больных ревматоидным артритом

Полученные в предыдущей главе данные о сохранной чувствительности ИФН-ДК больных РА к действию дексаметазона *in vitro* и способности ИФН-ДК больных подавлять функции аутологичных Т-клеток свидетельствуют о том, что IFN- α -индуцированная дифференцировка моноцитов в ДК может являться новой мишенью действия глюкокортикоидов в опосредовании их противовоспалительного эффекта у больных РА. Действительно, ДК играют важную роль в патогенезе РА, поддерживая воспалительный процесс за счет презентации хрящевых гликопротеинов, продукции провоспалительных цитокинов и активации Th1 и Th17 ответа. При воспалительных процессах существенным источником ДК становятся моноциты, причем мощным фактором их дифференцировки и поддержания активированного статуса при аутоиммунной патологии является IFN- α [15, 57], что создает предпосылки для активной генерации ИФН-ДК у больных РА.

Ингибирующий эффект высоких доз глюкокортикоидов на ДК *in vivo* продемонстрирован при некоторых аутоиммунных заболеваниях в отношении циркулирующих ДК [183], однако данные о влиянии пульс-терапии метилпреднизолоном на свойства ИФН-ДК у больных РА отсутствуют. Поэтому следующий раздел был посвящен изучению влияния пульс-терапии метилпреднизолоном на ИФН-ДК пациентов РА. Для этого использовали два подхода. В первом случае проводили сравнительное исследование ИФН-ДК у больных, оппозитных по пульс-терапии метилпреднизолоном, проведенной в предшествующие сроки (давностью с момента завершения не более 3 дней). Во втором случае оценивали изменение свойств ИФН-ДК до и после проведения пульс-терапии глюкокортикоидами у одних и тех же пациентов.

В рамках первого подхода исследовали фенотипические и функциональные свойства ДК в группах больных РА, получающих болезнь-модифицирующие препараты (группа 1), либо болезнь-модифицирующие препараты в комбинации с пульс-терапией высокими дозами глюкокортикоидов (группа 2). Данные, характеризующие пациентов исследуемых групп, представлены в таблице 3.5.1.

Таблица 3.5.1 - Клиническая характеристика пациентов

Параметр	Группы пациентов		Значимость различий*
	РА1 (БМП)	РА2 (БМП/ ГК)	
Пол (М/Ж)	6/13	8/12	$p_{\text{ТМФ}}=0.41$
Возраст, Ме (LQ-UQ)	58 (48-64)	60 (44-64)	$pU=0.7$
Длительность заболевания, мес; Ме (LQ-UQ)	71 (26-160)	76 (21-132)	$pU=0.9$
DAS 28, Ме (LQ-UQ)	6 (5,4-6,2)	5,8 (5,2-6,6)	$pU=0.9$
Умеренная активность (DAS 28), %	84	75	$p_{\chi^2}=0,11$
Высокая активность (DAS 28), %	16	25	
Наличие ревматоидного фактора, %	100	100	—
Примечания: БМП – антиревматические болезнь-модифицирующие препараты, ГК - глюкокортикоиды в режиме пульс-терапии. *Статистическая значимость различий по точному методу Фишера ($p_{\text{ТМФ}}$), U-критерию Манна-Уитни (pU), критерию хи-квадрат (p_{χ^2}).			

Пациенты первой группы (РА1) включали 19 человек и получали терапию противоревматическими БМП в стандартных терапевтических дозах: 9 пациентов - метотрексат (15-25 мг/нед), 4 – лефлуномид (20 мг/сут), 1 – сульфасалазин (2,0 /сут), 5 чел - комбинацию азатиоприна/сульфасалазина с метотрексатом. Девять больных этой группы в связи с высокой активностью заболевания наряду с

метотрексатом, азатиоприном или их комбинацией получали также глюкокортикоидную терапию *per os* в дозе 10-20 мг/сутки.

Во второй группе (РА2), составившей 20 человек, 11 человек получали метотрексат (20 мг/нед). Шесть больных находились на терапии лефлуномидом (20 мг/сут), 3-сульфасалазином (2,0/сут). В связи с высокой активностью заболевания 17 пациентам была проведена пульс-терапия метилпреднизолоном – внутривенно, 500 мг, №3.

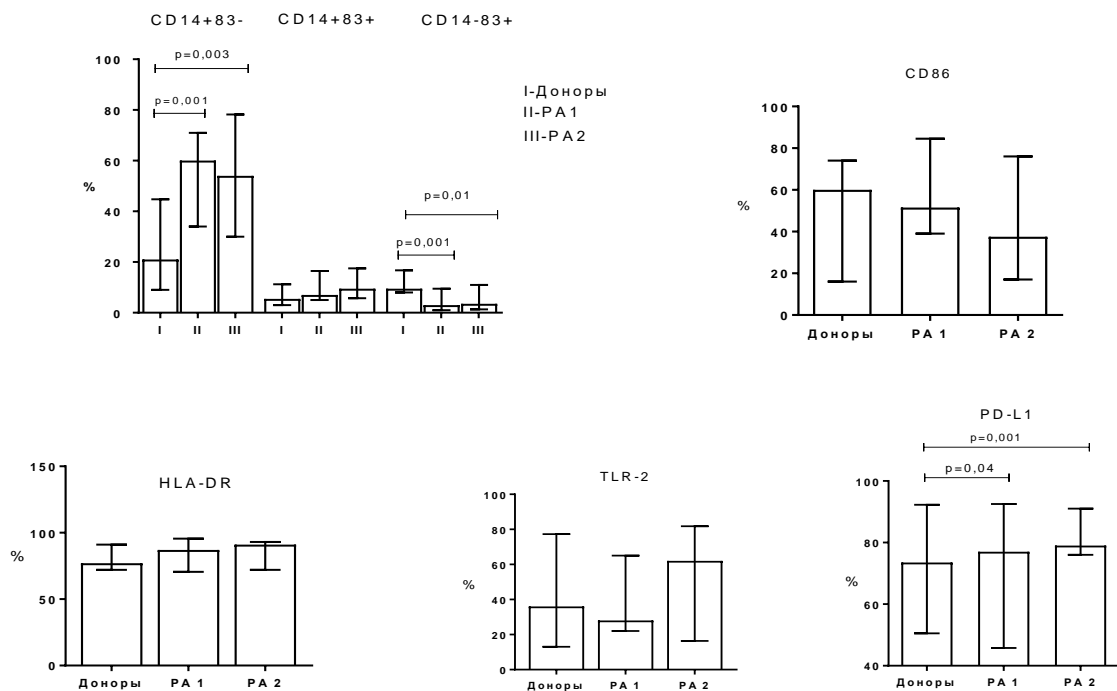


Рисунок 3.5.1. Сравнительная характеристика поверхностных маркеров ИФН-ДК больных РА (РА1 n=11, РА2 n=13) и здоровых доноров (n=20). % -относительное содержание клеток, p_U — значимость различий между показателями по U-критерию Манна-Уитни.

Анализ поверхностных маркеров (рисунок 3.5.1 и 3.5.2) показал, что ДК больных первой группы (ДК-РА1), получающие БМП, отличались от ДК доноров признаками меньшей зрелости: возрастанием относительного содержания $CD14^+$ и $CD14^+CD83^-$ клеток, а также плотности экспрессии $CD14$, и меньшим содержанием зрелых ДК ($CD14^-CD83^+$). ДК пациентов второй группы (ДК-РА2), получавших пульс терапию кортикостероидами, также характеризовались

повышенным содержанием и плотностью экспрессии CD14 и снижением доли CD14⁺CD83⁺. Однако в этой группе также отмечалось значимое возрастание популяции ДК, одновременно экспрессирующих CD14 и CD83 (CD14⁺CD83⁺), и плотности экспрессии ко-ингибиторной молекулы PD-L1 (как по сравнению с ДК доноров, так ДК-РА1).

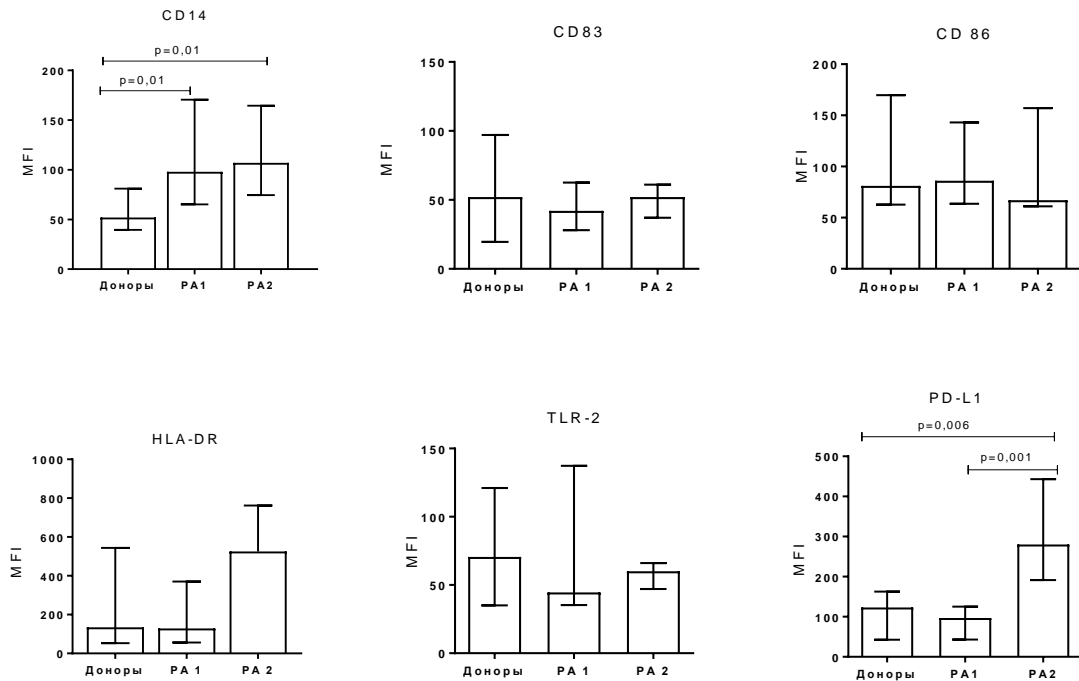


Рисунок 3.5.2. Уровень экспрессии поверхностных маркеров ИФН-ДК здоровых доноров (n=20) и больных РА (РА1 n=11, РА2 n=13). MFI-средняя интенсивность флуоресценции, рU – значимость различий между показателями по U-критерию Манна-Уитни.

Кроме того, по сравнению с ДК-РА1, ДК-РА2 отличались (на уровне тренда) меньшим содержанием ДК, экспрессирующих ко-стимуляторную молекулу CD86, и большей долей ДК, несущих TLR2, опосредующий толерогенные сигналы.

Оценка продукции цитокинов (TNFα, IL-10 и IL-6) в супернатантах ИФН-ДК больных сравниваемых групп показала, что ДК-РА1 продуцировали схожие уровни TNFα, IL-6 и IL-10 и не отличались соотношением TNFα/IL-10 от ДК доноров (таблица 3.5.2). В то же время, ДК-РА2 в сравнении с ДК доноров продуцировали более высокие уровни IL-6 (pU=0,01). При этом концентрация IL-6 превышала таковую в культурах ДК-РА1. Следует отметить, что выход ДК у

больных 1-й и 2-й группы значимо не различался ($0,10 \times 10^6 / 1$ млн МНК и $0,12 \times 10^6 / 1$ млн МНК, соответственно; $p=0.5$) и соответствовал таковому для ДК доноров ($0,08 \times 10^6 / 1$ млн МНК). Поэтому выявленные различия были обусловлены уровнем продукции цитокина, а не количеством цитокин-продуцирующих клеток.

Таблица 3.5.2 - Продукция цитокинов ИФН-ДК здоровых доноров и больных РА

Цитокин (пг/мл)	ДК-РА1(1) (n=5)	ДК-РА2 (2) (n=8)	pU (1-2)	ДК-доноров (3) (n=9)	pU (1-3)	pU (2-3)
TNF α	3780 (850-4230)	5275 (2490-5995)	0,24	3570 (1110-3960)	0,84	0,09
IL-10	1902 (756-3186)	1992 (1818-3174)	0,85	1834 (666-2224)	0,52	0,37
IL-6	16960 (14680-22180)	23970 (22800-24780)	0,017	19580 (18480-20960)	0,4	0,01
TNF α / IL-10	1,5 (0,85-5,49)	1,96 (1,75-3,25)	0,2	1,7 (0,2-2,8)	0,63	0,4
Примечание: представлены концентрации отдельных цитокинов в 5-суточных супернатантах ДК, полученных от 5 пациентов группы 1 (1), 8 пациентов группы 2 (2) и 9 здоровых доноров (3). pU – значимость различий между показателями по U-критерию Манна-Уитни.						

Сравнение пролиферативной активности МНК и индексов стимуляции в алло-СКЛ, индуцированной ДК-РА1 и доноров (рисунок 3.5.3), не выявило различий в аллостимуляторной активности ДК. В то же время ДК-РА2 отличались как от ДК доноров, так и от ДК-РА1 существенно более низкой аллостимуляторной активностью как на уровне интенсивности пролиферации в

СКЛ, так и ИВ ДК, что могло быть обусловлено большим содержанием $TLR2^+$ клеток в популяции ДК-РА2.

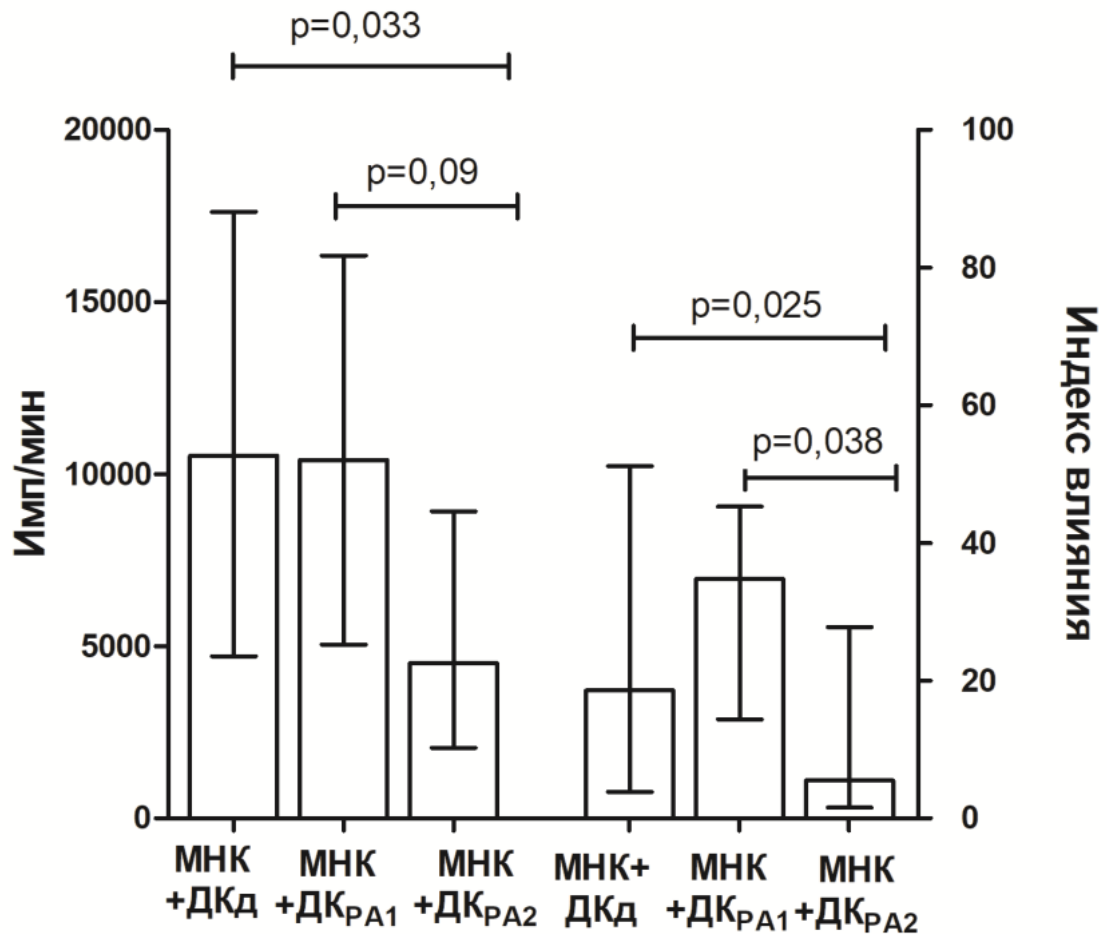


Рисунок 3.5.3. Аллостимуляторная активность ИФН-ДК здоровых доноров ($n=20$) и больных РА (РА1 $n=11$, РА2 $n=13$). По левой оси представлены данные пролиферации (имп/мин) аллогенных МНК в присутствии ИФН-ДК здоровых доноров и больных РА. По правой оси представлены индексы влияния (расч.ед) ИФН-ДК в алло-СКЛ. p – значимость различий между показателями по U -критерию Манна-Уитни.

В завершении, была исследована чувствительность ДК у больных сравниваемых групп к действию дексаметазона *in vitro*. Как видно (таблица 3.5.3), одним из проявлений толерогенного эффекта дексаметазона в отношении ИФН-ДК доноров является значимое подавление продукции $TNF\alpha$, приводящее к уменьшению индекса соотношения $TNF\alpha / IL-10$, а также угнетение аллостимуляторной активности ДК.

Таблица 3.5.3 - Чувствительность ДК пациентов 1-й и 2-й группы к толерогенному действию дексаметазона

[illegible]

Присутствие дексаметазона в культурах ДК больных РА также оказывало выраженный ингибирующий эффект на продукцию TNF α . Медианные значения супрессорной активности дексаметазона в отношении продукции TNF α ДК-РА1 и ДК-РА2 составляли соответственно 71 (42-79) и 75 (48-83) %. При этом, учитывая отсутствие супрессорного эффекта дексаметазона на продукцию IL-10, ДК пациентов обеих групп характеризовались выраженным снижением индекса соотношения TNF α и IL-10 в сторону преобладания последнего. Несмотря на более низкую исходную аллостимуляторную активность ДК-РА2, эти клетки сохраняли чувствительность к ингибирующему действию дексаметазона. Так, медианные значения супрессии аллостимуляторной активности ДК-РА1 и ДК-РА2 составили 51 и 57 %.

Второй подход к оценке толерогенного эффекта высоких доз глюкокортикоидов на ДК *in vivo* основывался на сравнительном исследовании свойств ИФН-ДК, полученных от больных РА до и после проведения пульс-терапии метилпреднизолоном (МП). Учитывая, что ответ в СКЛ определяется не только свойствами ДК, но и состоянием отвечающих Т-клеток, функции которых на фоне терапии глюкокортикоидами могут быть существенно изменены, стимуляторную активность ИФН-ДК в динамике пульс-терапии исследовали в алло-СКЛ с использованием в качестве отвечающих клеток функционально полноценных МНК здоровых доноров. Чтобы исключить вклад различий по аллоантигенам, аллостимуляторную активность ДК каждого пациента, сгенерированных накануне (за 1-3 дня до начала терапии) и после пульс-терапии МП (через 3-5 дней), тестировали в культурах МНК одного и того же донора. Видно (рисунок 3.5.4), что после пульс-терапии генерируемые ИФН-ДК обладали меньшей аллостимуляторной активностью. Так, медианные значения пролиферации и индексов влияния ДК, полученных после пульс-терапии МП, были в 2 раза ниже по сравнению с таковыми до терапии ($pU = 0,04$ и $pU = 0,0006$, соответственно). При анализе индивидуальных данных снижение аллостимуляторной активности ДК выявлялось у большинства (8/10) пациентов.

При этом ИФН-ДК, полученные после пульс-терапии, сохраняли чувствительность к ингибирующему действию дексаметазона *in vitro*. Причем супрессорный эффект дексаметазона на аллостимуляторную активность ДК, генерируемых после пульс-терапии, был выше, чем до терапии МП: 69 % (54–78 %) против 48 % (31–55 %); $pU=0,026$.

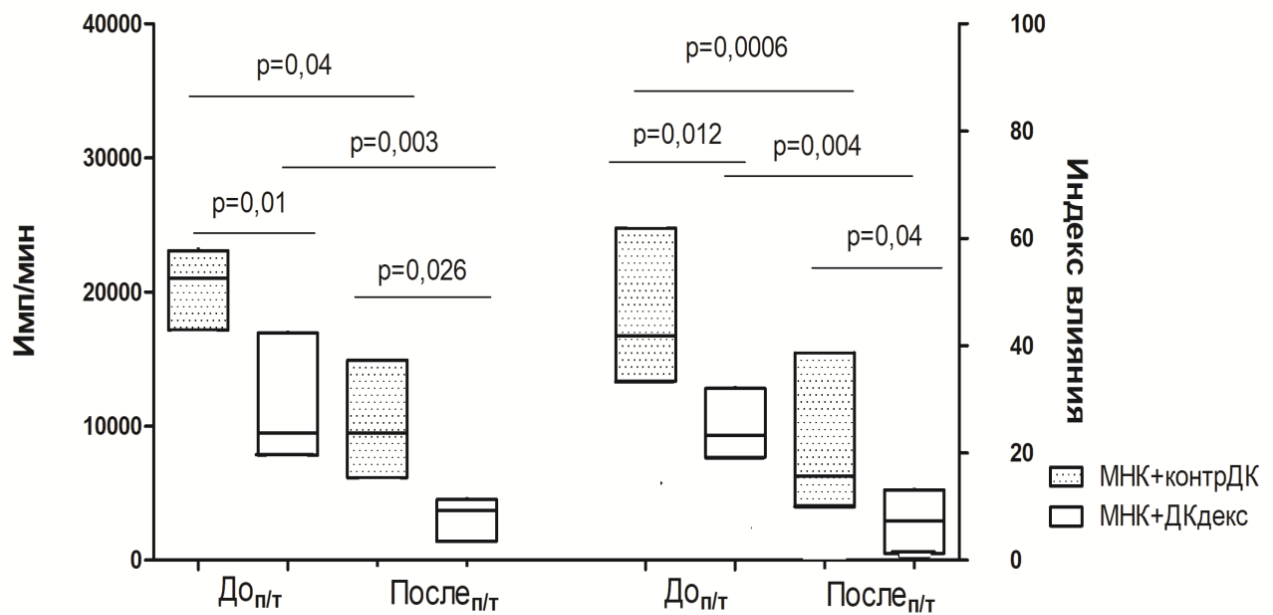


Рисунок 3.5.4. Влияние пульс-терапии МП на стимуляторную активность ИФН-ДК больных РА ($n=10$) в алло-СКЛ и их чувствительность к действию дексаметазона *in vitro*. Представлены данные пролиферативного ответа Т-клеток (по левой оси ординат) и индексы влияния ИФН-ДК в алло-СКЛ (по правой оси ординат) до и после пульс-терапии метилпреднизолоном («До_п/т» и «После_п/т»). Значимость различий между МНК + контрДК и МНК + ДКдекс оценивали по W-критерию Вилкоксона для парных выборок, значимость различий в культурах клеток до и после пульс-терапии – по U-критерию Манна-Уитни.

Исследование влияния пульс терапии МП на стимуляторную активность ДК больных РА в ауто-СКЛ (рисунок 3.5.5) выявило аналогичные закономерности. После пульс-терапии МП эффективность ИФН-ДК больных стимуляции пролиферативной активности аутологичных Т-клеток снижалась. В этом случае, однако, толерогенный эффект терапии МП на ДК в ауто-СКЛ проявлялся в виде

выраженного тренда ($p=0,09$) и при анализе индивидуальных данных регистрировался у 6 из 10 пациентов. Данный факт был, по-видимому, связан с выраженной гетерогенностью больных РА по уровню ответа в ауто-СКЛ после пульс-терапии, что могло объясняться различной выраженностью супрессивного эффекта МП на Т-клетки, используемые впоследствии в ауто-СКЛ. Важно также отметить, что ИФН-ДК, генерированные после пульс-терапии МП, сохраняли чувствительность к ингибирующему действию дексаметазона *in vitro*, причем ИФН-ДКдекс были практически лишены способности стимулировать пролиферацию аутологичных Т клеток.

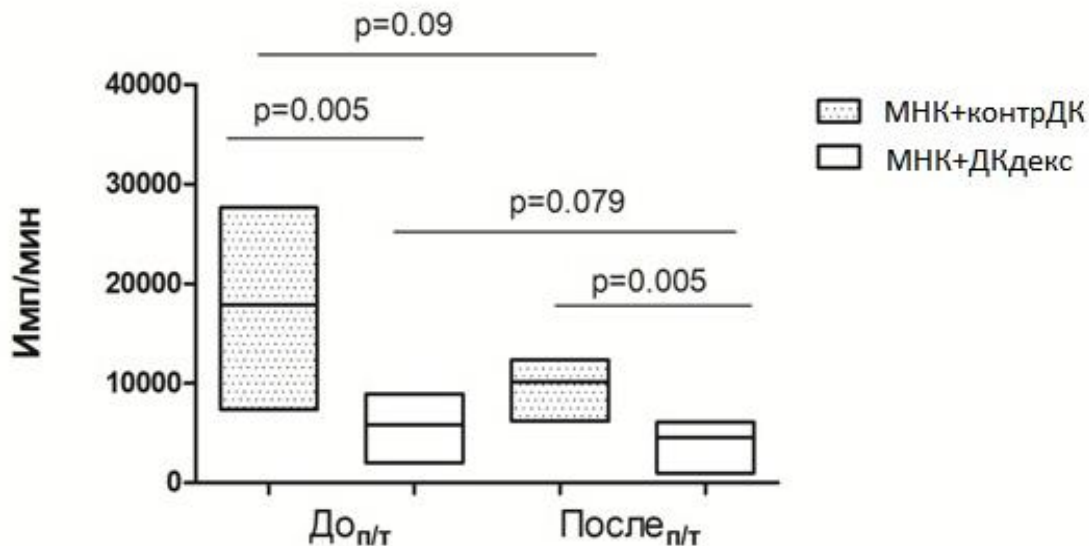


Рисунок 3.5.5. Влияние пульс-терапии метилпреднизолоном на стимуляторную активность ИФН-ДК больных РА ($n=10$) в ауто-СКЛ и их чувствительность к действию дексаметазона *in vitro*. Представлены данные пролиферации Т-клеток (имп/мин) в ауто-СКЛ у больных РА ($n=10$) до и после пульс-терапии метилпреднизолоном («До п/т» и «После п/т»).

Следует отметить, что ИФН-ДК больных генерировали из моноцитов в присутствии FCS (в качестве ростовых факторов). Поэтому снижение стимуляторной активности ДК не могло объясняться изменениями в содержании сывороточных цитокинов под действием глюкокортикоидов и было, по-видимому, связано с изменением свойств самих моноцитов. Известно, что глюкокортикоиды влияют как на субпопуляционный состав, так и на функции моноцитов, что может сказываться на свойствах генерируемых ДК [48].

Действительно, оценка относительного содержания классических ($CD14^{++}CD16^{-}$), промежуточных ($CD14^{++}CD16^{+}$) и альтернативных ($CD14^{+}CD16^{++}$) моноцитов здоровых доноров ($n=18$) и больных РА ($n=15$), находящихся на терапии БМП (таблица 3.5.4), выявила снижение относительного содержания $CD14^{++}CD16^{-}$ клеток у больных (Ме 78 против 90%; $pU=0,02$) и увеличение доли $CD14^{++}CD16^{+}$ (Ме 4,0 против 2,0 %; $pU=0,034$) и $CD14^{+}CD16^{++}$ моноцитов (Ме 5,0 против 1,5 %; $pU=0,02$). После окончания пульс-терапии относительное содержание $CD14^{++}CD16^{-}$ клеток возрастало, а доля $CD14^{+}CD16^{++}$ моноцитов снижалась, и пациенты РА уже значимо не отличались по этим показателям от здоровых доноров.

Таблица 3.5.4 - Влияние пульс-терапии метилпреднизолоном на субпопуляционный состав циркулирующих моноцитов у больных РА

Группы	Субпопуляции моноцитов (%)		
	$CD14^{++}CD16^{-}$	$CD14^{++}CD16^{+}$	$CD14^{+}CD16^{++}$
Доноры (1)	90 (86-94)	2 (2-6)	1,5 (1-2)
Больные РА до пульс-терапии МП (2)	78 (74-91)	4 (3-5)	5 (2-7)
Больные РА после пульс-терапии МП (3)	89 (89-90)	4 (2-4)	1,0 (1,0-6,0)
P (1-2)	0,02	0,034	0,02
P (2-3)	0,23	0,33	0,34
Примечание: представлено относительное содержание субпопуляций моноцитов в крови здоровых доноров ($n=18$) и пациентов РА ($n=15$) до и после пульс-терапии МП. P – значимость различий в культурах клеток до и после пульс-терапии по U-критерию Манна-Уитни.			

Таким образом, уменьшение содержания $CD14^{+}CD16^{++}$ клеток в популяции моноцитов на фоне пульс-терапии МП ассоциировалось со снижением

эффективности генерируемых ИФН-ДК стимулировать пролиферацию аллогенных Т-клеток. Учитывая, что генерируемые из классических и альтернативных моноцитов ДК различаются по своим функциям, можно полагать, что альтернативные моноциты, будучи более зрелыми, дают начало ДК с более высокой аллостимуляторной активностью, тогда как генерируемые из классических моноцитов ДК проявляют меньшую стимуляторную активность. В этом случае элиминация $CD14^+CD16^{++}$ клеток будет способствовать генерации ДК с меньшей способностью стимулировать пролиферацию Т-клеток.

Кроме того, нельзя исключить, что генерируемые из $CD14^+CD16^{++}$ клеток ИФН-ДК, наряду с более высокой аллостимуляторной активностью обладают и большей чувствительностью к действию глюкокортикоидов. Чтобы проверить последнее предположение, у больных РА была проанализирована корреляционная взаимосвязь между количеством $CD14^+CD16^{++}$ клеток в популяции циркулирующих моноцитов и стимуляторной активностью дексаметазон-модифицированных ИФН-ДК в ауто-СКЛ. Чтобы исключить эффект глюкокортикоидов на отвечающие Т-клетки, в корреляционный анализ были включены показатели, оцениваемые у больных до начала пульс-терапии МП. Полученные результаты продемонстрировали наличие обратной взаимосвязи между относительным содержанием альтернативных моноцитов и способностью ИФН-ДК декс стимулировать пролиферацию аутологичных Т-клеток в ауто-СКЛ ($R_s = -0,63$; $p = 0,04$, $n = 10$). Таким образом, более высокое содержание $CD14^+CD16^{++}$ клеток в популяции моноцитов детерминировало более низкую способность генерируемых в присутствии дексаметазона ИФН-ДК декс стимулировать пролиферацию аутологичных Т-клеток.

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

опосредовании эффектов глюкокортикоидов *in vivo* и *in vitro* играют CD14⁺CD16⁺⁺ моноциты, которые ассоциированы с генерацией ИФН-ДК, обладающих более выраженной стимуляторной активностью, и обратно коррелирующих с аллостимуляторной активностью дексаметазон-модифицированных ИФН-ДК *in vitro*, детерминируя чувствительность к толерогенному действию дексаметазона.

В целом результаты данного раздела свидетельствуют, что генерируемые из моноцитов ИФН-ДК у больных РА различаются не только по сравнению с ДК доноров, но и в зависимости от типа проводимой терапии. Общей особенностью ДК в группах, получающих терапию болезнь-модифицирующими препаратами (группа РА1) и болезнь-модифицирующими препаратами в комбинации с высокими дозами глюкокортикоидов (группа РА2) являются признаки незрелости ДК (усиление экспрессии CD14 и снижение доли зрелых CD14⁺CD83⁺). При этом ДК-РА2 имеют ряд дополнительных отличий и характеризуются значимо повышенным (по сравнению с ДК доноров) содержанием промежуточных по степени зрелости CD14⁺CD83⁺ клеток, более высокой (в сравнении с ДК-доноров и ДК-РА1) экспрессией ко-ингибиторной молекулы PD-L1, а также тенденцией к более низкой экспрессии CD86 и более высокому содержанию TLR2⁺ ДК, т.е. более выраженном «толерогенным» фенотипом, что подтверждается их функциональными особенностями в виде более высокой продукции ИЛ-6 и 2-кратно меньшей эффективностью в стимуляции пролиферативного ответа Т-клеток в культурах аллогенных МНК. Несмотря на выявленные различия ДК-РА1 и ДК-РА2, оба типа ДК сохраняют *in vitro* чувствительность к действию дексаметазона, обработка которым приводит к значительному угнетению продукции TNF α и снижению аллостимуляторной активности ДК. При этом ДК-РА2 практически теряют способность стимулировать пролиферацию Т-клеток, что обосновывает целесообразность получения толерогенных ДК после пульс-терапии глюкокортикоидами.

Выявленные изменения свойств ИФН-ДК у больных РА, особенно в группе пациентов РА2, которые получали пульс-терапию метилпреднизолоном, отражают эффект глюкокортикоидов *in vivo*. Другим подтверждением вовлеченности ДК в опосредовании противовоспалительного эффекта глюкокортикоидов при РА является продемонстрированное снижение аллостимуляторной активности ИФН-ДК в динамике после пульс-терапии метилпреднизолоном. Показано, что терапия высокими дозами глюкокортикоидов сопровождается значимым снижением аллостимуляторной активности ИФН-ДК и выраженным трендом к снижению способности ДК стимулировать пролиферацию аутологичных Т-клеток. Данный эффект сопряжен со снижением в пуле циркулирующих моноцитов исходно повышенной субпопуляции альтернативных моноцитов, что позволяет рассматривать эти клетки в качестве мишени действия глюкокортикоидов при РА. Кроме того, более высокое содержание CD14⁺CD16⁺⁺ клеток в популяции моноцитов коррелирует с меньшей способностью дексаметазон-модифицированных ИФН-ДК стимулировать пролиферацию аутологичных Т-клеток, т.е. детерминирует чувствительность к толерогенному эффекту дексаметазона *in vitro*.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Настоящая работа посвящена оценке влияния глюкокортикоидов на дифференцировку моноцитов в ДК, индуцированную интерфероном- α , и характеристике толерогенного потенциала ИФН-ДК у здоровых доноров и больных РА. Использование толерогенных ДК для подавления аутореактивных клонов лимфоцитов рассматривается в качестве нового подхода к лечению аутоиммунных заболеваний [10, 67, 80]. Поэтому разработке протоколов генерации толерогенных ДК и исследованию влияния медикаментозной терапии на свойства ДК уделяется большое внимание. Глюкокортикоиды, как толерогенные стимулы, привлекают особый интерес, поскольку обладают выраженной иммуномодулирующей активностью, в том числе на функции ДК, и активно используются в современной терапии аутоиммунных заболеваний [67, 104, 138]. Однако большинство исследований по оценке влияния глюкокортикоидов на ДК человека, демонстрирующие ингибирующий эффект на NF- κ B-зависимую дифференцировку и созревание ДК, проведено в культурах ДК, генерируемых из моноцитов в присутствии GM-CSF и IL-4 [19, 138, 197, 210]. В то же время при аутоиммунной патологии дифференцировка моноцитов в ДК может индуцироваться интерфероном- α , и эти клетки (ИФН-ДК) существенно отличаются от ИЛ4-ДК по сигнальным путям активации, спектру экспрессируемых генов и функциям [15, 55].

Проведенные исследования показали, что ИФН-ДК здоровых доноров чувствительны к толерогенному действию дексаметазона, в присутствии которого приобретают фенотипические и функциональные свойства толерогенных ДК. На это указывает возрастание доли CD14⁺ ДК и снижение CD83⁺ ДК, свидетельствующее о задержке созревания ДК; уменьшение доли ДК, экспрессирующих ко-стимуляторные молекулы (CD86) и возрастание экспрессии на ДК ко-ингибиторных (PD-L1) и толерогенных (TLR2) молекул, а также угнетение продукции цитокинов с Th1/провоспалительной активностью (TNF α ,

IL-1 β , IL-2, IFN γ , IL-12) и хемокинов (MIP-1 α , RANTES), снижение аллостимуляторной и Th1-стимуляторной активности и смещение баланса в сторону доминирования Th2-стимулирующей активности ИФН-ДК.

Согласно данным литературы, «толерогенные» свойства ИЛ4-ДК связывают с менее зрелым фенотипом, сниженной экспрессией ко-стимуляторных молекул, угнетением продукции провоспалительных (TNF α , IL-1 β) и Th1 (IL-12) цитокинов и повышенной продукцией IL-10 [138, 149, 208]. Модифицированные дексаметазоном ИЛ4-ДК отличаются также от контрольных ИЛ4-ДК низкой аллостимуляторной активностью, что обусловлено повышенной экспрессией PD-L1 и продукцией IL-10, не способны активировать Th1 ответ, индуцируют анегргию наивных Т-клеток и Т-клеток памяти и генерацию регуляторных Tr1-клеток [87, 210]. Таким образом, по многим параметрам ИФН-ДК и ИЛ4-ДК, генерируемые в присутствии дексаметазона, обладают сходными свойствами. Тем не менее, чтобы сравнить толерогенный потенциал дексаметазон-модифицированных ИФН-ДК и ИЛ4-ДК, на следующем этапе было проведено сравнительное исследование ИФН-ДКдекс и ИЛ4-ДКдекс, полученных от одних и тех же доноров и тестируемых в культурах алло-СКЛ одних и тех же доноров-тестеров. Эти исследования позволили выявить общие и отличительные свойства ИФН-ДКдекс и ИЛ4-ДКдекс. Оба типа ДКдекс характеризуются снижением экспрессии CD83 и CD86 и возрастанием экспрессии ко-ингибиторных и толерогенных молекул (PD-L1 и TLR2); уменьшением продукции цитокинов с Th1/провоспалительной активностью, а также меньшей способностью стимулировать пролиферацию и продукцию Th1/провоспалительных цитокинов в алло-СКЛ. При этом ИФН-ДКдекс отличаются большим содержанием TLR2⁺ и CD14⁺ клеток, более высокими показателями продукции IL-10 и IL-4, меньшим индексом соотношения TNF α /IL-10 и меньшей эффективностью стимулировать пролиферацию аллогенных МНК. В отличие от ИЛ4-ДКдекс, обладающих супрессорным эффектом на продукцию Th2 цитокинов, ИФН-ДКдекс не оказывают ингибирующего действия на продукцию IL-4, IL-5 и IL-13,

обуславливая смещение цитокинового баланса в сторону Th2 ответа. Таким образом, по своим толерогенным свойствам, ИФН-ДКдекс доноров не уступали, а по ряду параметров превосходили ИЛ-4-ДКдекс.

Эффект дексаметазона на экспрессию ко-ингибиторных молекул в культурах ИЛ4-ДК описан и другими авторами [30, 159], которые продемонстрировали, что высокая экспрессия TLR2 на ИЛ4-ДК ассоциирована с высокой продукцией IL-10 и низкой секрецией TNF α и IFN γ . Это позволяет рассматривать TLR2 в качестве маркера толерогенной активности ДК [30]. Полученные нами результаты подтвердили сопряженность высокой экспрессии TLR2 со снижением Th1/провоспалительных цитокинов в обоих типах ДКдекс, однако не выявили взаимосвязи с усилением продукции IL-10 ни в культурах ИФН-ДКдекс, ни ИЛ4-ДКдекс. Тем не менее, концентрация IL-10 в культурах ИФН-ДКдекс значительно превышала таковую в культурах ИЛ4-ДКдекс. Существующие в настоящее время данные о влиянии дексаметазона на продукцию IL-10 противоречивы. Ряд авторов демонстрируют стимулирующий эффект дексаметазона на продукцию IL-10 дендритными клетками [26, 149, 210], тогда как по данным других глюкокортикоиды не оказывают значимого эффекта на секрецию IL-10 [138, 197, 208], что, возможно, обусловлено различиями в дозе дексаметазона, времени его внесения в культуру ДК и особенностями оценки продукции цитокина.

Одним из возможных механизмов ингибирующего действия дексаметазона на способность ИФН-ДК стимулировать пролиферацию Т-клеток и активировать Th1-ответ может быть снижение продукции Th1 провоспалительных цитокинов, необходимых для поддержания пролиферации Т-клеток. Толерогенный потенциал этих клеток может быть также связан со способностью усиливать продукцию G-CSF аллогенными МНК. Исследования G-CSF *in vivo* и *in vitro* показали, что G-CSF способен подавлять продукцию провоспалительных цитокинов МНК периферической крови, индуцировать генерацию Трег, вызывать Th1/Th2 переключение и ингибировать пролиферацию Т-клеток. Причем эффект на Т-

лимфоциты может быть прямым или опосредоваться через моноциты и ДК [50, 64, 120, 130, 200].

Следующим важным разделом явилась характеристика ИФН-ДК, генерируемых у больных РА, и исследование чувствительности этих клеток к действию дексаметазона *in vitro*. Эти исследования позволили впервые продемонстрировать изменения фенотипических и функциональных параметров ИФН-ДК, в частности, возрастание доли $CD14^+CD83^-$ и снижение относительного содержания $CD14^-CD83^+$ клеток в культурах ИФН-ДК больных РА по сравнению с ИФН-ДК доноров, что указывает на задержку созревания ДК. Кроме того, ИФН-ДК больных отличались более высоким содержанием ДК, экспрессирующих коингибиторную молекулу PD-L1 и меньшей аллостимуляторной активностью, что свидетельствует о снижении стимуляторной активности ИФН-ДК больных и появлении толерогенных свойств, что возможно является результатом проводимой терапии. При этом обращала на себя внимание гетерогенность больных в отношении свойств генерируемых ИФН-ДК. Так, например, снижение аллостимуляторной активности ИФН-ДК, как интегрального маркера их функциональной активности, выявлялось у половины пациентов, тогда как в другой половине случаев данный показатель был сопоставим с таковым у доноров.

Данные о фенотипических и функциональных свойствах ДК моноцитарного происхождения при РА немногочисленны и касаются исключительно ДК, генерируемых в присутствии IL-4. В целом, ИЛ4-ДК больных РА схожи с ИЛ4-ДК доноров по экспрессии CD14, CD80, CD86, CD83, HLA-DR и TLR2 за исключением повышенной экспрессии CD32 (Fc-γIR) на незрелых ДК [63, 206]. Незрелые ИЛ4-ДК больных также не отличаются от ИЛ4-ДК доноров по продукции провоспалительных (IL-1β, IL-6, TNFα), Th1 (IL-12, IFNγ) и Th2 (IL-10) цитокинов. В то же время для зрелых ИЛ4-ДК больных РА характерна повышенная продукция провоспалительных цитокинов (IL-1β, IL-6, TNFα) и IL-10, а также ряда хемокинов (CCL18, CCL19, CCL17). Причем стимуляция ДК

больных через Fc- γ IIIR подавляет продукцию IL-6 и TNF α , что свидетельствует о преобладающей экспрессии Fc- γ IIIRb (но не Fc- γ IIIRa), который обеспечивает негативный сигналинг в отношении продукции провоспалительных цитокинов [143, 206]. Показано также, что более высокий уровень продукции IL-6/IL-23 ДК больных обуславливает их повышенную способность индуцировать Th17 [47]. Полученные нами результаты несколько расходятся с данными литературы о фенотипической схожести зрелых ИЛ4-ДК у больных РА и доноров, что может быть обусловлено различиями ДК, генерированных в присутствии IFN- α и IL-4, по степени зрелости и ряду функциональных свойств [90]. С другой стороны, полученные в настоящей работе данные о схожей продукции цитокинов ИФН-ДК больных РА и доноров согласуются с данными литературы [143] в отношении незрелых ИЛ4-ДК.

Еще одним существенным фактом является выявленная чувствительность ИФН-ДК больных РА к толерогенному действию дексаметазона, добавление которого в культуры ИФН-ДК больных ингибирует экспрессию CD83 и – в виде тренда – CD86, значимо подавляет продукцию ДК TNF α и в виде тенденции – IL-6, снижает аллостимуляторную активность и способность ИФН-ДК индуцировать Т-клетки к продукции Th1 цитокинов, смещая баланс в сторону Th2-стимулирующей активности. Эти данные обосновывают возможность генерации толерогенных ИФН-ДК у больных РА. При этом так же, как и в культурах ИФН-ДК доноров, дексаметазон в культурах ИФН-ДК больных РА не оказывал значимого ингибирующего влияния на продукцию IL-10. Следует отметить, что повторная стимуляция ИФН-ДК больных LPS не ослабляла толерогенный потенциал этих клеток, что согласовалось с данными о стабильности дексаметазон-модифицированных ИЛ4-ДК [63]. Также важно подчеркнуть, что снижение аллостимуляторной активности (как проявление толерогенных свойств ИФН-ДКдекс) находилось в обратной взаимосвязи с долей TLR2⁺ ДК.

Garcia-Gonzalez P.A. с соавт., используя 5-дневный прокол генерации ИЛ4-ДК в присутствии дексаметазона и активации ДК в последние 24 часа монофосфорил

липидом А, показали возможность получения тДК у больных РА [52]. Генерируемые ДК характеризовались сниженной экспрессией ко-стимуляторных молекул, высоким соотношением продуцируемых IL-10/IL-12, а также индуцировали гипореактивность Т-клеток, отвечающих в ауто-СКЛ и распознающих синовиальные антигены, хотя снижение пролиферативного ответа в ауто-СКЛ не было статистически значимым. Hilkens С.М. и Isaacs J.D. продемонстрировали возможность получения тДК у больных РА при использовании 7-дневного протокола генерации IL4-ДК. Дексаметазон-индуцированные тДК больных были сравнимы с тДК здоровых доноров, характеризовались сниженной экспрессией ко-стимуляторных молекул и продукцией провоспалительных цитокинов, низкой способностью стимулировать антигенспецифический ответ аутологичных Т-клеток и наличием супрессорной активности [68]. Дексаметазон-модифицированные ДК больных по данным этих авторов были стабильны и не теряли толерогенного потенциала при повторной активации провоспалительными стимулами. При этом экспрессия TLR2 позиционировалась в качестве оптимального маркера толерогенных ДК при оценке качества дексаметазон-индуцированных ИЛ4-ДК [52, 63]. В этом плане экспрессия TLR2 в качестве маркера толерогенности была характерна как для ИЛ4-ДКдекс, так и ИФН-ДКдекс, тогда как низкая доля CD83⁺ ДК в качестве маркера толерогенности была в большей степени свойственна ИФН-ДКдекс.

Одним из разделов работы явилось исследование влияния ИФН-ДКдекс больных на аутологичные Т-клетки. Полученные результаты показали, что дексаметазон-модифицированные ИФН-ДК пациентов индуцируют состояние гипореактивности Т-лимфоцитов в ауто-СКЛ. Низкий пролиферативный ответ в присутствии ИФН-ДКдекс ассоциировался с блокированием клеточного цикла CD4⁺ Т-лимфоцитов и угнетением продукции Th1 (IFN γ), Th17 (IL-17) и Th2 (IL-13, IL-4) цитокинов, что свидетельствует об индукции анергии CD4⁺ Т-клеток. При этом более выраженная ингибиция синтеза IFN γ и IL-17 указывает на большую подверженность анергии Th1 и Th17 клеток. Снижение

пролиферативного ответа в ауто-СКЛ ассоциировалось также с усилением апоптоза Т-лимфоцитов. Кроме того, ДКдекс больных РА обладали супрессорным эффектом, в частности, подавляли пролиферацию аутологичных Т-клеток, стимулированных интактными (контрольными) ДК. Данный эффект был сопряжен с возрастанием в ауто-СКЛ доли $CD4^+$ Т-клеток, секретирующих IL-10, и свидетельствовал о способности ДКдекс индуцировать конверсию $CD4^+$ Т-лимфоцитов в регуляторные Т-клетки (Tr1). В то же время важно отметить, что дексаметазон-модифицированные ИЛ4-ДК не оказывали значимого ингибирующего эффекта в ауто-СКЛ [68].

Ауто-СКЛ является хорошо известной витральной моделью, отражающей пролиферацию Т-лимфоцитов в ответ на стимуляцию аутологичными не Т-клетками, среди которых наиболее эффективными стимуляторами являются ДК [86, 199]. Хотя доминирующей субпопуляцией отвечающих клеток считаются $CD4^+CD45RA^+$ Т-лимфоциты [82], наивные $CD8^+$ Т-клетки также пролиферируют в ауто-СКЛ [54]. Предполагается, что пролиферации подвержены Т-лимфоциты с низкоаффинными Т-клеточными рецепторами, распознающими собственные антигены МНС в комплексе с аутологичными пептидами или модифицированными нуклеогистонами апоптотических клеток [4, 184]. Данная реакция направлена на поддержание пула наивных Т-клеток и является отражением гомеостатической пролиферации Т-лимфоцитов *in vivo* [184]. Однако поскольку пролиферирующие Т-клетки распознают собственные антигены, то их накопление препятствуют поддержанию Т-клеточной толерантности. Учитывая, что $CD4^+$ Т-лимфоциты больных РА подвержены гомеостатической пролиферации [203], выявленный нами ингибирующий эффект ДКдекс в ауто-СКЛ у больных РА свидетельствует о способности этих клеток ограничивать репликацию аутореактивных Т-лимфоцитов и, возможно, участвовать в негативной регуляции гомеостатической пролиферации. Согласно данным Ge Q. с соавт. пролиферация Т-клеток в системе сокультивирования ДК с аутологичными Т-лимфоцитами подвержена негативной регуляции со стороны $CD4^+CD25^+$ Трег

[54]. Результаты настоящего исследования демонстрируют, что угнетение функций аутореактивных Т-клеток под действием ДКдекс опосредуется несколькими механизмами, включая индукцию анергии и апоптоза отвечающих Т-клеток, а также генерацию регуляторных Tr1 клеток.

По способности индуцировать анергию Т-клеток и генерацию Tr1 ИФН-ДКдекс оказались сходными с дексаметазон-модифицированными ИЛ4-ДК, однако, обладали проапоптогенной активностью, нетипичной для ИЛ4-ДКдекс [25, 123]. Кроме того, важно подчеркнуть, что дексаметазон-модифицированные ИЛ4-ДК проявляли ингибирующие эффекты в культурах алло-СКЛ или подавляли ответ на чужеродные антигены, но не аутоантигены в ауто-СКЛ [68].

Способность ИФН-ДКдекс индуцировать анергию Т-клеток обусловлена, по всей видимости, незрелым фенотипом ДК, включая сниженную экспрессию ко-стимуляторных молекул, и повышенную экспрессию TLR2. Усиление экспрессии TLR2 является ответной реакцией на действие глюкокортикоидов и ассоциируется со сниженной секрецией ИЛ-12 и высокой продукцией ИЛ-10 и TGF β [30, 124], способных индуцировать Трег [45]. Исследования показали, что запуск продукции ИЛ-10 при сигналинге через TLR2 связан с активацией в ДК β -катенина, и данный сигнальный путь рассматривается в качестве нового механизма, посредством которого ДК через генерацию Трег могут регулировать аутоиммунное воспаление [103]. Способность ИФН-ДКдекс индуцировать апоптоз Т-клеток обусловлена, по-видимому, повышенной экспрессией молекулы PD-L1, которая при связывании с PD-1 вызывает апоптоз Т-лимфоцитов и коррелирует с толерогенной активностью ДК [42].

Поскольку при РА генерация ИФН-ДК может являться важной патогенетической составляющей, поддерживающей активность процесса, дифференцировка моноцитов в ИФН-ДК может являться мишенью противовоспалительного эффекта медикаментозной терапии. Действительно, сравнение свойств ИФН-ДК у пациентов с двумя режимами терапии показало, что ИФН-ДК больных с пульс-терапией глюкокортикоидами (в комбинации с БМП)

отличаются от ДК больных, получающих БМП, более высоким содержанием промежуточных по степени зрелости $CD14^+CD83^+$ ДК и экспрессией ко-ингибиторной молекулы PD-L1, а также тенденцией к более низкой экспрессии CD86, более высокой продукции IL-6 и в 2 раза меньшей эффективностью в стимуляции пролиферативного ответа Т-клеток в культурах аллогенных МНК. Учитывая, что незрелость ДК, низкая экспрессия ко-стимуляторных молекул, высокая экспрессия PD-L1, а также изменение баланса в сторону Th2/противовоспалительных цитокинов и снижение аллостимуляторной активности характерны для толерогенных ДК [67, 147, 206], полученные результаты свидетельствуют о более выраженном «толерогенном» фенотипе ДК в группе пациентов, получающих пульс-терапию метилпреднизолоном. Это предположение подтверждается и при сравнении показателей аллостимуляторной активности ИФН-ДК у одних и тех же пациентов до и после курса пульс-терапии, продемонстрировавшим значимое снижение способности ИФН-ДК стимулировать пролиферацию Т-клеток в присутствии IL-4 и IFN- α . С другой стороны, отсутствие выраженных изменений ИЛ4-ДК может быть связано с особенностями рекрутирования пациентов в цитируемых исследованиях, т.е. включением в исследование ранее не леченных пациентов или больных после терапии высокими дозами глюкокортикоидов. Согласно данным литературы, ДК, полученные у больных РА при культивировании моноцитов с GM-CSF и IL4, не обладают признаками незрелости и сохраняют стимулирующую активность [47, 63, 145], что расходится с нашими результатами в отношении ИФН-ДК. Эти расхождения могут быть отчасти обусловлены различными свойствами ДК, генерируемых от пациентов, получающих метотрексат, и исключением больных, принимающих высокие дозы стероидов.

Выявленное ингибирующее действие дексаметазона на способность ДК больных стимулировать пролиферацию Т-клеток и продукцию Th1/провоспалительных цитокинов в ауто-СКЛ позволяет предполагать, что хорошо известный противовоспалительный эффект пульс-терапии МП *in vivo*

может быть связан с прямым толерогенным действием глюкокортикоидов на дифференцировку ДК из моноцитов. С другой стороны, глюкокортикоиды могут влиять на субпопуляционный состав циркулирующих моноцитов, являющихся предшественниками ДК. Моноциты представляют собой гетерогенную популяцию, которая включает классические ($CD14^{++}CD16^{-}$), промежуточные ($CD14^{++}CD16^{+}$) и альтернативные ($CD14^{+}CD16^{++}$) субтипы [215]. Оценка указанных субпопуляций у больных РА выявила снижение относительного содержания $CD14^{++}CD16^{-}$ и увеличение доли $CD14^{++}CD16^{+}$ и $CD14^{+}CD16^{++}$ клеток, что согласуется с данными других исследователей о повышенном содержании $CD16^{+}$ моноцитов при РА [146, 158]. Относительно влияния глюкокортикоидов на субпопуляционный состав моноцитов, Dayyani F. с соавт. на здоровых донорах показали, что высокие дозы глюкокортикоидов способны вызывать апоптоз и селективную деплецию $CD16^{+}$ моноцитов в силу более высокой экспрессии на них глюкокортикоидных рецепторов [93]. Fingerle-Rowson G. с соавт. также продемонстрировали кратковременную (в течение недели) деплецию $CD16^{+}$ моноцитов у больных рассеянным склерозом после пульс-терапии глюкокортикоидами [48]. В то же время Liu B. с соавт. наблюдали увеличение доли $CD16^{+}$ клеток с фенотипом промежуточных моноцитов у больных с аутоиммунным увеитом на фоне приема таблетированных форм глюкокортикоидов [93].

Полученные нами результаты впервые продемонстрировали снижение $CD14^{+}CD16^{++}$ клеток у больных РА после пульс-терапии метилпреднизолоном и показали, что уменьшение содержания $CD14^{+}CD16^{++}$ клеток в популяции моноцитов ассоциировалось со снижением эффективности генерируемых ИФН-ДК стимулировать пролиферацию аллогенных Т-клеток. Кроме того, у обследованных нами больных РА была выявлена обратная корреляционная взаимосвязь между относительным содержанием альтернативных моноцитов и способностью генерируемых ИФН-ДК стимулировать пролиферацию аутологичных Т-лимфоцитов. Это позволило сделать заключение о важной роли

CD14⁺CD16⁺⁺ моноцитов в опосредовании эффектов глюкокортикоидов *in vivo* и *in vitro*. Можно предположить, что генерируемые из CD14⁺CD16⁺⁺ моноцитов ИФН-ДК обладают более выраженной стимуляторной активностью и детерминируют более высокую чувствительность ИФН-ДК к толерогенному действию дексаметазона. Аргументами в пользу такого предположения являются данные литературы о том, что CD16⁺ моноциты являются более сильными индукторами воспалительного ответа по сравнению с классическими CD16⁻ моноцитами [215] и дифференцируются в ДК с более выраженным провоспалительным фенотипом [202].

В целом, полученные данные свидетельствуют о том, что ИФН-ДК доноров чувствительны к толерогенному действию глюкокортикоидов и дексаметазон-модифицированные ИФН-ДК не уступают, а по ряду свойств превосходят толерогенный потенциал дексаметазон-индуцированных ИЛ4-ДК. Выявление сохранной чувствительности ИФН-ДК больных РА к действию дексаметазона *in vitro* и высокого толерогенного потенциала ИФН-ДКдекс в отношении аутологичных Т-лимфоцитов обосновывает возможность генерации у больных РА толерогенных ДК на основе ИФН-ДК. При этом изменение субпопуляционного состава моноцитов и индукция толерогенных свойств ИФН-ДК на фоне пульс-терапии метилпреднизолоном у больных ревматоидным артритом свидетельствует об участии антигенпрезентирующих клеток в реализации противовоспалительного эффекта глюкокортикоидов *in vivo*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

Анализ свойств ИФН-ДК у больных РА показал, что эти клетки отличаются от таковых у доноров признаками задержки созревания, более высокой экспрессией ко-ингибиторной молекулы PD-L1 и менее эффективно стимулируют пролиферацию Т-клеток в алло-СКЛ. Тем не менее, ДК больных РА сохраняют чувствительность к толерогенному действию дексаметазона, который индуцирует способность ДК ингибировать пролиферацию и Th1 ответ в алло-СКЛ. Генерируемые у больных ДКдекс характеризуются стабильностью, и их ингибирующий эффект прямо коррелирует с содержанием TLR2⁺ клеток. Проведенные исследования также продемонстрировали, что ИФН-ДКдекс пациентов подавляют пролиферативный ответ аутологичных Т-лимфоцитов в ауто-СКЛ и антиген (PPD)-стимулированных культурах. Причем ингибция аутореактивных Т-клеток опосредуется путем индукции апоптоза и анергии, а

также генерации регуляторных $CD4^{+}$ Т-клеток, секретирующих IL-10 (Tr1). Эти данные свидетельствуют о возможности генерации у больных РА толерогенных ИФН-ДК, способных супрессировать функции аутологичных Т-лимфоцитов.

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

ВЫВОДЫ

1. Генерируемые в присутствии дексаметазона ИФН-ДК доноров характеризуются сниженным относительным количеством $CD83^+$ и $CD86^+$ ДК и повышенным содержанием $CD14^+$, $TLR2^+$ и $PD-L1^+$ ДК, выраженным угнетением продукции $TNF-\alpha$, а также способностью ингибировать пролиферацию Т-клеток и продукцию цитокинов в алло-СКЛ, что свидетельствует о приобретении толерогенных свойств ИФН-ДК под действием глюкокортикоидов.
2. ИФН-ДКдекс доноров отличаются от ИЛ4-ДКдекс более высоким содержанием $CD14^+$ и $TLR2^+$ ДК, в большей степени ингибируют пролиферацию Т-клеток и подавляют продукцию $Th1$ /провоспалительных цитокинов ($IL-1\beta$, $TNF-\alpha$, $IL-2$, $IFN-\gamma$) в отсутствии супрессорного действия на $Th2$ ($IL-4$, $IL-13$) цитокины, что указывает на более выраженные толерогенные свойства дексаметазон-модифицированных ИФН-ДК.
3. ИФН-ДК больных РА отличаются от ДК доноров меньшим содержанием $CD83^+$ ДК, большей долей $CD14^+$ и $PD-L1^+$ ДК и умеренно сниженной аллостимуляторной активностью. При этом дексаметазон в культурах ИФН-ДК вызывает дальнейшее снижение доли $CD83^+$ ДК, подавляет продукцию $TNF-\alpha$ и индуцирует способность ДК ингибировать пролиферацию Т-клеток и продукцию $Th1$ ($IFN-\gamma$) цитокинов в алло-СКЛ, что свидетельствует о сохранной чувствительности ИФН-ДК больных к действию глюкокортикоидов.
4. ИФН-ДКдекс больных РА подавляют пролиферацию аутологичных Т-клеток в ауто-СКЛ, что сопряжено с блокированием клеточного цикла $CD4^+$ Т-лимфоцитов, угнетением продукции $Th1$ ($IFN-\gamma$), $Th17$ ($IL-17$) и в меньшей степени $Th2$ ($IL-13$, $IL-4$) цитокинов; усилением апоптоза $CD3^+$ Т-лимфоцитов и возрастанием $CD4^+$ Т-клеток, экспрессирующих $IL-10$ ($Tr1$), свидетельствуя,

что ингибирующий эффект ИФН-ДКдекс на аутореактивные Т-клетки реализуется с вовлечением нескольких механизмов.

5. Усиление экспрессии PD-L1 на генерируемых ИФН-ДК и снижение способности ДК стимулировать пролиферацию Т-клеток в алло-СКЛ у больных РА при проведении пульс-терапии метилпреднизолоном ассоциировано со снижением в популяции доли $CD14^{+}CD16^{++}$ моноцитов и увеличением содержания $CD14^{+}CD16^{-}$ клеток, что свидетельствует об индукции толерогенных свойств ИФН-ДК на фоне терапии глюкокортикоидами и причастности моноцитов к опосредованию эффектов глюкокортикоидов на функции ИФН-ДК *in vivo*.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АИЗ	Аутоиммунные заболевания
АПК	Антиген презентирующие клетки
БМП	Болезнь модифицирующие препараты
ГКС	Глюкокортикостероиды
ДК	Дендритные клетки
ДКдекс	Дендритные клетки, генерированные в присутствии дексаметазона
ИЛ-4ДК	Дендритные клетки, генерированные в присутствии интерлейкина-4
ИФН-ДК	Дендритные клетки, генерированные в присутствии интерферона-альфа
контрДК	Дендритные клетки, генерированные в отсутствии дексаметазона
мДК	Миелоидные дендритные клетки
МНК	Мононуклеарные клетки
мо-ДК	Дендритные клетки моноцитарного происхождения
МП	Метилпреднизолон
пДК	Плазмоцитоидные дендритные клетки
РА	Ревматоидный артрит
СКЛ	Смешанная культура лимфоцитов
тДК	Толерогенные дендритные клетки
Трег	Регуляторные Т клетки
APRIL	Лиганд, индуцирующий пролиферацию
BAFF	Фактор, активирующий В-клетки
CCR-7	С-С рецептор хемокина 7
CD	Кластер дифференцировки

DMARDS	Болезнь модифицирующие антиревматические препараты
GM-CSF	Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
HLA-DR	МНС II класса
HO-1	Гемоксигеназа-1
HSPs	Белки теплового шока
IDO	Индолеамин-2,3-диоксигеназа
IFN- α	Интерферон-альфа
IFN γ	Интерферон-гамма
IL-2, IL-4и др.	Интерлейкин 2, интерлейкин 4 и др.
LPS	Липополисахарид
МНС I, МНС II	Молекулы главного комплекса гистосовместимости I и II класса
NF κ B	Ядерный фактор κ B
NK	Натуральные киллерные клетки
PD-1L	Лиганд к рецептору программированной клеточной смерти-1
PSGL-1	Гликопротеиновый лиганд Р-селектина 1
RANKL	Лиганд к рецептору-активатору ядерного фактора κ B
TCR	Т-клеточный рецептор
TGF β	Трансформирующий фактор роста-бетта
Th1, Th2, Th17	Субпопуляции Т-хелперных клеток 1,2, 17 типов
TNF α	Фактор некроза опухоли альфа
TLR	Toll-подобные рецепторы
Tr1	Интерлейкин-10 продуцирующие Т регуляторные клетки
TSLP	Тимический стромальный липопротеин
VitD3	1,25-дигидрокси-витамин D3

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Насонов Е.Л. Ревматоидный артрит Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – С. 290–331.
2. Ahmed M.S. Dendritic Cell-based Immunotherapy for Rheumatoid Arthritis: from Bench to Bedside / M. S. Ahmed, Y.-S. Bae // Immune Netw. – 2016. – Vol. 16-№ 1 – P. 44.
3. Almawi W.Y. Regulation of cytokine and cytokine receptor expression by glucocorticoids. / W. Y. Almawi, H. N. Beyhum, A. A. Rahme, M. J. Rieder // J. Leukoc. Biol. – 1996. – Vol. 60.- № 5 – P. 563–72.
4. Amel Kashipaz M.R. Human autologous mixed lymphocyte reaction as an in vitro model for autoreactivity to apoptotic antigens. / M. R. Amel Kashipaz, M. L. Huggins, R. J. Powell, I. Todd // Immunology – 2002. – Vol. 107.-№ 3 – P. 358–65.
5. Anderson A.E. Differential regulation of naïve and memory CD4 + T cells by alternatively activated dendritic cells / A. E. Anderson, B. L. Sayers, M. A. Haniffa, D. J. Swan, J. Diboll, X.-N. Wang, J. D. Isaacs, C. M. U. Hilkens // J. Leukoc. Biol. – 2008. – Vol. 84.- № 1 – P.124–133.
6. Arkema E. V Are patients with rheumatoid arthritis still at an increased risk of tuberculosis and what is the role of biological treatments? / E. V Arkema, J. Jonsson, E. Baecklund, J. Bruchfeld, N. Feltelius, J. Askling, ARTIS Study Group // Ann. Rheum. Dis. – 2015. – Vol. 74.-№ 6 – P.1212–7.
7. Arya S.K. Dexamethasone-mediated inhibition of human T cell growth factor and gamma-interferon messenger RNA. / S. K. Arya, F. Wong-Staal, R. C. Gallo // J. Immunol. – 1984. – Vol. 133.-№ 1 –P. 273–6.
8. Balanescu A. Early and late effect of infliximab on circulating dendritic cells phenotype in rheumatoid arthritis patients. / A. Balanescu, E. Radu, R. Nat, T. Regalia, V. Bojinca, R. Ionescu, S. Balanescu, C. Savu, D. Predeteanu // Int. J. Clin. Pharmacol. Res. – 2005. – Vol. 25 – № 1 – P. 9–18.
9. Baldwin H.M. Tumour necrosis factor alpha blockade impairs dendritic cell survival

- and function in rheumatoid arthritis / H. M. Baldwin, T. Ito-Ihara, J. D. Isaacs, C. M. U. Hilkens // *Ann. Rheum. Dis.* – 2010. – Vol. 69 – № 6 – P.1200–1207.
10. Bell G.M. Autologous tolerogenic dendritic cells for rheumatoid and inflammatory arthritis / G. M. Bell, A. E. Anderson, J. Diboll, R. Reece, O. Eltherington, R. A. Harry, T. Fouweather, C. MacDonald, T. Chadwick, E. McColl, J. Dunn, A. M. Dickinson, C. M. U. Hilkens, J. D. Isaacs // *Ann. Rheum. Dis.* – 2017. – Vol. 76 – № 1 – P. 227–234.
11. Bella S. Della Functional repertoire of dendritic cells generated in granulocyte macrophage-colony stimulating factor and interferon- α / S. Della Bella, S. Nicola, A. Riva, M. Biasin, M. Clerici, M. L. Villa // *J. Leukoc. Biol.* – 2004. – Vol. 75 – № 1 – P. 106–116.
12. Benham H. Citrullinated peptide dendritic cell immunotherapy in HLA risk genotype–positive rheumatoid arthritis patients / H. Benham, H. J. Nel, S. C. Law, A. M. Mehdi, S. Street, N. Ramnoruth, H. Pahau, B. T. Lee, J. Ng, M. E. G. Brunck, C. Hyde, L. A. Trouw, N. L. Dudek, A. W. Purcell, B. J. O’Sullivan, J. E. Connolly, S. K. Paul, K.-A. Lê Cao, R. Thomas // *Sci. Transl. Med.* – 2015. – Vol. 7 – № 290 – P. 290ra87-290ra87.
13. Bettelli E. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. / E. Bettelli, Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T. B. Strom, M. Oukka, H. L. Weiner, V. K. Kuchroo // *Nature* – 2006. – Vol. 441 – № 7090 – P. 235–8.
14. Bianco N.R. Therapeutic effect of exosomes from indoleamine 2,3-dioxygenase-positive dendritic cells in collagen-induced arthritis and delayed-type hypersensitivity disease models / N. R. Bianco, S. H. Kim, M. A. Ruffner, P. D. Robbins // *Arthritis Rheum.* – 2009. – Vol. 60 – № 2 – P. 380–389.
15. Blanco P. Induction of dendritic cell differentiation by IFN- α in systemic lupus erythematosus. / P. Blanco, A. K. Palucka, M. Gill, V. Pascual, J. Banchereau // *Science* – 2001. – Vol. 294 – № 5546 – P.1540–3.
16. Boissier M.-C. Rheumatoid arthritis: from autoimmunity to synovitis and joint destruction. / M.-C. Boissier, L. Semerano, S. Challal, N. Saidenberg-Kermanac’h, G.

Falgarone // J. Autoimmun. – 2012. – Vol. 39 – № 3 – P.222–8.

17. Boltjes A. Human Dendritic Cell Functional Specialization in Steady-State and Inflammation / A. Boltjes, F. van Wijk // Front. Immunol. – 2014. – Vol. 5:131

18. Bombardieri M. A BAFF/APRIL-dependent TLR3-stimulated pathway enhances the capacity of rheumatoid synovial fibroblasts to induce AID expression and Ig class-switching in B cells. / M. Bombardieri, N.-W. Kam, F. Brentano, K. Choi, A. Filer, D. Kyburz, I. B. McInnes, S. Gay, C. Buckley, C. Pitzalis // Ann. Rheum. Dis. – 2011. – Vol. 70 – № 10 – P.1857–65.

19. Bosma B.M. Dexamethasone transforms lipopolysaccharide-stimulated human blood myeloid dendritic cells into myeloid dendritic cells that prime interleukin-10 production in T cells / B. M. Bosma, H. J. Metselaar, N. M. A. Nagtzaam, R. de Haan, S. Mancham, L. J. W. van der Laan, E. J. Kuipers, J. Kwekkeboom // Immunology – 2008. – Vol. 125 – № 1 – P. 91–100.

20. Broder A. Dendritic cells: An important link between antiphospholipid antibodies, endothelial dysfunction, and atherosclerosis in autoimmune and non-autoimmune diseases / A. Broder, J. J. Chan, C. Putterman // Clin. Immunol. – 2013. – Vol. 146 – № 3 – P. 197–206.

21. Brusko T.M. An integral role for heme oxygenase-1 and carbon monoxide in maintaining peripheral tolerance by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. / T. M. Brusko, C. H. Wasserfall, A. Agarwal, M. H. Kapturczak, M. A. Atkinson // J. Immunol. – 2005. – Vol. 174 – № 9 – P. 5181–6.

22. Bubnoff D. Von Identification of IDO-Positive and IDO-Negative Human Dendritic Cells after Activation by Various Proinflammatory Stimuli / D. Von Bubnoff, M. Scheler, H. Wilms, R. Fimmers, T. Bieber // J. Immunol. – 2011. – Vol. 186 – № 12 – P. 6701–6709.

23. Buckland J. First-in-human phase I trial of DC immunotherapy for early RA / J. Buckland // Nat. Rev. Rheumatol. – 2015. – Vol. 11 – № 8 – P. 443–443.

24. Calabresi E. One year in review 2018: pathogenesis of rheumatoid arthritis. / E. Calabresi, F. Petrelli, A. F. Bonifacio, I. Puxeddu, A. Alunno // Clin. Exp. Rheumatol. –

Vol. 36 – № 2 – P. 175–184.

25. Calmette J. Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper Enhanced Expression in Dendritic Cells Is Sufficient To Drive Regulatory T Cells Expansion In Vivo / J. Calmette, M. Ellouze, T. Tran, S. Karaki, E. Ronin, F. Capel, M. Pallardy, F. Bachelier, R. Krzysiek, D. Emilie, G. Schlecht-Louf, V. Godot // J. Immunol. – 2014. – Vol. 193 – № 12 – P. 5863–5872.
26. Canning M.O. Opposing effects of dehydroepiandrosterone and dexamethasone on the generation of monocyte-derived dendritic cells. / M. O. Canning, K. Grotenhuis, H. J. de Wit, H. A. Drexhage // Eur. J. Endocrinol. – 2000. – Vol. 143 – № 5 – P. 687–95.
27. Cantini F. Biologics and tuberculosis risk: the rise and fall of an old disease and its new resurgence. / F. Cantini, D. Goletti // J. Rheumatol. Suppl. – 2014. – Vol. 91 – P. 1–3.
28. Carlberg C. Current understanding of the function of the nuclear vitamin D receptor in response to its natural and synthetic ligands. / C. Carlberg // Recent Results Cancer Res. – 2003. – Vol. 164 – P.29–42.
29. Cassani B. Vitamin A and immune regulation: Role of retinoic acid in gut-associated dendritic cell education, immune protection and tolerance / B. Cassani, E. J. Villablanca, J. De Calisto, S. Wang, J. R. Mora // Mol. Aspects Med. – 2012. – Vol. 33 – № 1 – P. 63–76.
30. Chamorro S. TLR Triggering on Tolerogenic Dendritic Cells Results in TLR2 Up-Regulation and a Reduced Proinflammatory Immune Program / S. Chamorro, J. J. Garcia-Vallejo, W. W. J. Unger, R. J. Fernandes, S. C. M. Bruijns, S. Laban, B. O. Roep, B. A. 't Hart, Y. van Kooyk // J. Immunol. – 2009. – Vol. 183 – № 5 – P.2984–2994.
31. Chauveau C. Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cell maturation and proinflammatory function but conserves IL-10 expression / C. Chauveau // Blood – 2005. – Vol. 106 – № 5 – P. 1694–1702.
32. Chen E. Restricted cytokine expression in rheumatoid arthritis. / E. Chen, E. C. Keystone, E. N. Fish // Arthritis Rheum. – 1993. – Vol. 36 – № 7 – P. 901–10.

33. Chen K. Tissue-resident dendritic cells and diseases involving dendritic cell malfunction / K. Chen, J. M. Wang, R. Yuan, X. Yi, L. Li, W. Gong, T. Yang, L. Li, S. Su // *Int. Immunopharmacol.* – 2016. – Vol. 34 – P. 1–15.
34. Choy E.H. The problem of choice: current biologic agents and future prospects in RA. / E. H. Choy, A. F. Kavanaugh, S. A. Jones // *Nat. Rev. Rheumatol.* – 2013. – Vol. 9 – № 3 – P. 154–63.
35. Collin M. Human dendritic cell subsets: an update / M. Collin, V. Bigley // *Immunology* – 2018. – Vol. 154 – № 1 – P. 3–20.
36. Collin M. Human dendritic cell subsets / M. Collin, N. McGovern, M. Haniffa // *Immunology* – 2013. – Vol. 140 – № 1 – P. 22–30.
37. Conti L. Role of the cytokine environment and cytokine receptor expression on the generation of functionally distinct dendritic cells from human monocytes / L. Conti, M. Cardone, B. Varano, P. Puddu, F. Belardelli, S. Gessani // *Eur. J. Immunol.* – 2008. – Vol. 38 – № 3 – P. 750–762.
38. Conti L. GM-CSF in the generation of dendritic cells from human blood monocyte precursors: Recent advances / L. Conti, S. Gessani // *Immunobiology* – 2008. – Vol. 213 – № 9–10 – P. 859–870.
39. Corinti S. Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. / S. Corinti, C. Albanesi, A. la Sala, S. Pastore, G. Girolomoni // *J. Immunol.* – 2001. – Vol. 166 – № 7 – P. 4312–8.
40. Corsiero E. Single cell cloning and recombinant monoclonal antibodies generation from RA synovial B cells reveal frequent targeting of citrullinated histones of NETs / E. Corsiero, M. Bombardieri, E. Carlotti, F. Pratesi, W. Robinson, P. Migliorini, C. Pitzalis // *Ann. Rheum. Dis.* – 2016. – Vol. 75 – № 10 – P. 1866–1875.
41. Cosway E. The thymus and rheumatology / E. Cosway, G. Anderson, P. Garside, C. Prendergast // *Curr. Opin. Rheumatol.* – 2016. – Vol. 28 – № 2 – P. 189–195.
42. Dai S. The PD-1/PD-Ls pathway and autoimmune diseases / S. Dai, R. Jia, X. Zhang, Q. Fang, L. Huang // *Cell. Immunol.* – 2014. – Vol. 290 – № 1 – P. 72–79.
43. Dayer J.-M. Therapeutic targets in rheumatoid arthritis: the interleukin-6 receptor /

- J.-M. Dayer, E. Choy // *Rheumatology* – 2010. – Vol. 49 – № 1 – P. 15–24.
44. Delgado Alves J. Non-tumor necrosis factor-based biologic therapies for rheumatoid arthritis: present, future, and insights into pathogenesis / J. Delgado Alves, F. S. Paula // *Biol. Targets Ther.* – 2014. – Vol.8-P. 1-12.
45. Domogalla M.P. Tolerance through Education: How Tolerogenic Dendritic Cells Shape Immunity. / M. P. Domogalla, P. V Rostan, V. K. Raker, K. Steinbrink // *Front. Immunol.* – 2017. – Vol. 8 – P.1764.
46. Edrees A.F. Anti-tumor necrosis factor (TNF) therapy in rheumatoid arthritis: correlation of TNF-alpha serum level with clinical response and benefit from changing dose or frequency of infliximab infusions. / A. F. Edrees, S. N. Misra, N. I. Abdou // *Clin. Exp. Rheumatol.* – Vol. 23 – № 4 – P.469–74.
47. Estrada-Capetillo L. Induction of Th17 Lymphocytes and Treg Cells by Monocyte-Derived Dendritic Cells in Patients with Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus / L. Estrada-Capetillo, B. Hernández-Castro, A. Monsiváis-Urenda, C. Alvarez-Quiroga, E. Layseca-Espinosa, C. Abud-Mendoza, L. Baranda, A. Urzainqui, F. Sánchez-Madrid, R. González-Amaro // *Clin. Dev. Immunol.* – 2013. – Vol. 2013 – P. 1–9.
48. Fingerle-Rowson G. Selective depletion of CD14⁺ CD16⁺ monocytes by glucocorticoid therapy. / G. Fingerle-Rowson, M. Angstwurm, R. Andreessen, H. W. Ziegler-Heitbrock // *Clin. Exp. Immunol.* – 1998. – Vol. 112 – № 3 – P. 501–6.
49. Firestein G.S. Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis / G. S. Firestein, I. B. McInnes // *Immunity* – 2017. – Vol. 46 – № 2 – P. 183–196.
50. Franzke A. G-CSF as immune regulator in T cells expressing the G-CSF receptor: implications for transplantation and autoimmune diseases. / A. Franzke, W. Piao, J. Lauber, P. Gatzlaff, C. Könecke, W. Hansen, A. Schmitt-Thomsen, B. Hertenstein, J. Buer, A. Ganser // *Blood* – 2003. – Vol. 102 – № 2 – P. 734–9.
51. Furue M. Differential inhibition of the T cell activation pathway by dexamethasone and cyclosporine. / M. Furue, Y. Kawakami, T. Kawakami, S. I. Katz // *Transplantation* – 1990. – Vol. 49 – № 3 – P. 560–4.

52. García-González P. A short protocol using dexamethasone and monophosphoryl lipid A generates tolerogenic dendritic cells that display a potent migratory capacity to lymphoid chemokines / P. García-González, R. Morales, L. Hoyos, J. Maggi, J. Campos, B. Pesce, D. Gárate, M. Larrondo, R. González, L. Soto, V. Ramos, P. Tobar, M. Molina, K. Pino-Lagos, D. Catalán, J. Aguillón // *J. Transl. Med.* – 2013. – Vol. 11 – № 1 – P. 128.
53. García-González P.A. Treatment with Dexamethasone and Monophosphoryl Lipid A Removes Disease-Associated Transcriptional Signatures in Monocyte-Derived Dendritic Cells from Rheumatoid Arthritis Patients and Confers Tolerogenic Features / P. A. García-González, K. Schinnerling, A. Sepúlveda-Gutiérrez, J. Maggi, L. Hoyos, R. A. Morales, A. M. Mehdi, H. J. Nel, L. Soto, B. Pesce, M. C. Molina, M. Cuchacovich, M. L. Larrondo, Ó. Neira, D. F. Catalán, C. M. Hilkens, R. Thomas, R. A. Verdugo, J. C. Aguillón // *Front. Immunol.* – 2016. – Vol. 7:458
54. Ge Q. Homeostatic T cell proliferation in a T cell-dendritic cell coculture system / Q. Ge, D. Palliser, H. N. Eisen, J. Chen // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2002. – Vol. 99 – № 5 – P. 2983–2988.
55. Gessani S. Type I Interferons as Regulators of Human Antigen Presenting Cell Functions / S. Gessani, L. Conti, M. Del Cornò, F. Belardelli // *Toxins (Basel)*. – 2014. – Vol. 6 – № 6 – P. 1696–1723.
56. Gordon J.R. Regulatory Dendritic Cells for Immunotherapy in Immunologic Diseases / J. R. Gordon, Y. Ma, L. Churchman, S. A. Gordon, W. Dawicki // *Front. Immunol.* – 2014. – Vol. 5:7
57. Gottenberg J.-E. Dendritic cells and interferon-mediated autoimmunity. / J.-E. Gottenberg, G. Chiochia // *Biochimie* –2007- Vol. 89 – № 6–7 – P.856–71.
58. Gregori S. The Cellular and Molecular Mechanisms of Immuno-Suppression by Human Type 1 Regulatory T Cells / S. Gregori, K. S. Goudy, M. G. Roncarolo // *Front. Immunol.* – 2012. – T. 3:30
59. Grohmann U. Reverse signaling through GITR ligand enables dexamethasone to activate IDO in allergy / U. Grohmann, C. Volpi, F. Fallarino, S. Bozza, R. Bianchi, C.

Vacca, C. Orabona, M. L. Belladonna, E. Ayroldi, G. Nocentini, L. Boon, F. Bistoni, M. C. Fioretti, L. Romani, C. Riccardi, P. Puccetti // *Nat. Med.* – 2007. – Vol. 13 – № 5 – P. 579–586.

60. Guo Q. Rheumatoid arthritis: pathological mechanisms and modern pharmacologic therapies / Q. Guo, Y. Wang, D. Xu, J. Nossent, N. J. Pavlos, J. Xu // *Bone Res.* – 2018. – Vol. 6 – № 1 – P.15.

61. Hackstein H. Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs / H. Hackstein, A. W. Thomson // *Nat. Rev. Immunol.* – 2004. – Vol. 4 – № 1 – P. 24–35.

62. Hampel U. Chemokine and cytokine levels in osteoarthritis and rheumatoid arthritis synovial fluid / U. Hampel, S. Sesselmann, P. Iserovich, S. Sel, F. Paulsen, R. Sack // *J. Immunol. Methods* – 2013. – Vol. 396 – № 1–2 – P. 134–139.

63. Harry R.A. Generation and characterisation of therapeutic tolerogenic dendritic cells for rheumatoid arthritis / R. A. Harry, A. E. Anderson, J. D. Isaacs, C. M. U. Hilkens // *Ann. Rheum. Dis.* – 2010. – Vol. 69 – № 11 – P. 2042–2050.

64. Hartung T. Effect of granulocyte colony-stimulating factor treatment on ex vivo blood cytokine response in human volunteers. / T. Hartung, W. D. Döcke, F. Gantner, G. Krieger, A. Sauer, P. Stevens, H. D. Volk, A. Wendel // *Blood* – 1995. – Vol. 85 – № 9 – P. 2482–9.

65. Heuvel M.M. van den Glucocorticoids modulate the development of dendritic cells from blood precursors. / M. M. van den Heuvel, N. M. van Beek, E. Broug-Holub, P. E. Postmus, E. C. Hoefsmit, R. H. Beelen, G. Kraal // *Clin. Exp. Immunol.* – 1999. – Vol. 115 – № 3 – P. 577–83.

66. Hickman S.P. Homeostatic T cell proliferation as a barrier to T cell tolerance / S. P. Hickman, L. A. Turka // *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* – 2005. – Vol. 360 – № 1461 – P. 1713–1721.

67. Hilkens C.M.U. Tolerogenic Dendritic Cells in Clinical Practice / C. M. U. Hilkens, J. D. Isaacs // *Open Arthritis J.* – 2010. – Vol. 3 – № 2 – P. 8–12.

68. Hilkens C.M.U. Tolerogenic dendritic cell therapy for rheumatoid arthritis: where

- are we now? / C. M. U. Hilkens, J. D. Isaacs // Clin. Exp. Immunol. – 2013. – Vol. 172 – № 2 – P. 148–157.
69. Hochweller K. A novel CD11c.DTR transgenic mouse for depletion of dendritic cells reveals their requirement for homeostatic proliferation of natural killer cells / K. Hochweller, J. Striegler, G. J. Hämmerling, N. Garbi // Eur. J. Immunol. – 2008. – Vol. 38 – № 10 – P. 2776–2783.
70. Hori S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. / S. Hori, T. Nomura, S. Sakaguchi // Science – 2003. – Vol. 299 – № 5609 – P. 1057–61.
71. Hori S. Pillars Article: Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3. Science 2003. 299: 1057-1061. / S. Hori, T. Nomura, S. Sakaguchi // J. Immunol. – 2017. – Vol. 198 – № 3 – P. 981–985.
72. Hu J. Tolerogenic dendritic cells and their potential applications / J. Hu, Y. Wan // Immunology – 2011. – Vol. 132 – № 3 – P. 307–314.
73. Hubo M. Costimulatory Molecules on Immunogenic Versus Tolerogenic Human Dendritic Cells / M. Hubo, B. Trinschek, F. Kryczanowsky, A. Tuetttenberg, K. Steinbrink, H. Jonuleit // Front. Immunol. – 2013. – T. 4:82
74. Huppa J.B. T-cell-antigen recognition and the immunological synapse / J. B. Huppa, M. M. Davis // Nat. Rev. Immunol. – 2003. – Vol. 3 – № 12 – P. 973–983.
75. Joffre O.P. Cross-presentation by dendritic cells / O. P. Joffre, E. Segura, A. Savina, S. Amigorena // Nat. Rev. Immunol. – 2012. – Vol. 12 – № 8 – P. 557–569.
76. Jongbloed S.L. Plasmacytoid dendritic cells regulate breach of self-tolerance in autoimmune arthritis. / S. L. Jongbloed, R. A. Benson, M. B. Nickdel, P. Garside, I. B. McInnes, J. M. Brewer // J. Immunol. – 2009. – Vol. 182 – № 2 – P. 963–8.
77. Jongbloed S.L. Enumeration and phenotypical analysis of distinct dendritic cell subsets in psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis. / S. L. Jongbloed, M. C. Lebre, A. R. Fraser, J. A. Gracie, R. D. Sturrock, P. P. Tak, I. B. McInnes // Arthritis Res. Ther. – 2006. – Vol. 8 – № 1 – P. 15.
78. Jonuleit H. Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells. / H. Jonuleit, E. Schmitt, K. Steinbrink, A. H. Enk // Trends Immunol. – 2001. – Vol. 22 –

№ 7 – P. 394–400.

79. Ketelhuth D. Cellular immunity, low-density lipoprotein and atherosclerosis: Break of tolerance in the artery wall / D. Ketelhuth, G. Hansson // *Thromb. Haemost.* – 2011. – Vol. 106 – № 11 – P. 779–786.
80. Khan S. Dendritic cells as targets for therapy in rheumatoid arthritis / S. Khan, J. D. Greenberg, N. Bhardwaj // *Nat. Rev. Rheumatol.* – 2009. – Vol. 5 – № 10 – P. 566–571.
81. Kim S.H. Effective treatment of established mouse collagen-induced arthritis by systemic administration of dendritic cells genetically modified to express FasL. / S. H. Kim, S. Kim, T. J. Oligino, P. D. Robbins // *Mol. Ther.* – 2002. – Vol. 6 – № 5 – P. 584–90.
82. Kimura S. Impaired autologous mixed-lymphocyte reaction of peripheral blood lymphocytes in adult periodontitis. / S. Kimura, N. Fujimoto, H. Okada // *Infect. Immun.* – 1991. – Vol. 59 – № 12 – P. 4418–24.
83. Klarenbeek P.L. Inflamed target tissue provides a specific niche for highly expanded T-cell clones in early human autoimmune disease / P. L. Klarenbeek, M. J. H. de Hair, M. E. Doorenspleet, B. D. C. van Schaik, R. E. E. Esveldt, M. G. H. van de Sande, T. Cantaert, D. M. Gerlag, D. Baeten, A. H. C. van Kampen, F. Baas, P. P. Tak, N. de Vries // *Ann. Rheum. Dis.* – 2012. – Vol. 71 – № 6 – P. 1088–1093.
84. Klareskog L. Rheumatoid arthritis / L. Klareskog, A. I. Catrina, S. Paget // *Lancet* – 2009. – Vol. 373 – № 9664 – P. 659–672.
85. Koike T. Postmarketing surveillance of tocilizumab for rheumatoid arthritis in Japan: interim analysis of 3881 patients. / T. Koike, M. Harigai, S. Inokuma, N. Ishiguro, J. Ryu, T. Takeuchi, S. Takei, Y. Tanaka, K. Ito, H. Yamanaka // *Ann. Rheum. Dis.* – 2011. – Vol. 70 – № 12 – P. 2148–51.
86. Kondo T. Dendritic cells signal T cells in the absence of exogenous antigen / T. Kondo, I. Cortese, S. Markovic-Plese, K.-P. Wandinger, C. Carter, M. Brown, S. Leitman, R. Martin // *Nat. Immunol.* – 2001. – Vol. 2 – № 10 – P. 932–938.
87. Kooten C. van Handbook of Experimental Pharmacology “Dendritic Cells” - 2009– P. 233–249.

88. Kuipers H. Contribution of the PD-1 ligands/PD-1 signaling pathway to dendritic cell-mediated CD4⁺ T cell activation / H. Kuipers, F. Muskens, M. Willart, D. Hijdra, F. B. J. van Assema, A. J. Coyle, H. C. Hoogsteden, B. N. Lambrecht // *Eur. J. Immunol.* – 2006. – Vol. 36 – № 9 – P. 2472–2482.
89. Lebre M.C. Rheumatoid Arthritis Synovium Contains Two Subsets of CD83–DC–LAMP– Dendritic Cells with Distinct Cytokine Profiles / M. C. Lebre, S. L. Jongbloed, S. W. Tas, T. J. M. Smeets, I. B. McInnes, P. P. Tak // *Am. J. Pathol.* – 2008. – Vol. 172 – № 4 – P. 940–950.
90. Leplina O.Y. Interferon alpha induces generation of semi-mature dendritic cells with high pro-inflammatory and cytotoxic potential / O. Y. Leplina, T. V. Tyrinova, M. A. Tikhonova, A. A. Ostanin, E. R. Chernykh // *Cytokine* – 2015. – Vol. 71 – № 1 – P.1–7.
91. Leung D.Y.M. Update on glucocorticoid action and resistance. / D. Y. M. Leung, J. W. Bloom // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2003. – Vol. 111 – № 1 – P. 23.
92. Li M. Tolerogenic dendritic cells transferring hyporesponsiveness and synergizing T regulatory cells in transplant tolerance / M. Li, X. Zhang, X. Zheng, D. Lian, Z.-X. Zhang, H. Sun, M. Suzuki, C. Vladau, X. Huang, X. Xia, R. Zhong, B. Garcia, W.-P. Min // *Int. Immunol.* – 2008. – Vol. 20 – № 2 – P. 285–293.
93. Liu B. CD14 ++ CD16 + Monocytes Are Enriched by Glucocorticoid Treatment and Are Functionally Attenuated in Driving Effector T Cell Responses / B. Liu, A. Dhanda, S. Hirani, E. L. Williams, H. N. Sen, F. Martinez Estrada, D. Ling, I. Thompson, M. Casady, Z. Li, H. Si, W. Tucker, L. Wei, S. Jawad, A. Sura, J. Dailey, S. Hannes, P. Chen, J. L. Chien, S. Gordon, R. W. J. Lee, R. B. Nussenblatt // *J. Immunol.* – 2015. – Vol. 194 – № 11 – P. 5150–5160.
94. Liu J. Regulatory dendritic cells in autoimmunity: A comprehensive review // *J. Autoimmun.* – 2015. – Vol. 63. – P. 1–12.
95. Lu L. Adenoviral delivery of CTLA4Ig into myeloid dendritic cells promotes their in vitro tolerogenicity and survival in allogeneic recipients / L. Lu, A. Gambotto, W.-C. Lee, S. Qian, C. A. Bonham, P. D. Robbins, A. W. Thomson // *Gene Ther.* – 1999. – Vol. 6 – № 4 – P. 554–563.

96. Lubberts E. The IL-23–IL-17 axis in inflammatory arthritis / E. Lubberts // *Nat. Rev. Rheumatol.* – 2015. – Vol. 11 – № 7 – P. 415–429.
97. Luther C. Prednisolone Treatment Induces Tolerogenic Dendritic Cells and a Regulatory Milieu in Myasthenia Gravis Patients / C. Luther, E. Adamopoulou, C. Stoeckle, V. Brucklacher-Waldert, D. Rosenkranz, L. Stoltze, S. Lauer, S. Poeschel, A. Melms, E. Tolosa // *J. Immunol.* – 2009. – Vol. 183 – № 2 – P. 841–848.
98. Lutz M.B. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? / M. B. Lutz, G. Schuler // *Trends Immunol.* – 2002. – Vol. 23 – № 9 – P. 445–9.
99. Maldonado R.A. How Tolerogenic Dendritic Cells Induce Regulatory T Cells - 2010. – P. 111–165.
100. Maloy K.J. Regulatory T cells in the control of immune pathology / K. J. Maloy, F. Powrie // *Nat. Immunol.* – 2001. – Vol. 2 – № 9 –P. 816–822.
101. Manavalan J.S. High expression of ILT3 and ILT4 is a general feature of tolerogenic dendritic cells / J. S. Manavalan, P. C. Rossi, G. Vlad, F. Piazza, A. Yarilina, R. Cortesini, D. Mancini, N. Suciu-Foca // *Transpl. Immunol.* – 2003. – Vol. 11 – № 3–4 – P. 245–258.
102. Manicassamy S. Toll-like receptor 2–dependent induction of vitamin A–metabolizing enzymes in dendritic cells promotes T regulatory responses and inhibits autoimmunity / S. Manicassamy, R. Ravindran, J. Deng, H. Oluoch, T. L. Denning, S. P. Kasturi, K. M. Rosenthal, B. D. Evavold, B. Pulendran // *Nat. Med.* – 2009. – Vol. 15 – № 4 – P. 401–409.
103. Manoharan I. TLR2-Dependent Activation of β -Catenin Pathway in Dendritic Cells Induces Regulatory Responses and Attenuates Autoimmune Inflammation / I. Manoharan, Y. Hong, A. Suryawanshi, M. L. Angus-Hill, Z. Sun, A. L. Mellor, D. H. Munn, S. Manicassamy // *J. Immunol.* – 2014. – Vol. 193 – № 8 –P. 4203–4213.
104. Matasić R. Dexamethasone inhibits dendritic cell maturation by redirecting differentiation of a subset of cells. / R. Matasić, A. B. Dietz, S. Vuk-Pavlović // *J. Leukoc. Biol.* – 1999. – Vol. 66 – № 6 – P. 909–14.

105. McInnes I.B. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis / I. B. McInnes, G. Schett // *N. Engl. J. Med.* – 2011. – Vol. 365 – № 23 – P. 2205–2219.
106. Mellman I. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. / I. Mellman, R. M. Steinman // *Cell* – 2001. – Vol. 106 – № 3 – P. 255–8.
107. Mellor A. Indoleamine 2,3 dioxygenase and regulation of T cell immunity / A. Mellor // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2005. – Vol. 338 – № 1 – P. 20–24.
108. Menges M. Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. / M. Menges, S. Rössner, C. Voigtländer, H. Schindler, N. A. Kukutsch, C. Bogdan, K. Erb, G. Schuler, M. B. Lutz // *J. Exp. Med.* – 2002. – Vol. 195 – № 1 – P. 15–21.
109. Merad M. The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting / M. Merad, P. Sathe, J. Helft, J. Miller, A. Mortha // *Annu. Rev. Immunol.* – 2013. – Vol. 31 – № 1 – P. 563–604.
110. Meylan E. Intracellular pattern recognition receptors in the host response / E. Meylan, J. Tschopp, M. Karin // *Nature* – 2006. – Vol. 442 – № 7098 – P. 39–44.
111. Min S.-Y. Antigen-induced, tolerogenic CD11c⁺,CD11b⁺ dendritic cells are abundant in Peyer's patches during the induction of oral tolerance to type II collagen and suppress experimental collagen-induced arthritis / S.-Y. Min, K.-S. Park, M.-L. Cho, J.-W. Kang, Y.-G. Cho, S.-Y. Hwang, M.-J. Park, C.-H. Yoon, J.-K. Min, S.-H. Lee, S.-H. Park, H.-Y. Kim // *Arthritis Rheum.* – 2006. – Vol. 54 – № 3 – P. 887–898.
112. Miossec P. Dynamic interactions between T cells and dendritic cells and their derived cytokines/chemokines in the rheumatoid synovium / P. Miossec // *Arthritis Res. Ther.* – 2008. – Vol. 10 – № Suppl 1 – S2.
113. Miossec P. Low levels of interleukin-4 and high levels of transforming growth factor β in rheumatoid synovitis / P. Miossec, M. Naviliat, A. D. D'Angeac, J. Sany, J. Banchereau // *Arthritis Rheum.* – 2010. – Vol. 33 – № 8 – P. 1180–1187.
114. Mogensen K.E. The Type I Interferon Receptor: Structure, Function, and Evolution of a Family Business / K. E. Mogensen, M. Lewerenz, J. Reboul, G. Lutfalla,

G. Uzé // J. Interf. Cytokine Res. – 1999. – Vol. 19 – № 10 – P. 1069–1098.

115. Moreau A. Tolerogenic dendritic cells actively inhibit T cells through heme oxygenase-1 in rodents and in nonhuman primates / A. Moreau, M. Hill, P. Thébault, J. Y. Deschamps, E. Chiffolleau, C. Chauveau, P. Moullier, I. Anegon, B. Alliot-Licht, M. C. Cuturi // FASEB J. – 2009. – Vol. 23 – № 9 – P. 3070–3077.

116. Morelli A.E. Dendritic cells: regulators of alloimmunity and opportunities for tolerance induction. / A. E. Morelli, A. W. Thomson // Immunol. Rev. – 2003. – Vol. 196 – P. 125–46.

117. Moret F.M. Intra-articular CD1c-expressing myeloid dendritic cells from rheumatoid arthritis patients express a unique set of T cell-attracting chemokines and spontaneously induce Th1, Th17 and Th2 cell activity / F. M. Moret, C. E. Hack, K. M. van der Wurff-Jacobs, W. de Jager, T. R. Radstake, F. P. Lafeber, J. A. van Roon // Arthritis Res. Ther. – 2013. – Vol. 15 – № 5 – P. 155.

118. Moret F.M. Thymic Stromal Lymphopoietin, a Novel Proinflammatory Mediator in Rheumatoid Arthritis That Potently Activates CD1c+ Myeloid Dendritic Cells to Attract and Stimulate T Cells / F. M. Moret, C. E. Hack, K. M. G. van der Wurff-Jacobs, T. R. D. J. Radstake, F. P. J. G. Lafeber, J. A. G. van Roon // Arthritis Rheumatol. – 2014. – Vol. 66 – № 5 – P. 1176–1184.

119. Moret F.M. Synovial T cell hyporesponsiveness to myeloid dendritic cells is reversed by preventing PD-1/PD-L1 interactions / F. M. Moret, K. M. van der Wurff-Jacobs, J. W. Bijlsma, F. P. Lafeber, J. A. van Roon // Arthritis Res. Ther. – 2014. – Vol. 16 – № 6 – P. 497.

120. Morris E.S. Donor treatment with pegylated G-CSF augments the generation of IL-10-producing regulatory T cells and promotes transplantation tolerance / E. S. Morris // Blood – 2004. – Vol. 103 – № 9 – P. 3573–3581.

121. Moser M. Glucocorticoids down-regulate dendritic cell function in vitro and in vivo / M. Moser, T. De Smedt, T. Sornasse, F. Tielemans, A. A. Chentoufi, E. Muraille, M. Van Mechelen, J. Urbain, O. Leo // Eur. J. Immunol. – 1995. – Vol. 25 – № 10 – P. 2818–2824.

122. Nakayamada S. Differential effects of biological DMARDs on peripheral immune cell phenotypes in patients with rheumatoid arthritis / S. Nakayamada, S. Kubo, M. Yoshikawa, Y. Miyazaki, N. Yunoue, S. Iwata, I. Miyagawa, S. Hirata, K. Nakano, K. Saito, Y. Tanaka // *Rheumatology* – 2018. – Vol. 57 – № 1 – P. 164–174.
123. Naranjo-Gómez M. Comparative study of clinical grade human tolerogenic dendritic cells / M. Naranjo-Gómez, D. Raïch-Regué, C. Oñate, L. Grau-López, C. Ramo-Tello, R. Pujol-Borrell, E. Martínez-Cáceres, F. E. Borràs // *J. Transl. Med.* – 2011. – Vol. 9 – № 1 – P. 89.
124. Netea M.G. Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. / M. G. Netea, R. Suttmüller, C. Hermann, C. A. A. Van der Graaf, J. W. M. Van der Meer, J. H. van Krieken, T. Hartung, G. Adema, B. J. Kullberg // *J. Immunol.* – 2004. – Vol. 172 – № 6 – P. 3712–8.
125. Niedbala W. IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells / W. Niedbala, X. Wei, B. Cai, A. J. Hueber, B. P. Leung, I. B. McInnes, F. Y. Liew // *Eur. J. Immunol.* – 2007. – Vol. 37 – № 11 – P. 3021–3029.
126. O'Dell J.R. Rheumatoid arthritis / под ред. L. Goldman, A. Schafer. *Goldman's Cecil Medicine*- 2011-Vol. 24 – P. 1681–1689.
127. Obregon C. Update on Dendritic Cell-Induced Immunological and Clinical Tolerance / C. Obregon, R. Kumar, M. A. Pascual, G. Vassalli, D. Golshayan // *Front. Immunol.* – 2017. – Vol. 8.
128. Olsson Åkefeldt S. Targeting BCL2 Family in Human Myeloid Dendritic Cells: A Challenge to Cure Diseases with Chronic Inflammations Associated with Bone Loss / S. Olsson Åkefeldt, M. B. Ismail, H. Valentin, M. Aricò, J.-I. Henter, C. Delprat // *Clin. Dev. Immunol.* – 2013. – Vol. 2013 – P. 1–11.
129. Osorio F. Role of Dendritic Cells in the Induction of Lymphocyte Tolerance / F. Osorio, C. Fuentes, M. N. López, F. Salazar-Onfray, F. E. González // *Front. Immunol.* – 2015. – Vol. 6.

130. Pan L. Pretreatment of donor mice with granulocyte colony-stimulating factor polarizes donor T lymphocytes toward type-2 cytokine production and reduces severity of experimental graft-versus-host disease. / L. Pan, J. Delmonte, C. K. Jalonon, J. L. Ferrara // *Blood* – 1995. – Vol. 86 – № 12 – P. 4422–9.
131. Paquette R. Interferon- α induces dendritic cell differentiation of CML mononuclear cells in vitro and in vivo / R. Paquette, N. Hsu, J. Said, M. Mohammed, N. Rao, G. Shih, G. Schiller, C. Sawyers, J. Glaspy // *Leukemia* – 2002. – Vol. 16 – № 8 – P. 1484–1489.
132. Paquette R.L. Interferon-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor differentiate peripheral blood monocytes into potent antigen-presenting cells. / R. L. Paquette, N. C. Hsu, S. M. Kiertscher, A. N. Park, L. Tran, M. D. Roth, J. A. Glaspy // *J. Leukoc. Biol.* – 1998. – Vol. 64 – № 3 –P. 358–67.
133. Parlato S. Expression of CCR-7, MIP-3beta, and Th-1 chemokines in type I IFN-induced monocyte-derived dendritic cells: importance for the rapid acquisition of potent migratory and functional activities. / S. Parlato, S. M. Santini, C. Lapenta, T. Di Pucchio, M. Logozzi, M. Spada, A. M. Giammarioli, W. Malorni, S. Fais, F. Belardelli // *Blood* – 2001. – Vol. 98 – № 10 – P. 3022–9.
134. Pedersen A.W. Phenotypic and functional markers for 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃-modified regulatory dendritic cells / A. W. Pedersen, K. Holmstrøm, S. S. Jensen, D. Fuchs, S. Rasmussen, P. Kvistborg, M. H. Claesson, M.-B. Zocca // *Clin. Exp. Immunol.* – 2009. – Vol. 157 – № 1 – P. 48–59.
135. Peña C. Dexamethasone Preconditioning Improves the Response of Collagen-Induced Arthritis to Treatment with Short-Term Lipopolysaccharide-Stimulated Collagen-Loaded Dendritic Cells / C. Peña, D. Gárate, J. Contreras-Levicoy, O. Aravena, D. Catalán, J. C. Aguillón // *Clin. Dev. Immunol.* – 2013. – Vol. 2013 – P.1–7.
136. Penna G. 1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. / G. Penna, L. Adorini // *J. Immunol.* – 2000. – Vol. 164 – № 5 – P. 2405–

11.

137. Picca C.C. Role of TCR specificity in CD4+CD25+ regulatory T-cell selection / C. C. Picca, J. Larkin, A. Boesteanu, M. A. Lerman, A. L. Rankin, A. J. Caton // *Immunol. Rev.* – 2006. – Vol. 212 – № 1 – P. 74–85.

138. Piemonti L. Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation. / L. Piemonti, P. Monti, P. Allavena, M. Sironi, L. Soldini, B. E. Leone, C. Socci, V. Di Carlo // *J. Immunol.* – 1999. – Vol. 162 – № 11 – P. 6473–81.

139. Pitzalis C. Ectopic lymphoid-like structures in infection, cancer and autoimmunity / C. Pitzalis, G. W. Jones, M. Bombardieri, S. A. Jones // *Nat. Rev. Immunol.* – 2014. – Vol. 14 – № 7 – P. 447–462.

140. PREVOSTO C. Cytokine Secretion by Pathogen Recognition Receptor-stimulated Dendritic Cells in Rheumatoid Arthritis and Ankylosing Spondylitis / C. PREVOSTO, J. C. GOODALL, J. S. HILL GASTON // *J. Rheumatol.* – 2012. – Vol. 39 – № 10 – P. 1918–1928.

141. Qi H. Extrafollicular Activation of Lymph Node B Cells by Antigen-Bearing Dendritic Cells / H. Qi // *Science* (80-.). – 2006. – Vol. 312 – № 5780 – P. 1672–1676.

142. Qu C. Monocyte-derived dendritic cells: targets as potent antigen-presenting cells for the design of vaccines against infectious diseases / C. Qu, N.-S. Brinck-Jensen, M. Zang, K. Chen // *Int. J. Infect. Dis.* – 2014. – Vol. 19 – P. 1–5.

143. Radstake T.R.D.J. High production of proinflammatory and Th1 cytokines by dendritic cells from patients with rheumatoid arthritis, and down regulation upon Fc R triggering / T. R. D. J. Radstake // *Ann. Rheum. Dis.* – 2004. – Vol. 63 – № 6 – P. 696–702.

144. Radstake T.R.D.J. Increased expression of CCL18, CCL19, and CCL17 by dendritic cells from patients with rheumatoid arthritis, and regulation by Fc gamma receptors / T. R. D. J. Radstake // *Ann. Rheum. Dis.* – 2004. – Vol. 64 – № 3 – P. 359–367.

145. Radstake T.R.D.J. Dendritic cells from patients with rheumatoid arthritis lack the interleukin 13 mediated increase of Fc RII expression, which has clear functional

- consequences / T. R. D. J. Radstake // *Ann. Rheum. Dis.* – 2005. – Vol. 64 – № 12 – P. 1737–1743.
146. Radwan W.M. CD14⁺⁺CD16⁺ monocyte subset expansion in rheumatoid arthritis patients: Relation to disease activity and interleukin-17 / W. M. Radwan, K. A. Khalifa, H. A. Esaily, N. A. Lashin // *Egypt. Rheumatol.* – 2016. – Vol. 38 – № 3 – P. 161–169.
147. Raker V.K. Tolerogenic Dendritic Cells for Regulatory T Cell Induction in Man / V. K. Raker, M. P. Domogalla, K. Steinbrink // *Front. Immunol.* – 2015. – Vol. 6.
148. Raza K. Early rheumatoid arthritis is characterized by a distinct and transient synovial fluid cytokine profile of T cell and stromal cell origin. / K. Raza, F. Falciani, S. J. Curnow, E. J. Ross, C.-Y. Lee, A. N. Akbar, J. M. Lord, C. Gordon, C. D. Buckley, M. Salmon // *Arthritis Res. Ther.* – 2005. – Vol. 7 – № 4 – P. 784–95.
149. Rea D. Glucocorticoids transform CD40-triggering of dendritic cells into an alternative activation pathway resulting in antigen-presenting cells that secrete IL-10. / D. Rea, C. van Kooten, K. E. van Meijgaarden, T. H. Ottenhoff, C. J. Melief, R. Offringa // *Blood* – 2000. – Vol. 95 – № 10 – P. 3162–7.
150. Reynolds G. Synovial CD4⁺ T-cell-derived GM-CSF supports the differentiation of an inflammatory dendritic cell population in rheumatoid arthritis / G. Reynolds, J. R. Gibbon, A. G. Pratt, M. J. Wood, D. Coady, G. Raftery, A. R. Lorenzi, A. Gray, A. Filer, C. D. Buckley, M. A. Haniffa, J. D. Isaacs, C. M. U. Hilkens // *Ann. Rheum. Dis.* – 2016. – Vol. 75 – № 5 – P. 899–907.
151. RICHEZ C. Tocilizumab Treatment Decreases Circulating Myeloid Dendritic Cells and Monocytes, 2 Components of the Myeloid Lineage / c. Richez, t. Barnetche, l. Khoryati, p. Duffau, m. Kostine, c. Contin-bordes, p. Blanco, t. Schaefferbeke // *J. Rheumatol.* – 2012. – Vol. 39 – № 6 – P. 1192–1197.
152. Richez C. Myeloid dendritic cells correlate with clinical response whereas plasmacytoid dendritic cells impact autoantibody development in rheumatoid arthritis patients treated with infliximab / C. Richez, T. Schaefferbeke, C. Dumoulin, J. Dehais, J.-F. Moreau, P. Blanco // *Arthritis Res. Ther.* – 2009. – Vol. 11 – № 3 – P.100.
153. Rissoan M.C. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation.

- / M. C. Rissoan, V. Soumelis, N. Kadowaki, G. Grouard, F. Briere, R. de Waal Malefyt, Y. J. Liu // *Science* – 1999. – Vol. 283 – № 5405 – P. 1183–6.
154. Rodríguez-Carrio J. IFN α Serum Levels Are Associated with Endothelial Progenitor Cells Imbalance and Disease Features in Rheumatoid Arthritis Patients / J. Rodríguez-Carrio, B. de Paz, P. López, C. Prado, M. Alperi-López, F. J. Ballina-García, A. Suárez // *PLoS One* – 2014. – Vol. 9 – № 1 – e86069.
155. Rönnblom L. The interferon signature in autoimmune diseases / L. Rönnblom, M.-L. Eloranta // *Curr. Opin. Rheumatol.* – 2013. – Vol. 25 – № 2 – P. 248–253.
156. Roon J.A.G. van Increased intraarticular interleukin-7 in rheumatoid arthritis patients stimulates cell contact-dependent activation of CD4⁺ T cells and macrophages / J. A. G. van Roon, M. C. Verweij, M. W. Wijk, K. M. G. Jacobs, J. W. J. Bijlsma, F. P. J. G. Lafeber // *Arthritis Rheum.* – 2005. – Vol. 52 – № 6 – P. 1700–1710.
157. Rosa M. Di Vitamin D3: a helpful immuno-modulator / M. Di Rosa, M. Malaguarnera, F. Nicoletti, L. Malaguarnera // *Immunology* – 2011. – Vol. 134 – № 2 – P. 123–139.
158. Rossol M. The CD14 bright CD16⁺ monocyte subset is expanded in rheumatoid arthritis and promotes expansion of the Th17 cell population / M. Rossol, S. Kraus, M. Pierer, C. Baerwald, U. Wagner // *Arthritis Rheum.* – 2012. – Vol. 64 – № 3 – P. 671–677.
159. Rozkova D. Glucocorticoids severely impair differentiation and antigen presenting function of dendritic cells despite upregulation of Toll-like receptors / D. Rozkova, R. Horvath, J. Bartunkova, R. Spisek // *Clin. Immunol.* – 2006. – Vol. 120 – № 3 – P. 60–271.
160. Rubbert-Roth A. Assessing the safety of biologic agents in patients with rheumatoid arthritis. / A. Rubbert-Roth // *Rheumatology (Oxford)*. – 2012. – Vol. 51-Suppl 5 – P. 38-47.
161. Rutella S. Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age / S. Rutella // *Blood* – 2006. – Vol. 108 – № 5 – P. 1435–1440.
162. Sakaguchi S. Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-

- tolerance and autoimmune disease / S. Sakaguchi, M. Ono, R. Setoguchi, H. Yagi, S. Hori, Z. Fehervari, J. Shimizu, T. Takahashi, T. Nomura // *Immunol. Rev.* – 2006. – Vol. 212 – № 1 – P. 8–27.
163. Sallusto F. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. / F. Sallusto, A. Lanzavecchia // *J. Exp. Med.* – 1994. – Vol. 179 – № 4 – P. 1109–18.
164. Santiago-Schwarz F. 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 / F. Santiago-Schwarz, P. Anand, S. Liu, S. E. Carsons // *J. Immunol.* – 2001. – Vol. 167 – № 3 – P. 1758–1768.
165. Santiago B. CXCL12 γ isoform is expressed on endothelial and dendritic cells in rheumatoid arthritis synovium and regulates T cell activation / B. Santiago, E. Izquierdo, P. Rueda, M. J. Del Rey, G. Criado, A. Usategui, F. Arenzana-Seisdedos, J. L. Pablos // *Arthritis Rheum.* – 2012. – Vol. 64 – № 2 – P. 409–417.
166. Santini S.M. Advances in the Use of Dendritic Cells and New Adjuvants for the Development of Therapeutic Vaccines / S. M. Santini, F. Belardelli – 2003. – P. 495–505.
167. Santini S.M. Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice. / S. M. Santini, C. Lapenta, M. Logozzi, S. Parlato, M. Spada, T. Di Pucchio, F. Belardelli // *J. Exp. Med.* – 2000. – Vol. 191 – № 10 – P. 1777–88.
168. Santini S.M. Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice. / S. M. Santini, C. Lapenta, M. Logozzi, S. Parlato, M. Spada, T. Di Pucchio, F. Belardelli // *J. Exp. Med.* – 2000. – Vol. 191 – № 10 – P. 1777–88.
169. Santini S.M. The Natural Alliance Between Type I Interferon and Dendritic Cells and Its Role in Linking Innate and Adaptive Immunity / S. M. Santini, T. Di Pucchio, C.

- Lapenta, S. Parlato, M. Logozzi, F. Belardelli // *J. Interf. Cytokine Res.* – 2002. – Vol. 22 – № 11 – P. 1071–1080.
170. Santini S.M. A New Type I IFN-Mediated Pathway for the Rapid Differentiation of Monocytes into Highly Active Dendritic Cells / S. M. Santini, T. Di Puccio, C. Lapenta, S. Parlato, M. Logozzi, F. Belardelli // *Stem Cells* – 2003. – Vol. 21 – № 3 – P. 357–362.
171. Satpathy A.T. Re(de)fining the dendritic cell lineage / A. T. Satpathy, X. Wu, J. C. Albring, K. M. Murphy // *Nat. Immunol.* – 2012. – Vol. 13 – № 12 – P. 1145–1154.
172. Schuler G. A comparison of murine epidermal Langerhans cells with spleen dendritic cells. / G. Schuler, N. Romani, R. M. Steinman // *J. Invest. Dermatol.* – 1985. – Vol. 85 – № 1 Suppl – P. 99–106.
173. Schultz H.S. Collagen Induces Maturation of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells by Signaling through Osteoclast-Associated Receptor / H. S. Schultz, L. M. Nitze, L. H. Zeuthen, P. Keller, A. Gruhler, J. Pass, J. Chen, L. Guo, A. J. Fleetwood, J. A. Hamilton, M. W. Berchtold, S. Panina // *J. Immunol.* – 2015. – Vol. 194 – № 7 – P. 3169–3179.
174. Segura E. Human Inflammatory Dendritic Cells Induce Th17 Cell Differentiation / E. Segura, M. Touzot, A. Bohineust, A. Cappuccio, G. Chiochia, A. Hosmalin, M. Dalod, V. Soumelis, S. Amigorena // *Immunity* – 2013. – Vol. 38 – № 2 – P. 336–348.
175. Smolen J.S. Treating rheumatoid arthritis to target: recommendations of an international task force. / J. S. Smolen, D. Aletaha, J. W. J. Bijlsma, F. C. Breedveld, D. Boumpas, G. Burmester, B. Combe, M. Cutolo, M. de Wit, M. Dougados, P. Emery, A. Gibofsky, J. J. Gomez-Reino, B. Haraoui, J. Kalden, E. C. Keystone, T. K. Kvien, I. McInnes, E. Martin-Mola, C. Montecucco, M. Schoels, D. van der Heijde, D. van der Heijde, T2T Expert Committee // *Ann. Rheum. Dis.* – 2010. – Vol. 69 – № 4 – P. 631–7.
176. Smolen J.S. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update. / J. S. Smolen, R. Landewé, J. Bijlsma, G. Burmester, K. Chatzidionysiou, M. Dougados, J.

Nam, S. Ramiro, M. Voshaar, R. van Vollenhoven, D. Aletaha, M. Aringer, M. Boers, C. D. Buckley, F. Buttgereit, V. Bykerk, M. Cardiel, B. Combe, M. Cutolo, Y. van Eijk-Hustings, P. Emery, A. Finckh, C. Gabay, J. Gomez-Reino, L. Gossec, J.-E. Gottenberg, J. M. W. Hazes, T. Huizinga, M. Jani, D. Karateev, M. Kouloumas, T. Kvien, Z. Li, X. Mariette, I. McInnes, E. Mysler, P. Nash, K. Pavelka, G. Poór, C. Richez, P. van Riel, A. Rubbert-Roth, K. Saag, J. da Silva, T. Stamm, T. Takeuchi, R. Westhovens, M. de Wit, D. van der Heijde // *Ann. Rheum. Dis.* – 2017. – Vol. 76 – № 6 – P. 960–977.

177. Snir O. Identification and functional characterization of T cells reactive to citrullinated vimentin in HLA-DRB1*0401-positive humanized mice and rheumatoid arthritis patients. / O. Snir, M. Rieck, J. A. Gebe, B. B. Yue, C. A. Rawlings, G. Nepom, V. Malmström, J. H. Buckner // *Arthritis Rheum.* – 2011. – Vol. 63 – № 10 – P. 2873–83.

178. Spierings J. Heat shock proteins and their immunomodulatory role in inflammatory arthritis / J. Spierings, W. van Eden // *Rheumatology* – 2017. – Vol. 56 – № 2 – P. 198–208.

179. Steinman R.M. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. / R. M. Steinman, Z. A. Cohn // *J. Exp. Med.* – 1973. – Vol. 137 – № 5 – P. 1142–62.

180. Steinman R.M. Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance. / R. M. Steinman, D. Hawiger, K. Liu, L. Bonifaz, D. Bonnyay, K. Mahnke, T. Iyoda, J. Ravetch, M. Dhodapkar, K. Inaba, M. Nussenzweig // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2003. – Vol. 987 – P. 15–25.

181. Stocki P. Inducible Heat Shock Protein 70 Reduces T Cell Responses and Stimulatory Capacity of Monocyte-derived Dendritic Cells / P. Stocki, X. N. Wang, A. M. Dickinson // *J. Biol. Chem.* – 2012. – Vol. 287 – № 15 – P. 12387–12394.

182. Stoop J.N. Therapeutic effect of tolerogenic dendritic cells in established collagen-induced arthritis is associated with a reduction in Th17 responses / J. N. Stoop, R. A. Harry, A. von Delwig, J. D. Isaacs, J. H. Robinson, C. M. U. Hilken // *Arthritis Rheum.* – 2010. – Vol. 62 – № 12 – P. 3656–3665.

183. Suda T. High-dose intravenous glucocorticoid therapy abrogates circulating dendritic cells. / T. Suda, K. Chida, H. Matsuda, H. Hashizume, K. Ide, K. Yokomura, K. Suzuki, H. Kuwata, S. Miwa, H. Nakano, T. Fujisawa, N. Enomoto, A. Matsushita, H. Nakamura // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2003. – Vol. 112 – № 6 – P. 1237–9.
184. Surh C.D. Homeostatic T cell proliferation: how far can T cells be activated to self-ligands? / C. D. Surh, J. Sprent // *J. Exp. Med.* – 2000. – Vol. 192 – № 4 – P.9–14.
185. Syrbe U. Th1/Th2 subsets: distinct differences in homing and chemokine receptor expression? / U. Syrbe, J. Siveke, A. Hamann // *Springer Semin. Immunopathol.* – 1999. – Vol. 21 – № 3 – P. 263–85.
186. Szeles L. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Is an Autonomous Regulator of the Transcriptional Changes Leading to a Tolerogenic Dendritic Cell Phenotype / L. Szeles, G. Keresztes, D. Torocsik, Z. Balajthy, L. Krenacs, S. Poliska, A. Steinmeyer, U. Zuegel, M. Pruenster, A. Rot, L. Nagy // *J. Immunol.* – 2009. – Vol. 182 – № 4 – P. 2074–2083.
187. Takakubo Y. Distribution of myeloid dendritic cells and plasmacytoid dendritic cells in the synovial tissues of rheumatoid arthritis. / Y. Takakubo, M. Takagi, K. Maeda, Y. Tamaki, A. Sasaki, T. Asano, S. Fukushima, Y. Kiyoshige, H. Orui, T. Ogino, M. Yamakawa // *J. Rheumatol.* – 2008. – Vol. 35 – № 10 – P. 1919–31.
188. Takayama T. Retroviral delivery of viral interleukin-10 into myeloid dendritic cells markedly inhibits their allostimulatory activity and promotes the induction of T-cell hyporesponsiveness. / T. Takayama, Y. Nishioka, L. Lu, M. T. Lotze, H. Tahara, A. W. Thomson // *Transplantation* – 1998. – Vol. 66 – № 12 – P. 1567–74.
189. Terness P. Inhibition of Allogeneic T Cell Proliferation by Indoleamine 2,3-Dioxygenase-expressing Dendritic Cells / P. Terness, T. M. Bauer, L. Röse, C. Dufter, A. Watzlik, H. Simon, G. Opelz // *J. Exp. Med.* – 2002. – Vol. 196 – № 4 – P. 447–457.
190. Thomas R, Street S R.N. Safety and preliminary evidence of efficacy in a phase I clinical trial of autologous tolerizing dendritic cells exposed to citrullinated peptides (Rheumavax) in patients with rheumatoid arthritis / R. N. Thomas R, Street S // *Ann Rheum Dis* – 2011. – № 70 – P. 169.

191. Thomas R. Dendritic cells and the pathogenesis of rheumatoid arthritis. / R. Thomas, K. P. MacDonald, A. R. Pettit, L. L. Cavanagh, J. Padmanabha, S. Zehntner // *J. Leukoc. Biol.* – 1999. – Vol. 66 – № 2 – P. 286–92.
192. Thomson A.W. Tolerogenic dendritic cells for autoimmune disease and transplantation / A. W. Thomson, P. D. Robbins // *Ann. Rheum. Dis.* – 2008. – Vol. 67 – № Suppl 3 – p. 90-96.
193. Thurnher M. The disabled dendritic cell. / M. Thurnher, C. Zelle-Rieser, R. Ramoner, G. Bartsch, L. Höltl // *FASEB J.* – 2001. – Vol. 15 – № 6 – P. 1054–61.
194. Torres-Aguilar H. Tolerogenic Dendritic Cells Generated with Different Immunosuppressive Cytokines Induce Antigen-Specific Anergy and Regulatory Properties in Memory CD4 + T Cells / H. Torres-Aguilar, S. R. Aguilar-Ruiz, G. González-Pérez, R. Munguía, S. Bajaña, M. A. Meraz-Ríos, C. Sánchez-Torres // *J. Immunol.* – 2010. – Vol. 184 – № 4 – P. 1765–1775.
195. Tsark E.C. Differential MHC Class II-Mediated Presentation of Rheumatoid Arthritis Autoantigens by Human Dendritic Cells and Macrophages / E. C. Tsark, W. Wang, Y.-C. Teng, D. Arkfeld, G. R. Dodge, S. Kovats // *J. Immunol.* – 2002. – Vol. 169 – № 11 – P. 6625–6633.
196. Tubach F. Risk of tuberculosis is higher with anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody therapy than with soluble tumor necrosis factor receptor therapy: The three-year prospective French Research Axed on Tolerance of Biotherapies registry. / F. Tubach, D. Salmon, P. Ravaud, Y. Allanore, P. Goupille, M. Bréban, B. Pallot-Prades, S. Pouplin, A. Sacchi, R. M. Chichemanian, S. Bretagne, D. Emilie, M. Lemann, O. Lortholary, O. Lortholary, X. Mariette, Research Axed on Tolerance of Biotherapies Group // *Arthritis Rheum.* – 2009. – Vol. 60 – № 7 – P. 1884–94.
197. Unger W.W.J. Induction of Treg by monocyte-derived DC modulated by vitamin D 3 or dexamethasone: Differential role for PD-L1 / W. W. J. Unger, S. Laban, F. S. Kleijwegt, A. R. van der Slik, B. O. Roep // *Eur. J. Immunol.* – 2009. – Vol. 39 – № 11 – P. 3147–3159.
198. Urzainqui A. Functional role of P-selectin glycoprotein ligand 1/P-selectin

- interaction in the generation of tolerogenic dendritic cells. / A. Urzainqui, G. Martínez del Hoyo, A. Lamana, H. de la Fuente, O. Barreiro, I. M. Olazabal, P. Martin, M. K. Wild, D. Vestweber, R. González-Amaro, F. Sánchez-Madrid // *J. Immunol.* – 2007. – Vol. 179 – № 11 – P. 7457–65.
199. Vakkila J. Both dendritic cells and monocytes induce autologous and allogeneic T cells receptive to interleukin 2. / J. Vakkila, M. Hurme // *Scand. J. Immunol.* – 1990. – Vol. 31 – № 1 – P. 75–83.
200. Valente J.F. Effect of in vivo infusion of granulocyte colony-stimulating factor on immune function. / J. F. Valente, J. W. Alexander, B.-G. Li, J. G. Noel, D. A. Custer, J. D. Ogle, C. K. Ogle // *Shock* – 2002. – Vol. 17 – № 1 – P. 23–9.
201. Villadangos J.A. Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo / J. A. Villadangos, P. Schnorrer // *Nat. Rev. Immunol.* – 2007. – Vol. 7 – № 7 – P. 543–555.
202. Wacleche V.S. CD16 + monocytes give rise to CD103 + RALDH2 + TCF4 + dendritic cells with unique transcriptional and immunological features / V. S. Wacleche, A. Cattin, J.-P. Goulet, D. Gauchat, A. Gosselin, A. Cleret-Buhot, Y. Zhang, C. L. Tremblay, J.-P. Routy, P. Ancuta // *Blood Adv.* – 2018. – Vol. 2 – № 21 – P. 2862–2878.
203. Wagner U. Ex vivo homeostatic proliferation of CD4+ T cells in rheumatoid arthritis is dysregulated and driven by membrane-anchored TNFalpha. / U. Wagner, M. Pierer, M. Wahle, F. Moritz, S. Kaltenhäuser, H. Häntzschel // *J. Immunol.* – 2004. – Vol. 173 – № 4 – P. 2825–33.
204. Wehner R. Impact of chemotherapeutic agents on the immunostimulatory properties of human 6-sulfo LacNAc + (slan) dendritic cells / R. Wehner, A. Bitterlich, N. Meyer, A. Kloß, K. Schäkel, M. Bachmann, M. Schmitz // *Int. J. Cancer* – 2013. – Vol. 132 – № 6 – P. 1351–1359.
205. Weinblatt M.E. Safety of abatacept administered intravenously in treatment of rheumatoid arthritis: integrated analyses of up to 8 years of treatment from the abatacept clinical trial program. / M. E. Weinblatt, L. W. Moreland, R. Westhovens, R. B. Cohen,

- S. M. Kelly, N. Khan, R. Pappu, I. Delaet, A. Luo, S. Gujrathi, M. C. Hochberg // *J. Rheumatol.* – 2013. – Vol. 40 – № 6 – P. 787–97.
206. Wenink M.H. Dendritic Cells and their Potential Implication in Pathology and Treatment of Rheumatoid Arthritis Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg – 2009-Vol.188-P. 81–98.
207. Winthrop K.L. Tuberculosis and other opportunistic infections in tofacitinib-treated patients with rheumatoid arthritis. / K. L. Winthrop, S.-H. Park, A. Gul, M. H. Cardiel, J. J. Gomez-Reino, Y. Tanaka, K. Kwok, T. Lukic, E. Mortensen, D. Ponce de Leon, R. Riese, H. Valdez // *Ann. Rheum. Dis.* – 2016. – Vol. 75 – № 6 – P. 1133–8.
208. Woltman A.M. Maturation-Resistant Dendritic Cells Induce Hyporesponsiveness in Alloreactive CD45RA + and CD45RO + T-Cell Populations / A. M. Woltman, S. W. van der Kooij, J. W. de Fijter, C. van Kooten // *Am. J. Transplant.* – 2006. – Vol. 6 – № 11 – P. 2580–2591.
209. Wu C.Y. Glucocorticoids suppress the production of interleukin 4 by human lymphocytes. / C. Y. Wu, C. Fargeas, T. Nakajima, G. Delespesse // *Eur. J. Immunol.* – 1991. – Vol. 21 – № 10 – P. 2645–7.
210. Xia C.-Q. Dexamethasone Induces IL-10-Producing Monocyte-Derived Dendritic Cells with Durable Immaturity / C.-Q. Xia, R. Peng, F. Beato, M. J. Clare-Salzler // *Scand. J. Immunol.* – 2005. – Vol. 62 – № 1 – P. 45–54.
211. Yamazaki S. Direct Expansion of Functional CD25 + CD4 + Regulatory T Cells by Antigen-processing Dendritic Cells / S. Yamazaki, T. Iyoda, K. Tarbell, K. Olson, K. Velinzon, K. Inaba, R. M. Steinman // *J. Exp. Med.* – 2003. – Vol. 198 – № 2 – P. 235–247.
212. Yoshida Y. Interleukin 6 and Rheumatoid Arthritis / Y. Yoshida, T. Tanaka // *Biomed Res. Int.* – 2014. – Vol. 2014 – P. 1–12.
213. Yu M.B. The function of myeloid dendritic cells in rheumatoid arthritis / M. B. Yu, W. H. R. Langridge // *Rheumatol. Int.* – 2017. – Vol. 37 – № 7 – P. 1043–1051.
214. Yu X. Combination with Methotrexate and Cyclophosphamide Attenuated Maturation of Dendritic Cells: Inducing Treg Skewing and Th17 Suppression In Vivo /

X. Yu, C. Wang, J. Luo, X. Zhao, L. Wang, X. Li // Clin. Dev. Immunol. – 2013. – Vol. 2013 – P. 1–12.

215. Ziegler-Heitbrock L. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood / L. Ziegler-Heitbrock, P. Ancuta, S. Crowe, M. Dalod, V. Grau, D. N. Hart, P. J. M. Leenen, Y.-J. Liu, G. MacPherson, G. J. Randolph, J. Scherberich, J. Schmitz, K. Shortman, S. Sozzani, H. Strobl, M. Zembala, J. M. Austyn, M. B. Lutz // Blood – 2010. – Vol. 116 – № 16 –P. 74–80.