

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

На правах рукописи

ТЕРЕЩЕНКО ВАЛЕРИЙ ПАВЛОВИЧ

**ИНДУКЦИЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ С  
ПОМОЩЬЮ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК, ТРАНСФИЦИРОВАННЫХ ДНК-  
КОНСТРУКЦИЯМИ, КОДИРУЮЩИМИ АНТИГЕННЫЕ  
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ МОЛЕКУЛ МНС**

14.03.09 – «Клиническая иммунология, аллергология»

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:  
д-р. мед. наук, проф. Сенников Сергей Витальевич

Новосибирск

2020

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1 Иммунологическая толерантность .....	10
1.2 Центральные механизмы поддержания иммунологической толерантности .....	11
1.2.1 Центральные механизмы толерантности Т-лимфоцитов .....	11
1.2.2 Центральные механизмы толерантности В-лимфоцитов .....	17
1.3 Периферические механизмы иммунологической толерантности.....	19
1.3.1 Периферические механизмы толерантности Т-лимфоцитов .....	19
1.3.2 Апоптоз как периферический механизм поддержания толерантности.....	24
1.3.3 Периферические механизмы толерантности В-лимфоцитов .....	25
1.4 Иммунология трансплантационных реакций .....	26
1.4.1 Иммунопатогенез реакции отторжения .....	27
1.4.2 Иммунопатогенез реакции «трансплантат против хозяина» .....	31
1.5 Клеточная терапия трансплантационных реакций.....	34
1.6 Заключение .....	39
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	41
2.1 Объект и предмет исследования .....	41
2.2 Этическое заключение .....	41
2.3 Лабораторные животные .....	41
2.4 ДНК-конструкции .....	41
2.5 Схема эксперимента.....	44
2.6 Получение дендритных клеток .....	44
2.7 Фенотипирование дендритных клеток .....	45
2.8 Совместное культивирование дендритных клеток и аутоспленоцитов .....	46
2.9 Оценка толерогенных свойств дендритных клеток .....	47
2.10 Трансфекция дендритных клеток ДНК-конструкциями.....	48
2.11 Смешанная культура лимфоцитов.....	49
2.12 Реакция трансплантат против хозяина .....	49
2.13 Трансплантация кожного лоскута .....	50
2.14 Методы статистической обработки .....	50
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	51
3.1 Получение дендритных клеток с толерогенными свойствами из костного мозга мышей.....	51
3.2 Отработка протокола электропорации .....	54
3.3 Эффективность электропорации ДК экспериментальными плазмидами pIL-10 и pMHC.....	56
3.4 Толерогенные свойства ДК, трансфицированных pIL-10 и pMHC .....	57
3.5 Способность толерогенных ДК, трансфицированных pIL-10 и pMHC, .....	60
подавлять иммунный ответ <i>in vitro</i> .....	60

3.6 Подавление острой РТПХ с помощью дендритных клеток, трансфицированных pIL-10 и pMHC ..	62
3.7 Подавление реакции отторжения кожного лоскута с помощью дендритных клеток, трансфицированных pIL-10 и pMHC.....	72
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	75
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	86
ВЫВОДЫ .....	88
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	89
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	90

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность

На данный момент в клинической практике для подавления трансплантационных реакций, таких как реакция отторжения пересаженного органа или реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ), используется системная иммуносупрессивная терапия. Однако, действуя системно данная терапия вызывает множество побочных эффектов [Curtis et al., 2006] и действуя иммуносупрессивно – приводит к развитию различных оппортунистических инфекционных [Ponticelli, Glassock, 2019] и даже опухолевых заболеваний [Fijter, 2019]. Таким образом, актуальной остается разработка альтернативных методов подавления трансплантационных реакций без использования системной иммуносупрессии.

Поскольку реакция отторжения и РТПХ являются феноменами иммунной природы, то и их коррекция возможна с использованием механизмов функционирования иммунной системы. И возможным решением может стать целенаправленная индукция иммунологической толерантности на трансплантационные антигены пересаженных органов и тканей.

Иммунологической толерантностью называется активное подавление организмом формирования иммунного ответа на конкретные антигены. Принципиальная возможность индукции иммунологической толерантности на трансплантационные антигены была показана и теоретически обоснована в середине XX века П.Б. Медоваром и Ф.М. Бернетом, за что исследователи получили Нобелевскую премию [Billingham et al., 1953; Burnet, 1961].

На данный момент выделяют два механизма поддержания иммунологической толерантности: центральный и периферический. Центральный механизм поддержания иммунологической толерантности обеспечивается клональной деплецией аутореактивных развивающихся тимоцитов и также их дифференцировкой в FoxP3+ tTreg в центральном органе иммунной системы – в тимусе [Takaba, Takayanagi, 2017]. Периферический механизм поддержания иммунологической толерантности обеспечивается индукцией анергии и апоптоза наивных Т-клеток, и также их дифференцировкой в Т-регуляторные клетки (FoxP3+ iTreg и IL-10+ Tr1), с помощью дендритных клеток (ДК) в периферических органах иммунной системы [Iberg et al., 2017].

Для подавления трансплантационных реакций активно разрабатываются подходы, использующие запуск периферических механизмов иммунологической толерантности [Сенников, Хантакова, 2017]. Так, толерогенные алло-ДК донора и толерогенные ДК, нагруженные антигеном, вызывают индукцию функциональных антиген-специфичных FoxP3+ Т-регуляторных клеток (Treg) [Sela et al., 2011; Huang et al., 2014]. Такие толерогенные ДК и генерируемые под их влиянием Treg увеличивают время отторжения аллотрансплантата и

угнетают РТПХ [Pêche et al., 2005; Sela et al., 2011].

Также, для угнетения трансплантационных реакций распространено применение дендритных клеток, секретирующих иммунорегуляторный цитокин IL-10, которые индуцируют Т-регуляторные клетки 1го типа (Tr1), неэкспрессирующие FoxP3, но секретирующие IL-10, что и обеспечивает их регуляторную и иммуносупрессивную функции [Gregori et al., 2011; Chihara et al., 2016]. Показано, что такие IL-10 продуцирующие ДК и генерируемые под их влиянием Tr1-клетки увеличивают время отторжения аллотрансплантата и угнетают РТПХ [Wan et al., 2017].

Для получения ДК с иммуносупрессивными и толерогенными свойствами используют инкубирование клеток в среде с IL-10, TGF- $\beta$ , дексаметазоном, витамином D, рапамицином, циклоспорином, ретиноевой кислотой, апоптическими клетками др. [Сенников, Облеухова, 2016]. Главной характеристикой получаемых ДК является их незрелый фенотип, т.е. пониженная экспрессия молекул костимуляции CD80 и CD86, молекул активации CD40, CD83 и провоспалительных цитокинов IL-1, IL-2, IL-12, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ . А также повышенная экспрессия ингибиторных молекул PD-L1, IDO и иммунорегуляторных цитокинов IL-10 и TGF- $\beta$ , что и обеспечивает их иммуносупрессивную и толерогенную функции [Fu et al., 1996; Lutz et al., 2000]. Однако, при попадании в условия *in vivo*, полученные таким образом клетки могут изменять свою функцию с иммуносупрессивной на иммуногенную под влиянием их нового окружения, содержащего стимулы для созревания ДК [Kim et al., 2018].

Для стабилизации иммуносупрессивных свойств ДК при переносе в организм реципиента используется метод трансфекции дендритных клеток ДНК-конструкциями, кодирующими различные иммунорегуляторные протеины. Например, ДК мыши, трансфицированные лентивирусной конструкцией, кодирующей IL-10, вызывают снижение иммунного ответа на аллоантигены и трансплантационные антигены в реакции смешанной культуры лимфоцитов и реакции «трансплантат против хозяина», соответственно [Wan et al., 2017].

Для придания иммунологической толерантности специфичности дендритные клетки нагружают антигеном, против которого необходимо создать толерантность. На данный момент для загрузки ДК трансплантационными антигенами используют добавление к культуре клеток материала донора, например, клеточного или тканевого лизата донора [Fan et al., 2015] или везикул из донорской ткани [Ezzelarab et al., 2017]. Однако такой способ не обеспечивает длительного присутствия трансплантационного антигена в дендритных клетках, в результате чего толерантность может быть индуцирована на широкий спектр, в т.ч. нежелательных и потенциально опасных, антигенов. [Mullins et al, 2015]. Также данные способы требуют использование донорского материала, что делает их неудобными для применения в клинической практике.

Возможное решение проблемы загрузки толерогенных ДК трансплантационными

антигенами можно обнаружить в другой области клеточной иммунотерапии – иммунотерапии злокачественных новообразований. Так, в данной области для нагрузки ДК опухолевыми антигенами предложена трансфекция ДК РНК- и ДНК-конструкциями, кодирующими опухоль-ассоциированные антигены или их иммуногенные эпитопы [Aarntzen et al., 2012; Sennikov et al., 2016; Sennikov et al., 2017; Kuznetsova et al., 2019; Shevchenko et al., 2020].

Поскольку в основе реакции отторжения и РТПХ лежит развитие иммунного ответа в большей степени на антигены основных молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС – major histocompatibility complex)[Ayala García et al., 2012; Kuba et al., 2018], для индукции иммунологической толерантности в данном случае целесообразно использовать ДК, нагруженные трансплантационными антигенами с помощью трансфекции ДНК-конструкциями, кодирующими антигенные последовательности молекул МНС.

В целом, несмотря на большое количество подходов, предложенных для индукции иммунологической толерантности, достаточно эффективного и клинически приемлемого решения проблем реакции отторжения и РТПХ еще не разработано. Данная работа сконцентрирована на разработке способа подавления трансплантационных реакций путем индукции иммунологической толерантности с помощью дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими антигенные последовательности молекул МНС и IL-10. Поскольку, такой способ может быть более эффективен за счет использования для нагрузки ДК антигенных последовательностей молекул МНС, т.е. антигенных последовательностей основных молекул, на которые направлены трансплантационные реакции. А также более клинически приемлемым, поскольку способ нагрузки ДК антигеном с использованием кодирующих ДНК-конструкций не требует использования донорского материала.

### **Цель работы**

Таким образом, **целью** работы является изучение способности дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими антигенные последовательности МНС и/или IL-10 индуцировать иммунологическую толерантность.

### **Задачи**

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Разработать протокол получения толерогенных дендритных клеток, трансфицированных, ДНК-конструкциями, кодирующими IL-10 и антигенные последовательности МНС.

2. Оценить способность дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими IL-10, подавлять трансплантационные реакции *in vitro* и *in vivo*.

3. Оценить способность дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими антигенные последовательности МНС, подавлять трансплантационные реакции *in vitro* и *in vivo*.

4. Изучить механизмы подавления трансплантационных реакций дендритными клетками, трансфицированными ДНК-конструкциями, кодирующими IL-10 и антигенные последовательности МНС.

### **Научная новизна работы**

В работе впервые реализован способ нагрузки дендритных клеток трансплантационными антигенами с помощью трансфекции ДНК-конструкциями, кодирующими антигенные последовательности молекул главного комплекса гистосовместимости. В работе показана эффективность данного подхода в индукции FoxP3+ Treg и угнетении активации аутологичных спленоцитов в ответ на аллогенный стимул *in vitro*. Также показана способность культур аутологичных спленоцитов и дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими антигенные последовательности главного комплекса гистосовместимости, антиген-специфично угнетать реакцию отторжения и реакцию «трансплантат против хозяина» *in vivo*. Было показано, что способность дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими антигенные последовательности главного комплекса гистосовместимости, к угнетению РТПХ сопровождается генерацией повышенного количества FoxP3+ Treg в селезенках мышей с индукцией РТПХ.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

В работе показана принципиальная возможность использования ДК, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими антигенные последовательности молекул МНС, для антиген-специфичного подавления трансплантационных реакций, таких как реакция отторжения и РТПХ, что является новым подходом к индукции иммунологической толерантности. По предложенному способу индукции иммунологической толерантности получен патент RU 2717011 C1 «Способ индукции иммунологической толерантности на трансплантационные антигены у млекопитающих».

Также в работе показан различный характер подавления трансплантационных реакций с помощью дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими IL-10, и дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими антигенные последовательности МНС. Так, неспецифичное подавление реакции «трансплантат против

хозяина» достигаемое с помощью введения культур, содержащих дендритные клетки, трансфицированные ДНК-конструкциями, кодирующими IL-10, сопровождается подавлением цитотоксического иммунного ответа, а специфичное подавление РТПХ с помощью дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими антигенные последовательности МНС, сопровождается генерацией повышенного количества Treg.

Практически, примененный подход с использованием заранее разработанных и сконструированных ДНК-конструкций, позволяет отказаться от использования донорского материала при индукции иммунологической толерантности на трансплантационные антигены, а также может быть эффективен в снижении выраженности нежелательных побочных эффектов системной иммуносупрессивной терапии, связанных с неспецифической иммуносупрессией, что может способствовать трансляции клеточных технологий подавления трансплантационных реакций в клиническую практику.

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

1. Незрелые дендритные клетки мышей C57Bl/6, трансфицированные ДНК-конструкциями, кодирующими антигенные последовательности из локуса H2 (МНС I класса) мышей СВА, вызывают индукцию FoxP3<sup>+</sup> Treg в культурах аутологичных спленоцитов и антиген-специфично подавляют пролиферацию аутологичных спленоцитов на антигены мышей СВА *in vitro*.

2. Незрелые дендритные клетки мышей C57Bl/6, трансфицированные ДНК-конструкциями, кодирующими антигенные последовательности из локуса H2 (МНС I класса) мышей СВА, способны антиген-специфично подавлять реакцию отторжения и реакцию «трансплантат против хозяина», вызванные антигенами мышей СВА, при чем подавление реакции «трансплантат против хозяина» сопровождается наличием повышенного количества FoxP3<sup>+</sup> Treg в селезенках мышей с РТПХ.

#### **Апробация материалов диссертации**

Материалы диссертации были обсуждены на:

1. Семинарах лаборатории молекулярной иммунологии НИИФКИ в 2017, 2018, 2019 годах;
2. Отчетных конференциях аспирантов и ординаторов НИИФКИ в 2018 и 2019 годах;
3. Международном Симпозиуме по Дендритным Клеткам (15th International Symposium on Dendritic Cells) (Ахен, Германия, 2018 г.);
4. 5 Европейском конгрессе по иммунологии (5th European Congress of Immunology —

ЕСI) Амстердам, Нидерланды, 2018 г.);

5. На 4ом объединенном иммунологическом форуме, Новосибирск, Россия, 2019.

### **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 13 работ, из них 4 оригинальные статьи в изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science/Scopus. Получен 1 патент.

### **Самостоятельность выполненной работы**

Все работы, проведенные в рамках исследования, за исключением проектирования и конструирования ДНК-конструкций, выполнены при непосредственном участии автора на базе лаборатории молекулярной иммунологии НИИФКИ.

Большую признательность автор выражает научному руководителю работы профессору, д.м.н. С.В. Сенникову за подробное конструктивное обсуждение полученных результатов, а также всем сотрудникам лаборатории молекулярной иммунологии НИИФКИ за помощь в освоении методов молекулярной и клеточной иммунологии, ценные замечания и благожелательное отношение в ходе выполнения работы. Отдельная благодарность выражается Максютову А.З., за проектирование ДНК-конструкций, используемых в исследовании.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Иммунологическая толерантность

На данный момент явление иммунологической толерантности определено как «специфическое подавление способности к иммунному ответу на уровне отдельных клонов лимфоцитов» [Ярилин, 2010], «состояние ареактивности в отношении того или иного антигена» [Ройт и др, 2000], «отсутствие активации лимфоцитов (и соответственно продукции ими эффекторных молекул) при наличии в доступном им пространстве специфического антигена» [Хаитов и др, 2000]. Как видно все авторы говорят о том, что по своей сути иммунологическая толерантность является антиген-специфичной, т.е. направленной на конкретный антиген. На взгляд автора, определение А.А. Ярилина является наиболее точным, поскольку подчеркивает активное подавление эффекторных иммунных реакций, лежащее в основе реализации иммунологической толерантности. Таким образом, в данной работе под иммунологической толерантностью мы будем понимать активное подавление эффекторного иммунного ответа на тот или иной антиген.

Впервые конкретное представление об иммунологической толерантности было сформировано в работах Биллингема Р.Е., Брента Л. и Медавара П.Б. [Billingham et al, 1953; Billingham et al, 1955]. В своих работах исследователи вводили аллогенные клетки мышей линии А развивающимся плодам мышей СВА. После подобного введения рожденные мыши СВА не отторгали кожный лоскут, пересаженный им от мышей А, но отторгали кожные лоскуты от других линий мышей. Контрольные мыши СВА, полученные без введения аллогенных клеток отторгали аллогенный лоскут мышей линии А. По результатам экспериментов исследователи заключили о возможности индукции приобретенной иммунологической толерантности. А саму приобретенную толерантность определили как «индуцированное состояние специфичной ареактивности по отношению к веществу в норме являющимся антигенным, при чем ареактивность связана с первичными изменениями в механизмах иммунного ответа (induced state of specific non-reactivity towards a substance that is normally antigenic – non-reactivity, moreover, that is due to a primary failure of the machinery of the immunological response)».

Полученные результаты укладывались в гипотезу Ф.М. Бернета об элиминации аутореактивных клонов иммунных клеток, как основе неотвечаемости иммунной системы на «свое» [Burnet, 1960; Burnet, 1961]. И в 1960 году П.Б. Медавар и Ф.М. Бернет получили Нобелевскую премию по физиологии и медицине с формулировкой за «открытие приобретенной иммунологической толерантности (for discovery of acquired immunological tolerance)».

Пожалуй, наиболее значимым аспектом данного открытия явилось не само установление факта наличия иммунологической толерантности, а формирование понимания того, что иммунологическую толерантность можно индуцировать, и, следовательно, она является приобретенным, а не врожденным свойством иммунной системы высших животных. Формирование такого подхода к феномену иммунологической толерантности привело к активному изучению обеспечивающих ее механизмов в частности и развитию всей иммунологии в целом. В результате к сегодняшнему дню среди механизмов поддержания иммунологической толерантности выделяют центральные и периферические.

## **1.2 Центральные механизмы поддержания иммунологической толерантности**

Центральные механизмы иммунологической толерантности заключаются в элиминации аутореактивных клонов Т- и В-лимфоцитов в процессе их антиген-независимой дифференцировки в тимусе и костном мозге, соответственно.

### **1.2.1 Центральные механизмы толерантности Т-лимфоцитов**

В процессе своего развития в тимусе Т-лимфоциты проходят этапы реаранжировки генов Т-клеточного рецептора (TCR) и далее его позитивной и негативной селекции [Takaba H., Takayanagi, 2017; Cohn, 2016; Klein et al., 2014]. В результате независимой реаранжировки генов  $\alpha$  и  $\beta$  цепей TCR тимоцит приобретает антиген-распознающий рецептор практически идентичной специфичности. Так, возможных специфичностей насчитывают около  $10^{16}$ - $10^{19}$  вариантов [Ярилин, 2010]. Однако, данное случайное разнообразие не обеспечивает реальных потребностей многоклеточного организма. Поэтому, в результате дальнейшей позитивной селекции отбираются Т лимфоциты, способные распознавать собственные молекулы МНС. После, на этапе негативной селекции устраняются или подвергаются дифференцировке в регуляторные Т-клетки (Treg) Т-лимфоциты, несущие относительно высокоаффинный Т клеточный рецептор к комплексу аутоантигена и собственного МНС. На этом этапе как раз и происходит формирование центральной толерантности, т.е. в норме после прохождения негативной селекции из тимуса не выходят аутореактивные эффекторные Т-лимфоциты. Поэтому на нем мы остановимся поподробнее.

И так, CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> тимоциты, успешно прошедшие этап позитивной селекции в кортикальном слое тимуса, мигрируют в мозговое вещество с помощью CCR7 по градиенту хемокинов CCL19 и CCL21, продуцируемых медулярными эпителиальными клетками тимуса

(mTEC, medullary thymic epithelial cells) [Förster et al, 2008]. В мозговом веществе лимфоциты Т клеточным рецептором взаимодействуют с антиген-представляющими клетками – дендритными клетками (ДК) и mTEC, презентирующими собственные антигены. Считается, что дальнейшая судьба лимфоцитов зависит от параметров данного взаимодействия.

Главной характеристикой данного взаимодействия считают силу сигнала, поступающего с TCR в лимфоцит, определяющейся аффинностью комплекса TCR с МНС и временем его существования. Длительное высокоаффинное взаимодействие приводит к относительно сильному сигналу и запуску негативной селекции - деплеции лимфоцита, получившего такой сигнал [Alam et al, 1999; Stepanek et al, 2014;]. Получение слабого и короткого сигнала на этапе позитивной селекции приводит к обратному результату – выживанию тимоцита [Williams et al, 1999, Alam et al, 1996;]. Данные отличия были объяснены различными вариантами активации протеинкиназ Lck, JNK, ERK, участвующих в передаче сигнала с TCR, при получении сигнала различной силы [Gil et al, 2005; McNeil et al, 2005]. А также различной внутриклеточной локализацией киназ Ras и MAP на этапах позитивной и негативной селекции [Daniels et al, 2006]. Деплеция тимоцита, получившего сильный сигнал с TCR, происходит в результате индукции апоптоза без получения дополнительных сигналов с рецепторов смерти [Alvarez-Diaz et al, 2016; Strasser et al, 1991]. Известно, что во внутреннем пути апоптоза тимоцита принимают участие проапоптотические факторы BAX, BAK, BIM, PUMA и стероидный рецептор Nur77 [Bouillet et al, 2002; Rathmell et al, 2002; Gray et al, 2012; Calnan et al, 1995].

Важной составляющей центральной толерантности является то, что помимо деплеции аутореактивных клонов, в тимусе также происходит дифференцировка аутореактивных тимоцитов в Treg клетки, называемые тимическими (tTreg) или натуральными (nTreg). Считается, что для запуска дифференцировки Treg в тимусе требуется сигнал с TCR промежуточной силы, находящийся по интенсивности между слабым сигналом, необходимым для успешного прохождения позитивной селекции, и сильным сигналом, приводящим к деплеции тимоцита на стадии негативной селекции [Knoechel et al, 2005]. В TCR инвариантной трансгенной модели с помощью эпитопов, обеспечивающих различную аффинность взаимодействия TCR и МНС, было показано, что для индукции Treg в тимусе требовался в 100 раз меньший по интенсивности сигнал, чем для деплеции тимоцитов. При этом аффинность, приводящая к дифференцировке Treg, варьировала в 1000 кратном диапазоне [Lee et al, 2012]. Помимо сигнала определенной интенсивности для дифференцировки Treg в тимусе необходим цитокин-индуцированный запуск экспрессии FoxP3. Так, у мышей с отсутствующим функциональным рецептором к IL-2 практически полностью отсутствуют индуцированные и тимические FoxP3<sup>+</sup> Treg клетки [Fontenot et al, 2005]. Однако точная роль IL-2 сигналинга и экспрессии FoxP3 в Treg тимоцитах не установлена. Есть данные, что сигнал с IL-2R, вызывает

экспрессию FoxP3, которая позволяет пережить тимоцитам проапоптотическое влияние сильного сигнала с TCR [Burchill et al, 2008]. Альтернативное мнение гласит, что сигнал с IL-2R необходим для преодоления проапоптотического влияния экспрессии FoxP3, вызванной сигналом с TCR [Tai et al, 2013]. Также показано, что TGF- $\beta$  играет определенную роль в развитии тимических Treg, поскольку мыши нокаутированные по TGF $\beta$ RI или TGF $\beta$ RII демонстрируют сниженный выход Treg из тимуса [Liu et al, 2008; Marie et al, 2006].

Таким образом, ключевые этапы развития и селекции тимоцита основаны на взаимодействии его TCR с комплексом МНС и собственного антигена. При этом эпитоп собственного антигена в данном взаимодействии служит для определения тимоцитов, несущих высокоаффинный TCR к собственным антигенам, которые необходимо устранить или дифференцировать в Treg. Поэтому важно, чтобы в тимусе был представлен широкий спектр аутоантигенов и не только тимических, но и всех органов и тканей организма. Известны несколько источников аутоантигенов остального организма в тимусе.

Первый внутренний источник связан с работой генов *AIRE* и *Fezf2* в mTEC, продукты экспрессии которых приводят к экспрессии множества генов, кодирующих тканеспецифичные антигены (TCA или tissue-restricted antigens - TRA).

Экспрессия *AIRE* (autoimmune regulator) в mTEC регулируется через рецепторы семейства TNF – RANK и CD40 [Akiyama et al, 2012]. Тимоциты, мигрирующие в мозговое вещество тимуса, экспрессируют лиганды данных рецепторов RANKL и CD40L, и вызывают экспрессию *AIRE* в mTEC через активацию транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B [Akiyama et al, 2008; Nikosaka et al, 2008]. 5' регион гена *AIRE* содержит консервативный сайт связывания NF- $\kappa$ B, критичный для его экспрессии [Haljasorg et al, 2015].

Продукт гена *AIRE* – белок AIRE состоит из 4 субдоменов: CARD, SAND, PHD1 и PHD2 [Mathis, Benoist, 2009]. CARD обеспечивает мультимеризацию комплекса AIRE. SAND взаимодействует с комплексом ATF7ip– MBD1, располагающимся на метилированных CpG островках энхансеров и вызывает экспрессию подконтрольных им генов [Waterfield et al, 2014]. При этом, промоторные регионы AIRE-зависимых генов характеризуются метилированием, и без помощи AIRE данные гены в тимусе не экспрессируются. Субъединица PHD1 напрямую взаимодействует с гистонем H3K4, вызывая его триметилирование или H3 ацетилирование, что приводит к возможности экспрессии генов, заблокированных данным гистонем [Org et al, 2008]. При этом неподконтрольные AIRE гены, наоборот, ассоциированы с гистонами, не препятствующими транскрипции. В результате, комплекс AIRE способен вызывать экспрессию генов, заблокированных как гиперметилированием ДНК, так и определенными гистонами, что и лежит в основе его способности обеспечивать эктопическую экспрессию в тимусе

тканеспецифичных антигенов, характерных для всех тканей организма. Субъединица PHD2 служит для связывания с белками партнерами, например, с РНК-полимеразой II [Gaetani et al, 2012]. Таким образом, AIRE является не транскрипционным фактором в классическом понимании, а действительно комплексом - регулятором транскрипции генов, не экспрессирующихся при других условиях. Подсчитано, что около 40% тканеспецифичных эпитопов, представленных в тимусе, экспрессируются под влиянием AIRE [St.Pierre. et al, 2015; Sansom et al, 2014]. Спектр тканеспецифичных антигенов, экспрессируемых под влиянием AIRE представлен на рисунке 1 [Kyewski, Derbinski, 2004].

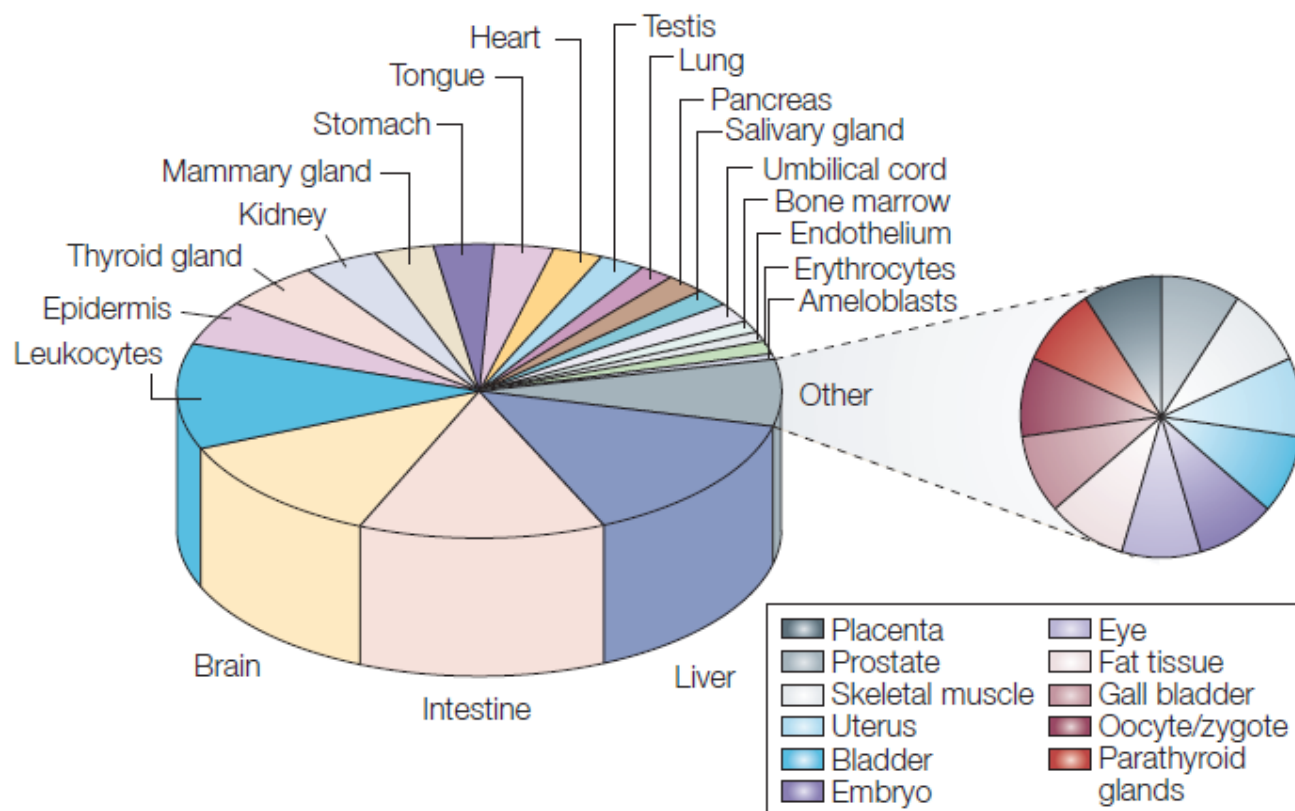


Рисунок 1 – Тканеспецифичные антигены, экспрессирующиеся в тимусе в результате функционирования AIRE [Kyewski, Derbinski, 2004].

Помимо AIRE, участие в экспрессии тканеспецифичных антигенов в тимусе принимает транскрипционный фактор Fezf2 (forebrain embryonic zinc finger-like protein 2). Так, у мышей, нокаутированных по гену *Fezf2*, определялся более высокий уровень антител и аутореактивных Т-клеток, а картина аутоиммунных нарушений отличалась от мышей, нокаутированных по гену *AIRE*. Также, у мышей, нокаутированных по *Fezf2*, в mTEC отсутствовал широкий спектр мРНК, кодирующих отличные от подконтрольных AIRE тканеспецифичные антигены [Takaba et al, 2015]. Однако, некоторые AIRE- и Fezf2-зависимые антигены совпадают, например, Fabp9 – специфичный антиген яичек [Danzl et al, 2010].

Белок Fezf2 содержит Eh1 домен и 6 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> цинковых пальца с помощью которых он специфично связывается с определенными ДНК мотивами [Takaba, Takayanagi, 2017]. Например, с сайтами старта транскрипции множества белок-кодирующих генов [Lodato et al, 2014]. Механизмы индукции экспрессии Fezf2 слабо изучены. Известно, что RANK и CD40 пути не принимают участия в индукции экспрессии Fezf2, но в ней участвует LTβR путь [Takaba et al, 2015]. Механизмы функционирования Fezf2, обеспечивающие экспрессию множества тканеспецифичных антигенов в тимусе также не раскрыты. Согласно биоинформатическому анализу 60% тканеспецифичных антигенов, представленных в тимусе, обеспечивается работой генов *AIRE* и *Fezf2* [Takaba et al, 2015], что предполагает наличие и других источников собственных антигенов в тимусе.

Как было сказано выше, в презентации собственных антигенов в тимусе участвуют не только mTEC, с реализованной экспрессией *AIRE* и *Fezf2*, но и дендритные клетки. Принято выделять 3 вида тимических дендритных клеток – CD8α+Sirpα– и CD8α–Sirpα+ конвенциональные ДК 1 и 2 типа, соответственно (кДК1, кДК2), а также B220+ плазматоидные ДК (пДК) [Oh, Shin, 2015; Cedile et al, 2017; Cosway et al, 2018].

CD8α+Sirpα– кДК1 развиваются из предшественников в тимусе [Luche et al, 2011] и презентируют тимоцитам тканеспецифичные антигены, полученные от mTEC путем захвата из экстрацеллюлярного матрикса или трофоцитоза [Perry et al, 2014].

CD8α–Sirpα+ кДК2 и B220+ пДК развиваются на периферии и мигрируют в тимус для презентации антигенов, захваченных ими в тканях [Li et al, 2009], что и формирует еще один источник тканеспецифичных антигенов в тимусе. CD8α–Sirpα+ кДК2 мигрируют в тимус под действием сигналов с рецептора хемотаксиса CCR2 [Baba et al, 2009]. B220+ пДК мигрируют в тимус под воздействием сигналов как с CCR2, так и с CCR9 [Cedile et al, 2017; Hadeiba et al, 2012]. Миграция происходит в направлении лигандов данных рецепторов - хемокинов CCL2 и CCL25, продуцируемых стромальными клетками тимуса [Cedile et al, 2014; Wurbel et al, 2000]. При этом, при созревании ДК на периферии с помощью стимуляции Toll-подобных рецепторов (Toll-like receptors, TLR), ДК снижают экспрессию CCR9 и теряют способность мигрировать в тимус [Drakes et al, 2009]. Биологический смысл данного явления заключается в устранении миграции в тимус ДК, столкнувшихся с патогенами, и исключения возможности попадания в тимус чужеродных антигенов. Также, было установлено, что CD8α–Sirpα+ кДК2, попадая в тимус, располагаются вблизи мелких сосудов кортикомедулярного сочленения, стенки которых легко проницаемы для веществ, циркулирующих в крови. Такое расположение CD8α–Sirpα+ кДК2 позволяет им эффективно захватывать и презентировать в тимусе антигены, полученные из кровотока [Atibalentja et al, 2011].

Дендритные клетки активно участвуют в негативной селекции CD4<sup>+</sup> тимоцитов. Так, у мышей, нокаутированных по МНС II класса в дендритных клетках или у мышей с отсутствующими ДК, наблюдается активное накопление CD4<sup>+</sup> тимоцитов в тимусе [Ohnmacht, et al, 2009]. Так же в трансгенных мышинных моделях экспрессии определенного МНС II класса, определенного TCR или определенного антигена было показано, что ДК эффективно устраняют специфичные клоны CD4<sup>+</sup> тимоцитов [Brockner, 1999; Aschenbrenner et al, 2007; Oh et al, 2013]. Интересно, что, когда определенный антиген экспрессируется с помощью AIRE в mTEC, но дендритные клетки отсутствуют, в тимусе также наблюдается накопление CD4<sup>+</sup> тимоцитов, специфичных к данному антигену [Hubert et al, 2011]. Таким образом, не до конца ясно какие из тканеспецифичных антигенов и в каком объеме презентуются mTEC, а какие ДК. На этот счет было выдвинуто предположение, что тканеспецифичные антигены, экспрессируемые с помощью AIRE и способные попасть в аутофагосому, презентуют mTEC, а не попадающие в аутофагосому – презентуются ДК [Aichinger et al, 2013]. Роль ДК в деплеции CD8<sup>+</sup> тимоцитов не до конца ясна, поскольку нокаут мышей по МНС I класса приводит лишь к небольшому накоплению CD8<sup>+</sup> лимфоцитов в тимусе, а деплеция ДК ни как не влияет на их количество [van Meerwijk et al, 1997; 90: Ohnmacht, et al, 2009].

Дендритные клетки также участвуют и в дифференцировке Treg в тимусе. Так, у трансгенных мышей с Ova и HEL специфичными TCR при нагрузке тимических ДК пептидами Ova и HEL выявляются Ova и HEL специфичные Treg клетки [Proietto et al, 2008; Oh et al, 2013]. Интересно, что при введении в тимус нормальных мышей и мышей, с отсутствующими ДК, тимоцитов 15-ти определенных специфичностей и нагрузке тимуса соответствующими пептидами, около половины специфичностей тимоцитов не смогли дифференцироваться в Treg при отсутствии ДК [Perry et al, 2014], что еще раз поднимает вопрос о том, какие из антигенов презентуются ДК, а какие mTEC.

Для дифференцировки в Treg тимоцит должен получить от ДК те же сигналы, что и от mTEC – сигнал с TCR определенной интенсивности и цитокиновый сигнал для запуска или поддержания экспрессии FoxP3. Есть данные, что приобретение ДК фенотипа, необходимого для запуска дифференцировки тимических Treg, осуществляется с помощью тимического стромального лимфопоэтина (TSL или thymic stromal lymphopoietin, TSLP). Тимический стромальный лимфопоэтин секретируется в тимусе тельцами Гассала, а дендритные клетки, полученные с помощью TSL, отличаются повышенной способностью к индукции Treg клеток [Watanabe et al, 2005; Hanabuchi et al, 2010]. Так же, в дифференцировке Treg в тимусе участвуют молекулы семейства ФНО – CD70-CD27, GITR-GITRL, OX40-OX40L. Однако, их экспрессия характерна не только для тимических ДК, но и для mTEC [Oh et al, 2015].

### 1.2.2 Центральные механизмы толерантности В-лимфоцитов

Развитие В-лимфоцитов происходит в костном мозге. На пути к зрелому лимфоциту В-клетки проходят различные стадии, основными из которых являются стадии про-В-лимфоцита и пре-В-лимфоцита. На стадии про-В-лимфоцита каждая клетка подвергается независимой реаранжировке V (variable), D (diversity) и J (join) сегментов гена H (тяжелой) цепи. Про-В-стадия заканчивается экспрессией уникального реанжированного гена H-цепи и выведением его продукта – белка H-цепи на поверхность клетки. С появления на поверхности клетки молекул H-цепи начинается стадия пре-В-лимфоцита. На этой стадии происходит реаранжировка V и J сегментов одного из локусов L (легкой)- цепи - κ или λ. По завершению реаранжировки начинается экспрессия готовой L-цепи. Две L-цепи связываются с двумя молекулами H-цепей и в виде классической молекулы В-клеточного рецептора (BCR) выводятся на поверхность клетки. Выведенный на поверхность BCR является иммуноглобулином класса М – согласно константному домену H-цепей. Клетки, несущие такой BCR, определяют как незрелые В-клетки. Выведенный на поверхность BCR образует комплекс с молекулами CD79A и CD79B (Igα и Igβ), несущими на своих цитоплазматических концах активационный мотив ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) [Nemazee, 2017].

Такие незрелые В-лимфоциты уже способны связываться своим BCR с антигенами и принимать сигнал от данного связывания. Однако, поскольку, развитие происходит в костном мозге, антигены окружающие В-клетку являются аутоантигенами. Соответственно, на этом этапе происходят процессы, направленные на снижение аутореактивности, т.е. формирование центральной В-клеточной толерантности.

Поначалу считалось, что механизмы центральной В-клеточной толерантности включают в себя как деплецию аутореактивного лимфоцита, так и введение его в анергичное состояние [Klinman, 1996]. Однако также, было выявлено, что возможен процесс изменения BCR, путем замены легкой цепи на заново реаранжированную, что спасает В-лимфоцит от деплеции [Tiegs et al, 1993]. А анергичные В-лимфоциты все же погибают на периферии, что приравнивало анергию к деплеции [Fulcher, Basten, 1994].

Таким образом, после первой реаранжировки L-цепи дальнейшее развитие В-лимфоцита может идти 3 путями, 2 из которых имеют биологический смысл позитивной селекции, а 1 - негативной селекции.

Первый путь - позитивной селекции случается если реаранжированные H- и L- цепи способны к формированию функционального BCR, но BCR не распознает доступные аутоантигены. Тогда в клетку поступает тонический подпороговый сигнал, связанный именно с успешной сборкой BCR на мембране, а не с его связыванием с антигеном. Так, несвязанный с

антигеном BCR вызывает активацию PI3K (phosphoinositide 3-kinase) сигнального пути с помощью фосфорилирования адаптерных белков CD19 и BCAP (В-клеточные адапторы PI3K) тирозинкиназами семейства Src [Fujimoto et al, 2000]. Дальнейшее действие PI3K приводит к снижению экспрессии генов *RAG1* и *RAG2* из-за увеличения активности Akt и выхода транскрипционного фактора FoxO1 (forkhead box protein O1) из ядра, что останавливает процесс рекомбинации легких цепей [Amin, Schlissel, 2008]. Данный сигнальный путь также приводит к выживаемости В-лимфоцита [Srinivasan et al, 2009]. Таким образом, успешная сборка BCR и отсутствие связывания антигена приводит к остановке реаранжировки генов BCR и дальнейшему развитию В-лимфоцита.

Второй путь – позитивной селекции случается если реаранжированные H- и L- цепи не способны к формированию функционального BCR. Тогда сигнала с успешно собранного BCR не поступает, и рекомбинация легких цепей происходит до тех пор, пока BCR не будет успешно собран или до тех пор, пока лимфоцит не погибнет путем апоптоза, поскольку сигнала к выживанию также не поступило. Таким образом, механизмы позитивной селекции обеспечивают наличие на В-лимфоцитах функциональных BCR.

Третий путь негативной селекции случается при связывании BCR антигена. Согласно одной из моделей в этом случае происходит снижение экспрессии и вывода на поверхность клетки BCR, что приводит к снижению PI3K сигналинга, снижению активности Akt и увеличению экспрессии FoxO1 в ядре, в результате чего увеличивается экспрессия генов *RAG* и усиливается рекомбинация, целью которой является получение новых легких цепей, обеспечивающих отсутствие аутореактивности BCR [Schram B.R et al, 2008]. Однако, в данной модели не ясно как именно происходит снижение экспрессии BCR, возможно, в результате особых механизмов интернализации [Nemazee D., 2015].

Согласно другой модели, связывание BCR с антигеном приводит к более сильной активации связанных с комплексом BCR Src-киназ, что приводит к активации BLNK (B cell linker protein) и далее к супрессии активности Akt, усилению экспрессии *FoxO1* и *RAG* [Herzog et al, 2008].

Есть данные, что около 20% В-лимфоцитов подвергаются исправлению аутореактивных BCR [Duong et al, 2011]. Интересно, что исправление генов аутореактивных BCR, в отличие от первичной реаранжировки, не совсем случайно. Так исправление идет в направлении от J к к V к сегментам, а затем переходит в λ локус [Arakawa et al, 1996]. Также возможна прогрессия от более эффективно реаранжируемых сегментов к менее [Aoki-Ota et al, 2012]. Это приводит к диверсификации BCR и способствует использованию λ легких цепей, что обеспечивает более успешное устранение аутореактивности [Wardemann et al, 2004].

В-клетки не сумевшие успешно перестроить гены BCR подвергаются апоптозу по внутреннему пути. Основную роль в апоптозе В-лимфоцитов играет проапоптотический фактор BIM, а усиленная экспрессия противоапоптотического фактора Bcl-2 способна отменить запрограммированную смерть В-клетки [Enders et al, 2003]. При этом экспрессия Bcl-2 связана с усилением исправления генов BCR [Lang et al, 1997].

Таким образом, процессы, обеспечивающие центральную толерантность, приводят к деплеции аутореактивных клонов Т- и В-лимфоцитов в тимусе и костном мозге, соответственно. При этом, аутореактивные Т-лимфоциты под действием определенных сигналов в тимусе могут быть дифференцированы в Treg, а аутореактивные В-лимфоциты способны править свой BCR для снижения аутореактивности.

### **1.3 Периферические механизмы иммунологической толерантности**

#### **1.3.1 Периферические механизмы толерантности Т-лимфоцитов**

Наивные Т-клетки, прошедшие этап негативной селекции и мигрирующие из тимуса, все же сохраняют определенную степень аутореактивности [Richards et al., 2016]. Сохранение аутореактивности объясняют определенной кросс-реактивностью TCR, т.е. на периферии Т-клетка может с большей аффинностью распознать эпитоп, отличный от эпитопа с которым она взаимодействовала в тимусе на этапе негативной селекции [Nelson et al, 2015]. Также, процесс негативной селекции может не выполнить свою функцию, поскольку презентация некоторых тканеспецифичных антигенов в тимусе менее эффективна, чем на периферии [Enouz et al., 2012]. И в добавок, в провоспалительных условиях, часто встречающихся при течении инфекционных заболеваний, Т-клетки, обладающие низкой аффинностью к собственным антигенам, могут быть активированы в связи с высоким уровнем костимуляции [Zehn, Bevan, 2006]. В норме, оставшаяся аутореактивность эффективно контролируется механизмами периферической толерантности, центральную роль в которых также выполняют дендритные клетки.

Изначально функцию дендритных клеток на периферии сводили к активации наивных Т-лимфоцитов (прайминг). Однако, позже было обнаружено, что прайминг Т-лимфоцитов способны осуществлять дендритные клетки, подвергнутые воздействию провоспалительных стимулов, например, агонистами паттерн-распознающих рецепторов или провоспалительными цитокинами [Coquerelle, Moser, 2010]. В результате такого воздействия дендритные клетки приобретают зрелый фенотип, проявляющийся в повышении уровня экспрессии молекул МНС I и II класса, молекул костимуляции и молекул активации, что и обеспечивает способность таких дендритных клеток праймировать Т-лимфоциты. В отсутствии провоспалительных стимулов

дендритные клетки обладают меньшей способностью к праймированию, что привело к развитию мнения о том, что незрелые ДК обладают толерогенной функцией [Steinman, 2003].

Действительно, незрелые аутологичные дендритные клетки, нагруженные основным белком миеллина, приводили к снижению выраженности экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита на крысах [Huang, 2000]. Также, введение незрелых дендритных клеток, нагруженных матричным белком гриппа, приводило к угнетению CD8<sup>+</sup> иммунного ответа, направленного на матричный белок, увеличению количества клеток, продуцирующих IL-10 в ответ на матричный белок, и снижению цитотоксической активности и продукции INF- $\gamma$  в ответ на стимуляцию матричным белком [Dhodapkar et al, 2001].

Изучение толерогенных механизмов, реализуемых периферическими дендритными клетками, выявило, что после взаимодействия с незрелыми дендритными клетками Т-лимфоциты подвергаются частичной делеции, а оставшиеся переходят в состояние неответственности – анергии [Hawiger et al., 2001]. Также под влиянием толерогенных дендритных клеток была показана дифференцировка FoxP3<sup>+</sup> негативных клеток в FoxP3<sup>+</sup> позитивные периферические или индуцированные Т-регуляторные клетки (pTreg или iTreg) и увеличение количества предсуществующих FoxP3<sup>+</sup> tTreg [Kretschmer et al, 2005].

Такое разнообразие возможных исходов взаимодействия незрелой дендритной клетки и наивного Т-лимфоцита привело к пониманию того, что концепция есть сигнал /нет сигнала не способна в полной мере объяснить функционирование системы периферической толерантности и незрелые дендритные клетки должны обеспечивать ряд дополнительных сигналов, определяющих дальнейшую судьбу Т-лимфоцита. На основе данного заключения была сформирована концепция наличия 3х сигналов при активации наивных Т-лимфоцитов дендритными клетками:

1. сигнал от связывания TCR Т-лимфоцита с комплексом МНС и эпитопа на дендритной клетке, определяющий специфичность взаимодействия;
2. сигнал от связывания костимуляторных молекул (CD28-CD80/86, CD40-CD40L и др.) и коингибиторных молекул (CTLA4-CD80/CD86, PD-1-PD-L1/PD-L2 и др.), определяющий дальнейшую функциональность и жизнеспособность Т-лимфоцита;
3. сигнал, в основном цитокиновой природы, определяющий поляризацию Т-клетки (IL-12 – Th1, IL-10 – Th2, IL-1, IL-6 – Th-17, TGF- $\beta$ , IL-10 - iTreg).

Комбинирование различных качественных и количественных характеристик данных сигналов определяет дальнейшую судьбу Т-лимфоцита [Chung et al, 2013]. Далее будут рассмотрены сигналы, приводящие к реализации толерогенной функции лимфоцита.

На наиболее раннем этапе было определено, что сигнал от взаимодействия TCR Т-лимфоцита с комплексом МНС и эпитопа на дендритной клетке является необходимым, но не достаточным для полноценной активации наивной Т-клетки, и Т-лимфоциты, активированные с помощью данного сигнала в отсутствии какой-либо костимуляции, являются анергичными [Jenkins, Schwartz, 1987]. При этом выделяют 2 типа анергии – клональную и адаптивную. Клональная анергия встречается у ранее активированных Т-лимфоцитов и вызывается длительным сильным сигналом с TCR в отсутствии сигналов костимуляции. Анергия в данном случае является следствием неполной активации Т-лимфоцитов и обусловлена блоком в сигнальном пути Ras/MAP киназ. При этом выход из состояния клональной анергии может быть достигнут с помощью IL-2 и CD40L.

Адаптивная анергия развивается при попытке активации наивных Т-клеток и вызывается сигналом с TCR при недостаточной костимуляции или достаточно сильной коингибиции. Получив такой сигнал Т-лимфоцит пролиферирует и дифференцируется до определенного момента, но при встрече с антигеном снижает свою функциональную активность и проявляет анергичные свойства. В отсутствии антигена состояние адаптивной анергии не проявляется. Интересно, что IL-2 не способен вывести лимфоцит из состояния адаптивной анергии. Адаптивную анергию связывают с ранним блоком развития сигнального пути тирозинкиназ и блокадой мобилизации ионов кальция. Оба механизма развития анергии принимают участие в формировании периферической толерантности [Schwartz, 2003].

Периферическая делеция Т-лимфоцитов происходит путем апоптоза. Для индукции апоптоза в Т-лимфоците он должен получить дополнительный сигнал от дендритной клетки или от своего окружения. Так, было показано, что дефицит триптофана в присутствии IDO, продуцируемого дендритными клетками, и метаболиты триптофана (кинуринин и его производные) обладают цитотоксическим действием на Т-лимфоциты. Дендритные клетки, получение в присутствии TNF- $\alpha$  и PGE2 увеличивают уровень экспрессии IDO, что приводит к повышенной делеции Т-лимфоцитов [Cools, 2007]. Также апоптоз Т-лимфоцита может быть достигнут в результате взаимодействия FasL на дендритной клетке и его рецептора Fas на поверхности лимфоцита [Suss, Shortman, 1996]. Таким образом, в отличие от центральной толерантности, делеция Т-лимфоцитов на периферии может быть достигнута с помощью запуска апоптоза с помощью специализированных рецепторов смерти.

Индукция периферических FoxP3<sup>+</sup> Treg с помощью дендритных клеток на данный момент описана достаточно подробно. Индукция экспрессии FoxP3 в Т-лимфоците происходит при слабом сигнале с TCR, недостаточном для полноценной активации. Такой слабый сигнал может быть получен при стимуляции низкими дозами антигена, обеспечивающего высокую аффинность взаимодействия TCR и МНС, и большими дозами антигена, обеспечивающего

низкую аффинность взаимодействия TCR и МНС. Необходимость слабого сигнала с TCR определяется тем, что сигнальная ось PI3K–Akt–mTOR, активирующаяся при связывании TCR, угнетает экспрессию FoxP3, поскольку киназа Akt ингибирует белки FoxO, являющиеся важным регулятором экспрессии FoxP3 [Ouyang et al, 2010]. Поэтому, при превышении определенного порога сигнала с TCR Т-клетка будет дифференцироваться в эффекторную, а не регуляторную [Gottschalk et al, 2010]. Также было показано, что сигнал с CD5 способен угнетать активность mTOR. CD5 экспрессируется Treg и наивными Т-клетками в ответ на толерогенные агенты, что приводит к стабилизации и индукции экспрессии FoxP3 соответственно [Henderson et al, 2015].

Дифференцировка iTreg требует слабого костимуляторного сигнала с CD28 и достаточной стимуляции CTLA4, поскольку сильная стимуляция CD28 увеличивает активность Lck тирозинкиназы, ингибирующей экспрессию FoxP3 [Semple et al, 2011].

Помимо определенных сигналов с TCR и молекулы костимуляции CD28 экспрессия FoxP3 требует наличия коингибиторных сигналов. Так, молекула IDO, часто продуцируемая толерогенными дендритными клетками и снижающая уровень доступного в микроокружении триптофана, активирует стресс-киназу GCN2, угнетающую активность mTORC2 и тем самым препятствующую фосфорилированию Akt в ее активационном сайте Сер473. Угнетение активности Akt приводит увеличению активности белка FoxO3a и повышению экспрессии другой коингибиторной молекулы на поверхности лимфоцита – PD-1. PD-1, связываясь со своими лигандами PD-L1 и PD-L2 на поверхности дендритной клетки, активирует фосфатазу PTEN, которая угнетает активность PI3K и блокирует фосфорилирование Akt в ее другом активационном сайте – Тре308. Таким образом, петля IDO-PD-1 сигналинга устойчиво блокирует сигнальный путь PI3K–Akt–mTOR и стабилизирует экспрессию FoxP3 в лимфоците [Munn, Mellor, 2016].

Сигнальный путь PI3K–Akt–mTOR может быть заблокирован путем прямой активации PTEN с помощью сигнала с рецептора нейропилина 1 (Nrp1, CD304), который, таким образом, также является мощным иммуносупрессивным агентом и участвует в формировании иммуносупрессивного микроокружения опухоли [Delgoffe et al, 2013]. Более того, было показано, что tTreg, обладающие устойчивой экспрессией FoxP3, преимущественно несут Nrp1, в то время как iTreg с менее стабильной экспрессией FoxP3 преимущественно не имеют Nrp-1 на своей поверхности [Yadav et al, 2012], что еще раз подчеркивает роль данного рецептора в стабилизации экспрессии FoxP3. Отсутствие сигналов, угнетающих сигнальный путь PI3K–Akt–mTOR, может дестабилизировать экспрессию FoxP3 и приводить к трансдифференцировке Treg в провоспалительные эффекторные Th17 клетки [Sharma et al, 2009].

Представленные механизмы дифференцировки периферических Treg под влиянием дендритных клеток проиллюстрированы на рисунке 2.

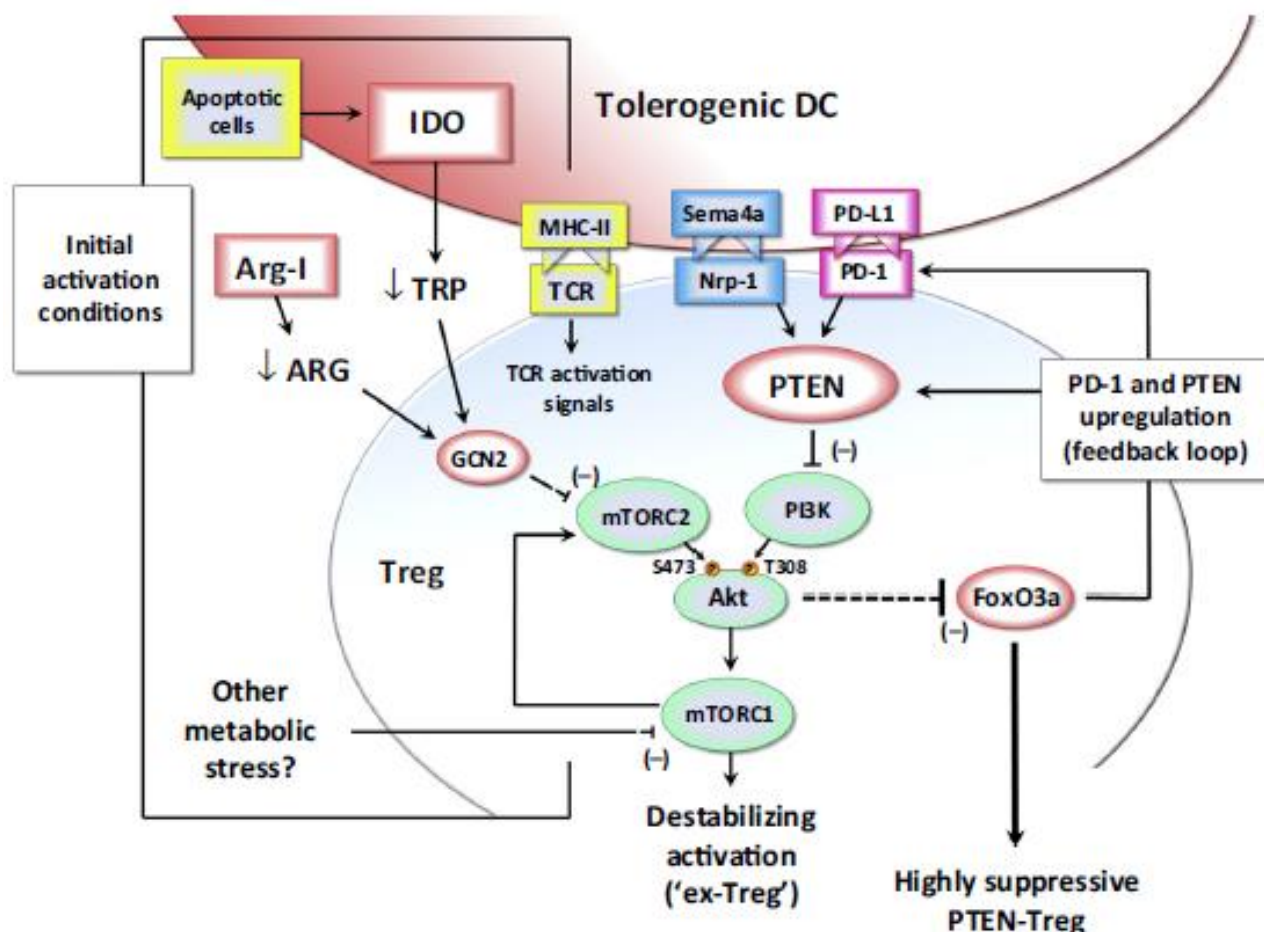


Рисунок 2 – Сигналы, приводящие к экспрессии FoxP3 при дифференцировке iTreg [Munn, Mellor, 2016].

Дифференцировка iTreg зависит не только от контактных сигналов, поступающих от дендритных клеток, но и от гуморальных факторов, находящихся в микроокружении и часто также продуцируемых дендритными клетками. Например, дифференцировка iTreg может быть достигнута с помощью TGF- $\beta$  и IL-2. Так, экспрессия FoxP3 обеспечивается TGF- $\beta$  зависимым связыванием Smad3 и NFAT с CNS1. Также TGF- $\beta$  подавляет способность TCR сигнала угнетать экспрессию FoxP3 за счет угнетения активности ДНК метилтрансферазы I, которая препятствует транскрипции локуса *foxp3* [Josefowicz et al, 2009]. IL-2 способен вызывать экспрессию FoxP3 в лимфоцитах, несущих TCR средней аффинности к аутоантигенам и избежавших негативной селекции в тимусе [Schallenberg et al, 2010]. IL-2 вызывает фосфорилирование STAT5, что угнетает экспрессию ROR $\gamma$ t и увеличивает экспрессию FoxP3 [Laurence et al, 2007].

IL-2, TGF- $\beta$  и ретиноевая кислота способны угнетать трансдифференцировку iTreg в Th17 эффекторные клетки. Механизм действия ретиноевой кислоты, продуцируемой дендритными клетками, в данном случае заключается в индукции экспрессии и фосфорилирования Smad3,

который в свою очередь усиливает TGF- $\beta$  сигналинг и далее экспрессию FoxP3 [Van Nieuwenhuijze, Liston, 2015].

### **1.3.2 Апоптоз как периферический механизм поддержания толерантности**

Считается, что в физиологических условиях фагоцитоз апоптических телец дендритными клетками является важнейшим стимулом для приобретения ими толерогенных свойств и основным механизмом поддержания периферической толерантности на антигены собственных тканей. Так, например, дендритные клетки, нагруженные апоптическими клетками угнетают развитие CD4<sup>+</sup> эффекторных клеток памяти и блокируют активность эффекторных Th17-клеток в модели экспериментального энцефаломиелита [Zhou et al, 2016; Zhou et al, 2013].

Апоптические клетки привлекают фагоциты, в т.ч. дендритные клетки, с помощью хемокинов (CX3CL1/фракталкин), липидов (липофосфатидилхолина и сфингозиг-1-фосфата) и нуклеотидов (АТФ и УТФ). Распознавание и фагоцитоз апоптических клеток происходит с помощью детекции фосфатидилсерина, который в норме располагается на внутренней стороне клеточной мембраны, но в течение первых 2х часов апоптоза увеличивается более чем 200-кратно на внешней стороне мембраны. На внешней стороне мембраны фосфотидилсерин и другие липиды подвергается перекисному окислению. Окисленные липиды распознаются рецепторами-мусорщиками (scavenger receptors) CD36, CD14, CD68, SRA, MARCO фагоцитов. Сигнал с данных рецепторов приводит к началу процесса фагоцитоза, а также к запуску толерогенной программы внутри фагоцита [Wermeling et al, 2007]. Фосфатидилсерин-опосредованный фагоцитоз осуществляется в отношении клеток, находящихся на ранней стадии апоптоза. Клетки на поздней стадии апоптоза опсонизируются C1q и C3b компонентами комплемента в результате потери мембранной молекулы CD46, в норме предотвращающей сборку комплексов комплемента на клеточной мембране. Фагоцитоз поздних апоптических телец в результате детекции компонентов комплемента на мембране происходит с помощью рецепторов SIGN-R1 и SCARF1. Дефициты C1q и SCARF1 приводят к накоплению апоптических клеток и возникновению волчаночно-подобного заболевания у мышей [Ramirez-Ortiz et al, 2013], что говорит о том, что фагоцитоз поздних апоптических телец также сопровождается индукцией толерогенного состояния фагоцита.

ДНК апоптических клеток также приводит к индукции толерогенной функции в фагоцитах. Так, ДНК апоптических клеток способна выходить из фагосомы и стимулировать TLR 9 и другие ДНК-сенсоры в цитоплазме [Huang et al, 2012], что приводит к STING зависимой экспрессии INF 1 типа и последующей компенсаторной экспрессии IDO в дендритных клетках [Huang et al, 2013]. Дефицит STING приводит к неспособности фагоцитов продуцировать IDO

при захвате апоптических клеток и способствует ухудшению аутоиммунных заболеваний [Sharma et al, 2015]. Считается, что слабая стимуляция STING, происходящая при захвате ДНК апоптических клеток, вызывает ограниченную экспрессию INF, но достаточную для индукции толерогенного состояния аутокринную и паракринную экспрессию IDO [McGaha, Karlsson, 2016]. Экспрессия IDO, является одной из основных механизмов индукции толерантности с помощью апоптических клеток, поскольку при дефиците IDO, введение апоптических клеток не приводит формированию толерантности. Влияние IDO приводит к повышенной экспрессии IL-10, TGF- $\beta$  и сниженной экспрессии IL-12 в доступном микроокружении [Ravishankar et al, 2012].

### 1.3.3 Периферические механизмы толерантности В-лимфоцитов

Известно, что дендритные клетки, в частности, фолликулярные дендритные клетки участвуют в активации В-лимфоцитов в лимфоузлах [Heath et al, 2019]. Однако, способность толерогенных дендритных клеток индуцировать толерантность внутри В-клеточного звена изучено не столь подробно.

Известно, что толерогенные дендритные клетки, полученные с помощью дексаметазона и витамина D3, увеличивают численность FoxP3+ Breg (В-регуляторных клеток) в культуре [Volchenkov et al, 2013]. Также, дендритные клетки, полученные из костного мозга крыс с помощью аторвастатина, приводили к увеличению количества FoxP3+ и IL-10+ Breg и снижали проявления модельной миастении гравис [Li et al, 2015].

Механизм индукции Breg с помощью толерогенных ДК включает в себя IFN- $\beta$  сигналинг и CD40-CD40L контактное взаимодействие В-клетки и ДК [Qian et al, 2012]. Также, существующие данные о индукции периферической толерантности внутри В-клеточного звена говорят о возможности влияния второго сигнала, полученного дендритной клеткой и/или В-клеткой с паттерн-распознающего рецептора, на характер будущего ответа [Johnson et al, 2019]. Так, было показано, что удвоение внутриклеточного TLR7, распознающего одноцепочечную ДНК, увеличивает количество аутореактивных антител в модели аутоиммунного заболевания, а его дефицит – уменьшает. При этом также отмечается, что высокий уровень экспрессии TLR7 приводит к экспансии провоспалительных дендритных клеток, но является ли это причиной повышенного образования аутореактивных антител не изучено [Deane et al, 2007]. Дефицит TLR9, наоборот, ухудшает течение аутоиммунных заболеваний, обусловленных появлением аутоантител, в мышечных моделях и увеличивает частоту встречаемости аутореактивных В-клеток [Christensen et al, 2006]. Возможный механизм данного феномена заключается в том, что совместный сигнал с В-клеточного рецептора (BCR) и TLR9 обеспечивает более высокий

уровень экспрессии дезаминазы AID, необходимой для устранения аутореактивных В-клеток [Kuraoka et al, 2017].

#### **1.4 Иммунология трансплантационных реакций**

Под трансплантационными реакциями мы будем понимать иммунные реакции, возникающие при трансплантации органов и тканей донора в организм реципиента, в т.ч. реакцию отторжения – при трансплантации негемопоетических органов и тканей и реакцию «трансплантат против хозяина» (РТПХ) – при пересадке костного мозга или гемопоетических стволовых клеток.

Трансплантационные реакции возникают в результате внесения в организм чужеродных трансплантационных антигенов, на которые впоследствии развивается иммунный ответ. Иммунный ответ повреждает пересаженный орган или ткани реципиента в случае трансплантации костного мозга, что приводит к нарушению функции пораженных органов и несостоятельности трансплантации.

Известно множество трансплантационных антигенов, среди которых молекулы главного комплекса гистосовместимости (ГКГС, МНС- major histocompatibility complex), антигены групп крови А и В и минорные антигены, не принадлежащие молекулам МНС.

Минорные антигены, не принадлежащие молекулам МНС, вносят относительно небольшой вклад в развитие трансплантационных реакций в связи с их меньшим полиморфизмом по сравнению с молекулами МНС. Антигены групп крови также не столь существенны при развитии трансплантационных реакций, однако могут приводить к острому отторжению первично васкуляризированных трансплантатов, например почки и сердца [Ayala García et al., 2012].

Еще в прошлом веке было выявлено, что ведущую роль в отторжении пересаженных органов и тканей играют молекулы МНС. Согласно своей функции, сами молекулы и ген, их кодирующий, были названы главным комплексом гистосовместимости [Bach, 1976]. Интересно, что в тоже время уже начало формироваться мнение об участии данных молекул в инициации и других типов иммунного ответа [Brondz et al, 1975]. К сегодняшнему дню молекулы МНС все также считаются основными антигенами, на которые направлены трансплантационные реакции, однако, на данный момент накоплено большое количество данных о механизмах развития и течения иммунных реакций, вызванных введением в организм чужеродных молекул МНС.

### 1.4.1 Иммунопатогенез реакции отторжения

Выделяют 3 механизма распознавания аллогенных молекул МНС на пересаженных органах и тканях иммунными клетками реципиента – прямой, непрямой и полупрямой (direct, indirect and semi-direct pathway of allorecognition).

Прямой механизм заключается в распознавании CD4 и CD8 лимфоцитами реципиента молекул МНС I и II класса на поверхности антиген-представляющих клеток донора, вне зависимости от эпитопа ими презентируемого. Данный механизм был предположен в результате наблюдений за течением смешанных культур лейкоцитов *in vitro*, где было выявлено, что аллогенные лимфоциты успешно активируются антиген-представляющими клетками другого генотипа [Bain et al., 1964]. Причиной возможности подобной активации считается то, что TCR лимфоцитов способен распознавать аллогенные МНС с высокой аффинностью, поскольку аллогенные МНС, с некоторыми изменениями относительно аутологичных МНС, имитируют комплекс аутологичного МНС и чужеродного пептида. Так, было показано, что около 10% T-клеток реципиента распознают молекулы МНС донора [Lechler, Batchelor, 1982]. Определенное время данный механизм считался основным инициатором реакции отторжения. Его понимание было дополнено выявлением того факта, что для возникновения прямого пути отторжения необходимо наличие дендритных клеток в трансплантате, которые мигрируя в лимфоузлы реципиента осуществляют активацию лимфоцитов по прямому пути – теория лейкоцитов-пассажира (passenger leucocyte theory) [Lakkis et al, 2000]. Однако, удаление лейкоцитов из трансплантата перед его пересадкой хоть и снижало выраженность острой реакции отторжения, но не отменяло ее полностью [Lechler, Batchelor, 1982].

Полученные данные говорили о том, что трансплантат также может быть отторгнут с помощью захвата, процессинга и представления молекул МНС донора антиген-представляющими клетками реципиента. Выявленный механизм называли непрямым, а его роль в инициации реакции отторжения также оказалась значимой [Harris et al, 1999]. Несмотря на то, что молекулы МНС крайне полиморфны, активация лимфоцитов непрямым механизмом осуществляется в основном на ограниченное количество иммунодоминантных эпитопов молекул МНС [Lovegrove et al, 2001].

Далее, открытие феномена трофоцитоза, сформировало гипотезу о том, что молекулы МНС донора могут быть представлены на антиген-представляющих клетках реципиента и, таким образом, лимфоциты реципиента могут быть активированы молекулами МНС донора, но антиген-представляющими клетками реципиента. Данная гипотеза была подтверждена экспериментально путем обнаружения МНС II класса донора на антиген-представляющих клетках реципиента при трансплантации солидных органов [Brown et al, 2008]. Открытый

механизм был назван полупрямым (semi-direct). Среди механизмов трансфера молекул МНС донора на антиген-представляющие клетки реципиента известны контактный трогицитоз и бесконтактный трансфер с помощью везикул [Harshyne et al, 2001; Liu et al, 2016]. Хотя данный механизм и рассматривается на данный момент в качестве самостоятельного, спектр специфичностей лимфоцитов, активирующихся при его реализации, должен совпадать со спектром специфичностей лимфоцитов, активирующихся прямым путем. При этом спектр специфичностей лимфоцитов, активированных непрямым путем, должен быть отличным.

Схематичное изображение механизмов распознавания аллогенных МНС представлено на рисунке 3 [Siu et al, 2018].

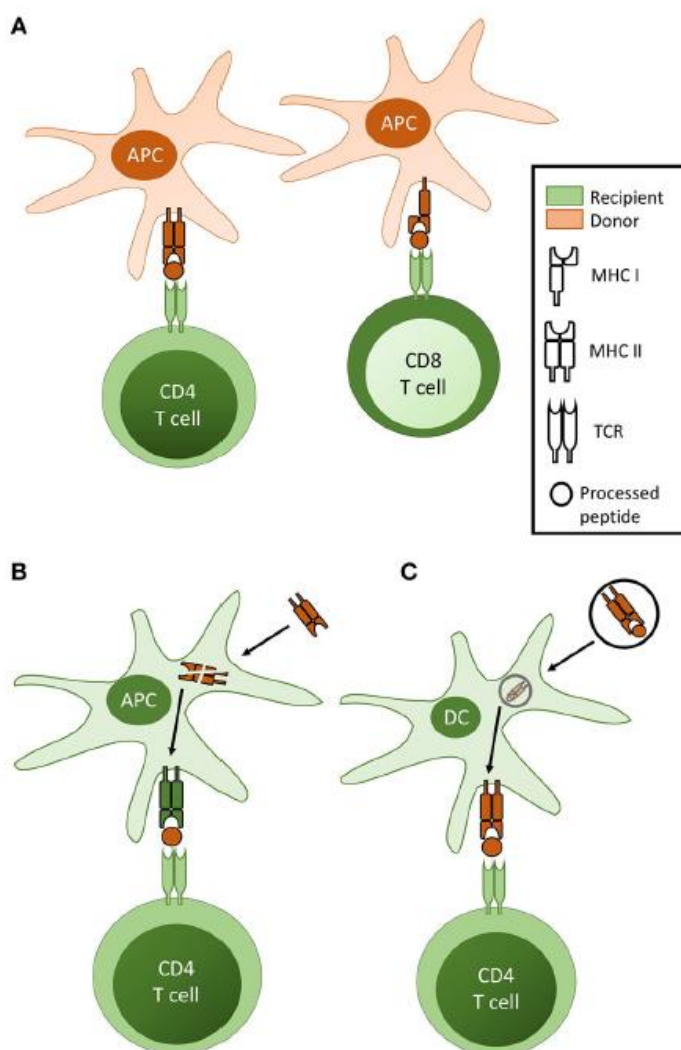


Рисунок 3 – Механизмы распознавания аллогенных МНС при трансплантации солидных органов [Siu et al, 2018]. А – прямой. В – не прямой. С – полупрямой.

Было показано, что прямой механизм активации Т-лимфоцитов реципиента донорскими антиген-представляющими клетками происходит наиболее активно в первые несколько недель

после трансплантации, что определено временем выживаемости донорских АПК в организме реципиента [Ali et al, 2016]. Однако, с открытием полупрямого механизма было показано, что трансфер донорских молекул МНС на антиген-представляющие клетки реципиента может осуществляться и все время нахождения трансплантата в организме, что обеспечивает наличие иммунного ответа на интактные молекулы МНС донора и в более поздние сроки [Marino et al, 2016].

Непрямой механизм активации Т-лимфоцитов реципиента на процессированные эпитопы МНС донора развивается и длится дольше, чем прямой. Так, например, при трансплантации сердца в трансгенной мышшиной модели с TCR, специфичными только к определенному эпитопу МНС донора, прямой механизм активации не наблюдался уже через 1 неделю после трансплантации. В то время как непрямой механизм наблюдался в более поздние сроки и сопровождался презентацией эпитопов МНС донора и поздней активацией CD4<sup>+</sup> лимфоцитов [Ali et al, 2016].

Таким образом, считается, что прямой механизм ответственен за возникновение острой реакции отторжения, непрямой – за хроническое отторжение, а полупрямой вносит вклад в острое и хроническое отторжение, однако объемы влияния не определены.

Интересно, что прямой механизм активации лимфоцитов и, соответственно, острая реакция отторжения направлены на молекулы МНС I и II класса. В то время как непрямой механизм и хроническое отторжение направлены преимущественно на эпитопы молекул МНС I класса. Так, на мышшиной модели, непрямой механизм, активирующий Т-лимфоциты на эпитопы МНС II класса, не наблюдается уже через неделю после трансплантации, как и прямой механизм. А непрямая активация лимфоцитов на эпитопы МНС I класса развивается позже 1 недели после трансплантации [Ali et al, 2016]. У людей же основной причиной дисфункции трансплантата в первые 6 месяцев после пересадки является несовпадение гаплотипа по HLA-DR (МНС II), а в течение первых 2х лет – несовпадение гаплотипа по HLA-B (МНС I) [Ayala García et al, 2012].

Данные отличия в направленности прямого и непрямого механизмов, вероятно, связаны с различными источниками антигенов, доступными в раннем и позднем посттрансплантационном периоде. Так, на ранних сроках, источником антигена для прямой активации CD4-лимфоцитов являются донорские АПК, несущие интактный МНС II. Прямая активация CD8-лимфоцитов с помощью МНС I на донорских АПК на ранних сроках также происходит, однако, для успешной активации CD8-лимфоцитов требуется помощь CD4 Т-хелперов, поэтому цитотоксический ответ против интактного аллогенного МНС I все же требует несовпадения по МНС II класса. На поздних сроках, после элиминации донорских АПК, основным источником эпитопов донорских антигенов в АПК реципиента становятся соматические клетки трансплантата, несущие преимущественно МНС I класса [Siu et al, 2018].

В иммунном ответе против аллоантигенов трансплантата участвуют также клетки памяти. Т.е. помимо первичного праймирования лимфоцитов в течение реакции отторжения происходит также и повторная активация клеток памяти. Так, в раннем посттрансплантационном периоде происходит повторная активация клеток памяти, существующих до трансплантации и специфичных к ранее встречаемым нетрансплантационным антигенам, но перекрестно распознающих донорские МНС [Benichou et al, 2017]. А в позднем посттрансплантационном периоде происходит активация клеток памяти, наработанных во время острой реакции отторжения и специфичных к целевым трансплантационным антигенам. При этом, т.к. острая реакция отторжения направлена в основном на интактные МНС II класса, повторная активация клеток памяти может приводить к цитотоксическому ответу против данного антигена и в течение хронического отторжения. Возможной причиной повторной активации данного пула клеток памяти может быть транзистная экспрессия МНС II донора на эндотелии трансплантата, вызванная провоспалительными факторами [Ali et al, 2016].

Как известно, адаптивный иммунный ответ развивается в провоспалительных условиях, заданных реакциями врожденного иммунитета. Считается, что активация врожденного иммунитета при пересадке солидных органов происходит из-за повреждения клеток трансплантата в результате ишемии-реперфузии, возникающей при изъятии и последующем возвращении трансплантата в кровоток при пересадке [Land, Messmer, 1996]. При повреждении клетки трансплантата продуцируют активные формы кислорода и DAMP (damage associated molecular patterns, молекулярные паттерны повреждения), в т.ч. белки HSP (heat shock proteins, белки теплового шока) и фрагменты гиалуроновой кислоты, которые распознаются TLR2 и TLR4. Связывание TLR2 и TLR4 приводит к запуску экспрессии основных активационных факторов NF-κB, AP-1 и IRF-3 в клетках врожденного иммунитета, в т.ч. и антиген-представляющих клетках. В результате активированные дендритные клетки способны осуществлять запуск адаптивного иммунного ответа [Land, 2007].

Из клеток врожденного иммунитета в отторжении трансплантата также участвуют NK-клетки. Активационные рецепторы NK-клеток CD94/NKG2C, NKG2D, NKp30, NKp44 и NKp46 распознают молекулы МНС донора как измененные «свои» из-за их отличного морфологического варианта. В результате чего NK-клетки осуществляют цитотоксическую функцию в отношении клеток трансплантата. При этом клетки трансплантата не несут интактных молекул МНС реципиента, которые способны угнетать цитотоксическую функцию NK-клеток путем связывания их ингибиторных рецепторов семейства KIR [Kroemer et al, 2008]. Цитотоксическая активность NK-клеток против клеток трансплантата расценивается как один из механизмов его повреждения и отторжения.

### **1.4.2 Иммунопатогенез реакции «трансплантат против хозяина»**

Реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ) возникает при трансплантации костного мозга или гемопоэтических стволовых клеток донора в организм реципиента. Основные причины развития РТПХ – несовпадение гаплотипов МНС донора и реципиента, наличие иммунокомпетентных клеток донора в организме реципиента и неспособность реципиента отторгнуть трансплантат, были описаны еще в прошлом веке [Billingham, 1966]. РТПХ протекает остро и хронически, причем механизмы повреждения тканей в данных случаях различны.

#### **Иммунопатогенез острой РТПХ**

Сейчас в патогенезе острой РТПХ выделяют стадию повреждения клеток реципиента, вызванную режимом кондиционирования и приводящей к созданию провоспалительных условий. Стадию активации донорских Т-клеток антиген-представляющими клетками [Kernan et al., 1986]. И стадию направленной миграции эффекторных клеток в органы мишени РТПХ [Kuba, Raida, 2018].

Режим фармакологического или лучевого кондиционирования, применяемый для элиминации клеток костного мозга реципиента, приводит к повреждению всех клеток организма и массивной продукции DAMP – HMGB1, АТФ, мочевой кислоты, гепаран-сульфатных протеогликанов и белков теплового шока. Рецепция сигналов опасности антиген-представляющими клетками приводит к их активации и секреции провоспалительных цитокинов TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IL-6 [Toubai et al, 2016]. Провоспалительный фон во время острой РТПХ, создаваемый режимом кондиционирования, настолько выражен, что к нему применяют термин «цитокиновый шторм». Однако, устранение некоторых DAMP сглаживает течение острой РТПХ [Magenau et al, 2016]. Выявление данного обстоятельства привело к использованию более щадящих режимов кондиционирования, например, к использованию немиелооблативных режимов.

Интересно, что в результате кондиционирования повреждаются не только клетки реципиента, но и клетки его микробиома. В результате чего происходит также и продукция PAMP (pathogen associated molecular patterns, молекулярные паттерны патогенов), что увеличивает выраженность и даже влияет на направленность РТПХ. Так, хроническая интоксикация LPS (липополисахаридом бактериальной стенки грамотрицательных бактерий) приводит к развитию легочных проявлений РТПХ [Martinu et al, 2014]. А замена лактобактерий на условно-патогенные энтерококки в микрофлоре кишечника в результате антибиотикотерапии увеличивает риск развития РТПХ и ее кишечных проявлений [Holler et al, 2014].

Активированные DAMP и PAMP антиген-представляющие клетки далее способны активировать эффекторные лимфоциты донора, специфичные к антигенам реципиента.

Основными антигенами, на которые направлен адаптивный иммунный ответ при течении острой РТПХ, также являются МНС I и II класса. А тяжесть РТПХ прямо коррелирует со степенью различий молекул МНС донора и реципиента [Petersdorf et al, 2015]. Однако, РТПХ возникает и при МНС-идентичной трансплантации, что подчеркивает роль минорных молекул гистосовместимости в развитии РТПХ [Goulmy et al, 1996].

Основными эффекторными клетками при течении острой РТПХ являются трансплантированные Т-клетки донора. При этом, это могут быть ранее активированные эффекторные клетки и клетки-памяти, кросс-реактивно реагирующие на антигены реципиента или наивные Т-клетки, которые будут активированы с помощью молекул МНС реципиента. Судя по всему, данные субпопуляции вносят различный вклад в течение РТПХ. Так, исключение из трансплантата наивных Т-клеток не влияло на тяжесть острой РТПХ, но снижало выраженность хронической РТПХ [Bleakley et al, 2015]. Что может говорить о том, что за развитие острой РТПХ отвечают ранее активированные кросс-реактивные Т-клетки донора, поскольку они либо не требуют активации - в случае эффекторных клеток, либо активируются быстро - в случае Т-клеток памяти. А определенный вклад в развитие хронической РТПХ вносят наивные Т-клетки донора при активации которых на антигены реципиента возникает персистирующий клон клеток памяти, определяющий наличие отдаленных иммунных реакций. Т-клетки памяти и наивные Т-клетки могут быть активированы во время острой РТПХ как донорскими дендритными клетками, так и дендритными клетками реципиента [Shlomchik et al, 1999; Matte et al, 2004]. При чем, при активации дендритными клетками реципиента осуществляется прямой механизм аллораспознавания, а при активации дендритными клетками донора – непрямой.

Цитокиновый шторм во время острой РТПХ также сопровождается выбросом в тканях большого количества молекул хемотаксиса семейств C, CC, CXC и CX3C, с помощью которых активированные эффекторные Т-клетки мигрируют в органы мишени РТПХ [Kittan, Hildebrandt, 2010]. Хотя МНС I класса представлены на всех ядеросодержащих клетках организма, основными мишенями острой РТПХ наиболее часто являются желудочно-кишечный тракт, печень и кожа. Причины такой селективности не до конца ясны. Повреждение клеток органов мишеней осуществляется цитотоксическими Т-лимфоцитами путем перфорин-гранзим зависимого лизиса и индукции апоптоза через Fas-FasL и TNFR-TRAIL взаимодействий. Активированные Th1- клетки поддерживают провоспалительный фон путем секреции INF- $\gamma$ , а также вызывают Fas-FasL зависимый апоптоз [Paczesny et al, 2010]. Помимо клеток адаптивного иммунитета по градиенту хемокинов в органы мишени привлекаются нейтрофилы, осуществляющие повреждение тканей дегрануляцией и фагоцитозом. А резидентные макрофаги, активированные провоспалительным фоном и получающие помощь от Th1-клеток, активно осуществляют фагоцитоз поврежденных клеток [Holtan et al, 2014].

## **Иммунопатогенез хронической РТПХ**

Полная элиминация Т-клеток из трансплантата приводит к практически полному отсутствию острой РТПХ, но сохранности хронической РТПХ [Blazar et al, 2012], что говорит о том, что механизмы развития хронической РТПХ, в отличие от острой, не связаны с перенесенными зрелыми донорскими Т-клетками.

Считается, что хроническая РТПХ развивается на фоне воспаления и повреждений, возникших при течении острой РТПХ. Одним из самых значимых повреждений, возникающем при течении острой РТПХ и определяющим дальнейшее течение хронической РТПХ, является повреждение тимуса. Повреждение тимуса сопровождается его атрофией и снижением эктопической экспрессии тканеспецифичных антигенов, используемых для негативной селекции и поддержания центральной толерантности. В результате во время течения хронической РТПХ из тимуса мигрируют Т-клетки, дифференцированные из гемопоэтических предшественников донора, с нарушенной толерантностью к антигенам органов-мишеней реципиента – коже, печени, слюнным железам, легким, глазам и ЖКТ [Dertschnig et al, 2013]. Данное обстоятельство придает течению хронического РТПХ аутоиммунный характер, хотя аутоиммунным в полной мере данный процесс назвать нельзя, поскольку соматические клетки реципиента повреждаются Т-клетками донора.

Еще один из механизмов развития хронической РТПХ с участием гемопоэтических предшественников донора и тимуса реципиента был показан на мышинной модели [Sakoda et al, 2007]. Так, при переносе трансплантата, лишённого Т-клеток, реципиенту, отличному по гаплотипу МНС, возникала хроническая РТПХ. Но при удалении тимуса ее не возникало. Более того, Т-клетки мышей с хронической РТПХ были реактивны к клеткам донора и могли вызывать хроническую РТПХ у реципиентов только при условии введения им антиген-представляющих клеток донора. Данная работа показала, что Т-клетки, развивающиеся из гемопоэтических предшественников донора в тимусе реципиента, реактивны не только к клеткам реципиента, по причине нарушений механизмов поддержания центральной толерантности, но и на клетки собственного гаплотипа МНС, поскольку негативная селекция в тимусе в отношении данных МНС слабо выражена, т.к. в тимусе в основном осуществляется самоподдержание клеток реципиента, выполняющих негативную селекцию, а приток новых клеток с донорским гаплотипом происходит в существенно меньшем объеме. Таким образом, течение хронической РТПХ определено в том числе реакцией «трансплантат против трансплантата», эффекторы и мишени, в которой происходят из гемопоэтических предшественников донора.

В иммунопатогенезе хронической РТПХ участвуют также В-клетки, развивающиеся из гемопоэтических предшественников донора. В течение хронической РТПХ В-клетки продуцируют антитела с высокой аффинностью к антигенам реципиента, в основном к минорным

антигенам гистосовместимости [Miklos et al, 2014]. Причиной появления В-клеток, специфичных к антигенам реципиента, считают нарушение процессов поддержания центральной толерантности в костном мозгу, поврежденном режимом кондиционирования и течением острой РТПХ. Также, во время хронической РТПХ в сыворотке крови наблюдается повышенные концентрации BAFF (B-cell activating factor, фактор активации В-клеток), который способствует выживанию реципиент-специфичных В-клеток и их ускользанию от периферической делеции [Sarantopoulos et al, 2009]. BAFF увеличивает экспрессию TLR7 и TLR9, распознающих РНК и двуцепочечную ДНК, соответственно. А сигналы с TLR7 и TLR9 увеличивают экспрессию BAFF, что приводит к формированию петли положительной обратной связи [Groom et al, 2007]. Закрепившийся синергичный сигнал с BCR и TLR7/TLR9 приводит к активной пролиферации В-клеток и продукции ими цитокинов и антител [Suthers, Sarantopoulos, 2017].

Реципиент-специфичные антитела, продуцируемые В-клетками, также определяют картину течения хронической РТПХ. Так, антитела, специфичные к рецептору PDGFR (platelet-derived growth factor receptor, рецептор фактора роста тромбоцитов), стимулируют его, что приводит к отложению коллагена I типа и фиброзу органов-мишеней РТПХ. Повышенное количество анти-PDGFR антител наблюдается при активном течении хронической РТПХ [Svegliati et al, 2007].

На финальных стадиях течения хронической РТПХ наблюдается глубокая дисрегуляция процессов восстановления тканей в результате постоянного повреждения. Ткани и органы фиброзируются, теряют свойственную им микроархитектонику, а далее и функцию [Wynn, Ramalingam, 2012].

### **1.5 Клеточная терапия трансплантационных реакций**

На данный момент в клинической практике для лечения трансплантационных реакций используется системная иммуносупрессивная терапия. Однако, действуя системно данная терапия приводит к возникновению множества побочных эффектов и действуя иммуносупрессивно - к развитию оппортунистических инфекционных и даже опухолевых заболеваний [Curtis et al, 2006; Ponticelli, Glassock, 2019; De Fijter, 2017]. Поэтому последнее время активно разрабатываются подходы для терапии трансплантационных реакций без использования системной иммуносупрессии. А одним из перспективных разрабатываемых подходов считается клеточная иммунотерапия.

Смысл клеточной иммунотерапии трансплантационных реакций заключается в создании иммунологической толерантности на антигены пересаженных органов и тканей или на антигены

реципиента в случае терапии РТПХ. Основными клетками, которые используют для индукции иммунологической толерантности, являются толерогенные дендритные клетки.

Как было сказано выше, для выполнения толерогенной функции дендритная клетка должна обладать рядом свойств, таких как: способность взаимодействовать с TCR-лимфоцита с определенной аффинностью, сниженная экспрессия костимуляторных молекул и экспрессия коингибиторных молекул, а также секреция иммунорегуляторных цитокинов.

В данном разделе будут рассмотрены способы получения дендритных клеток с заданным набором свойств, механизмы индукции иммунологической толерантности с помощью данных дендритных клеток, а также их способность подавлять трансплантационные реакции.

Как известно, незрелые дендритные клетки, несущие относительно малое количество МНС II и молекул костимуляции уже обладают способностью к выполнению толерогенной функции. Поэтому, как оказалось, для получения толерогенных ДК достаточно культивирования их предшественников в среде с относительно малым количеством GM-CSF, классически используемым для получения миелоидных ДК. Полученные с помощью малых доз GM-CSF мышинные незрелые ДК характеризовались сниженной экспрессией МНС II и молекул костимуляции, резистентностью к созреванию под действием LPS, TNF- $\alpha$  и агониста CD-40 и сниженной аллостимуляторной способностью. Более того, введенные аллогенному реципиенту за 7 суток до эктопической трансплантации сингенного сердца, полученные ДК увеличивали время его отторжения [Lutz et al., 2000]. Возможность получения толерогенных ДК в условиях дефицита факторов, используемых для их получения *in vitro*, была показана также и при устранении IL-4. Так, дендритные клетки, полученные в присутствии GM-CSF, но без IL-4, секретируют большие количества IL-10, меньшие количества IL-12 и вызывали меньшую пролиферацию CD4<sup>+</sup> клеток по сравнению с ДК, полученными в присутствии GM-CSF и IL-4 [Guindi et al, 2018]. Также, даже под воздействием стандартных в культуральной практике доз GM-CSF и IL-4, в получаемых культурах присутствуют ДК, обладающие выраженной толерогенной функцией. Так, прилипающая фракция ДК, полученных с помощью GM-CSF и IL-4, обладала меньшей экспрессией молекул костимуляции, меньшей аллостимуляторной способностью, большей рефрактерностью к созреванию с помощью LPS и CD-40L, чем неприлипающая фракция ДК. Также, только прилипающая фракция была способна увеличивать время отторжения эктопически трансплантированного аллогенного сердца [Pêche et al, 2005].

Дендритные клетки с толерогенной функцией получают также с помощью добавления дополнительных агентов в культуральную среду. Среди данных толерогенных агентов можно выделить естественные иммунорегуляторные соединения – TGF- $\beta$  и IL-10, витамин D3 и биологические агенты, не представленные в организме, но обладающие иммунорегуляторным эффектом – дексаметазон, BAY-11-7082 (специфический ингибитор NF- $\kappa$ B). Судя по

проанализированной литературе, принципиальным отличием дендритных клеток, получаемых с помощью данных толерогенных агентов, от незрелых ДК, получаемых в дефиците факторов роста, является повышенная экспрессия ими коингибиторных молекул (например, PD-L1 и IDO) и иммунорегуляторных цитокинов (TGF- $\beta$  и IL-10) и, как следствие, их повышенная способность к индукции регуляторных Т-клеток (Treg и Tr1).

Так, дендритные клетки, полученные в присутствии TGF- $\beta$  обладают сниженной экспрессией МНС II, молекул костимуляции и активационных молекул CD86, CD40 и CD83. TGF- $\beta$  способствует экспрессии IL-10 в дендритных клетках и ограничивает экспрессию IL-12. Однако, особенно важно, что TGF- $\beta$  повышает экспрессию дендритными клетками толерогенного фактора IDO, участвующего в дифференцировке Treg [Song et al, 2014]. Возможным механизмом толерогенного влияния TGF- $\beta$  на дендритные клетки является угнетение с его помощью сигналинга с  $\beta$ -катенина, вызывающего созревание дендритных клеток [Vander Lugt et al, 2011].

Основной характеристикой дендритных клеток, полученных в присутствии IL-10, является их способность продуцировать повышенные количества IL-10 и тем самым вызывать дифференцировку IL-10 продуцирующих регуляторных FoxP3<sup>+</sup> Tr1 клеток. При этом, дифференцировка Tr1 клеток под действием IL-10 связана с функционированием ILT4/HLA-G сигнального пути в лимфоцитах [Comi et al, 2018]. Однако, встречаются данные и о индукции FoxP3<sup>+</sup> Treg клеток IL-10 продуцирующими ДК [Boks et al, 2012].

Толерогенная функция дендритных клеток, полученных с помощью совместного добавления TGF- $\beta$  и IL-10, настолько выражена, что для их обозначения начали применять термин регуляторные дендритные клетки (DCreg). Так, регуляторные дендритные клетки, полученные с помощью TGF- $\beta$  и IL-10, обладают сниженной экспрессией молекул МНС I и II класса, молекул костимуляции и активации CD80, CD86 и CD40, а также способностью к дифференцировке CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Treg из CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>-</sup> аллогенных лимфоцитов. Более того, регуляторные ДК, введенные реципиенту с индуцированной РТПХ, откладывали ее начало и снижали выраженность ее проявлений, за счет генерации повышенного количества CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Treg *in vivo* и снижения уровня провоспалительных цитокинов TNF- $\alpha$ , IL-12 и INF- $\gamma$ . При этом действие регуляторных дендритных клеток при нагрузке антигеном проявляло антиген-специфичный характер за счет генерации антиген-специфичных Treg [Fujita et al, 2007]. Регуляторные дендритные клетки увеличивают время приживаемости ортотопически трансплантированной роговицы, также за счет увеличенной генерации FoxP3<sup>+</sup> Treg *in vivo*. При этом, было показано, что полученные дендритные клетки угнетали преимущественно не прямой путь активации лимфоцитов [Hattori et al, 2012].

Дендритные клетки, получаемые в присутствии витамина D3, также обладают сниженной экспрессией МНС II и молекул костимуляции CD80, CD86 и CD40 и соответственно вызывают сниженный Т-клеточный ответ. Более того, такие дендритные клетки обладают повышенной экспрессией ко-ингибиторной молекулы PD-L1, что позволяет им индигировать повышенное количество FoxP3+ Treg [Huang et al, 2014]. Введение витамина D3 реципиенту увеличивает время приживаемости островков поджелудочной железы и сердца. При этом дендритные клетки, полученные от данных реципиентов, обладают сниженной экспрессией молекул костимуляции и IL-12. А CD4+CD25+ клетки реципиентов, перенесенные сингенной мыши, также защищают ее от отторжения островков поджелудочной железы, что говорит о *in vivo* генерации Treg с помощью витамина D3 [Gregori et al, 2001].

Известно, что одним из основных транскрипционных факторов, ответственных за активацию дендритных клеток, является NF-κB. Поэтому, применение его ингибиторов - BAY-11-7082, андрографолида и розиглитозона, приводит к получению незрелых дендритных клеток со сниженной экспрессией МНС II, CD86 и CD40 и повышенной способностью индуцировать экспрессию FoxP3 в лимфоцитах. Дендритные клетки с заблокированным NF-κB снижают тяжесть течения модельных аутоиммунных заболеваний – аутоиммунного артрита и экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита [Martin et al, 2007; Iruretagoyena 2006].

Дендритные клетки, полученные в присутствии дексаметазона обладают сниженной экспрессией МНС II, молекул костимуляции CD80 и CD86 и провоспалительных цитокинов IL-1β, IL-6 и IL-12, однако, большей экспрессией толерогенного фактора IDO [Lynch et al, 2017]. Несмотря на то, что дексаметазоновые дендритные клетки экспрессируют обычное количество PD-L1, они обладают повышенной способностью индуцировать экспрессию FoxP3 в наивных Т-лимфоцитах [Gong et al, 2011].

Для стабилизации толерогенной функции дендритных клеток при переносе в организм реципиента используется их трансфекция конструкциями, кодирующими иммунорегуляторные агенты. Например, ДК мыши, трансфицированные лентивирусной конструкцией, кодирующей IL-10, вызывают снижение иммунного ответа на аллоантигены и трансплантационные антигены в реакции смешанной культуры лимфоцитов и реакции трансплантат против хозяина, соответственно [Wan et al, 2017]. Наиболее длительная выживаемость почечного аллотрансплантата наблюдалась при введении реципиенту аллогенных дендритных клеток, трансфицированных одновременно IL-10 и TGF-β. При этом выживаемость трансплантата прямо коррелировала с угнетением цитотоксического ответа и увеличением количества иммунорегуляторных цитокинов IL-4, IL-10 и TGF-β в плазме крови [Gorczyński et al., 2000]. Дендритные клетки, трансфицированные FasL и иммуноглобулином-агонистом CTLA-4

увеличивали выживаемость аллогенных сердца и островков поджелудочной железы, соответственно, путем индукции анергии Т-клеток [Min et al, 2000; O'Rourke et al, 2000]. При этом в обоих случаях эффект был антиген-специфичным. Также, трансфекция дендритных клеток двуцепочечной ДНК, способной связываться с NF-κB, приводила к увеличению времени приживаемости аллогенного сердца [Giannoukakis et al, 2000].

Для целенаправленной индукции антиген-специфичной толерантности используют введение толерогенных дендритных клеток аллогенных реципиенту, но сингенных трансплантату или введение дендритных клеток сингенных реципиенту, нагруженных аллоантигенами трансплантата (донора).

Первый способ индукции антиген-специфичной иммунологической толерантности с введением аллогенных дендритных клеток использовался в подавляющем большинстве рассмотренных работ – в работах авторов Fujita et al, 2007, Pêche et al, 2005, Lutz et al., 2000, Hattori et al, 2012, Min et al, 2000, O'Rourke et al, 2000, Gorczynski et al., 2000, Wan et al, 2017. При этом в работах Lutz et al., 2000, Pêche et al, 2005, Min et al, 2000, O'Rourke et al, 2000 дополнительно показано, что аллогенные дендритные клетки не обладают способностью к увеличению времени отторжения трансплантата от третьей стороны, что подчеркивает их антиген-специфичное действие.

Согласно изложенным механизмам активации лимфоцитов при отторжении трансплантата, аллогенные толерогенные дендритные клетки индуцируют анергию и регуляторные Т клетки путем прямого взаимодействия с лимфоцитами реципиента (взаимодействия TCR лимфоцита реципиента с интактной молекулой МНС на ДК донора) и, соответственно, угнетают прямой путь активации Т-эффекторов при течении реакции отторжения. При этом получается, что индуцируемая толерантность специфична не к конкретным эпитопам трансплантационных антигенов, а к определенным распознаваемым участкам молекул МНС донора. Однако, в работе Hattori et al, 2012 указано, что при трансплантации роговицы аллогенные дендритные клетки, угнетают преимущественно непрямой путь активации лимфоцитов. Полученные исследователем данные могут быть объяснены тем, что роговица, являясь неваскуляризированным и иммунопривилегированным органом, отторгается преимущественно путем непрямого механизма [Sano et al, 1999].

Введение реципиенту сингенных толерогенных дендритных клеток, нагруженных аллоантигеном трансплантата (донора), сопровождается индукцией анергии и регуляторных Т клеток по непрямому пути, что, соответственно, угнетает непрямой путь активации эффекторных лимфоцитов. Для загрузки сингенных дендритных клеток антигенами донора используют простое добавление клеточного или тканевого лизата донора [Fan et al, 2015] и везикул из донорской ткани в среду к дендритным клеткам [Ezzelarab et al, 2017]. Также для загрузки

дендритных клеток антигеном часто используют апоптотические тельца, поскольку фагоцитоз апоптотических телец служит не только источником антигенов в дендритной клетке, но и индуцирует ее толерогенную функцию. Сингенные дендритные клетки, нагруженные апоптотическими тельцами донора, вызвали увеличение времени отторжения эктопически трансплантированного аллогенного сердца [Xu et al, 2004].

Поскольку основными трансплантационными антигенами являются молекулы МНС, их изолированное применение, а не в составе лизатов клеток и апоптотических телец донора, для нагрузки дендритных клеток реципиента может повысить эффективность индукции антиген-специфичной иммунологической толерантности. Однако, работ, использующих МНС или их производные в качестве основного антигена для нагрузки дендритных клеток, было обнаружено не много. В одном из найденных исследований, дендритные клетки, трансфицированные ДНК-конструкцией, кодирующей полную молекулу МНС I донора, вызвали увеличение времени приживаемости аллогенного сердца [Billing et al, 2001]. В другой группе работ для индукции толерантности использовали иммунодоминантную полипептидную последовательность р5 из молекулы МНС I крыс линии WF. Так, прямая инъекция р5 в тимус крыс линии ACI вызывала увеличение времени приживаемости трансплантированного им сердца от крыс линии WF, но не от крыс линии Lewis [Garrovillo et al, 1999]. В следующем своем исследовании та же группа показала, что инъекция в тимус крыс ACI сингенных дендритных клеток, нагруженных р5, вызывала длительное приживание островков поджелудочной железы от мышей WF, но не от мышей BN. Внутривенное введение тех же ДК увеличивало время приживаемости островков, но не столь выражено, как внутритимическое введение [Oluwole et al, 2001].

В работах данной группы предполагается индукция центральной толерантности за счет внутритимического введения дендритных клеток, нагруженных трансплантационным антигеном. В остальных же рассмотренных работах использовалось внутривенное введение дендритных клеток и точный вклад центральной и периферической толерантностей в супрессию трансплантационных реакций при данном способе введения дендритных клеток оценить сложно, поскольку введенные дендритные клетки могут естественным путем мигрировать в тимус и участвовать в индукции центральной толерантности, но данный механизм не был изучен в рассмотренных исследованиях.

## **1.6 Заключение**

Таким образом, в организме млекопитающих толерантность Т- и В-клеточного звена к аутоантигенам активно поддерживается в центральных и периферических органах иммунной системы с помощью механизмов, требующих участия дендритных клеток. При этом механизмы

поддержания иммунологической толерантности на данный момент изучены достаточно для целенаправленной индукции толерантности даже на чужеродные антигены, в т.ч. на трансплантационные антигены с целью угнетения трансплантационных реакций.

Трансплантационные реакции – реакция отторжения и РТПХ обусловлены протеканием иммунных реакций, вызванных несовпадением МНС гаплотипов донора и реципиента. Иммунные реакции, обуславливающие реакцию отторжения и РТПХ, множественны и характеризуются различной направленностью (например, на интактные молекулы МНС донора или на эпитопы молекул МНС донора, представленные в комплексе с молекулами МНС реципиента) и отличными эффекторными субпопуляциями, участвующими в реакции (например, ранее активированные эффекторные клетки и клетки памяти или активирующиеся в течение реакции наивные клетки и клетки памяти). Такая множественность механизмов, реализующих трансплантационные реакции, обуславливает различное время возникновения их проявлений (острые и хронические) и мишени, на которые они направлены.

Несмотря на такую множественность и сложность механизмов течения трансплантационных реакций на данный момент разработаны методы клеточной терапии, позволяющие снизить их выраженность. В основе данных методов лежит использование толерогенных дендритных клеток и генерируемых с их помощью регуляторных Т-клеток. Однако, предложенные подходы все еще не достигают эффективности достаточной для трансляции полученных результатов в клиническую практику. Таким образом, клеточная терапия трансплантационных реакций требует дальнейшей оптимизации.

Поэтому данная работа сосредоточена на разработке более эффективных экспериментальных и клинически подходящих подходов угнетения трансплантационных реакций путем индукции иммунологической толерантности с помощью дендритных клеток. Для этого в работе используется новый способ нагрузки дендритных клеток антигеном – с помощью трансфекции, ДНК-конструкциями, кодирующими антигенные последовательности молекул МНС – основных молекул, на которые направлены трансплантационные реакции. А также одновременная трансфекция ДК, ДНК-конструкциями, кодирующими IL-10 и антигенные последовательности МНС.

## **ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **2.1 Объект и предмет исследования**

Объектом исследования явились дендритные клетки, полученные из костного мозга лабораторных мышей линии C57Bl/6. Предметом исследования явилась способность дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими IL-10 и/или антигенные последовательности молекул МНС, угнетать трансплантационные реакции.

### **2.2 Этическое заключение**

Работа выполнена согласно принципам Хельсинской декларации о проведении исследований на людях и животных. Все протоколы и методы исследования были утверждены этическим комитетом НИИФКИ, Новосибирск, Россия (Протокол № 99/2016-02-09).

### **2.3 Лабораторные животные**

Работа выполнена с использованием самок лабораторных мышей линий C57Bl/6, CBA, CBF1 (F1: C57Bl/6 x CBA), BALB/c в возрасте 2-6 месяцев. Животных содержали в условиях вивария НИИФКИ под естественным светом с неограниченным доступом к воде и еде.

### **2.4 ДНК-конструкции**

Для дизайна конструкций для подавления трансплантационных реакций (pMHC) был произведен биоинформатический анализ геномов двух линий мышей (C57Bl/6 и CBA), на основе которого были выбраны последовательности из локуса H2 мышей CBA (аллель H2-k), в которых сконцентрированы основные аминокислотные замены по сравнению с локусом H2 мышей C57Bl/6 (аллель H2-b).

Генотипы мышей были взяты из электронного ресурса Mouse Genomes Project. В качестве генов гистосовместимости были предварительно взяты все гены со словом histocompatibility в названии, содержащиеся в локусе H2 хромосомы 17. После исключения генов, в которых нет заметных различий между линиями мышей, остались 7 генов: uc008ccd.1, uc008ccb.2, uc008chr.1, uc008car.1, uc008cld.1, uc008chg.1, uc008chl.1. Для кодирования в ДНК-конструкцию были выбраны фрагменты данных генов, несущие основные аминокислотные замены: uc008ccd.1 (68-

108), uc008ccb.2(1-134), uc008chp.1 (110-173) и uc008chg.1(1-211). Согласно *in silico* анализу, выполненному на сайте <http://www.iedb.org/>, выбранные последовательности содержали множественные Т-клеточные эпитопы аллеля H2-k, отличные от аналогичных эпитопов аллеля H2-b. Для улучшения процессинга на N-конец конструкции также был добавлен убиквитин с заменённой С-концевой аминокислотой {Gly76-Val} (UbV76) [Duan et al., 2006; Eslami et al., 2012]: {MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLR LGV}. Последовательности антигенов соединяли через линкер GPGPG.

Дизайн искусственных генов проводили с использованием программы Gene Designer 2.0 (DNA2.0, INC.), используя разработанные аминокислотные последовательности молекул H2 (MHC). Для оптимизации кодового состава использовали частоты встречаемости кодонов человека. В нуклеотидной последовательности генов исключили сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции *AgeI*, *BamHI* и *SacI* для последующей возможности клонирования в вектор pmax-Ub.

Клонирование искусственных генов в вектор pmax-Ub и получение рабочих генетических конструкций, кодирующих целевые белковые продукты, проводили согласно следующим стадиям: гидролиз ДНК эндонуклеазами рестрикции, элюция фрагментов ДНК из агарозного геля, лигирование ДНК, трансформация компетентных клеток *E.coli*, выделение плазмидной ДНК, секвенирование ДНК. В дальнейшую работу были отобраны по два независимых клона для каждой генетической конструкции с подтвержденной нуклеотидной последовательностью встроенных искусственных генов, кодирующих антигенные последовательности МНС. Каждая плазмидная генетическая конструкция с подтвержденной нуклеотидной последовательностью была наработана в препаративном количестве и очищена от эндотоксинов с помощью набора EndoFree Plasmid Maxi Kit (“Qiagen”, Германия) в соответствии с рекомендациями производителя. Концентрацию плазмидной ДНК измеряли спектрофотометрически на приборе Ultrospec 3000 pro (“GE Healthcare Life Sciences”, США). Подтверждение правильности структуры очищенных ДНК-конструкций проводили рестрикционным анализом относительно исходных клонов и секвенированием по обеим цепям. Диаграмма плазмиды, кодирующей антигенные последовательности молекул МНС I класса мышей СВА (pMHC), представлена на рисунке 4.

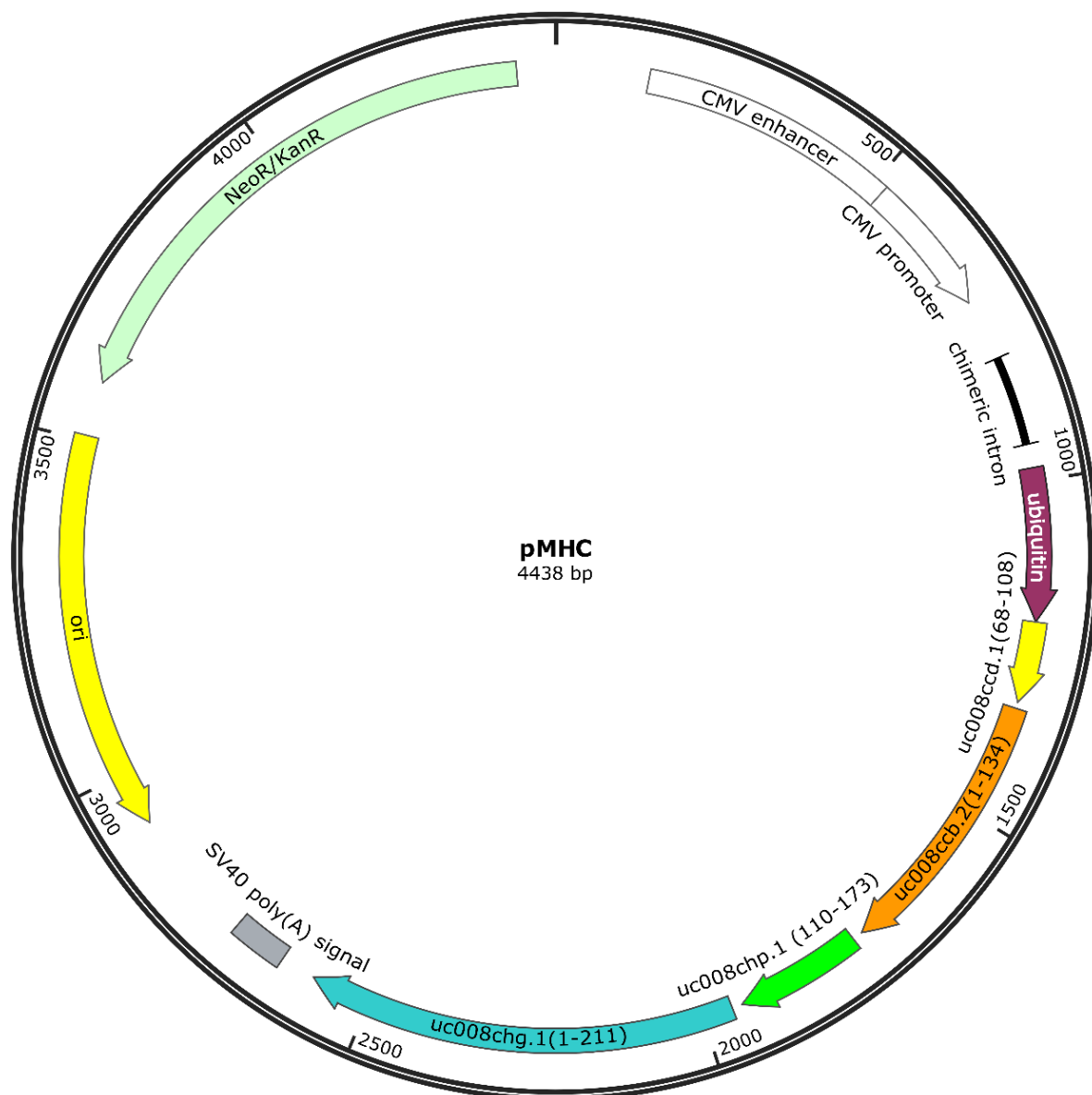


Рисунок – 4. Диаграмма плазмиды pMHC, кодирующей антигенные последовательности молекул MHC I класса мышей CBA.

В качестве контрольной выступала некодирующая плазида р5 на основе вектора ртах-Ub.

В ДНК-конструкцию pIL-10 был закодирован мышиный IL-10. Последовательность мышиноного IL-10 была взята из базы данных UniProtKB P18893.

В ДНК-конструкцию pGFP был закодирован зеленый флуоресцентный белок.

## 2.5 Схема эксперимента

Схема эксперимента по изучению способности дендритных клеток, трансфицированных рМНС и/или рIL-10, подавлять реакцию отторжения и РТПХ представлена на рисунке 5.

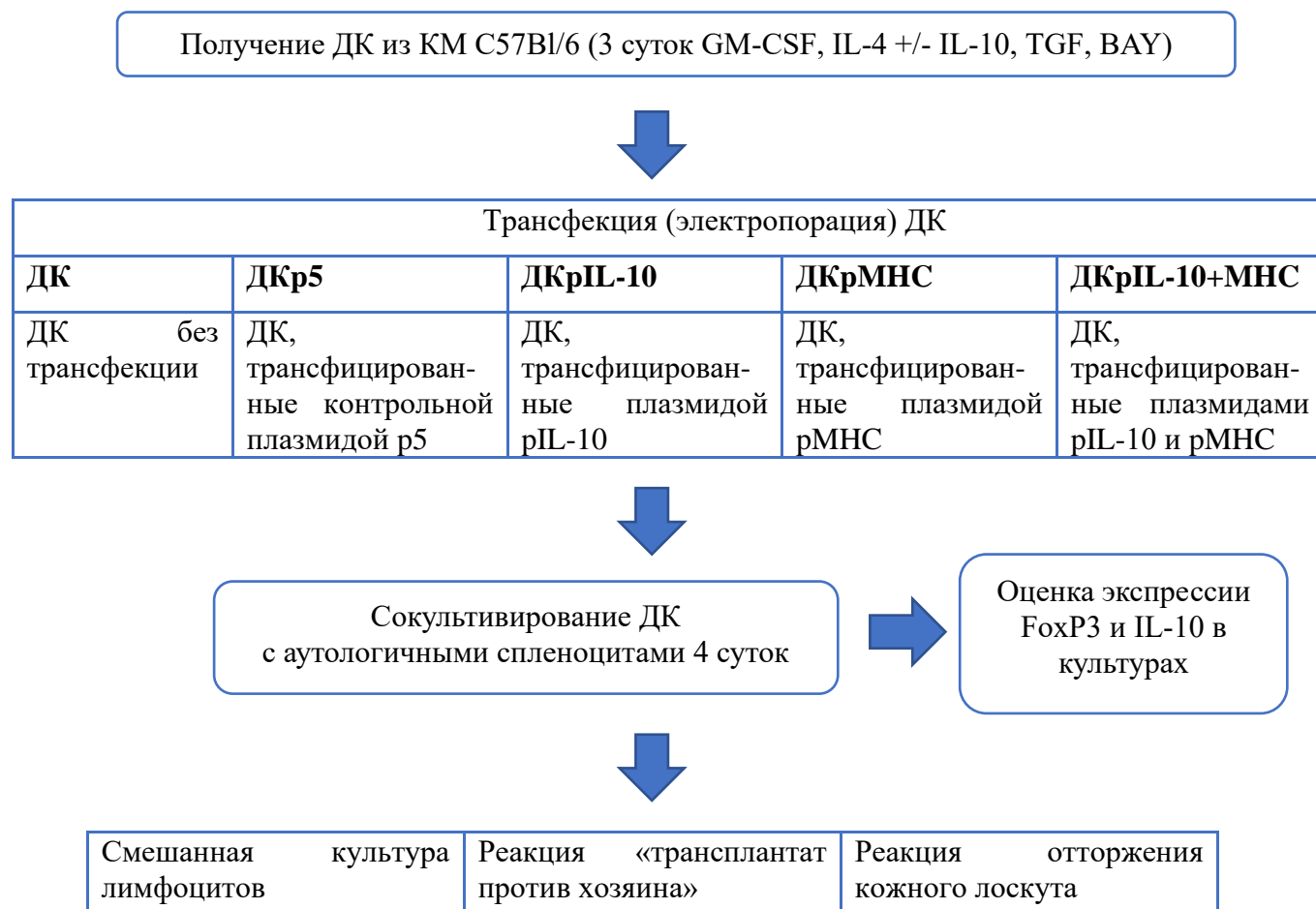


Рисунок – 5. Схема эксперимента по изучению способности дендритных клеток, трансфицированных рМНС и/или рIL-10, подавлять реакцию отторжения и РТПХ.

## 2.6 Получение дендритных клеток

Дендритные клетки получали из костного мозга мышей C57Bl/6. Клетки костного мозга (ККМ) получали из бедренных костей животного, с помощью промывки шприцом костномозгового канала. Полученную клеточную массу ресуспендировали и дважды отмывали центрифугированием при 1500 об/мин 10 минут в среде RPMI-1640 (Биолот, Россия). Далее, методом адгезии клеток на пластике в течении 30 минут получали прилипающую фракцию ККМ. Общее количество клеток в прилипающей фракции клеток костного мозга определяли на гематологическом анализаторе Beckman Coulter (США) и разводили до концентрации 1 млн/мл.

Прилипшую фракцию ККМ культивировали в концентрации 1 млн. клеток в 1 мл питательной среды RPMI-1640, содержащей 10% FCS (Biowest, Франция), 2 mM L-глутамина (Биолот, Россия), 10 mM HEPES буфера (Биолот, Россия),  $5 \cdot 10^{-4}$  M 2-меркаптоэтанола mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, США), 80 мкг/мл гентамицина (KRKA, Словения), 100 мкг/мл бензилпенициллина (Биолот, Россия) (полная среда RPMI-1640) при добавлении мышинных ростовых факторов 20 нг/мл GM-CSF (R&D systems, США) и 20 нг/мл IL-4 (R&D systems, США). Для определения оптимальных условий генерации толерогенных дендритных клеток проводили подбор различных агентов: добавление Bay 11-7082 (специфический ингибитор NF-κB, R&D systems, США) в дозе 2,5 μM/мл на 2 сутки культивирования, добавление рекомбинантных цитокинов IL-10 (10 нг/мл, R&D systems, США) или TGF-β (10 нг/мл, R&D systems, США) на 0 сутки, и добавление IL-10 и Bay 11-7082 или TGF-β и Bay 11-7082. Через трое суток культивирования клеточные культуры снимались с пластика и использовались для дальнейших экспериментов. Для некоторых экспериментов к ДК на последние сутки культивирования добавляли LPS O55:B5 (Sigma, США) в концентрации 1 мкг/мл.

## **2.7 Фенотипирование дендритных клеток**

Спустя 3 дня от начала культивирования 200 тыс. клеток отбирали для анализа фенотипических характеристик ДК, полученных согласно описанному выше протоколу. Оценка фенотипических и функциональных показателей культуры ДК проводилась методом проточной цитофлуорометрии на проточном цитометре FACS Versa (BD, США). Для этого, суспензию клеток в 100 мкл полной RPMI инкубировали со следующими моноклональными антителами: CD11c-APC, H-2D(b)-PE, CD86-APC-Cy7, CD80-BV421, CD83- FITC, CD40 – PerCP (Biolegend, США) в течение 20 минут при комнатной температуре в темноте. По окончании инкубации, клетки отмывались в 500 мкл раствора PBS с азидом натрия и разводили в 100 мкл PBS с азидом натрия для последующего анализа. Схема и примеры гейтирования при цитометрическом фенотипировании дендритных клеток представлен на рисунке 6.

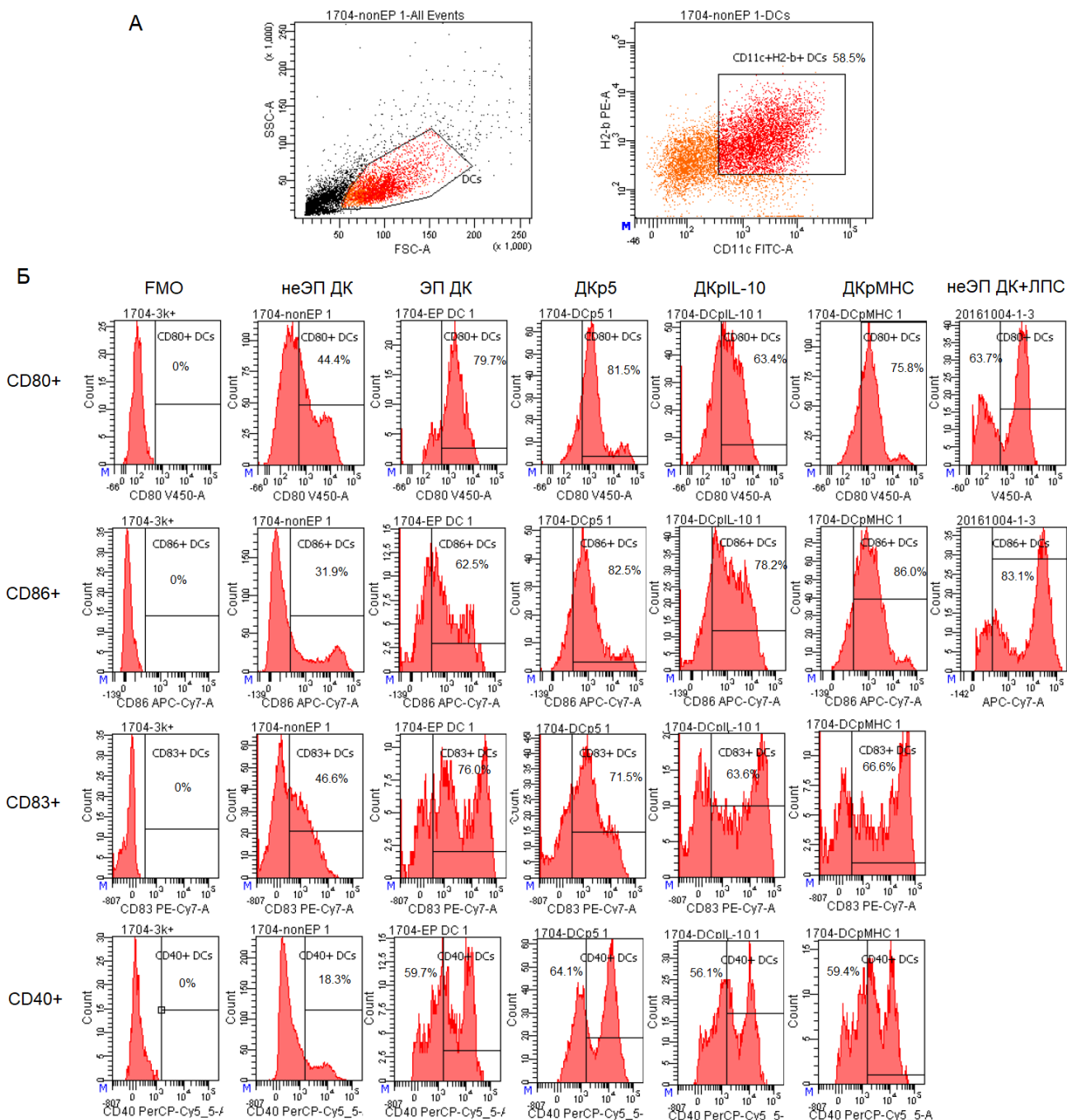


Рисунок – 6. Схема (А) и примеры (Б) гейтирования дендритных клеток при цитометрическом фенотипировании.

## 2.8 Совместное культивирование дендритных клеток и аутоспленоцитов

Аутологичные дендритным клеткам спленоциты получали из селезенок мышей C57Bl/6 путем измельчения селезенки ножницами и последующего ресуспендирования через иглы уменьшающегося диаметра. Суспензия клеток селезенки дважды отмывалась центрифугированием в PBS, с последующим удалением супернатанта.

Дендритные клетки сокультивировали с аутологичными спленоцитами в соотношении 1 к 10 (для экспериментов по индукции РТПХ – в соотношении 1 к 100) в концентрации 1 млн. клеток на 1 мл полной RPMI в течение 4 суток. Полученные совместные культуры ДК и аутоспленоцитов использовались для последующих экспериментов.

## 2.9 Оценка толерогенных свойств дендритных клеток

Толерогенные свойства полученных ДК оценивались цитометрически по изменению относительного количества FoxP3+ Treg, внутриклеточной продукции IL-10 и TGF- $\beta$  в совместных культурах ДК и аутоспленоцитах, а также по содержанию IL-10 в кондиционных средах совместных культур.

Оценка содержания Treg проводилась методом проточной цитофлуориметрии с поверхностным окрашиванием антителами CD4-PerCP, CD25-APC, и внутриклеточной окраской FoxP3-PE (Biolegend, США). Схема и примеры гейтирования CD4+CD25+FoxP3+ Treg представлены на рисунке – 7.

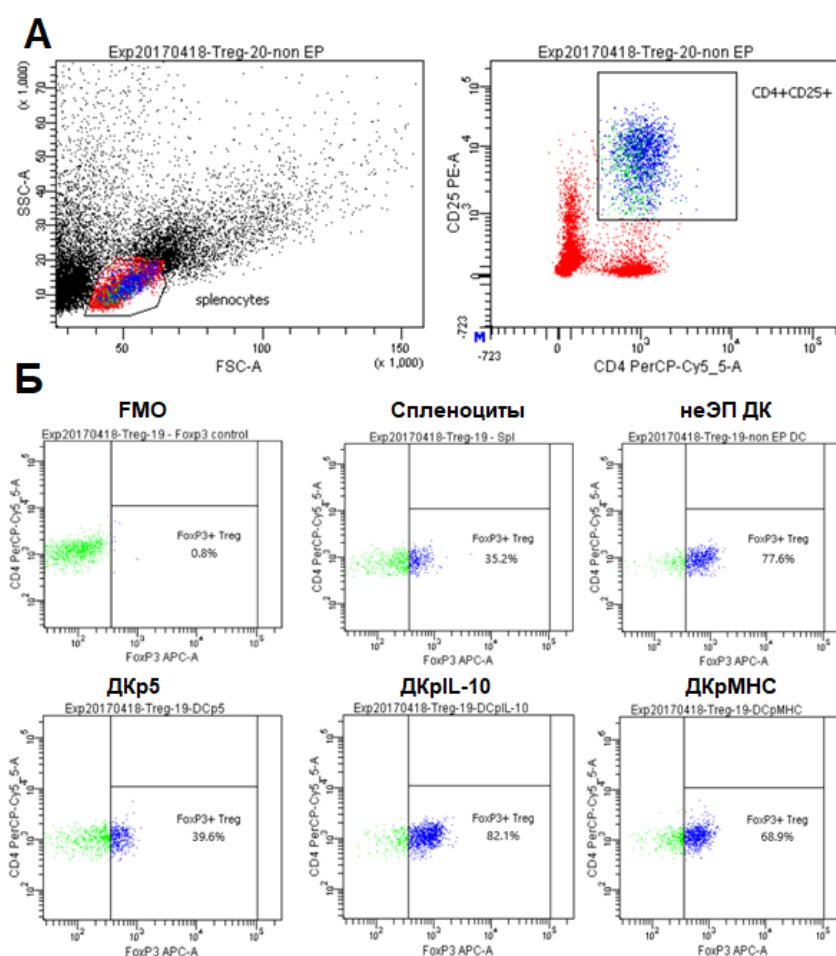


Рисунок – 7. Схема (А) и примеры (Б) цитометрического гейтирования CD4+CD25+FoxP3+ Treg.

Для анализа продукции внутриклеточных цитокинов 200 мкл клеток совместных культур в концентрации 1 млн/мл культивировали в присутствии 2,5 мкг/мл РМА с 1 мкг/мл иономицина, через 1 час от начала культивирования, к клеткам добавляли монензин (5мг/мл) и брефелдин А (10 мкг/мл), ресуспендировали и культивировали в течение 3 часов в атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub> при 37 °С. После чего клетки отмывали 500 мкл раствора PBS с азидом натрия 10 минут при 1500 об/мин и окрашивали поверхностными антителами CD4-PerCP, и после фиксации и пермобилизации окрашивали внутриклеточными антителами к цитокинам IL-10-PE, TGF- $\beta$ -APC.

Оценку содержания иммунорегуляторного цитокина IL-10 в кондиционных средах культур спленоцитов с дендритными клетками проводили методом иммуноферментного анализа с помощью коммерческой тест-систем (R&D systems, США) согласно протоколу производителя (порог чувствительности составлял 1,97 пг/мл для IL-10, динамический диапазон (разброс) составлял 0,625-5,22 пг/мл).

## **2.10 Трансфекция дендритных клеток ДНК-конструкциями**

Трансфекцию дендритных клеток и, при отработке, клеток костного мозга выполняли методом электропорации.

Электропорация осуществлялась на электропораторе BTX 830 square-wave (BTX, США) согласно разработанному протоколу. Для этого, дендритные клетки полученные из клеток костного мозга в присутствии ростовых факторов GM-CSF и IL-4, дважды отмывали центрифугированием при 1500 об/мин 10 минут в PBS и разводили до концентрации 10 млн в 1 мл холодного OptiMem (Thermo Fisher Scientific, США) без фенолового красного. Кондиционную среду после первой отмывки собирали для дальнейшего приготовления культуральной среды. Далее для проведения электропорации к 100 мкл раствора, содержащего 1 млн ДК (или 1 млн клеток костного мозга), добавляли 6 мкг/мл клеток ДНК-конструкций pGFP, p5, pMHC или pIL-10. Полученную суспензию помещали в кювету для электропорации (2 мм). Кювету помещали в камеру (ячейку) и проводили электропорацию клеток при 260 V в течение 5 мс. Одновременно с этим готовился раствор для культивирования клеток после процедуры трансфекции. Для этого, полная среда RPMI-1640 смешивалась с кондиционной средой от данных клеток в отношении 1:1. Сразу после электропорации к клеткам в кюветы добавляли 900 мкл теплого приготовленного раствора и переносили в планшеты или флаконы для дальнейшего культивирования в концентрации 1 млн/мл.

Для полученных трансфицированных дендритных клеток изучали фенотип и толерогенные свойства согласно протоколам, описанным выше. Далее трансфицированные ДК сокультивировались с аутологичными спленоцитами согласно описанному выше протоколу и

полученные культуры использовались для дальнейших экспериментов.

### **2.11 Смешанная культура лимфоцитов**

Смешанную культуру лимфоцитов получали путем сокультивирования 100 тыс. клеток из совместных культур трансфицированных ДК и аутоспленоцитов (ответчики) и 100 тыс. спленоцитов мышей СВА, BALB/c или CBF1 (F1: C57Bl/6 x CBA), предварительно обработанных митомицином С (стимуляторы), в присутствии и отсутствии стимуляторов, в течение 3х суток.

Оценку пролиферации совместной культуры аутоспленоцитов и трансфицированных ДК в ответ на аллогенный стимул проводили с помощью нерадиоактивного теста для определения пролиферации клеток PreMix WST-1 (Takara, Япония). Процедуру осуществляли согласно протоколу производителя. Для этого, 100 мкл клеток в концентрации 0,5 млн/мл переносили в 96-луночный планшет в триплетах и добавляли по 10 мкл на лунку раствора PreMix WST-1. Клетки инкубировали в течение 4 часов в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37 °С. Оптическую плотность измеряли с помощью аппарата TriStar LB 941 (Berthold Technologies, Германия) на длине волны 440 нм.

Индекс подавления пролиферации в СКЛ рассчитывали как отношение оптической плотности раствора ответчиков без добавления стимуляторов (спонтанная пролиферация) к оптической плотности раствора ответчиков при добавлении стимуляторов. Таким образом, чем меньше пролиферировали культуры спленоцитов и трансфицированных ДК мышей C57Bl/6 в ответ на спленоциты других линий мышей (стимуляторов), тем больше получался индекс подавления пролиферации.

### **2.12 Реакция трансплантат против хозяина**

Острую РТПХ *in vivo* моделировали путем переноса мышам линий CBF1 (F1: C57Bl/6 x CBA) и BALB/c совместных культур ДК, трансфицированных ДНК-конструкциями, и спленоцитов мышей C57Bl/6, сокультивированных в соотношении 1:100. Каждая мышь получала однократно 100 млн клеток путем внутривенного введения в 0,5 мл физиологического раствора. Оценка показателей проводилась спустя 2-3 недели от момента введения.

В качестве основных показателей течения РТПХ и развития специфического иммунного ответа использовали весовые показатели селезенки и тимуса, относительное содержание иммунокомпетентных клеток (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, FoxP3<sup>+</sup> Treg) в селезенке мышей, подвергнутых индукции РТПХ.

### 2.13 Трансплантация кожного лоскута

Кожный лоскут с хвоста мышей CBA или BALB/c пересаживали на спину мышам C57Bl/6 в операционное ложе, совпадающим по размеру с изготовленным кожным лоскутом. Для сингенной трансплантации использовали кожные лоскуты с хвоста мышей C57Bl/6. За сутки до трансплантации и через 3-е суток после реципиентам подкожно в область операции вводили 1 млн трансфицированных ДК мышей C57Bl/6, сокультивированных с аутологичными спленоцитами в соотношении 1 к 10.

Операция проводилась под общей анестезией 2% изофлураном. После операции на область трансплантации надевалась тугая повязка. Далее мыши содержались в стандартных условиях.

Отторжение трансплантата оценивали по некротическим изменениям каждый день начиная с 7-х суток после трансплантации. Кожный лоскут, некротизированный на 80% считался отторгшимся. Кожные лоскуты некротизированные до 7 суток считались неудачно трансплантированными и не включались в анализ.

### 2.14 Методы статистической обработки

Статистическая обработка данных производилась с использованием программы Prism 7.0 (GraphPad Software, США). Статистические выборки проверялись на нормальность с помощью критериев Шапиро-Уилка и Колмогорова-Смирнова. Оценка значимости отличий между нормально распределенными выборками осуществлялась с помощью параметрического однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с множественными сравнениями Тьюки. Для выборок с нормальным распределением на рисунках указаны средние и стандартные отклонения. Оценка значимости отличий между ненормально распределенными выборками осуществлялась с помощью непараметрического критерия Краскела-Уоллиса с множественными сравнениями Данна. Для выборок с ненормальным распределением на рисунках указаны медианы и межквартильные интервалы. Различия сравниваемых параметров считались статистически значимыми при  $p \leq 0.05$ . Значимость отличий между группами проиллюстрирована на рисунках скобками.

Значимость отличий кривых выживаемости кожного лоскута оценивалась с помощью теста Мантеля-Кокса и логарифмического теста трендов. Различия считались статистически значимыми при  $p \leq 0.05$ . Значимость отличий между группами проиллюстрирована на рисунках скобками.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 3.1 Получение дендритных клеток с толерогенными свойствами из костного мозга мышей

Для получения толерогенных дендритных клеток было протестировано несколько протоколов. Так, для получения дендритных клеток прилипающую фракцию костного мозга мышей C57Bl/6 культивировали в присутствии GM-CSF и IL-4 без дополнительных агентов или при добавлении IL-10, TGF- $\beta$ , BAY 11-7082 (специфический ингибитор NF- $\kappa$ B), IL-10 и BAY 11-7082 или TGF- $\beta$  и BAY 11-7082. Полученные культуры анализировались на проточном цитометре на предмет количества генерируемых ДК, экспрессии на ДК коstimуляторных молекул CD80 и CD86, экспрессии на ДК молекул активации CD40 и CD83. Результаты анализа представлены на рисунке 8.

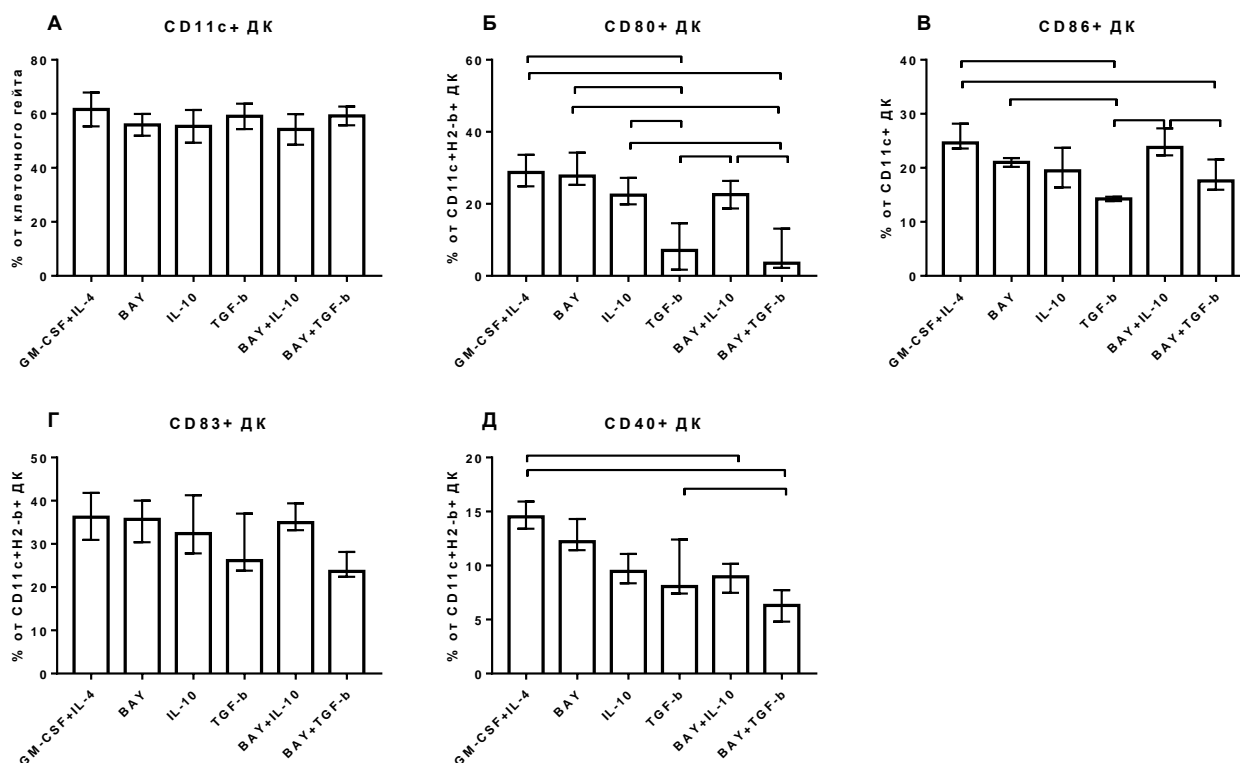


Рисунок 8 – Фенотипическая характеристика дендритных клеток, полученных с использованием различных агентов. А,Б,Д,Е: N=6. В,Г: N=12. Скобками указаны статистически значимые отличия  $p \leq 0.05$ . А: средние и стандартное отклонение, однофакторный дисперсионный анализ с множественными сравнениями Тьюки. Б-Д: медианы и межквартильный интервал, критерий Краскела-Уоллиса с множественными сравнениями Данна.

Результаты показали, что ни один из дополнительных агентов не влиял значимо на количество получающихся CD11c<sup>+</sup> ДК в культуре (Рис. 8 А). Однако, количество CD80<sup>+</sup> и CD86<sup>+</sup> ДК, полученных в присутствии TGF- $\beta$  и TGF- $\beta$  и BAY 11-7082, оказалось значимо меньше количества CD80<sup>+</sup> и CD86<sup>+</sup> ДК, полученных в стандартных условиях GM-CSF и IL-4 (Рис. 8 Б, В). Также количество CD80<sup>+</sup> ДК, полученных в присутствии TGF- $\beta$  и TGF- $\beta$ /BAY 11-7082, оказалось значимо меньше по сравнению с количеством аналогичных ДК в других экспериментальных группах (Рис. 8 Б). Значимых изменений в экспрессии на ДК активационной молекулы CD83 не было отмечено при добавлении каких-либо толерогенных агентов (Рис. 8 Г). Экспрессия же CD40 обнаруживалась на значимо меньшем количестве ДК, полученных в присутствии IL-10/BAY 11-7082 и TGF- $\beta$ /BAY 11-7082 по сравнению с ДК, полученными в стандартных условиях GM-CSF и IL-4 (Рис. 8 Д).

Далее была исследована способность, полученных ДК индуцировать FoxP3<sup>+</sup> Treg клетки и экспрессию регуляторных цитокинов IL-10 и TGF- $\beta$  в совместных культурах с аутологичными спленоцитами (Рис. 9).

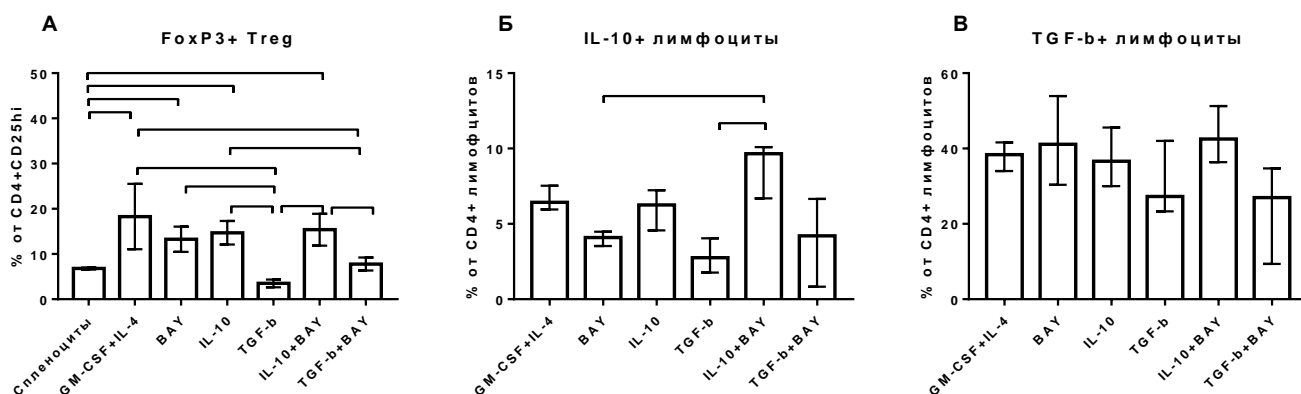


Рисунок 9 – Относительное количество FoxP3<sup>+</sup> Treg, IL-10<sup>+</sup> и TGF- $\beta$ <sup>+</sup> лимфоцитов в совместных культурах толерогенных ДК и аутоспленоцитов (N=6). Скобками указаны статистически значимые отличия  $p \leq 0.05$ . А: средние и стандартное отклонение, однофакторный дисперсионный анализ с множественными сравнениями Тьюки. Б,В: медианы и межквартильный интервал, критерий Краскела-Уоллиса с множественными сравнениями Данна.

Результаты, показали, что во всех экспериментальных группах, кроме ДК, полученных в присутствии TGF- $\beta$  и TGF- $\beta$ /BAY 11-7082, наблюдалось значимо большее количество FoxP3<sup>+</sup> Treg клеток по сравнению с их стандартным количеством в спленоцитах, несокультивированных с ДК (Рис. 9 А). Также, для группы IL-10/BAY 11-7082 ДК отмечено значимо большее количество CD4-клеток, несущих внутриклеточный IL-10, по сравнению с группами ДК, полученных в

присутствии BAY 11-7082 и TGF-  $\beta$  (Рис. 9 Б). Значимые отличия в экспрессии TGF-  $\beta$  не были обнаружены между какими-либо группами дендритных клеток (Рис. 9 В).

Таким образом, ДК, генерируемые в присутствии TGF-  $\beta$  и TGF-  $\beta$ /BAY 11-7082, обладали сниженной способностью к индукции FoxP3<sup>+</sup> Treg по сравнению с остальными группами, поэтому данные группы были исключены из дальнейших экспериментов.

Между остальными группами ДК, согласно данным об индукции экспрессии FoxP3, IL-10 и TGF-  $\beta$  в совместных культурах ДК и аутоспленоцитов, выраженной разницы в реализации толерогенной функции не наблюдалось.

Далее для подтверждения незрелого фенотипа полученных ДК, их фенотип был сопоставлен с фенотипом аналогично полученных ДК при добавлении липополисахарида (ЛПС, LPS) в течение последних суток культивирования (Рис. 10).

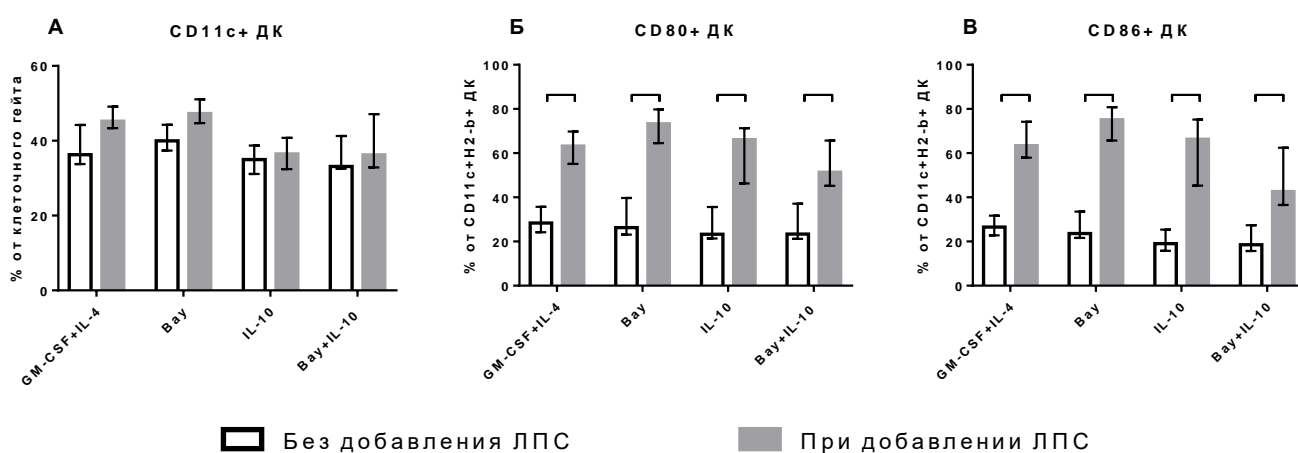


Рисунок 10 – Фенотипическая характеристика ДК с и без добавления LPS (N=6). Медианы и межквартильный интервал. Скобками указаны статистически значимые отличия  $p \leq 0.05$ , двухфакторный дисперсионный анализ с множественными сравнениями Сидака.

Добавление LPS значимо не сказалось на генерации CD11c<sup>+</sup> ДК в исследуемых культурах (Рис. 10 А). Однако его добавление значимо повысило количество ДК, экспрессирующих CD80 и CD86, во всех исследуемых группах, что продемонстрировало незрелый фенотип ДК, полученных без добавления ЛПС, а также отсутствие рефрактерности к созреванию полученных ДК под действием LPS (Рис. 10 Б, В).

Таким образом, проведенная серия экспериментов не выявила существенной разницы в реализации толерогенной функции между группами ДК, полученными в присутствии GM-CSF и IL-4, с или без добавления IL-10, BAY 11-7082, IL-10 и BAY 11-7082. Поэтому для дальнейших экспериментов было решено использовать наиболее простые в получении ДК, генерируемые в присутствии GM-CSF и IL-4 без добавления дополнительных агентов.

### 3.2 Обработка протокола электропорации

Полученные дендритные клетки трансфицировали разработанными ДНК-конструкциями с помощью электропорации на аппарате BTX 830 square-wave (BTX, США). Для подбора оптимальных условий электропорации были проанализированы литературные данные и протоколы производителей [Hamm et al, 2002; BTX protocol database; Biorad Protocol Finder], согласно которым параметры вольтажа при электропорации различных типов клеток могут варьировать от 100 до 500 В, параметры длительности импульса - от 1 до 25 мс, количество трансфицируемой ДНК - от 0,1 до 8 мкг на 1 млн клеток.

Для определения оптимальных условий электропорации для данного эксперимента первичные клетки костного мозга мышей C57Bl/6 электропорировали ДНК-конструкцией pGFP, кодирующей зеленый флюоресцентный белок (GFP), при различных параметрах, укладывающихся в описанные значения. Далее трансфицированные клетки анализировали на проточном цитометре на предмет экспрессии GFP, что определяло эффективность электропорации, и на предмет включения пропидий йодида (PI), что определяло клеточную гибель в результате процесса электропорации.

Оптимальными параметрами для электропорации клеток были признаны вольтаж 260 В, длительность электрического импульса 5 мс и 6 мкг трансфицируемой ДНК на 1 млн клеток (Рис. 11 А-В).

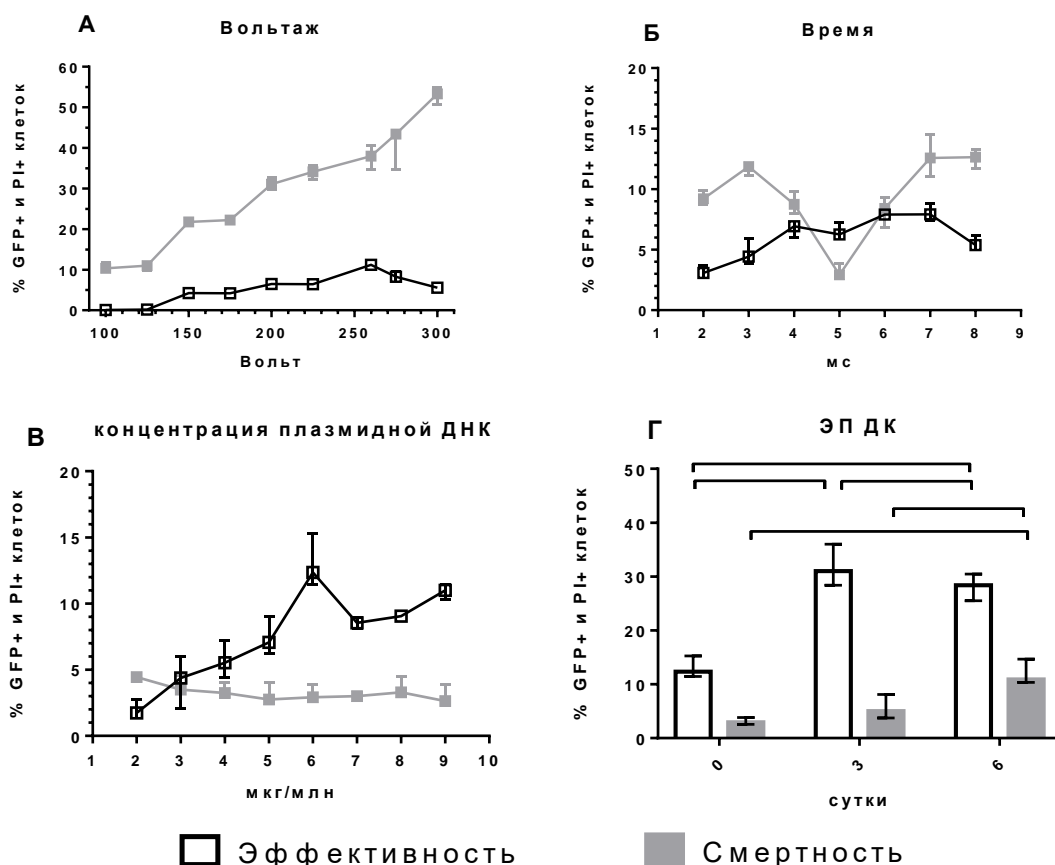


Рисунок 11 – Влияние вольтажа, времени и концентрации плазмидной ДНК (А, Б, В) на эффективность электропорации и смертность клеток костного мозга мышей. Г - эффективность и смертность дендритных клеток при электропорации на 0,3,6 сутки (N=6). Медианы и межквартильный интервал. Скобками указаны статистически значимые отличия  $p \leq 0.05$ , двухфакторный дисперсионный анализ с множественными сравнениями Сидака.

Поскольку подбор параметров электропорации производили в порядке вольтаж, длительность импульса, концентрация трансфицируемой ДНК, и в каждом следующем эксперименте использовали значения ранее подобранного параметра, то итоговыми результатами электропорации клеток костного мозга можно считать смертность – 2,93% от всех электропорированных клеток, эффективность – 12,35% от живых электропорированных клеток, что представлено на рисунке 9 В (данные представлены в медианах).

Интересно, что эффективность электропорации ДК, полученных из костного мозга мышей C57Bl/6 с помощью инкубации с GM-CSF и IL-4 в течение 3 и 6 суток, на заданных параметрах оказалась значимо выше эффективности трансфекции клеток костного мозга. Так, медиана эффективности трансфекции ДК, генерируемых в течение 3х и 6ти дней, составляет 31% и 28,4%, соответственно (Рис. 11 Г). Вероятно, данные отличия связаны с физико-химическими и

биологическими свойствами электропорлируемых клеток. Клеточная смертность от электропорации была значимо повышена у ДК, генерируемых в течение 6 суток, а у ДК, полученных в течение 3х суток оставалась на уровне смертности клеток костного мозга – медианы 10,91% и 5,01%, соответственно (Рис.11 Г).

### 3.3 Эффективность электропорации ДК экспериментальными плазмидами рIL-10 и рМНС

После отработки протокола электропорации была изучена эффективность данного протокола для трансфекции ДК плазмидой рIL-10, кодирующей мышинный IL-10. Для этого дендритные клетки электропорировали различным количеством плазмидной ДНК рIL-10 и через 24 часа методом ИФА определяли количество IL-10 в кондиционной среде электропорированных клеток. Результаты показали, что при увеличении количества плазмидной ДНК, используемой для трансфекции, увеличивалось и количество IL-10, секретируемого трансфицированными клетками в кондиционную среду (Рис. 12). На основе полученных данных было заключено, что трансфекция ДК плазмидой рIL-10, согласно разработанному протоколу, проходит успешно.

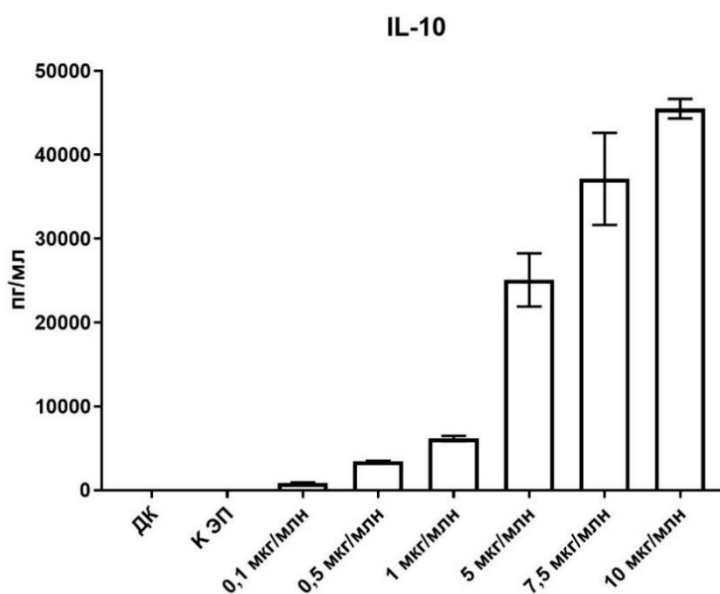


Рисунок 12 – Содержание IL-10 в кондиционной среде ДК, трансфицированных различными дозами рIL-10. Медианы и межквартильные интервалы.

Эффективность трансфекции плазмиды рМНС, кодирующей антигенные последовательности главного комплекса гистосовместимости I класса мышей СВА с предсказанными в них Т-клеточными эпитопами, может быть оценена по включению

закодированных в ней пептидов-эпитопов в молекулы МНС на поверхности трансфицированных клеток, что, согласно литературным данным, выполняют путем выделения пептидов определенной массы ультрацентрифугированием и далее анализируют их состав методом масс-спектрометрии [Espinosa et al, 2013; Collado et al, 2013]. Из-за недоступности данных методов, эффективность трансфекции рМНС считалась приближенной к эффективности трансфекции ДК плазмидой рGFP, описанной в предыдущем пункте. Данное допущение представляется автору возможным, поскольку обе плазмиды сконструированы на основе одного вектора рmax-Ub и имеют схожий размер (рМНС – 4,58 kb, рGFP – 3,617 kb). Также эффективность трансфекции дендритных клеток плазмидой рМНС будет показана в описанных далее результатах экспериментов по индукции антиген-специфичной иммунологической толерантности.

### **3.4 Толерогенные свойства ДК, трансфицированных рIL-10 и рМНС**

Толерогенные свойства ДК, подвергнутых электропорации плазмидами рIL-10 и рМНС, изучали с помощью определения их фенотипа методом проточной цитометрии и по индукции ими FoxP3+ Treg клеток и экспрессии IL-10 в совместных культурах с аутоспленоцитами.

Анализ фенотипа ДК после электропорации плазмидами рIL-10 и рМНС, контрольной некодирующей плазмидой р5, а также после электропорации без добавления каких-либо плазмид показал, что во всех группах, подвергшихся электропорации, количество ДК, экспрессирующих молекулы костимуляции CD80 и CD86 и маркеры зрелости CD83 и CD40, оказалось значимо больше по сравнению с неэлектропорированной группой ДК (Рис. 13). Однако, группы трансфекции плазмидами р5 и рМНС имели тенденцию содержать большее количество CD80+, CD86+ и CD40+ ДК по сравнению с группой электропорации без плазмид.

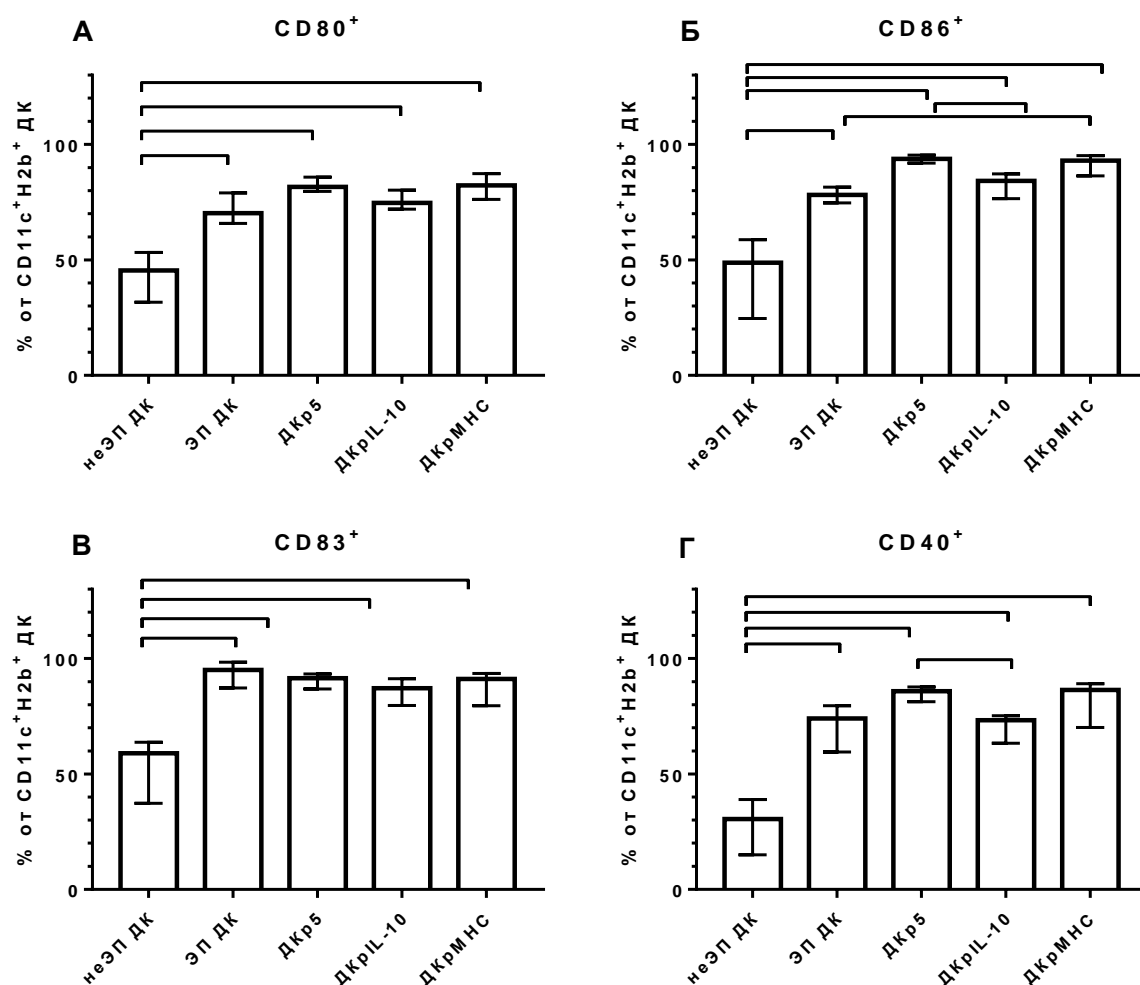


Рисунок 13 – Фенотипическая характеристика ДК, подвергнутых электропорации. неЭП ДК – неэлектропорированные ДК. ЭП ДК – ДК, электропорированные без плазмид. ДКp5 – ДК, электропорированные плазмидой p5. ДКpIL-10 – ДК, электропорированные плазмидой pIL-10. ДКpMHC – ДК, электропорированные плазмидой pMHC. (N=6-12). Медианы и межквартильный интервал. Скобками указаны статистически значимые отличия  $p \leq 0.05$ , критерий Крассела-Уоллиса с множественными сравнениями Данна.

Электропорация ДК плазмидой, кодирующей IL-10, приводила к значимому снижению количества ДК, экспрессирующих, CD86 и CD40, по сравнению группой электропорации плазмидой p5 (Рис. 13 Б,Г). Также, в группе ДКpIL-10 наблюдалась тенденция к снижению относительного количества CD80<sup>+</sup>, CD86<sup>+</sup> и CD40<sup>+</sup> ДК по сравнению с другими группами электропорации плазмидами (ДКp5, ДКpMHC).

После выявления более зрелого фенотипа электропорлируемых ДК важно было определить сохранность их толерогенных свойств. Для этого трансфицированные ДК сокультивировали с

аутологичными спленоцитами и в полученных культурах определяли количество FoxP3<sup>+</sup> Treg клеток и экспрессию лимфоцитами IL-10.

Результаты показали, что при сокультивировании с аутологичными спленоцитами дендритные клетки, электропорированные pIL-10 и pMHC, способны индуцировать в них экспрессию толерогенных маркеров FoxP3 и IL-10, значимо не отличающуюся от экспрессии, вызываемой толерогенными дендритными клетками без трансфекции (Рис. 14 А, Б). При этом количество спленоцитов, экспрессирующих FoxP3 и IL-10, в группах стимуляции ДК, трансфицированными pIL-10 и pMHC, оказалось достоверно больше, чем в группах спленоцитов без стимуляции и стимуляции ДК, трансфицированных контрольной плазмидой p5.

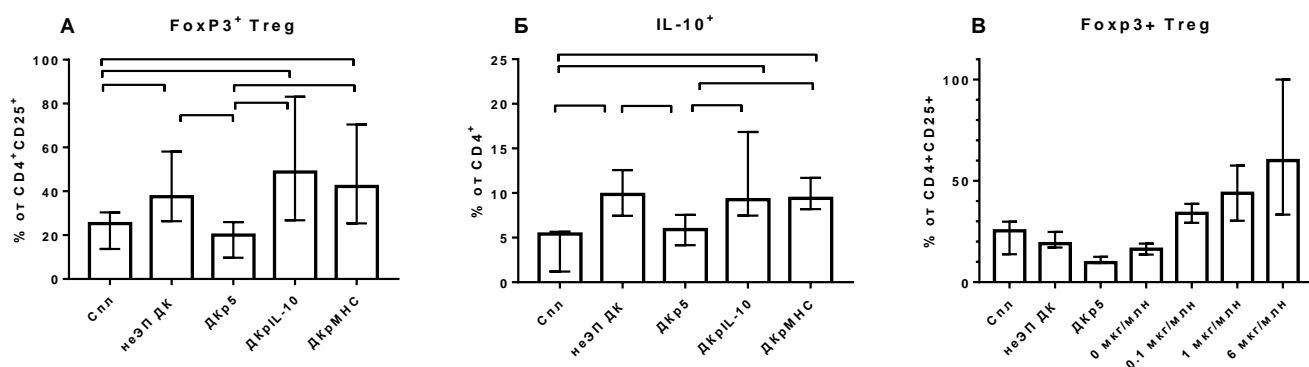


Рисунок 14 – Индукция FoxP3<sup>+</sup> Treg и экспрессия IL-10 в совместных культурах трансфицированных ДК и аутологичных спленоцитов (А, Б). Дозозависимая индукция FoxP3<sup>+</sup> Treg при трансфекции ДК различным количеством pIL-10 (В). Спл – спленоциты, несокультивированные с ДК. неЭП ДК – неэлектропорированные ДК. ЭП ДК – ДК, электропорированные без плазмид. ДКр5 – ДК, электропорированные плазмидой p5. ДКрIL-10 – ДК, электропорированные плазмидой pIL-10. ДКрMHC – ДК, электропорированные плазмидой pMHC. N=12. Медианы и межквартильный интервал. Скобками указаны статистически значимые отличия  $p \leq 0.05$ , критерий Краскела-Уоллиса с множественными сравнениями Данна.

Также, для ДК, трансфицированных pIL-10, было показано дозозависимое увеличение количества CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Treg клеток в совместных культурах трансфицированных ДК и аутоспленоцитов при увеличении количества плазмидной ДНК, используемой для трансфекции (Рис.14 В).

Таким образом, несмотря на более зрелый фенотип, дендритные клетки, трансфицированные pIL-10 и pMHC способны к повышенной индукции FoxP3<sup>+</sup> Treg клеток и экспрессии IL-10 в совместных культурах с аутоспленоцитами.

С целью повышения толерогенного эффекта в следующих экспериментах использовалась также группа одновременной совместной трансфекции ДК рIL-10 и рМНС. При этом концентрацию каждой из плазмид, используемой для трансфекции, уменьшали в 2 раза.

### **3.5 Способность толерогенных ДК, трансфицированных рIL-10 и рМНС, подавлять иммунный ответ *in vitro***

Для *in vitro* оценки толерогенной функции ДК, трансфицированных рIL-10 и/или рМНС, исследовалась их способность подавлять пролиферацию аутологичных спленоцитов в ответ на аллогенный стимул в смешанной культуре лимфоцитов.

При стимуляции различных групп трансфицированных ДК, сокультивированных с аутологичными спленоцитами, спленоцитами мышей СВА, предварительно обработанных митомицином С, обнаружена значимо большая способность экспериментальных групп трансфекции рIL-10, рМНС и совместной трансфекции угнетать пролиферацию аутологичных спленоцитов по сравнению с контрольной группой трансфекции р5. Однако, способность данных групп к угнетению пролиферации значимо не отличалась от таковой группы неэлектропорированных ДК (Рис. 15 А). Таким образом, полученные результаты говорят о способности всех экспериментальных групп (рIL-10, рМНС, совместная трансфекция) подавлять активацию аутологичных спленоцитов на антигены мышей СВА в смешанной культуре лимфоцитов, а также о проявлении аналогичных свойств неэлектропорированными ДК, но в менее выраженном объеме.

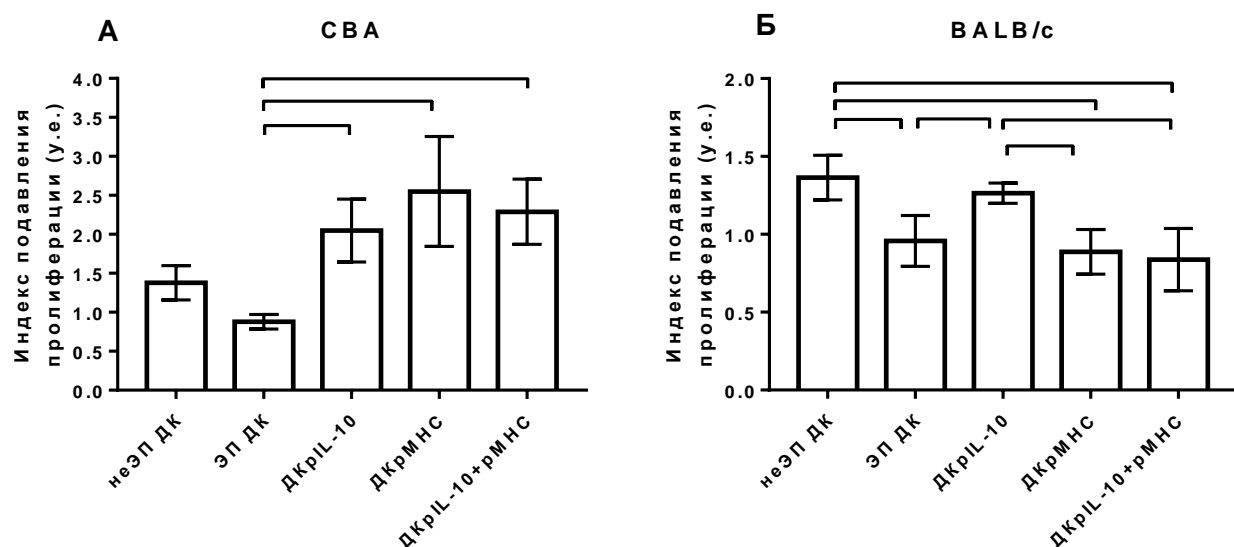


Рисунок 15 – подавление трансфицированными ДК пролиферации аутологичных спленоцитов в ответ на стимуляцию спленоцитами А – СВА (N=27), В – BALB/c (N=6). А - медианы и межквартильный интервал, скобками указаны статистически значимые отличия  $p \leq 0.05$ , критерий Краскела-Уоллиса с множественными сравнениями Данна. В – средние и стандартные отклонения, скобками указаны статистически значимые отличия  $p \leq 0.05$ , однофакторный дисперсионный анализ с множественными сравнениями Тьюки. неЭП ДК – неэлектропорированные ДК. ЭП ДК – ДК, электропорированные без плазмид. ДКp5 – ДК, электропорированные плазмидой p5. ДКpIL-10 – ДК, электропорированные плазмидой pIL-10. ДКpMHC – ДК, электропорированные плазмидой pMHC. ДКpIL-10+pMHC – ДК, электропорированные pIL-10 и pMHC одновременно.

Поскольку, трансфекция ДК плазмидой pMHC, кодирующей антигенные последовательности главного комплекса гистосовместимости I класса мышей СВА, предполагает специфичность подавления иммунных реакций именно на антигены мышей СВА, данную специфичность было решено проверить путем постановки смешанной культуры лимфоцитов со спленоцитами мышей BALB/c, несущих другой аллель МНС (H2-d), в качестве стимуляторов.

Результаты показали, что группы ДК, трансфицированные с участием плазмиды pMHC, кодирующей антигенные последовательности МНС мышей СВА, не способны значимо эффективнее подавлять пролиферацию аутологичных спленоцитов в ответ на антигенный стимул мышей BALB/c, по сравнению с группой контрольной трансфекции p5 (Рис. 15 Б). При этом ДК, трансфицированные pIL-10, сохранили данную способность и угнетали пролиферацию значимо

эффективнее групп трансфекции p5, pMHC и совместной трансфекции. Также, способность к значимо более выраженному подавлению пролиферации аутоспленоцитов на антигены мышей BALB/c проявили и неэлектропорированные ДК, что еще раз подчеркнуло толерогенную функцию незрелых ДК.

Таким образом, в условиях *in vitro*, ДК мышей C57Bl/6, трансфицированные плазмидой, кодирующей антигенные последовательности MHC I класса мышей CBA, способны к угнетению пролиферации аутологичных спленоцитов только в ответ на антигены мышей CBA. А дендритные клетки, трансфицированные ДНК-конструкцией, кодирующей IL-10, способны к угнетению пролиферации на антигены мышей CBA и BALB/c.

### 3.6 Подавление острой РТПХ с помощью дендритных клеток, трансфицированных pIL-10 и pMHC

Острую РТПХ моделировали путем переноса донорских спленоцитов от родительской линии C57Bl/6 к реципиентам CBF1 (F1: C57Bl/6×CBA) (полуаллогенная модель РТПХ).

Для отработки выбранной модели РТПХ мышам CBF1 (F1: C57Bl/6×CBA) однократно внутривенно вводили физиологический раствор или 50, 100, 150 млн спленоцитов мышей C57Bl/6. Выраженность РТПХ оценивали по массе селезенки и тимуса на 7, 14, 21 и 28 сутки после ее индукции. Также на 7, 14 и 21 сутки проводился цитометрический анализ клеток селезенки на предмет изменений субпопуляционного состава при индукции острой РТПХ.

В таблице 1 представлены данные о массе селезенки и тимуса у мышей на 7, 14, 21 и 28 сутки после индукции РТПХ различным количеством клеток трансплантата.

Таблица 1 – Массы селезенки и тимусов мышей на разных сроках течения РТПХ.

Масса селезенки, мг					Масса тимуса, мг				
сутки	физ. р-р	50 млн	100 млн	150 млн	сутки	физ. р-р	50 млн	100 млн	150 млн
7	70	73	213	318	7	53	54	57	76
14	83	93	247	473	14	33	63	16	21
21	119	251	384	353	21	70	14	20	17
28	83	33	227	634	28	10	7	14	14

Из приведенных данных следует, что увеличение массы селезенки, как признака острой РТПХ [Renkonen, Näyru, 1984], свидетельствующего о протекании в ней иммунных реакций, наблюдалось с 7х суток при введении доз трансплантата 100 и 150 млн. При введении 50 млн данная реакция наблюдалась лишь на 21 сутки. Также при введении 100 и 150 млн клеток трансплантата с 14 суток наблюдалось снижение массы тимуса, что свидетельствует об его

атрофии – признаке острой РТПХ [Krenger et al, 2000]. При введении 50 млн клеток, снижение массы тимуса наблюдалось только к 21 суткам.

Также был проанализирован субпопуляционный состав селезенок мышей, подвергшихся индукции РТПХ различными дозами трансплантата (Рис. 16).

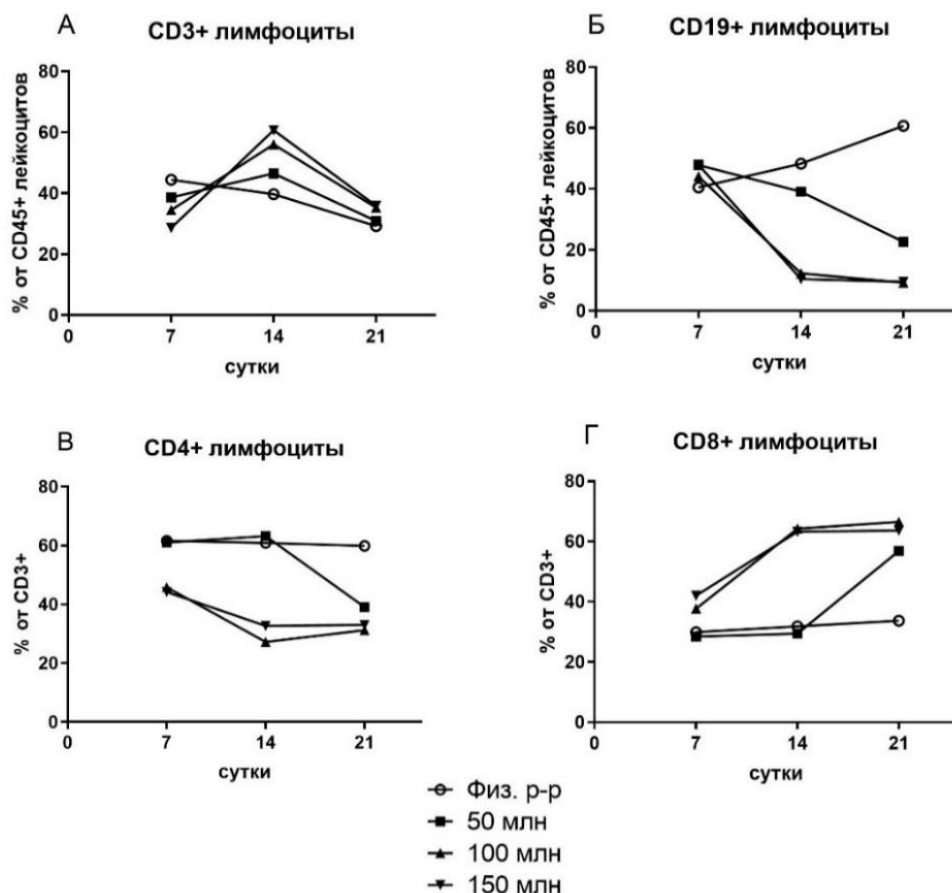


Рисунок 16 – Субпопуляционный состав селезенок мышей, подвергшихся индукции РТПХ различными дозами полуаллогенных спленоцитов, в различные временные точки.

Согласно данным об относительном содержании CD3 и CD19 клеток в селезенках мышей, развивающаяся РТПХ сопровождалась усилением Т-клеточного ответа и угнетением В-клеточного начиная с 14 суток после ее индукции (Рис. 14 А, Б). При этом внутри Т-клеточного звена относительное содержание CD8 клеток преобладало над содержанием CD4 клеток (Рис. 16 В, Г). Изменения в относительных количествах CD4 и CD8 клеток наблюдались с 7 по 21 сутки при введении 100 и 150 млн клеток трансплантата, а при введении 50 млн – только на 21 сутки (Рис. 16 В, Г). Полученные данные говорили о активации цитотоксического Th1-ответа, который является основным эффекторным механизмом развития острой РТПХ [Yi et al, 2009; Boieri et al, 2017].

Таким образом, спленциты мышей C57BL/6 в дозах 50, 100, 150 млн способны вызывать острую реакцию трансплантат против хозяина у мышей CBF1 (F1: C57BL/6×CBA), сопровождающуюся спленомегалией, атрофией тимуса и развитием цитотоксического иммунного ответа. При этом дозы трансплантата 100 и 150 млн клеток приводят к более ранним и выраженным изменениям, поэтому для дальнейших экспериментов по индукции РТПХ была выбрана доза 100 млн клеток.

Способность толерогенных дендритных клеток, трансфицированных pIL-10 и/или pMHC, угнетать острую РТПХ изучали при введении реципиенту в качестве трансплантата культур, полученных при сокультивировании данных дендритных клеток и аутологичных спленцитов. Однако, т.к. для индукции выраженной острой РТПХ, согласно вышеописанному эксперименту, необходимо использовать 100 млн клеток трансплантата, то сокультивирование ДК и аутоспленцитов в соотношении 1 к 10, как это выполняли в предыдущих экспериментах, требовало бы получения трансфицированных ДК в количестве  $10^8$ - $10^9$  единиц, что не являлось возможным. Поэтому для индукции РТПХ использовали культуры толерогенных ДК и аутологичных спленцитов, сокультивированных в соотношении 1 к 100. Но, предварительно данные культуры были проверены на сохранность способности угнетать активацию лимфоцитов *in vitro* при постановке смешанной культуры лимфоцитов со спленцитами мышей CBF1 (F1: C57BL/6×CBA) в качестве стимуляторов (Рис. 17).

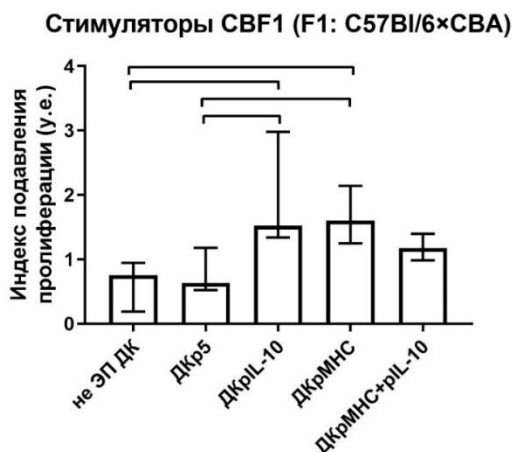


Рисунок 17 – Подавление пролиферации аутологичных спленцитов трансфицированными ДК в ответ на стимуляцию спленцитами мышей CBF1 (F1: C57BL/6×CBA). N=7. Медианы и межквартильный интервал. Скобками указаны статистически значимые отличия  $p \leq 0.05$ , критерий Краскела-Уоллиса с множественными сравнениями Данна. неЭП ДК – неэлектропорированные ДК. ДКр5 – ДК, электропорированные плазмидой p5. ДКрIL-10 – ДК, электропорированные плазмидой pIL-10. ДКрMHC – ДК, электропорированные плазмидой pMHC. ДКрIL-10+pMHC – ДК, электропорированные pIL-10 и pMHC одновременно.

Результаты показали, что ДК, трансфицированные pIL-10 и pMHC, сокультивированные с аутологичными спленоцитами в соотношении 1 к 100, способны значимо эффективнее подавлять пролиферацию аутологичных спленоцитов в ответ на стимуляцию лимфоцитами мышей CBF1 по сравнению с контрольными группами нетрансфицированных ДК и трансфицированных контрольной плазмидой p5. Дендритные клетки, трансфицированные совместно pIL-10 и pMHC не проявили данной способности. Возможно, это связано с уменьшением в 2 раза дозы каждой плазмиды при совместной трансфекции или с недостаточным объемом выборки (N=7). Таким образом, результаты показали, что ДК, трансфицированные pIL-10 или pMHC, способны оказывать толерогенное влияние на аутологичные спленоциты при сокультивировании в соотношении 1 к 100.

И так, индукцию острой РТПХ у мышей CBF1 выполняли путем однократного внутривенного введения 100 млн клеток из совместных культур экспериментальных трансфицированных дендритных клеток мышей C57Bl/6 и аутологичных спленоцитов, сокультивированных в соотношении 1 к 100. На 2 и 3 неделе после индукции РТПХ у реципиентов оценивалась ее выраженность по массе селезенки, а также изучался субпопуляционный состав лимфоцитов селезенки.

Через 2 недели после индукции РТПХ, в группах введения спленоцитов, ДКp5, ДКpMHC и ДКpIL-10+pMHC наблюдались значимо большие массы селезенки по сравнению с группой без индукции РТПХ (введения физ. р-ра), что свидетельствовало о выраженном протекании РТПХ в данных группах (Рис. 18 А). Однако, дендритные клетки, трансфицированные pIL-10, обеспечивали значимо меньшие массы селезенки по сравнению с контрольной группой индукции РТПХ (введения спленоцитов без ДК) и группой введения ДК, трансфицированных контрольной плазмидой p5. При этом массы селезенки в группе трансфекции pIL-10 значимо не отличались от масс селезенки в группе без индукции РТПХ – в группе введения физиологического раствора. Таким образом, ДК, трансфицированные с использованием pIL-10, оказались способны снижать выраженность РТПХ на 2 неделе ее течения.

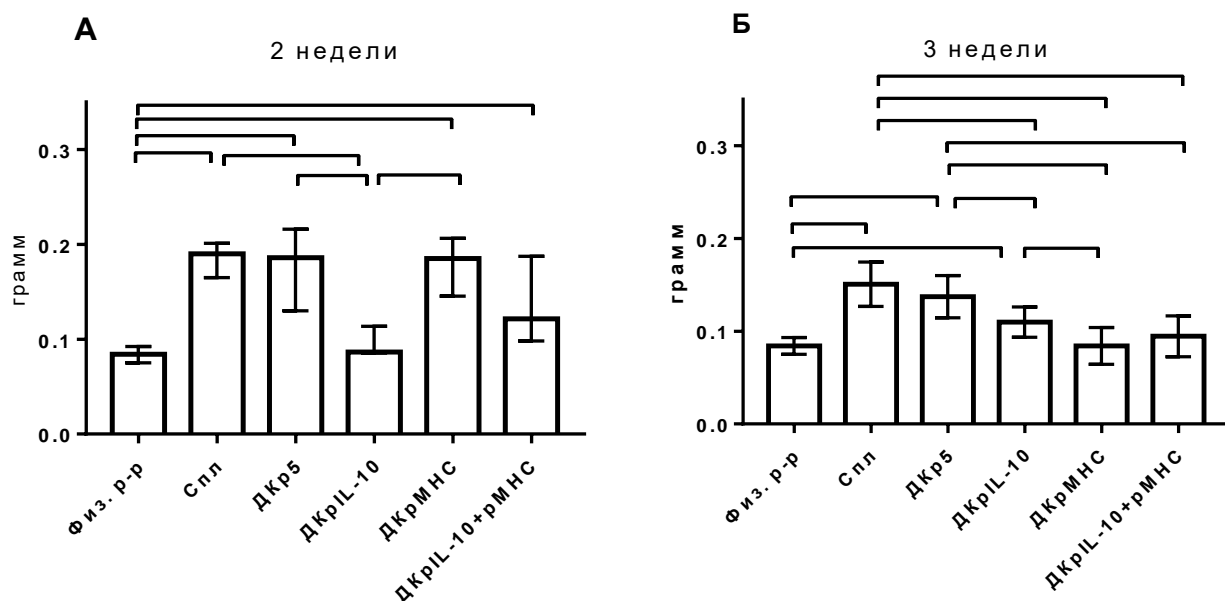


Рисунок 18 – Массы селезенок мышей CBF1(F1: C57Bl/6×CBA), подвергшихся индукции РТПХ различными группами ДК, через 2 (А) и 3 (Б) недели после ее индукции. N=10. А: медианы и межквартильный интервал, скобками указаны статистически значимые отличия  $p \leq 0.05$ , критерий Краскела-Уоллиса с множественными сравнениями Данна. Б: средние и стандартные отклонения, скобками указаны статистически значимые отличия  $p \leq 0.05$ , однофакторный дисперсионный анализ с множественными сравнениями Тьюки. Физ. р-р – введение физиологического раствора. Спл – введение спленоцитов. ДКр5 – ДК, электропорированные плазмидой р5. ДКрIL-10 – ДК, электропорированные плазмидой рIL-10. ДКрМНС – ДК, электропорированные плазмидой рМНС. ДКрIL-10+рМНС – ДК, электропорированные рIL-10 и рМНС одновременно.

Через 3 недели после индукции РТПХ достоверно меньшие массы селезенок по сравнению с контрольными группами введения спленоцитов и ДКр5 были обнаружены в группах трансфекции рIL-10, рМНС и совместной трансфекции рIL-10 и рМНС (Рис. 18 Б). Однако, массы селезенок мышей, получивших рIL-10 трансфицированные ДК, на данном сроке были значимо больше масс селезенок мышей с введением ДКрМНС. При этом массы селезенок в группах ДКрМНС и ДКрМНС+рIL-10 значимо не отличались от масс селезенок в группе без индукции РТПХ (введением физ. раствора).

Таким образом, согласно полученным данным, ДК, трансфицированные рIL-10, были способны подавлять проявления острой РТПХ начиная со 2 недели ее течения, однако, к 3 неделе данная способность становилась менее выраженной. ДК, трансфицированные с участием рМНС, были способны подавлять проявления острой РТПХ начиная с 3 недели ее течения.

Анализ субпопуляционного состава селезенок мышей через 2 недели после индукции РТПХ показал, что только группа ДК, трансфицированных рIL-10, на данном сроке способна к устранению сдвига в сторону Т-клеточного иммунного ответа при течении РТПХ (Рис. 19 А). Однако, в данной группе все равно наблюдалось снижение В клеточного ответа по сравнению с группой без индукции РТПХ (Рис. 19 Б). Также в селезенках мышей, подвергнутых индукции РТПХ с помощью культур, содержащих рIL-10 трансфицированные ДК, наблюдалось неизменное по отношению к группе без индукции РТПХ содержание CD4 и CD8 клеток (Рис 19 В, Г), что свидетельствовало о подавлении Th1 цитотоксического ответа при течении РТПХ.

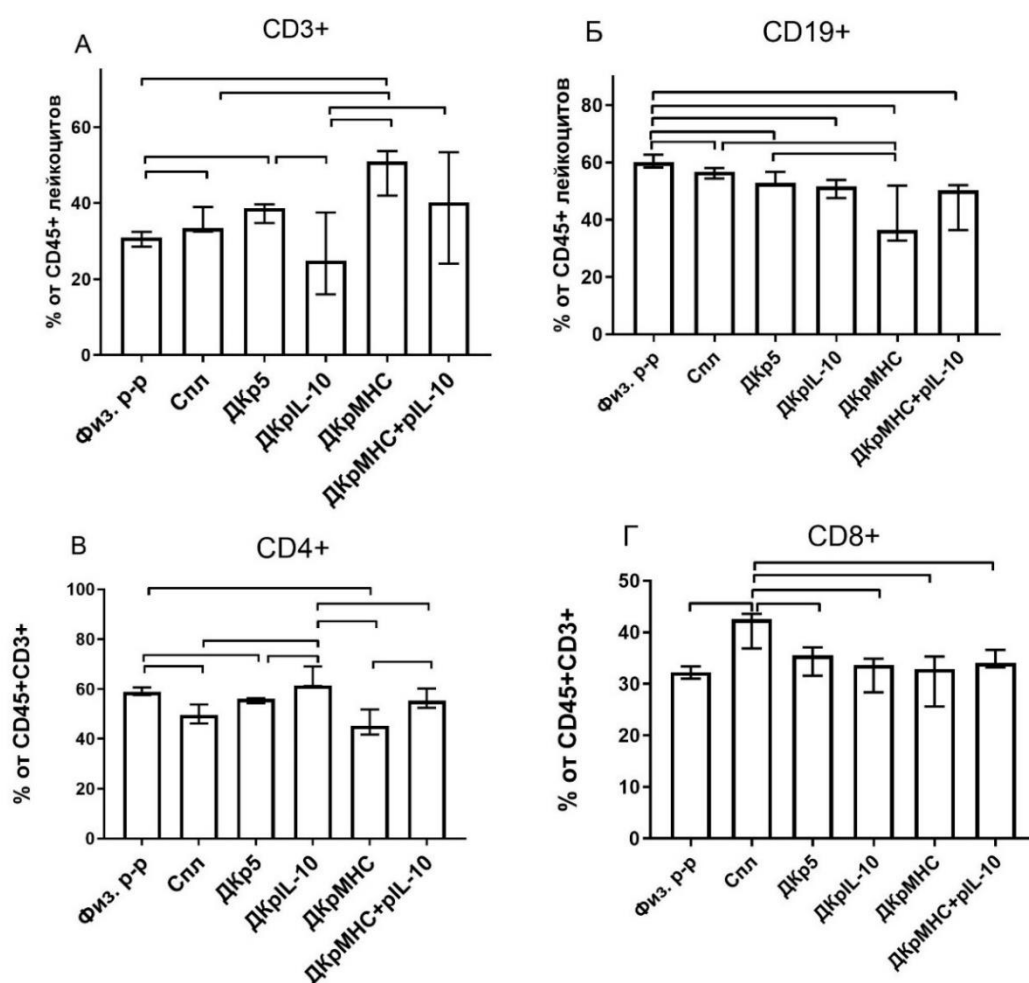


Рисунок 19 – Субпопуляционный состав селезенок мышей СВF1 на 2 неделе течения РТПХ. N=7. Медианы и межквартильный интервал. Скобками указаны статистически значимые отличия  $p \leq 0.05$ , критерий Краскела-Уоллиса с множественными сравнениями Данна. Физ. р-р – введение физиологического раствора. Спл – введение спленоцитов. ДКр5 – ДК, электропорированные плазмидой р5. ДКрIL-10 – ДК, электропорированные плазмидой рIL-10. ДКрMNC – ДК, электропорированные плазмидой рMNC. ДКрIL-10+рMNC – ДК, электропорированные рIL-10 и рMNC одновременно.

Через 2 недели после введения мышам культур с ДК, трансфицированными рМНС и совместно рМНС и рIL-10, в их селезенке наблюдалось достоверно большее содержание CD3+ клеток и достоверно меньшее содержание CD19+ клеток по сравнению с группой без индукции РТПХ. Группа трансфекции рМНС обеспечивала значимо большие значения по данным маркерам также и по сравнению с контрольными группами индукции РТПХ – группами введения спленоцитов и трансфекции контрольной плазмидой р5 (Рис. 19 А, Б). Также, ДК, трансфицированные рМНС, приводили к достоверно меньшему содержанию CD4 клеток в селезенках мышей по сравнению с группой без индукции РТПХ (Рис. 19 В). Однако, обе группы трансфицированные с использованием рМНС значимо снижали количество CD8 клеток в селезенках мышей по сравнению с группой индукции РТПХ спленоцитами (Рис. 19 Г).

Таким образом, через 2 недели после индукции РТПХ ДК, трансфицированные рIL-10, эффективно устраняли субпопуляционные изменения в селезенке, характерные для течения РТПХ. Группа трансфекции ДК рМНС не обладала данной способностью, но все же снижала количество CD8 лимфоцитов, по сравнению с группой индукции РТПХ спленоцитами. А группа совместной трансфекции проявляла промежуточные свойства.

Через 3 недели после индукции РТПХ ДК, трансфицированные рIL-10, потеряли способность удерживать относительное количество CD3, CD19 клеток, но не CD4 и CD8 клеток, на уровне, характерном для мышей без индукции РТПХ (Рис. 20). Что, выглядит согласовано с промежуточными (между группами с индукцией РТПХ и без) массами селезенки, полученными на этом сроке. Для групп трансфекции рМНС и совместно рМНС и рIL-10 на данном сроке также наблюдалась способность удерживать относительное количество CD4 и CD8, но не CD3 и CD19, клеток в рамках контрольных значений (Рис. 20).

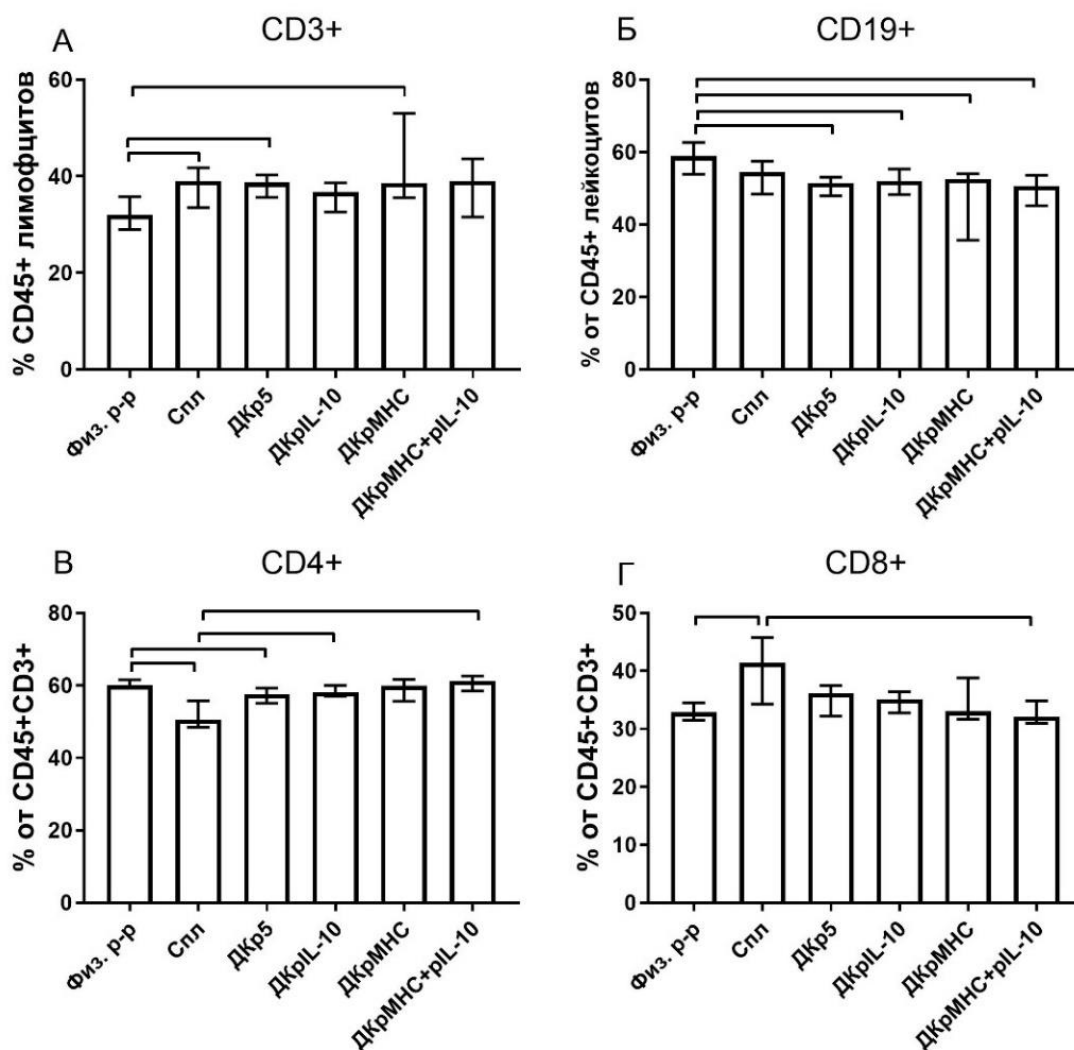


Рисунок 20 – Субпопуляционный состав селезенок мышей CBF1 на 3 неделе течения РТПХ. N=10. Медианы и межквартильный интервал. Скобками указаны статистически значимые отличия  $p \leq 0.05$ , критерий Краскела-Уоллиса с множественными сравнениями Данна. Физ. р-р – введение физиологического раствора. Спл – введение спленоцитов. ДКр5 – ДК, электропорированные плазмидой p5. ДКрIL-10 – ДК, электропорированные плазмидой pIL-10. ДКрМНС – ДК, электропорированные плазмидой pMHC. ДКрIL-10+pMHC – ДК, электропорированные pIL-10 и pMHC одновременно.

Также в селезенках мышей было проанализировано содержание CD4+CD25+FoxP3+ Treg клеток и CD4+CD25+FoxP3- эффекторных клеток. На сроке 2 недели после индукции РТПХ для всех экспериментальных группах трансфекции не было обнаружено каких-либо значимых изменений в содержании CD4+CD25+FoxP3+Treg клеток по сравнению с группой без индукции РТПХ и с группами контрольной индукции РТПХ (Рис. 21 А). Через 3 недели повышенное

относительное содержание Treg в селезенках мышей наблюдалось в группах трансфекции рМНС и рМНС и рIL-10, но не в группе рIL-10 (Рис. 21 Б).

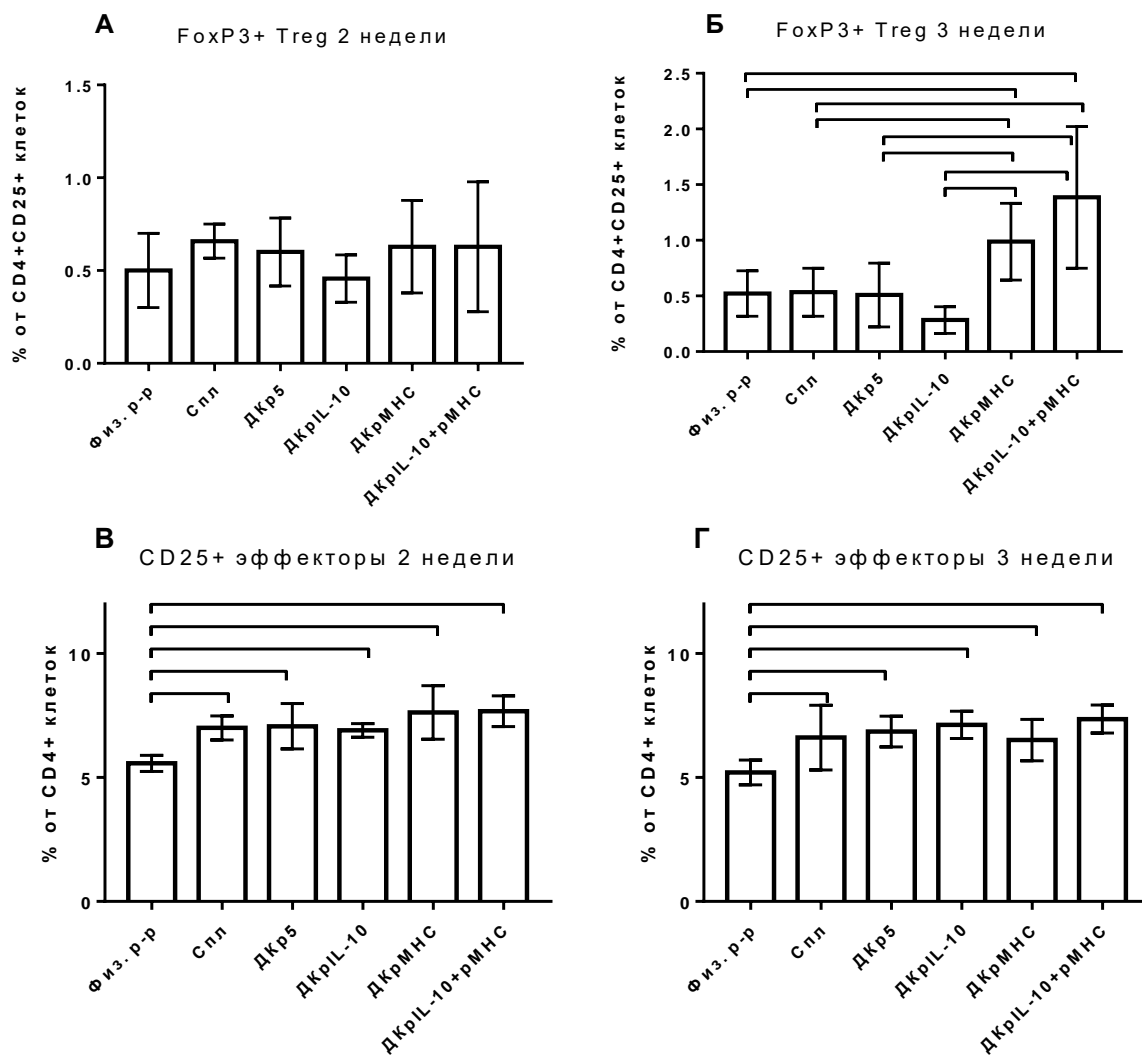


Рисунок 21 – Содержание CD4+C25+FoxP3+ Treg (А,Б) и CD4+CD25+FoxP3- эффекторных клеток (В,Г) в селезенках мышей CBF1 на 2 и 3 неделе течения РТПХ. N=7. Средние и стандартные отклонения. Скобками указаны статистически значимые отличия  $p \leq 0.05$ , однофакторный дисперсионный анализ с множественными сравнениями Тьюки. Физ. р-р – введение физиологического раствора. Спл – введение спленоцитов. ДКр5 – ДК, электропорированные плазмидой р5. ДКрIL-10 – ДК, электропорированные плазмидой рIL-10. ДКрМНС – ДК, электропорированные плазмидой рМНС. ДКрIL-10+рМНС – ДК, электропорированные рIL-10 и рМНС одновременно.

На сроках 2 и 3 недели во всех группах индукции РТПХ наблюдалось повышенное относительное количество CD4+CD25+FoxP3- эффекторных клеток по сравнению с группой

введения физ. р-ра (Рис. 21 В,Г), что может говорить о отсутствии угнетения активации эффекторных клеток в экспериментальных группах.

Таким образом, согласно полученным данным, снижение интенсивности течения РТПХ на 2 неделе, обеспечиваемое рIL-10 трансфицированными ДК, сопровождалось подавлением цитотоксического иммунного ответа. А в группе трансфекции рМНС на 3 неделе после индукции РТПХ - повышенным количеством Treg клеток.

Для проверки антиген-специфичности подавления РТПХ с помощью ДК, трансфицированных рМНС, кодирующей антигенные последовательности МНС мышей СВА, была поставлена РТПХ на мышах, несущих другой аллель МНС I класса, в частности, на мышах BALB/c (аллель H2-d). Результаты показали, что согласно данным о массах селезенок, только группа ДК, трансфицированных рIL-10, способна угнетать проявления РТПХ у мышей BALB/c (Рис. 22 А).

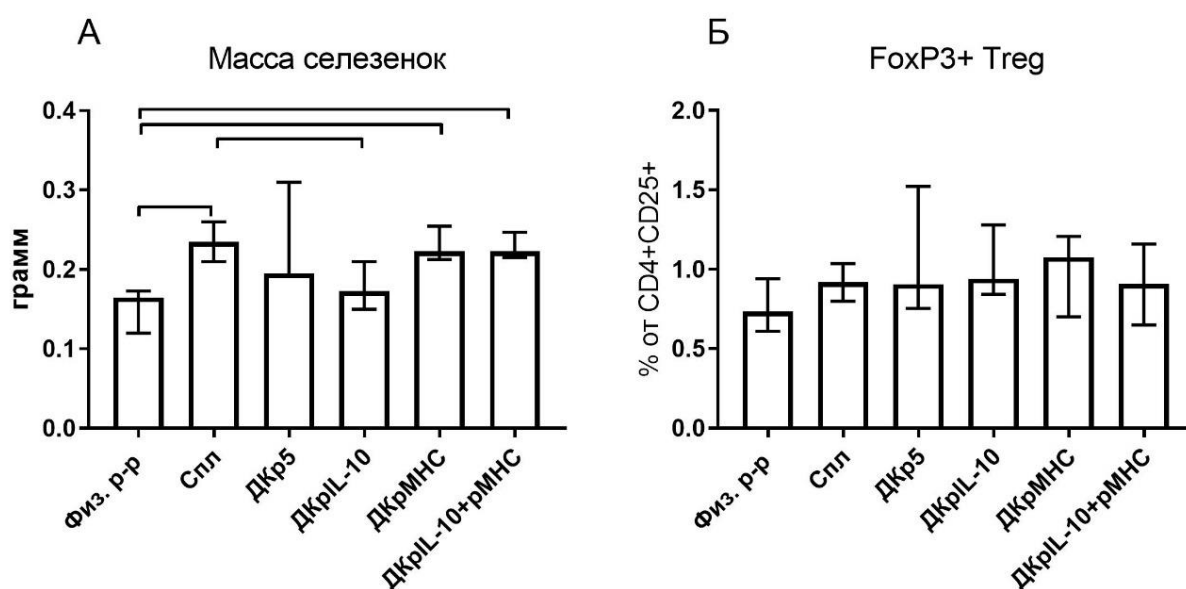


Рисунок 22 – Масса селезенок мышей BALB/c через 3 недели после индукции РТПХ (А) и относительное содержание в селезенках FoxP3+ Treg (Б). n=7. Медианы и межквартильный интервал. Скобками указаны статистически значимые отличия  $p \leq 0.05$ , критерий Краскела-Уоллиса с множественными сравнениями Данна. Физ. р-р – введение физиологического раствора. Спл – введение спленоцитов. ДКр5 – ДК, электропорированные плазмидой р5. ДКрIL-10 – ДК, электропорированные плазмидой рIL-10. ДКрМНС – ДК, электропорированные плазмидой рМНС. ДКрIL-10+рМНС – ДК, электропорированные рIL-10 и рМНС одновременно.

При этом повышенного количества FoxP3+ Treg клеток в селезенках мышей с индукцией РТПХ культурами с любыми трансфицированными ДК не наблюдалось (Рис. 22 Б).

Таким образом, ДК, трансфицированные pIL-10, способны неспецифично подавлять острую РТПХ, направленную на антигены мышей СВА и BALB/с, по-видимому, за счет угнетения цитотоксического иммунного ответа с помощью иммунорегуляторного эффекта IL-10. А дендритные клетки, трансфицированные антигенными последовательностями МНС мышей СВА, способны антиген-специфично подавлять РТПХ, вызванную антигенами мышей СВА, но не на антигенами мышей BALB/с, в связи с генерацией Treg клеток.

### 3.7 Подавление реакции отторжения кожного лоскута с помощью дендритных клеток, трансфицированных pIL-10 и pMHC

На завершающем этапе была исследована способность полученных трансфицированных ДК увеличивать время отторжения аллогенного кожного лоскута. Мышам С57В1/6 на спину пересаживали кожный лоскут с хвоста мышей СВА или BALB/с. Толерогенные культуры, полученные с помощью сокультивирования трансфицированных дендритных клеток и аутологичных спленоцитов в соотношении 1 к 10, вводили подкожно в холку животному в количестве 1 млн за 1 сутки до трансплантации и через 3 суток после. Отторжение кожного лоскута начинали оценивать с 7 суток по некротическим изменениям внешнего вида лоскута. Кожный лоскут некротизированный на 80% считался отторгшимся (Рис. 23).





	7 суток	12 суток
Приживление		
Отторжение		

Рисунок 23 – Примеры приживления и отторжения трансплантированного кожного лоскута. Приживление – сингенная трансплантация. Отторжение – аллогенная трансплантация.

При пересадке кожного лоскута от мышей СВА мышам С57В1/6 отмечена способность всех экспериментальных групп, т.е. групп трансфекции рIL-10, рМНС и совместной трансфекции, значимо увеличивать время отторжения кожного лоскута по сравнению с контрольными группами введения физ.р-ра, спленоцитов и совместных культур спленоцитов и ДК, трансфицированных плазмидой р5 (Рис. 24, Табл. 2).

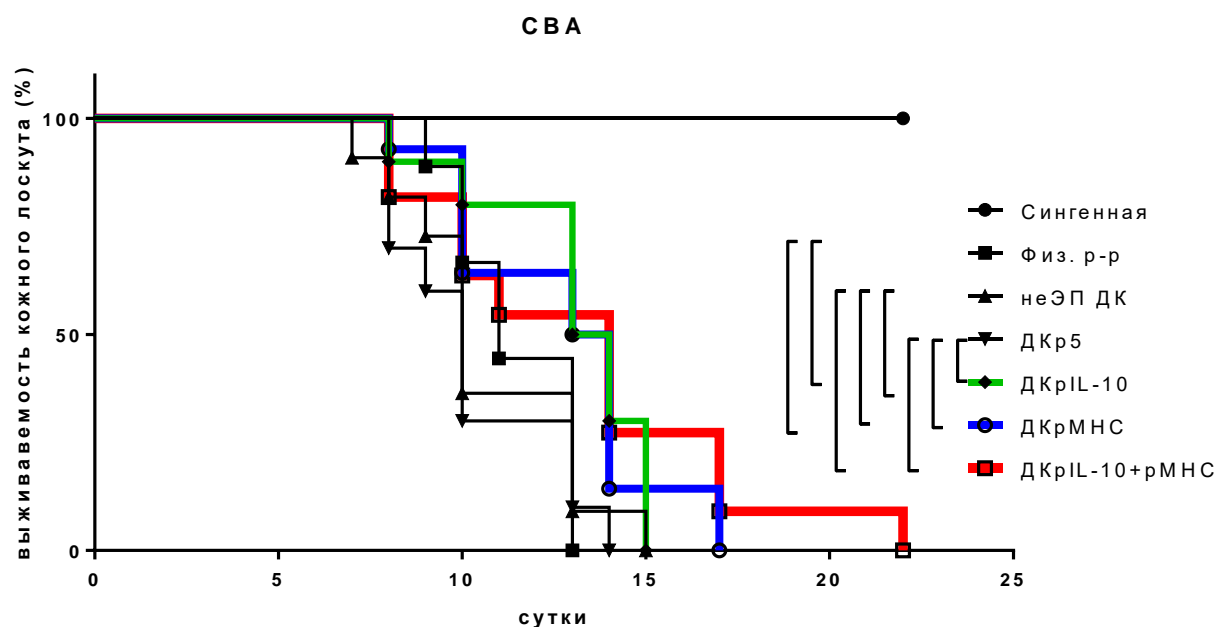


Рисунок 24 – Кривые выживаемости кожного лоскута мышей СВА при трансплантации мышам С57В1/6 и введении трансфицированных ДК. N=10-14. Статистически значимые отличия между группами проиллюстрированы скобками,  $p \leq 0.05$ , критерий Мантеля-Кокса. Сингенная – трансплантация сингенного лоскута. Физ. р-р – введение физиологического раствора. неЭП ДК – введение неэлектропорированных ДК. ДКр5 – ДК, электропорированные плазмидой р5. ДКрIL-10 – ДК, электропорированные плазмидой рIL-10. ДКрМНС – ДК, электропорированные плазмидой рМНС. ДКрIL-10+рМНС – ДК, электропорированные рIL-10 и рМНС одновременно.

Медианы времени отторжения кожного лоскута приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Медианы времени отторжения кожного лоскута мышей СВА и BALB/c при трансплантации мышам С57В1/6 и введении трансфицированных ДК.

Донор	Физ. р-р	Сплено-циты	неЭП ДК	ДКр5	ДК рIL-10	ДК рМНС	ДК рIL-10+рМНС
СВА	11		10	10	13,5	13,5	14
BALB/c	8	9,5		8	12	9	12

При трансплантации кожного лоскута от мышей BALB/c способность к увеличению медианы времени отторжения кожного лоскута была отмечена только для групп трансфекции pIL-10 и совместной трансфекции pMHC и pIL-10, т.е. для тех групп, где использовалась плазида, кодирующая IL-10 (Рис. 25; Табл. 2).

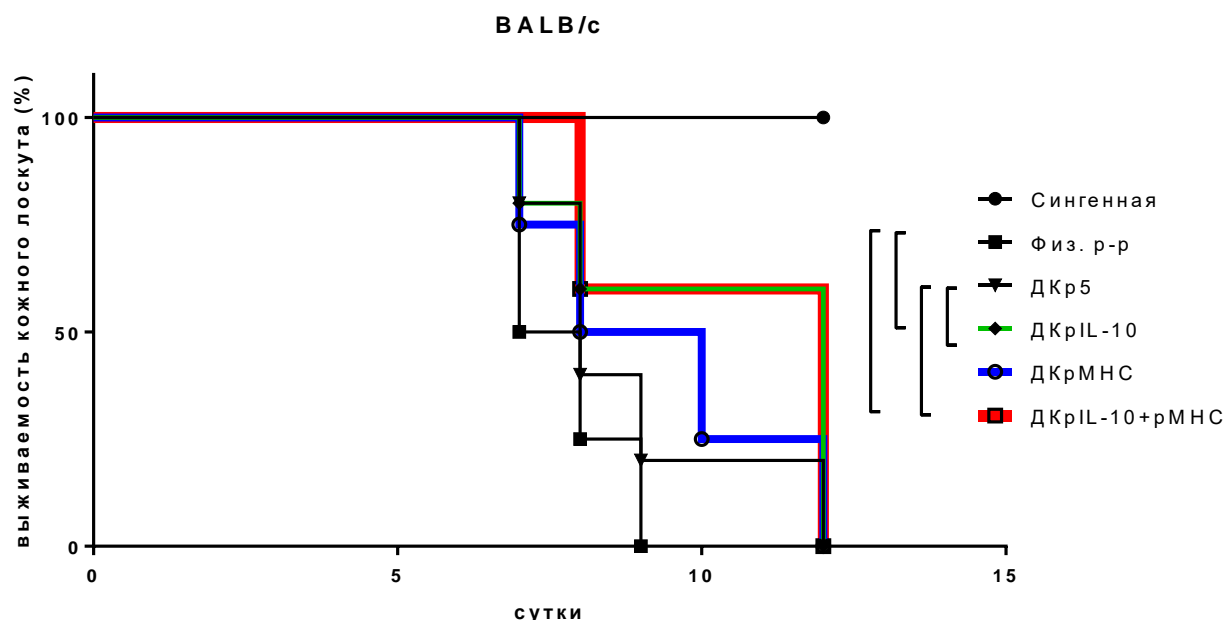


Рисунок 25 – Кривые выживаемости кожных лоскутов мышей BALB/c при трансплантации мышам C57Bl/6 и введении трансфицированных ДК. N=5. Статистически значимые отличия между группами проиллюстрированы скобками,  $p \leq 0.05$ , логарифмический тест трендов. Сингенная – трансплантация сингенного лоскута. Физ. р-р – введение физиологического раствора. Спл – введение спленоцитов. ДКр5 – ДК, электропорированные плазмидой p5. ДКрIL-10 – ДК, электропорированные плазмидой pIL-10. ДКрMHC – ДК, электропорированные плазмидой pMHC. ДКрIL-10+pMHC – ДК, электропорированные pIL-10 и pMHC одновременно.

Таким образом, в модели отторжения кожного лоскута ДК, трансфицированные с участием pIL-10, способны продлевать отторжение кожного лоскута как мышей СВА, так и мышей BALB/c, что говорит о неспецифичном характере подавления реакции отторжения с помощью данных ДК. Дендритные клетки, трансфицированные антигенными последовательностями MHC мышей СВА, способны продлевать время отторжения кожного лоскута только мышей СВА, что еще раз указывает на антиген-специфичное подавление иммунных реакций с их помощью.

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведенное исследование было направлено на разработку более эффективного и более клинически приемлемого подхода клеточной терапии трансплантационных реакций (реакции отторжения солидных органов и реакции трансплантат против хозяина), который бы позволил снизить необходимость применения системной иммуносупрессивной терапии. Для этого в исследовании были разработаны протоколы получения дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими антигенные последовательности молекул МНС (pМНС) и IL-10 (pIL-10). При этом нагрузка дендритных клеток антигеном с помощью трансфекции заранее изготовленными и спроектированными с помощью *in silico* анализа ДНК-конструкциями, кодирующими антигенные последовательности молекул МНС, отличающимися у донора и реципиента, является новым подходом для индукции иммунологической толерантности с целью угнетения трансплантационных реакций. Такой подход, в отличие от большинства предложенных в литературе способов, не требует использования донорского материала для нагрузки дендритных клеток антигеном, что может способствовать трансляции методов клеточной терапии трансплантационных реакций в клиническую практику. Также для увеличения эффективности угнетения трансплантационных реакций в работе была применена одновременная трансфекция дендритных клеток ДНК-конструкциями, кодирующими антигенные последовательности молекул МНС и IL-10.

Логика исследования предполагала использование периферических механизмов иммунологической толерантности для подавления трансплантационных реакций поскольку в исследовании использовалось внутримышечное (подкожное для угнетения реакции отторжения кожного лоскута и внутривенное для угнетения РТПХ) введение ДК животному, а оценка толерогенных свойств трансфицированных дендритных клеток включала изучение периферических механизмов поддержания толерантности – индукцию FoxP3+ Treg из периферических Т-клеток с помощью ДК вне центральных органов иммунной системы и экспрессию ДК IL-10, участвующего в дифференцировке pTreg из периферических наивных Т-клеток (Рис. 14) [Voks et al, 2012]. Однако, вовлечение центральных механизмов толерантности при использовании выбранной схемы эксперимента невозможно исключить, поскольку незрелые дендритные клетки способны мигрировать из периферических тканей в тимус и выполнять там функцию поддержания толерантности [Li et al, 2009]. Оценка вклада центральных механизмов в индукцию толерантности в данной работе не проводилось.

Также, логика исследования предполагает угнетение непрямого механизма аллораспознавания при течении трансплантационных реакций, поскольку в работе

использовались аутологичные дендритные клетки, нагруженные антигеном, а для угнетения прямого механизма аллораспознавания необходимо было бы обеспечить присутствие аллогенных молекул МНС на используемых дендритных клетках [Siu et al, 2018].

Для получения толерогенных дендритных клеток в исследовании были использованы протоколы генерации толерогенных ДК из костного мозга мышей, описанные в литературе, с некоторыми модификациями [Pêche et al, 2005; Song et al, 2014; Boks et al, 2012; Martin et al, 2007]. Так, клетки костного мозга мышей C57Bl/6 культивировали в среде, содержащей GM-CSF и IL-4 без дополнительных агентов или при добавлении IL-10, TGF- $\beta$ , BAY 11-7082 (специфический ингибитор NF- $\kappa$ B), IL-10 и BAY 11-7082 или TGF- $\beta$  и BAY 11-7082.

Согласно фенотипическому анализу по маркерам CD80, CD86, CD83, CD40 (Рис. 8) среди полученных ДК наиболее низкой экспрессией данных маркеров и, следовательно, наиболее незрелым фенотипом обладали ДК, генерируемые в присутствии TGF- $\beta$  и TGF- $\beta$ /BAY 11-7082. Однако, известно, что для активации Т-клеток, в том числе и Treg-клеток требуется определенный уровень экспрессии молекул костимуляции и активации на ДК [Takahashi et al, 1998; Zeng et al, 2009], поэтому важно было подтвердить реализацию полученными ДК толерогенной функции.

Последующий анализ толерогенной функции полученных ДК по индукции с их помощью экспрессии FoxP3, IL-10 и TGF- $\beta$  в аутологичных спленоцитах (Рис. 9) показал, что ДК, генерируемые в присутствии TGF- $\beta$  и TGF- $\beta$ /BAY 11-7082 обладают сниженными толерогенными свойствами несмотря на их незрелый фенотип, что может быть связано с недостаточной дифференцировкой предшественников костного мозга в антиген-представляющие клетки в данных группах. В связи с чем группы ДК, полученные в присутствии TGF- $\beta$  и TGF- $\beta$ /BAY 11-7082, были исключены из дальнейших экспериментов.

При стимулировании оставшихся групп ДК LPS во всех группах наблюдалось увеличение экспрессии CD80 и CD86, что говорило о приобретении дендритными клетками зрелого фенотипа под действием LPS (Рис. 10).

Проведенная серия экспериментов показала, что ДК, полученные с помощью GM-CSF и IL-4, с или без добавления IL-10, BAY 11-7082, IL-10 и BAY 11-7082 являлись фенотипически незрелыми, а свойства и выраженность их толерогенной функции значимо не отличались. Однако, согласно литературным данным дендритные клетки полученные в присутствии IL-10 более рефрактерны к созреванию, чем ДК, полученные с помощью GM-CSF и IL-4, что обеспечивает генерацию повышенного количества Treg клеток и сниженную пролиферацию лимфоцитов под их влиянием [Boks et al, 2012]. А дендритные клетки, полученные в присутствии BAY 11-7082 более эффективно снижают выраженность экспериментального артрита по

сравнению с GM-CSF/L-4 ДК [Martin et al, 2007], что также говорит о их более выраженной толерогенной функции. Возможно, данное отличие связано с тем, что в литературных данных использовался 6-8 суточный протокол генерации ДК с помощью IL-10 и BAY 11-7082, а в проведенном автором исследовании дендритные клетки культивировали 3 суток, поскольку электропорация именно 3х суточных ДК происходила наиболее успешно (Рис. 11). Таким образом, выбранного временного интервала могло быть недостаточно для реализации толерогенных эффектов IL-10 и BAY 11-7082. В то время как, уменьшение воздействия GM-CSF и IL-4 на ДК, наоборот, согласно литературным данным, приводит к формированию ДК с повышенной толерогенной функцией [Lutz et al., 2000; Guindi et al, 2018].

Таким образом, поскольку значимой разницы в реализации толерогенной функции между группами ДК, полученными в течении 3х суток с помощью GM-CSF и IL-4, с или без добавления IL-10, BAY 11-7082, IL-10 и BAY 11-7082 выявлено не было, в дальнейших экспериментах было решено использовать наиболее простые в получении ДК, генерируемые в присутствии GM-CSF и IL-4 без добавления дополнительных агентов.

Далее дендритные клетки, полученные по выбранному протоколу, трансфицировали методом электропорации ДНК-конструкциями, кодирующими IL-10, антигенные последовательности МНС мышей СВА (рМНС), или контрольной плазмидой р5.

Согласно литературным данным, на ранних этапах использования метода электропорации эффективность трансфекции дендритных клеток ДНК-конструкциями была относительно низка и составляла от менее 1% до 10% [Strobel et al, 2000; Lohmann et al, 2000]. А выживаемость клеток после электропорации составляла 20-50% [Van Leeuwen et al, 2006; Van Tendeloo et al, 1998]. Эффективность электропорации, как оказалось, обратна пропорциональна выживаемости клеток при электропорации [Xie Q et al, 2012]. А цитотоксическое действие электропорации проявляется наиболее выражено в присутствии нуклеиновых кислот и, по-видимому, связана с нарушением прохождения нуклеиновых кислот через образующиеся поры в клеточной мембране [Lesueur et al, 2016]. Поэтому получение высокой эффективности и низкой смертности при электропорации требует тонкой отработки метода.

По мере накопления данных и развития метода электропорации эффективность трансфекции дендритных клеток ДНК-конструкциями и их выживаемость стали превышать 50% [Landi et al, 2007; Mullins et al, 2015].

В нашем исследовании, в результате отработки параметров электропорации (Рис. 11 А-В) и подбора среды для культивирования клеток после электропорации, эффективность электропорации, оцененная по экспрессии плазмиды рGFP, кодирующей зеленый флуоресцентный белок, составила 31% для дендритных клеток, полученных по выбранному

протоколу. Клеточная смертность в результате электропорации составляла 5,01% (Рис. 11 Г). Полученные результаты, таким образом, соответствовали литературным данным.

Эффективность электропорации дендритных клеток рIL-10 была показана также в дозозависимом увеличении секреции IL-10 трансфицированными дендритными клетками при увеличении количества трансфицируемой ДНК (Рис. 11). Полученные данные говорят о пригодности электропорации для трансфекции ДНК-конструкций, кодирующих полноразмерные белки.

Интересно, что электропорация дендритных клеток сама по себе оказывала созревающее действие на дендритные клетки (Рис. 13). Проявления данного феномена встречается и в литературных данных [Son et al, 2013; Michiels et al, 2005]. Природа данного явления не до конца ясна, возможно, она связана с транслокацией внутриклеточно расположенных белков на клеточную мембрану во время образования в ней пор при электропорации [Wang et al, 2008]. Электропорация ДК плазмидой, кодирующей IL-10, приводила к значимому снижению количества ДК, экспрессирующих CD86 и CD40, по сравнению с группой трансфекции р5. Также, в группе ДКрIL-10 наблюдалась тенденция к снижению относительного количества CD80+, CD86+ и CD40+ ДК по сравнению с другими группами электропорации плазмидами (ДКр5, ДКрМНС). что может говорить о сдерживающем характере действия IL-10 на созревание ДК под действием электропорации.

Однако, несмотря на более зрелый фенотип, дендритные клетки, электропорированные рIL-10 и рМНС, были способны индуцировать экспрессию FoxP3 и IL-10 в аутологических спленоцитах на уровне сопоставимом с неэлектропорированными ДК и на уровне значимо большем по сравнению с группой контрольной электропорации плазмидой р5. Также количество FoxP3+ и IL-10+ клеток при стимулировании аутологических спленоцитов рIL-10 и рМНС трансфицированными ДК было значимо больше по сравнению с исходными количествами данных клеток в спленоцитах (Рис. 14).

Если повышенная индукция Treg клеток в присутствии незрелых ДК и ДК, продуцирующих IL-10, является закономерным описанным в литературе феноменом [Lutz et al., 2000; Guindi et al, 2018; Xu et al, 2019; Boks et al, 2012; Raker et al, 2015], то повышенная индукция Treg дендритными клетками, трансфицированными антигенными последовательностями МНС, требует научного обоснования, поскольку сами по себе антигенные последовательности МНС не несут в себе толерогенного стимула, в отличие от IL-10.

На взгляд автора, повышенная индукция Treg клеток с помощью ДК, трансфицированных аллогенными эпитопами МНС, связана с чужеродностью трансфицированных антигенных последовательностей и эпитопов в них закодированных. Так, согласно современной парадигме иммунологии, Т-клеточный рецептор (TCR – T cell receptor) наивных лимфоцитов более аффинен

к МНС в комплексе с эпитопами чужеродных антигенов, чем к МНС в комплексе с эпитопами собственных антигенов, поскольку аутореактивные Т-клетки устраняются в результате негативной селекции в тимусе [Takaba, Takayanagi, 2017]. В результате чего ДК мышей C57Bl/6, трансфицированные аллогенными последовательностями МНС мышей СВА, более эффективно презентируют полученные аллогенные эпитопы сингенным лимфоцитам, чем собственные. Но поскольку используемые ДК не подвергались провоспалительным стимулам, таким как сигнал с паттерн-распознающих toll-подобных рецепторов (toll-like receptors, TLR) и как было показано выше способны выполнять толерогенную функцию, то в результате такой более эффективной презентации лимфоциты более активно дифференцируются в периферические Treg клетки. В литературе также встречаются данные о более эффективной индукции Treg на чужеродный антиген с помощью толерогенных дендритных клеток [Fujita et al, 2007].

В смешанной культуре лимфоцитов все экспериментальные группы ДК (группы трансфекции IL-10, антигенными последовательностями молекул МНС мышей СВА и совместной трансфекции) проявили способность угнетать пролиферацию аутологичных спленоцитов на антигены мышей СВА (Рис. 13 А). В менее выраженном объеме данную способность проявили и неэлектропорированные ДК, что еще раз подчеркнуло их способность к выполнению толерогенной функции.

Угнетать пролиферацию спленоцитов на антигены мышей BALB/c оказались способны лишь не трансфицированные ДК и ДК, трансфицированные IL-10 (Рис. 15 Б), что продемонстрировало антиген-специфичное подавление *in vitro* иммунных реакций с помощью дендритных клеток, трансфицированных антигенными последовательностями молекул МНС. Дендритные клетки, трансфицированные IL-10, в свою очередь, проявили способность к неспецифичному угнетению иммунных реакций.

Однако, ранее нами было показано, что обе группы трансфекции - pIL-10 и pМНС, вызывают индукцию FoxP3+ Treg клеток, а активация и действие Treg в современной парадигме иммунологии считается антиген-специфичными процессами, несмотря на некоторые неспецифичные механизмы, реализуемые ими для супрессии иммунных реакций [Bacher et al, 2016; Ноерпли et al, 2016]. Таким образом, ДК, трансфицированные pIL-10 ДК, также могли проявить специфичное подавление иммунных реакций, но данного явления не было отмечено. Вероятно, наблюдаемое неспецифичное угнетение иммунных реакций с помощью ДК, трансфицированных pIL-10, осуществляется через прямое иммунорегуляторное действие IL-10 [Romagnani, 2006]. Также, в отсутствии антигена, дендритные клетки, трансфицированные pIL-10, вероятно, осуществляют индукцию поликлонального пула Treg, что тоже может приводить к наблюдаемой картине неспецифичной иммуносупрессии.

Интересно, что при постановке смешанной культуры лимфоцитов со спленоцитами мышей BALB/c в качестве стимуляторов свою способность к значимому угнетению пролиферации проявили и нетрансфицированные толерогенные ДК, чего не наблюдалось в столь выраженном объеме при использовании спленоцитов мышей CBA. На взгляд автора это связано с более активным проявлением феномена прямого аллораспознавания (allorecognition direct pathway) в паре C57BL/6-BALB/c, чем в паре C57BL/6-CBA. Суть данного феномена заключается в том, что Т-клеточный рецептор лимфоцитов способен связываться с аллогенными молекулами МНС вне зависимости от встроенного в них пептида, поскольку аллогенные молекулы МНС распознаются как комплекс собственного МНС и чужеродного пептида, в связи с высоким полиморфизмом молекул МНС [Marino et al, 2016]. Таким образом, лимфоциты мышей CBA и BALB/c, также, как и аутологичные спленоциты, способны взаимодействовать с полученными толерогенными дендритными клетками мышей C57BL/6, но вне зависимости от презентруемых ими эпитопов, и приобретать толерогенную функцию, проявляющуюся в дополнительном угнетении пролиферации в исследуемой культуре. При этом клетки мышей BALB/c и C57BL/6 являясь более генетически отдаленными взаимодействуют более активно, чем клетки в паре CBA - C57BL/6, в связи с более выраженными отличиями в молекулах МНС. В результате данного феномена, например, для постановки смешанных культур лимфоцитов традиционно используют пару BALB/c - C57BL/6, а не CBA - C57BL/6 [Mansilla et al, 2015; Drakes et al, 2009; Carretero-Iglesia et al, 2016; Takaaki et al, 2012; Huang et al, 2014; Lutz et al, 2000].

В проведенном исследовании в качестве модели острой РТПХ была выбрана полуаллогенная модель переноса донорских спленоцитов от родительской линии C57BL/6 к реципиентам – гибридам 1го поколения CBF1 (F1: C57BL/6×CBA). Использование полуаллогенной модели позволяет не прибегать к режиму кондиционирования – радиационного или медикаментозного уничтожения костного мозга реципиента, т.к. в данной модели клетки мышей CBF1 не реагируют на родительские антигены, т.е. не происходит отторжения введенного трансплантата, а вводимые клетки мышей линии C57BL/6 распознают чужеродные антигены другой родительской линии CBA. Однако, в такой модели клетки трансплантата не могут занять достаточную нишу для будущего роста и постепенно элиминируются из организма, а РТПХ, вызванная ими, протекает менее выражено и разрешается без летального исхода [Ellison et al, 1998, Miura et al, 2000]. Поэтому основными маркерами течения острой РТПХ в полуаллогенной модели являются атрофия тимуса (признак его повреждения) [Krenger et al, 2000], увеличение селезенки (признак течения в ней иммунных реакций) [Renkonen, Häyry, 1984] и увеличение выраженности цитотоксического иммунного ответа, как основного эффекторного механизма острой РТПХ [Yi et al, 2009; Boieri et al, 2017].

Обработка полуаллогенной модели острой РТПХ при внутривенном введении спленоцитов от родительской линии C57Bl/6 реципиентам CBF1 (F1: C57Bl/6×CBA) показала, что 100 млн спленоцитов способны к 14 суткам вызывать острую реакцию «трансплантат против хозяина», сопровождающуюся спленомегалией, атрофией тимуса и развитием цитотоксического иммунного ответа (Табл. 1, Рис. 16).

Поэтому способность толерогенных дендритных клеток, трансфицированных рIL-10 и/или рМНС, угнетать острую РТПХ изучали при введении реципиенту в качестве трансплантата 100 млн клеток, полученных при сокультивировании данных дендритных клеток и аутологичных спленоцитов.

Согласно полученным данным, ДК, трансфицированные рIL-10, были способны подавлять проявления острой РТПХ (значимо снижать массы селезенок у мышей с индукцией РТПХ) уже на 2 неделе ее течения. А ДК, трансфицированные с участием рМНС, позже – к 3 неделе течения РТПХ (Рис.18).

Также, ДК, трансфицированные рIL-10, приводили к подавлению цитотоксического иммунного ответа, характерного для острой РТПХ, на 2 неделе ее течения. Группа трансфекции ДК рМНС не обладала данной способностью, но все же снижала количество CD8 лимфоцитов, по сравнению с группой индукции РТПХ спленоцитами. А группа совместной трансфекции проявляла промежуточные свойства (Рис. 19, 20). При введении мышам спленоцитов, сокультивированных с ДК, трансфицированными рМНС, наблюдалось значимое повышение относительного количества Treg в селезенке мышей на 3 неделе течения РТПХ (Рис. 21 А, Б).

Данные отличия в подавлении выраженности течения РТПХ, вероятно, связаны с различным механизмом действия ДК, трансфицированных рIL-10 и рМНС. Так, IL-10, как известно, способствует формированию Th2 ответа и угнетению Th1 цитотоксического ответа [Bashyam, 2007; Coffman, 2006], что согласуется с отсутствием сдвига в сторону цитотоксического ответа при использовании рIL-10 трансфицированных ДК для индукции РТПХ в описанных экспериментах. Так же, ДК, продуцирующие IL-10, способствуют индукции не только FoxP3<sup>+</sup> Treg, но и Tr1 клеток, которые также экспрессируют IL-10 и являются регуляторными, но не экспрессируют FoxP3 [Comi et al, 2018; Gregori et al, 2010]. Т.е. генерация Tr1 клеток также может являться одним из механизмов угнетения РТПХ при использовании рIL-10 трансфицированных ДК при отсутствии индукции Treg клеток.

Напротив, толерогенные ДК, нагруженные антигеном, вызывают индукцию и экспансию функционально активных антиген-специфичных Treg клеток [Yamazaki et al, 2003; Yamazaki et al, 2006; Hamdi et al, 2007], что вероятно является механизмом угнетения РТПХ при использовании ДК, трансфицированных рМНС, кодирующей антигенные детерминанты МНС I класса мышей CBA, поскольку в данной группе было обнаружено повышенное количество Treg

через 3 недели после индукции РТПХ. При этом ДК, трансфицированные одновременно рIL-10 и рМНС, демонстрировали свойства обеих групп отдельной трансфекции, но менее выражено.

Интересно также, что в условиях *in vitro* рIL-10 трансфицированные ДК были способны индуцировать генерацию FoxP3+ Treg клеток (Рис. 14), но не проявили данной способности *in vivo* при индукции РТПХ.

При анализе литературных данных было отмечено, что для индукции FoxP3+ Treg *in vivo* необходимо использовать аллогенные или нагруженные антигеном ДК, продуцирующие IL-10 [Xu et al, 2019; Turnquist et al, 2007]. А для *in vitro* индукции Treg возможно использование сингенных и не нагруженных антигеном ДК, продуцирующих IL-10 [Boks et al, 2012], что и было выполнено в данной работе при использовании рIL-10 трансфицированных ДК.

Данное отличие в *in vitro* и *in vivo* индукции Treg можно объяснить тем, что IL-10 вызывает временную экспрессию FoxP3, поскольку при потере IL-10 сигналинга в CD4+ клетках пропадает и экспрессия FoxP3 [Murai, 2009]. А в работе, где временную экспрессию FoxP3 исключили из анализа, IL-10 не влиял на количество клеток, стабильно экспрессирующих FoxP3. [Chaudhry, 2011].

С другой стороны, контактное взаимодействие и сигнал через TCR, способны приводить к стойкой экспрессии FoxP3 [Lohr et al, 2006], что и реализуется при использовании аллогенных или нагруженных антигеном ДК.

Таким образом, в выполненных экспериментах смешанной культуры лимфоцитов при постоянном IL-10 сигналинге, исходящем от рIL-10 трансфицированных ДК, вероятно, детектировалась временная экспрессия FoxP3. А в условиях *in vivo*, продукция IL-10 трансфицированными дендритными клетками, вероятно, была недостаточной для индукции детектируемого уровня экспрессии FoxP3 в Т-клетках, в связи с системным распределением введенных дендритных клеток и возможностью Т-клеток мигрировать из под влияния данных дендритных клеток.

В свою очередь, ДК, трансфицированные одновременно рIL-10 и рМНС, которые обеспечивают как IL-10, так и TCR сигналинг проявили наиболее выраженную способность к индукции FoxP3+ Treg *in vivo* (Рис. 21), что согласуется с представленными данными.

Также, индукция временной экспрессии FoxP3 под действием IL-10 может объяснять дозозависимую экспрессию FoxP3 под влиянием дендритных клеток, трансфицированных различными количествами рIL-10, представленную на рисунке 14 В.

Все группы индукции РТПХ через 2 и 3 недели приводили к наличию значимо повышенного количества CD4+CD25+FoxP3- эффекторных клеток в селезенках мышей по сравнению с группой введения физ. р-ра (Рис. 21 В,Г), что может говорить о неспособности экспериментальных ДК (трансфицированных рIL-10, рМНС и рIL-10+рМНС) индуцировать

клональную анергию лимфоцитов, характеризующуюся отсутствием их активации и пролиферации [Jenkins, Schwartz, 1987]. Однако, дальнейшего более подробного изучения требует способность экспериментальных групп ДК индуцировать адаптивную анергию, при которой лимфоциты активируются, пролиферируют, но не выполняют эффекторной функции при встрече с антигеном [Jenkins, Schwartz, 1987].

При постановке полностью аллогенной РТПХ на мышях BALB/c способностью к подавлению ее проявлений обладали только дендритные клетки, трансфицированные pIL-10. При этом не было отмечено повышения относительного количества Treg ни в одной из исследуемых групп трансфицированных ДК. Что может говорить о том, что повышение относительного количества Treg в селезенках мышей CBF1 (F1: C57Bl/6×CBA) обусловлено *in vivo* экспансией Treg, преактивированных во время сокультивирования с ДКрМНС, в условиях доступа к антигенам мышей CBA. А при переносе таких Treg мыши BALB/c, необходимые антигены в которой отсутствуют, их экспансии, соответственно, не происходило.

Таким образом, согласно полученным результатам, pIL-10 трансфицированные ДК, обеспечивали неспецифическое подавление острой РТПХ у мышей CBF1 и BALB/c, вероятно, за счет иммуносупрессивного и иммунорегуляторного действия IL-10, которое проявлялось в угнетении цитотоксического иммунного ответа. В то время как, ДК, трансфицированные ДНК-конструкциями, кодирующими антигенные последовательности молекул МНС мышей CBA, подавляли острую РТПХ специфично у мышей CBF1 (F1: C57Bl/6×CBA), несущих антигены мышей CBA. При этом подавление острой РТПХ с помощью ДК рМНС сопровождалось экспансией FoxP3<sup>+</sup> Treg клеток, вероятно, специфичных к антигенам мышей CBA, поскольку данной экспансии при индукции РТПХ у мышей BALB/c не наблюдалось.

При пересадке кожного лоскута от мышей CBA способность к увеличению времени его отторжения была отмечена у всех экспериментальных групп – групп трансфекции pIL-10, рМНС и совместной трансфекции pIL-10 и рМНС. При этом, наибольшая медиана времени отторжения кожного лоскута была отмечена в группе совместной трансфекции pIL-10 и рМНС и составила 14 суток. Медиана времени отторжения кожного лоскута при введении физиологического раствора составила 11 суток (Рис. 24, Табл. 2).

При пересадке кожного лоскута от мышей BALB/c способность к увеличению времени его отторжения проявили группы трансфекции ДК pIL-10 и совместной трансфекции, т.е. те группы, где использовалась плаزمиды pIL-10 (Рис. 25, Табл. 2).

Таким образом, в модели отторжения кожного лоскута ДК, трансфицированные с участием pIL-10, способны продлевать отторжение кожного лоскута как мышей CBA, так и мышей BALB/c, что говорит о неспецифичном характере угнетения реакции отторжения с помощью данных ДК. Дендритные клетки, трансфицированные антигенными

последовательностями МНС мышей СВА, способны продлевать время отторжения кожного лоскута только мышей СВА, что еще раз указывает на антиген-специфичное подавление иммунных реакций с их помощью.

Следует отметить, что группа совместной трансфекции ДК рIL-10 и рМНС оказалась не способной к снижению проявлений острой РТПХ у мышей BALB/c, но способной к увеличению времени отторжения кожного лоскута от мышей BALB/c. Возможно, данный феномен связан с различным путем введения дендритных клеток в данных моделях. Так, подкожное введение экспериментальных культур при трансплантации кожного лоскута могло формировать локальное депо дендритных клеток, продуцирующих IL-10, под кожей в месте введения, а также в дренирующих кожу лимфоузлах, что позволяло обеспечить достаточные для супрессии иммунных реакций количества IL-10, даже при трансфекции уменьшенной в 2 раза дозы рIL-10 в дендритные клетки, как это и выполнялось для группы совместной трансфекции. При внутривенном введении экспериментальных культур в случае индукции РТПХ, вероятно, происходило системное распределение ДК, что не позволяло обеспечить локальные концентрации IL-10, достаточные для проявления иммуносупрессивного эффекта дендритных клеток, трансфицированных уменьшенной в 2 раза дозой рIL-10.

Также, при постановке РТПХ на мышах BALB/c формировалась полностью аллогенная модель РТПХ, где протекала также и реакция отторжения введенных клеток, т.к. иммунная система реципиента не была подавлена режимом кондиционирования. Поэтому, возможно, что уменьшенной в 2 раза дозы рIL-10 не хватило для подавления сразу двух реакций – реакции отторжения и реакции трансплантат против хозяина.

Наблюдаемые в проведенном исследовании сроки отторжения кожного лоскута при введении мышам трансфицированных ДК сопоставимы со сроками отторжения кожного лоскута, наблюдающимися при введении мышам иммуносупрессивных веществ – рапамицина или циклоспорина [Cheng et al, 2017]. Также, наблюдаемое увеличение сроков отторжения кожных лоскутов сопоставимо с увеличением сроков отторжения эктопически трансплантированного аллогенного сердца при введении мышам не нагруженных антигеном толерогенных дендритных клеток сингенных трансплантату и аллогенных реципиенту [Pêche et al, 2005]. И, наблюдаемое увеличение сроков отторжения кожных лоскутов оказалось сопоставимо с увеличением сроков отторжения эктопически трансплантированных островков поджелудочной железы при внутривенном введении реципиенту аутологичных ДК, нагруженных пептидом, полученным из молекул МНС [Oluwole et al, 2001]. Однако, в исследовании Oluwole et al, 2001 внутритимическое введение тех же ДК приводило к существенно большим срокам отторжения островков поджелудочной железы (сроки отторжения более 200 суток). Также, встречаются данные о существенно более длительном отторжении (более 100 суток) эктопически трансплатированного

аллогенного сердца при введении ДК, аллогенных реципиенту и сингенных трансплантату [Lutz et al., 2000].

Более эффективное подавление реакции отторжения с помощью внутритимического введения ДК может быть связано с вовлечением центральных, а не периферических, механизмов индукции толерантности. А возможная причина более эффективного подавления реакции отторжения с помощью дендритных клеток сингенных трансплантату и аллогенных реципиенту может заключаться в подавлении прямого механизма аллораспознавания, который в свою очередь ответственен за острую реакцию отторжения [Ali et al, 2016]. В проведенном же исследовании применялись сингенные реципиенту ДК, нагруженные донорскими антигенами, что позволяло продлить срок отторжения трансплантата за счет угнетения непрямого пути аллораспознавания [Siu et al, 2018]. Однако, не прямой путь аллораспознавания является основным механизмом развития хронической реакции отторжения, что делает целесообразным применение полученных дендритных клеток в позднем посттрансплантационном периоде. Также, прямой путь аллораспознавания при острой реакции отторжения в основном направлен на МНС II класса, а не прямой путь аллораспознавания при хронической реакции – в основном на эпитопы МНС I класса [Ali et al, 2016; Ayala García et al, 2012], которые и использовались для индукции толерантности в проведенном исследовании.

Поэтому, использование в ДНК-конструкциях антигенных последовательностей МНС I класса при введении трансфицированных ДК в раннем посттрансплантационном периоде могло привести к недооценке эффективности предложенного метода. Однако, даже в такой не совсем релевантной модели предложенный метод проявил определенную эффективность. Но в целом, рассмотренные данные демонстрируют возможность увеличения эффективности предложенного метода, например, с помощью доставки дендритных клеток, трансфицированных, ДНК-конструкцией, кодирующей антигенные последовательности молекул МНС, в тимус для индукции центральной иммунологической толерантности. Также, возможно, с помощью добавления в ДНК-конструкции антигенных последовательностей молекул МНС II класса или с помощью дополнительного введения аллогенных толерогенных ДК для угнетения прямого пути аллораспознавания и подавления острой реакции отторжения. Возможной стратегией увеличения эффективности предложенного метода может быть также множественное отсроченное введение полученных трансфицированных дендритных клеток, поскольку в проведенном исследовании введение осуществлялось в сроки близкие ко дню трансплантации, а полученные дендритные клетки все же направлены на подавление механизмов реализации хронической реакции отторжения.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной работе с целью подавления трансплантационных реакций были разработаны подходы получения толерогенных дендритных клеток с помощью трансфекции незрелых ДК ДНК-конструкциями, кодирующими IL-10 и антигенные последовательности молекул МНС I класса. Потенциал к подавлению трансплантационных реакций дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими IL-10 и антигенные последовательности молекул МНС, проявлялся в их способности генерировать повышенное количество FoxP3+ Treg и IL-10+CD4+ лимфоцитов в культурах аутологичных спленоцитов.

Полученные дендритные клетки проявили различный характер подавления иммунных реакций. Так, дендритные клетки, трансфицированные ДНК-конструкциями, кодирующими IL-10, *in vitro* в смешанной культуре лимфоцитов и *in vivo* в моделях отторжения кожного лоскута и реакции «трансплантат против хозяина» осуществляли подавление иммунных реакций как на антигены мышей СВА, так и на антигены мышей BALB/с, что говорит о неспецифичной иммуносупрессии, достигаемой с помощью данных дендритных клеток. При этом, в модели острой РТПХ было показано, что данная иммуносупрессия сопровождается угнетением цитотоксического иммунного ответа, вероятно, в результате прямого иммунорегуляторного действия IL-10.

Дендритные клетки, трансфицированные, ДНК-конструкциями, кодирующими антигенные последовательности молекул МНС I класса мышей СВА, *in vitro* в смешанной культуре лимфоцитов и *in vivo* в моделях отторжения кожного лоскута и реакции «трансплантат против хозяина» осуществляли подавление иммунных реакций на антигены мышей СВА, но не антигены мышей BALB/с. При этом, в модели острой РТПХ данные дендритные клетки обеспечивали экспансию FoxP3+ Treg клеток, вероятно, специфичных к антигенам мышей СВА. Таким образом, дендритные клетки, трансфицированные, ДНК-конструкциями, кодирующими антигенные последовательности молекул МНС, в отличие от ДК, трансфицированных IL-10, индуцируют иммунологическую толерантность, поскольку вызываемая ими иммуносупрессия носит антиген-специфичный характер и реализуется через один из механизмов поддержания периферической иммунологической толерантности – генерацию Treg клеток.

Таким образом, в представленной работе реализовано два подхода к подавлению трансплантационных реакций – с помощью IL-10 продуцирующих ДК и с помощью ДК, нагруженных трансплантационными антигенами. Показан различный механизм действия данных ДК, приводящий к неспецифическому подавлению иммунных реакций в результате иммунорегуляторного действия IL-10 при использовании ДК, трансфицированных IL-10, и приводящий к индукции антиген-специфичной иммунологической толерантности через

генерацию Treg при использовании ДК, трансфицированных антигенными последовательностями МНС.

В работе предложен новый способ нагрузки ДК трансплантационными антигенами с помощью их трансфекции заранее разработанными и сконструированными ДНК-конструкциями, кодирующими антигенные последовательности молекул МНС I класса донора (для подавления реакции отторжения) или реципиента (для подавления РТПХ) и показана его эффективность для индукции антиген-специфичной иммунологической толерантности и подавления трансплантационных реакций. Преимуществом данного способа является отсутствие необходимости использования донорского материала для нагрузки ДК трансплантационными антигенами, поскольку ДНК-конструкции, кодирующие трансплантационные антигены, проектируют *in silico* с помощью доступных баз данных. Однако, по мнению автора, главным преимуществом толерогенных дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими антигенные последовательности молекул МНС, является антиген-специфичное подавление трансплантационных реакций с их помощью, что может снизить частоту встречаемости нежелательных побочных эффектов, связанных с неспецифичной иммуносупрессией, которая наблюдается при системной иммуносупрессивной терапии и при использовании IL-10 продуцирующих дендритных клеток.

Представленные в работе решения могут быть полезными при дальнейшей теоретической и практической разработке новых методов клеточной иммунотерапии для подавления трансплантационных реакций, а также для трансляции данных методов к клиническую практику.

## ВЫВОДЫ

1. Разработанный протокол позволяет получать фенотипически незрелые дендритные клетки, трансфицированные ДНК-конструкциями, кодирующими IL-10 или антигенные последовательности МНС, индуцирующие экспрессию FoxP3 и IL-10 в аутологических спленоцитах, что свидетельствует об их толерогенном потенциале.
2. Незрелые дендритные клетки мышей C57Bl/6, трансфицированные ДНК-конструкциями, кодирующими IL-10, обуславливают подавление пролиферации аутологических спленоцитов *in vitro* в ответ на стимуляцию спленоцитами мышей CBA и BALB/c, *in vivo* обуславливают подавление реакции «трансплантат против хозяина» в мышах CBF1 (F1: CBAxC57Bl/6) и BALB/c и обуславливают увеличение времени отторжения кожного лоскута от мышей CBA и BALB/c, что говорит о неспецифичном подавлении иммунных реакций с их помощью.
3. Незрелые дендритные клетки мышей C57Bl/6, трансфицированные ДНК-конструкциями, кодирующими антигенные последовательности МНС I класса мышей CBA, обуславливают подавление пролиферации аутологических спленоцитов *in vitro* в ответ на стимуляцию спленоцитами мышей CBA, но не BALB/c, *in vivo* обуславливают подавление реакции «трансплантат против хозяина» в мышах CBF1 (F1: CBAxC57Bl/6), но не в BALB/c, и обуславливают увеличение времени отторжения кожного лоскута от мышей CBA, но не BALB/c, что говорит о антиген-специфичном подавлении иммунных реакций с их помощью.
4. Угнетение реакции «трансплантат против хозяина», обусловленное дендритными клетками, трансфицированными IL-10, сопровождается преимущественно подавлением цитотоксического иммунного ответа, а дендритными клетками, трансфицированными антигенными последовательностями МНС – преимущественно генерацией Treg, что говорит о различиях в механизмах подавления трансплантационных реакций данными дендритными клетками.
5. Разработан подход к индукции иммунологической толерантности с помощью дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими антигенные последовательности молекул МНС, что подтверждено по антиген-специфичному подавлению пролиферации аутологических спленоцитов *in vitro* и *in vivo* по подавлению реакций отторжения кожного лоскута, «трансплантат против хозяина» и генерации Treg клеток.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДК – дендритные клетки

толДК – толерогенные дендритные клетки

МНС – главный комплекс гистосовместимости

РТПХ – реакция «трансплантат против хозяина»

pIL-10 – ДНК-конструкция (плазмида), кодирующая мышинный IL-10

pMHC – ДНК-конструкция (плазмида), кодирующая антигенные последовательности из локуса H2 (МНС I класса) мышей СВА, несущие основные аминокислотные замены относительно гомологичных последовательностей из локуса H2 мышей C57Bl/6

Tr1 – CD4+IL-10+FoxP3- T-регуляторные клетки 1го типа

Treg – CD4+CD25<sup>hi</sup>FoxP3+ T-регуляторные клетки

pTreg, iTreg – периферические или индуцированные CD4+CD25<sup>hi</sup>FoxP3+ T-регуляторные клетки

tTreg, nTreg – тимические или натуральные CD4+CD25<sup>hi</sup>FoxP3+ T-регуляторные клетки

TCR – Т-клеточный рецептор

mTEC – медулярные эпителиальные клетки тимуса

TSA – тканеспецифичные антигены

AIRE – аутоиммунный регулятор

Fezf2 – forebrain embryonic zinc finger-like protein 2

TLR – Toll-подобные рецепторы

TSL – тимический стромальный лимфопоэтин

BCR – В-клеточный рецептор

ITAM – активационный мотив иммунорецепторов

PI3K – фосфоинозитид-3 киназа

BLNK – линкерный протеин В-клеток

*RAG1*, *RAG2* – гены, кодирующие рекомбиназы 1 и 2

Nrp1 – нейропилин 1

Breg – FoxP3+ В-регуляторные клетки

DAMP – молекулярные паттерны повреждения

BAFF – фактор активации В-клеток

PDGFR – рецептор фактора роста, полученного из тромбоцитов

GFP – зеленый флюоресцентный белок

LPS – липополисахарид

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ройт А. Иммунология. / Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. – Мир, 2000. – 592 с.
2. Сенников С.В., Облеухова И.А. Методы индукции толерогенных дендритных клеток у животных и человека. // Иммунология. – 2016. – Н. 5. – С. 291-296.
3. Сенников С.В., Хатакова Ю.Н. Роль субпопуляций Т-клеток в индукции иммунологической толерантности. // Иммунология. – 2017. – 38(5). – С. 239-244.
4. Хаитов Р.М. Иммунология / Хаитов Р.М., Игнатьева Г.Л., Сидорович И.Г. – Медицина, 2000. – 432 с.
5. Ярилин, А.А. Иммунология/ А.А. Ярилин. ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 752 с.
6. Aarntzen E., Schreiber G., Bol K. et al. Vaccination with mRNA-electroporated dendritic cells induces robust tumor antigen-specific CD4+ and CD8+ T cells responses in stage III and IV melanoma patients. // Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research. — 2012. — Vol. 18. — No 19. — P. 5460–5470.
7. Aichinger M., Wu C., Nedjic J. Macroautophagy substrates are loaded onto MHC class II of medullary thymic epithelial cells for central tolerance // J. Exp. Med. – 2013. – Vol. 210. – P. 287-300.
8. Akiyama T, Shimo Y., Yanai H., et al. The Tumor Necrosis Factor Family Receptors RANK and CD40 Cooperatively Establish the Thymic Medullary Microenvironment and Self-Tolerance. // Immunity. – 2008. – Vol. 29. – P. 423-437.
9. Akiyama T., Shinzawa M., Akiyama N. TNF receptor family signaling in the development and functions of medullary thymic epithelial cells. // Front Immunol. – 2012. – Vol. 3. – P. 278.
10. Alam S.M., Davies G.M., Lin C.M., et al. Qualitative and quantitative differences in T cell receptor binding of agonist and antagonist ligands. // Immunity. – 1999. – Vol. 10. – P. 227–37.
11. Alam S.M., Travers P.J., Wung J.L., et al. T cell receptor affinity and thymocyte positive selection. // Nature. – 1996. – Vol. 381. – P. 616–620.
12. Ali A., Garrovillo M., Jin M.X., et al. Major histocompatibility complex class I peptide-pulsed host dendritic cells induce antigen-specific acquired thymic tolerance to islet cells. // Transplantation. – 2000. – Vol. 69. – P. 221–226.
13. Ali J.M., Negus M.C., Conlon T.M., et al. Diversity of the CD4 T cell alloresponse: the short and the long of it. // Cell Rep. – 2016. – Vol. 14. – P. 1232–1245.
14. Alvarez-Diaz S., Dillon C.P., Lalaoui N, et al. The pseudokinase MLKL and the kinase RIPK3 have distinct roles in autoimmune disease caused by loss of death-receptor-induced apoptosis. // Immunity. – 2016. – Vol. 45. – P. 513-526.

15. Amin R.H., Schlissel M.S.. Foxo1 directly regulates the transcription of recombination-activating genes during B cell development. // Nat Immunol. – 2008. – Vol. 9. – P. 613–622.
16. Aoki-Ota M., Torkamani A., Ota T., et al. Skewed primary igkappa repertoire and v-j joining in C57BL/6 mice: implications for recombination accessibility and receptor editing. // J Immunol. – 2012. – Vol. 188. – P. 2305–2315.
17. Arakawa H., Shimizu T., Takeda S. Re-evaluation of the probabilities for productive arrangements on the kappa and lambda loci. // Int Immunol. – 1996. – Vol. 8. – P. 91–99.
18. Aschenbrenner K., D'Cruz L. M., Vollmann E. H et al. Selection of Foxp3 + regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire + medullary thymic epithelial cells. // Nat. Immunol. – 2007. – Vol. 8. – P. 351-358.
19. Atibalentja D. F., Murphy K. M., Unanue E. R. Functional redundancy between thymic CD8alpha + and Sirpalpha + conventional dendritic cells in presentation of blood-derived lysozyme by MHC class II proteins. // J. Immunol. – 2011. – Vol. 186. – P. 1421-1431.
20. Ayala García M.A., González Yebra B., López Flores A.L., et al. The major histocompatibility complex in transplantation. // J Transplant. - 2012. - 2012:842141.
21. Baba T., Nakamoto Y., Mukaida N., Crucial contribution of thymic Sirp alpha+ conventional dendritic cells to central tolerance against blood-borne antigens in a CCR2-dependent manner. // J. Immunol. – 2009. – Vol. 183. – P. 3053–3063.
22. Bach, F. H. Genetics of Transplantation: The Major Histocompatibility Complex. // Annual Review of Genetics. – 1976. – Vol. 10(1). – P. 319–339.
23. Bacher P., Heinrich F., Stervbo U., et al. Regulatory T Cell Specificity Directs Tolerance versus Allergy against Aeroantigens in Humans. // Cell. – 2016. – Vol. 167(4). – P. 1067–1078.
24. Bain B., Vas M.R., Lowenstein L. The development of large immature mononuclear cells in mixed leukocyte cultures. // Blood. – 1964. – Vol. 23. – P. 108–116.
25. Bashyam H. Th1/Th2 cross-regulation and the discovery of IL-10. // J Exp Med. – 2007. – Vol. 204. – P. 237.
26. Benichou G., Gonzalez B., Marino J., et al. Role of memory T cells in allograft rejection and tolerance. // Front Immunol. - 2017. – 8:170.
27. Billing J., Fry J.W., Wheeler P.R., et al. Donor-specific dendritic cells modulate cardiac allograft rejection. // British Transplantation Society 4th Annual Congress. – 2001. - Abstract L28.
28. Billingham R. E. The biology of graft-versus-host reactions. // Harvey Lectures. – 1966. – Vol. 62. – P. 21–78.

29. Billingham R.E., Brent L., Medawar P.B. Acquired tolerance of skin homografts. // *Ann N Y Acad Sci.* – 1955. – Vol. 59(3). – P. 409-416.
30. Billingham R.E., Brent L., Medawar P.B. Actively acquired tolerance of foreign cells. // *Nature.* – 1953. – Vol. 172. – P. 603-606.
31. Blazar B.R., Murphy W.J., Abedi M. Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. // *Nat Rev Immunol.* – 2012. – Vol. 12(6). – P. 443–458.
32. Bleakley M., Heimfeld S., Loeb K.R., et al. Outcomes of acute leukemia patients transplanted with naive T cell-depleted stem cell grafts. // *The Journal of Clinical Investigation.* – 2015. – Vol. 125. – P. 2677–2689.
33. Boieri M., Shah P., Jalapothu D., et al., Rat acute GvHD is Th1 driven and characterized by predominant donor CD4+ T-cell infiltration of skin and gut. // *Experimental Hematology.* – 2017. – Vol. 50. – P. 33-45.
34. Boks M.A., Kager-Groenland J.R., Haasjes M.S.P., et al. IL-10-generated tolerogenic dendritic cells are optimal for functional regulatory T cell induction – a comparative study of human clinical-applicable DC. // *Clin Immunol.* – 2012. -Vol. 142. – P. 332–342.
35. Bouillet P., Purton J.F., Godfrey D.I., et al. BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes. // *Nature.* – 2002. -Vol. 415. – P. -922-926.
36. Brocker T. The role of dendritic cells in T cell selection and survival. // *J. Leukoc. Biol.* – 1999. – Vol. 66. – P. 331-335.
37. Brondz B.D., Egorov I.K., Drizlikh G.I. Private specificities of H-2K and H-2D loci as possible selective targets for effector lymphocytes in cell-mediated immunity. // *J Exp Med.* – 1975. – Vol. 141(1). – P. 11–26.
38. Brown K., Sacks S.H., Wong W. Extensive and bidirectional transfer of major histocompatibility complex class II molecules between donor and recipient cells *in vivo* following solid organ transplantation. // *Faseb J.* – 2008. – Vol. 22. – P. 3776–3784.
39. Burchill M.A., Yang J., Vang K.B., et al. Linked T cell receptor and cytokine signaling govern the development of the regulatory T cell repertoire. // *Immunity.* – 2008. – Vol. 28. – P. 112-121.
40. Burnet F. M. Theories of immunity. // *Perspect Biol Med.* – 1960. – Vol. 3. – P. 447-458.
41. Burnet F.M. Immunological Recognition of Self: Such recognition suggests a relationship with processes through which functional integrity is maintained. // *Science.* – 1961. - Vol. 133. – P. 307–311.
42. Calnan B.J., Szychowski S., Chan F.K., et al. A role for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis accompanying antigen-induced negative selection. // *Immunity.* – 1995. – Vol. 3(3). – P. 273–282.

43. Carretero-Iglesia L., Bouchet-Delbos L., Louvet C., et al. Comparative Study of the Immunoregulatory Capacity of In Vitro Generated Tolerogenic Dendritic Cells, Suppressor Macrophages, and Myeloid-Derived Suppressor Cells. // *Transplantation*. – 2016. – Vol. 100. – P. 2079-2089.
44. Cedile O., Jørgensen L.O., Frank I., et al. The chemokine receptor CCR2 maintains plasmacytoid dendritic cell homeostasis. // *Immunology Letters*. – 2017. – Vol. 192. – P. 72–78.
45. Cedile O., Løbner M., Toft-Hansen H., et al. Thymic CCL2 influences induction of T-cell tolerance. // *J. Autoimmun.* – 2014. – Vol. 55. – P. 73–85.
46. Chaudhry A., Samstein R.M., Treuting P., et al. Interleukin-10 signaling in regulatory T cells is required for suppression of Th17 cell-mediated inflammation. // *Immunity*. – 2011. – Vol. 34. – P. 566–578.
47. Cheng C., Lee C., Fryer M., et al. Murine Full-thickness Skin Transplantation. // *Journal of Visualized Experiments*. – 2017. – Vol. 119. doi:10.3791/55105
48. Chihara N., Madi A., Karwacz K., et al. Differentiation and Characterization of Tr1 Cells. // *Curr Protoc Immunol*. – 2016. – Vol. 113. – P. 1–10.
49. Christensen S.R., Shupe J., Nickerson K., et al. Toll-like receptor 7 and TLR9 dictate autoantibody specificity and have opposing inflammatory and regulatory roles in a murine model of lupus. // *Immunity*. – 2006. – Vol. 25. – P. 417-428.
50. Chung C.Y., Ysebaert D., Berneman Z.N., et al. Dendritic cells: cellular mediators for immunological tolerance. // *Clin Dev Immunol*. – 2013. – Vol. 2013:972865.
51. Coffman R.L., Origins of the T(H)1-T(H)2 model: a personal perspective. // *Nat Immunol*. – 2006. – Vol. 7. – P. 539-541.
52. Cohn, M., Thoughts on Positive Selection in Thymus. // *Scand J Immunol*. – 2016. – Vol. 83. – P. 303-310.
53. Collado J.A., Alvarez I., Ciudad M.T., et al. Composition of the HLA-DR-associated human thymus peptidome. // *European Journal of Immunology*. – 2013. – Vol. 43. – P. 2273–2282.
54. Comi M., Amodio G., Gregori S. Interleukin-10-Producing DC-10 Is a Unique Tool to Promote Tolerance Via Antigen-Specific T Regulatory Type 1 Cells. // *Front. Immunol*. – 2018. – Vol. 9. – P. 682.
55. Cools N., Ponsaerts P., Van Tendeloo V. F. I., et al. Balancing between immunity and tolerance: an interplay between dendritic cells, regulatory T cells, and effector T cells. // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2007. – Vol. 82(6). – P. 1365–1374.
56. Coquerelle C., Moser M. DC subsets in positive and negative regulation of immunity. // *Immunol Rev*. – 2010. – Vol. 234(1). – P. 317–334.

57. Cosway E.J., Ohigashi I., Schauble K., et al. Formation of the Intrathymic Dendritic Cell Pool Requires CCL21-Mediated Recruitment of CCR7<sup>+</sup>Progenitors to the Thymus. // *J Immunol.* – 2018. – Vol. 201(2). – P. 516–523.
58. Curtis J. R., Westfall A. O., Allison J., et al. Population-based assessment of adverse events associated with long-term glucocorticoid use. // *Arthritis & Rheumatism.* – 2006. – Vol. 55. – P. 420–426.
59. Daniels M.A., Teixeira E., Gill J., et al. Thymic selection threshold defined by compartmentalization of Ras/MAPK signalling. // *Nature.* – 2006. – Vol. 444(7120). – P. 724–729.
60. Danzl N.M., Donlin L.T., Alexandropoulos K. Regulation of medullary thymic epithelial cell differentiation and function by the signaling protein Sin. // *J Exp Med.* – 2010. – Vol. 207(5). – P. 999–1013.
61. De Fijter J., Cancer and mTOR Inhibitors in Transplant Recipients. // *Transplantation.* – 2017. – Vol. 101(1). – P. 45–55.
62. Deane J.A., Pisitkun P., Barrett R.S., et al. Control of toll-like receptor 7 expression is essential to restrict autoimmunity and dendritic cell proliferation. // *Immunity.* – 2007. – Vol. 27(5). – P. 801–810.
63. Delgoffe G.M., Woo S.R., Turnis M.E., et al. Stability and function of regulatory T cells is maintained by a neuropilin-1-semaphorin-4a axis. // *Nature.* – 2013. – Vol. 501. – P. 252–256.
64. Dertschnig S., Nusspaumer G., Ivanek R., et al. Epithelial cytoprotection sustains ectopic expression of tissue-restricted antigens in the thymus during murine acute GVHD. // *Blood.* – 2013. – Vol. 122(5). – P. 837–841.
65. Dhodapkar M.V., Steinman R.M., Krasovsky J., et al. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. // *J Exp Med.* – 2001. – Vol. 193(2). – P. 233–238.
66. Drakes M.L., Stiff P.J., Blachard T.G. Inverse relationship between dendritic cell CCR9 expression and maturation state. // *Immunology.* – 2009. - Vol. 127. – P. 466–476.
67. Duan X., Hisaeda H., Shen J., et al. The ubiquitin-proteasome system plays essential roles in presenting an 8-mer CTL epitope expressed in APC to corresponding CD8<sup>+</sup> T cells. // *Int Immunol.* – 2006. – Vol.18. – P. 679–87.
68. Duong B.H., Ota T., Aoki-Ota M., et al. Negative selection by IgM superantigen defines a B cell central tolerance compartment and reveals mutations allowing escape. // *J Immunol.* – 2011. – Vol. 187(11). – P. 5596–5605.
69. Ellison C.A., Fischer J.M., HayGlass K.T., et al. Murine graft-versus-host disease in an F<sub>1</sub>-hybrid model using IFN- $\gamma$  gene knockout donors. // *J Immunol.* -1998. – Vol. 161. – P. 631–640.

70. Enders A., Bouillet P., Puthalakath H., et al. Loss of the pro-apoptotic BH3-only Bcl-2 family member Bim inhibits BCR stimulation-induced apoptosis and deletion of autoreactive B cells. // *J Exp Med.* – 2003. – Vol. 198(7). – P. 1119–1126.
71. Enouz S., Carrié L., Merkler D., et al. Autoreactive T cells bypass negative selection and respond to self-antigen stimulation during infection. // *J Exp Med.* – 2012. – Vol. 209(10). – P. 1769–1779.
72. Eslami N.S., Shokrgozar M.A., Mousavi A., et. al. Simultaneous immunisation with a Wilms' tumour 1 epitope and its ubiquitin fusions results in enhanced cell mediated immunity and tumour rejection in C57BL/6 mice. // *Mol Immunol.* – 2012. - Vol. 51. – P. 325-331.
73. Espinosa G., Collado J.A., Scholz E., et al. Peptides presented by HLA class I molecules in the human thymus. // *Journal of Proteomics.* – 2013. – Vol. 94. – P. 23–36.
74. Ezzelarab M.B., Raich-Regue D., Lu L., et al. Renal Allograft Survival in Nonhuman Primates Infused With Donor Antigen-Pulsed Autologous Regulatory Dendritic Cells. // *Am J Transplant.* – 2017. – Vol. 17(6). – P.1476–1489.
75. Fan C., Wang Y., Wang Q., et al. Alloantigen-specific T-cell hyporesponsiveness induced by dnIKK2 gene-transfected recipient immature dendritic cells. // *Cell Immunol.* – 2015. – Vol. 297. – P.100-107.
76. Fijter J.W. Cancer and mTOR Inhibitors in Transplant Recipients. // *Transplantation.* - 2017. – Vol. 101. – P. 45–55.
77. Fontenot J.D., Rasmussen J.P., Gavin M.A., et al. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. // *Nat Immunol.* – 2005. – Vol. 6. – P. 1142-1151.
78. Förster R., Davalos-Missslitz A.C., Rot A., CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. // *Nature Reviews Immunology.* – 2008. – Vol. 8. – P. 362–371.
79. Fu F., Li Y., Qian S., et al. Costimulatory molecule-deficient dendritic cell progenitors (MHC class II<sup>+</sup>, CD80dim, CD86<sup>–</sup>) prolong cardiac allograft survival in nonimmunosuppressed recipients. // *Transplantation.* - 1996. – Vol. 62. – P. 659—665.
80. Fujimoto M., Fujimoto Y., Poe J.C., et al. CD19 regulates Src family protein tyrosine kinase activation in B lymphocytes through processive amplification. // *Immunity.* – 2000. – Vol. 13. – P. 47–57.
81. Fujita S., Sato Y., Sato K., et al. Regulatory dendritic cells protect against cutaneous chronic graft-versus-host disease mediated through CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. // *Blood* 2007. – Vol. 110(10). – P. 3793–3803.
82. Fulcher D.A., Basten A. Reduced life span of anergic self-reactive B cells in a double-transgenic model. // *J Exp Med.* – 1994. – Vol. 179. – P. 125–134.

83. Gaetani M., Matafora V., Saare M., et al. AIRE-PHD fingers are structural hubs to maintain the integrity of chromatin-associated interactome. // *Nucleic Acids Res.* – 2012. – Vol. 40(22). – P. 11756–11768.
84. Garrovillo M., Ali A., Oluwole S.F. Indirect allorecognition in acquired thymic tolerance: induction of donor-specific tolerance to rat cardiac allografts by allopeptide-pulsed host dendritic cells. // *Transplantation.* – 1999. – Vol. 68. – P. 1827–1834.
85. Giannoukakis N., Bonham C.A., Qian S., et al. Prolongation of cardiac allograft survival using dendritic cells treated with NF- $\kappa$ B decoy oligodeoxyribonucleotides. // *Mol Ther.* – 2000. – Vol. 1. – P. 430–437.
86. Gil D., Schrum A.G., Alarcon B., et al. T cell receptor engagement by peptide-MHC ligands induces a conformational change in the CD3 complex of thymocytes. *J Exp Med.* – 2005. – Vol. 201(4). – P. 517–522.
87. Gong Y.B., Huang Y.F., Li Y., et al. Experimental study of the mechanism of tolerance induction in dexamethasone-treated dendritic cells. // *Med Sci Monit.* – 2011. – Vol. 17(5). – P. 125–131.
88. Gorczynski R.M., Bransom J., Catral M., et al. Synergy in induction of increased renal allograft survival after portal vein infusion of dendritic cells transduced to express TGF $\beta$  and IL-10, along with administration of CHO cells expressing the regulatory molecule OX-2. // *Clin Immunol.* – 2000. – Vol. 95. – P. 182–189.
89. Gottschalk R.A., Corse E., Allison J.P. TCR ligand density and affinity determine peripheral induction of Foxp3 in vivo. // *J Exp Med.* – 2010. – Vol. 207(8). – P. 1701–1711.
90. Goulmy E., Schipper R., Pool J., et al. Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. // *New England Journal of Medicine.* – 1996. – Vol. 334(5). – P. 281–285.
91. Gray D.H.D., Kupresanin F., Berzins S.P. The BH3-only proteins Bim and Puma cooperate to impose deletional tolerance of organ-specific antigens. // *Immunity.* – 2012. – Vol. 37. – P. 451–462.
92. Gregori S., Roncarolo M.G., Bacchetta R. Methods for in vitro generation of human type 1 regulatory T cells. // *Methods Mol Biol.* – 2011. – Vol. 677. – P. 31–46.
93. Gregori S., Tomasoni D., Pacciani V., et al. Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway. // *Blood.* – 2010. – Vol. 6. – P. 935–944.
94. Gregori S., Casorati M., Amuchastegui S., et al. Regulatory T Cells Induced by 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and Mycophenolate Mofetil Treatment Mediate Transplantation Tolerance. // *The Journal of Immunology.* – 2001. – Vol. 167(4). – P. 1945–1953.

95. Groom J. R., Fletcher C. A., Walters S. N., et al. BAFF and MyD88 signals promote a lupuslike disease independent of T cells. // *The Journal of Experimental Medicine*. - 2007. – Vol. 204(8). – P. 1959–1971.
96. Guindi C., Cloutier A., Gaudreau S., et al. Role of the p38 MAPK/C/EBP $\beta$  Pathway in the Regulation of Phenotype and IL-10 and IL-12 Production by Tolerogenic Bone Marrow-Derived Dendritic Cells. // *Cells*. – 2018. – Vol. 7(12). – P. 256.
97. Hadeiba H., Lahl K., Edalati A., et al. Plasmacytoid dendritic cells transport peripheral antigens to the thymus to promote central tolerance. // *Immunity*. – 2012. – Vol. 36(3). P. 438–450.
98. Haljasorg U., Bichele R., Saare M., et al. A highly conserved NF- $\kappa$ B-responsive enhancer is critical for thymic expression of Aire in mice. // *Eur. J. Immunol.* – 2015. – Vol. 45. – P. 3246–3256.
99. Hamdi H., Godot V., Maillot M., et al. Induction of antigen-specific regulatory T lymphocytes by human dendritic cells expressing the glucocorticoid-induced leucine zipper. // *Blood*. – 2007. – Vol.110. – P. 211–219.
100. Hamm A., Krott N., Breibach I., et al. Efficient transfection method for primary cells. // *Tissue Eng.* – 2002. – Vol. 8. – P.235.
101. Hanabuchi, S., Ito T., Park W. R., et al. Thymic stromal lymphopoietin-activated plasmacytoid dendritic cells induce the generation of FOXP3 + regulatory T cells in human thymus. // *J. Immunol.* – 2010. – Vol. 184. – P. 2999–3007.
102. Harris P.E., Cortesini R., Suciu-Foca N. Indirect allorecognition in solid organ transplantation. // *Rev Immunogenet.* – 1999. – Vol. 1. – P. 297–308.
103. Harshyne L.A., Watkins S.C., Gambotto A., et al. Dendritic cells acquire antigens from live cells for cross-presentation to CTL. // *J Immunol.* 2001. – Vol. 166. – P. 3717–3723.
104. Hattori T., Saban D.R., Emami-naeini P., et al. Donor-derived, tolerogenic dendritic cells suppress immune rejection in the indirect allosensitization-dominant setting of corneal transplantation. // *J Leukoc Biol.* – 2012. – Vol. 91. – P. 621–627.
105. Hawiger D., Inaba K., Dorsett Y., et al. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. // *J Exp Med.* – 2001. – Vol. 194(6). – P. 769–779.
106. Heath W. R., Kato Y., Steiner T. M., et al. Antigen presentation by dendritic cells for B cell activation. // *Current Opinion in Immunology*. 2019. – Vol. 58. – P. 44–52.
107. Henderson J.G., Opejin A., Jones A., et al. CD5 instructs extrathymic regulatory T cell development in response to self and tolerizing antigens. // *Immunity*. – 2015. – Vol. 42(3). – P. 471–483.

108. Herzog S., Hug E., Meixlsperger S., et al. SLP-65 regulates immunoglobulin light chain gene recombination through the PI(3)K-PKB-Foxo pathway. // *Nat Immunol.* – 2008. - Jun;9(6):623-31.
109. Hikosaka Y., Nitta T., Ohigashi I., et al. The Cytokine RANKL Produced by Positively Selected Thymocytes Fosters Medullary Thymic Epithelial Cells that Express Autoimmune Regulator. // *Immunity.* – Vol. 29. – P. 438-450.
110. Hoeppli R. E., MacDonald K. G., Levings M. K., et al. How antigen specificity directs regulatory T-cell function: self, foreign and engineered specificity. // *HLA.* – 2016. – Vol. 88(1-2). – P. 3–13.
111. Holler E., Butzhammer P., Schmid K., et al. Metagenomic analysis of the stool microbiome in patients receiving allogeneic stem cell transplantation: loss of diversity is associated with use of systemic antibiotics and more pronounced in gastrointestinal graft-versus-host disease. // *Biology of Blood and Marrow Transplantation.* – 2014. – Vol. 20(5). – P. 640–645.
112. Holtan S. G., Pasquini M., Weisdorf D. J. Acute graft-versus-host disease: a bench-to-bedside update. // *Blood.* – 2014. – Vol. 124(3). – P. 363–373.
113. Huang L., Lemos H.P., Li L., et al. Engineering DNA nanoparticles as immunomodulatory reagents that activate regulatory T cells. // *J Immunol.* – 2012. – Vol. 188(10). – P. 4913–4920.
114. Huang L., Li L., Lemos H., et al. Cutting edge: DNA sensing via the STING adaptor in myeloid dendritic cells induces potent tolerogenic responses. // *J Immunol.* 2013. -Vol. 191(7). – P. 3509–3513.
115. Huang Y., Zhao Y., Ran X. et al. Increased expression of herpesvirus entry mediator in 1,25-dihydroxyvitamin D3-treated mouse bone marrow-derived dendritic cells promotes the generation of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. // *Molecular Medicine Reports.* – 2014. – Vol. 9. – P. 813-818.
116. Huang Y.M., Yang J.S., Xu L.Y., et al. Autoantigen-pulsed dendritic cells induce tolerance to experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in Lewis rats. // *Clin Exp Immunol.* – 2000. – Vol.122(3). – P. 437–444.
117. Huang, Y., Zhao, Y., Ran, X., et al. Increased expression of herpesvirus entry mediator in 1,25-dihydroxyvitamin D3-treated mouse bone marrow-derived dendritic cells promotes the generation of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. // *Molecular Medicine Reports.* – 2014. – Vol. 9(3). – P. 813-818.
118. Hubert F. X., Kinkel S. A., Davey G. M. Aire regulates the transfer of antigen from mTECs to dendritic cells for induction of thymic tolerance. // *Blood.* – 2011. – Vol. 118. – P. 2462-2472.
119. Iberg C.A., Jones A., Hawiger D. Dendritic Cells As Inducers of Peripheral Tolerance. // *Trends Immunol.* – 2017. – Vol. 38(11). – P. 793–804.

120. Iruretagoyena M. I. Inhibition of Nuclear Factor- $\kappa$ B Enhances the Capacity of Immature Dendritic Cells to Induce Antigen-Specific Tolerance in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2006. – Vol. 318(1). – P. 59–67.
121. Jenkins M.K., Schwartz R.H. Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. // *J Exp Med*. – 1987. – Vol. 165(2). – P. 302–319.
122. Johnson J. L., Scholz J. L., Marshak-Rothstein A. Molecular pattern recognition in peripheral B cell tolerance: lessons from age-associated B cells. // *Current Opinion in Immunology*. – 2019. – Vol. 61. – P. 33–38.
123. Josefowicz S.Z., Wilson C.B., Rudensky A.Y. Cutting edge: TCR stimulation is sufficient for induction of Foxp3 expression in the absence of DNA methyltransferase 1. // *J Immunol*. – 2009. – Vol. 182(11). – P. 6648–6652.
124. Kernan N. A., Collins N. H., Juliano L., et al. lymphocytes in T cell-depleted bone marrow transplants correlate with development of graft-v-host disease. // *Blood*. – 1986. – Vol. 68(3). – P. 770–773.
125. Kim S., Jung H., Lee C. Generation, Characteristics and Clinical Trials of Ex Vivo Generated Tolerogenic Dendritic Cells. // *Yonsei Med J*. – 2018. – Vol. 59(7). – P. 807–815.
126. Kittan N. A., Hildebrandt G. C. The chemokine system: a possible therapeutic target in acute graft versus host disease. // *Current Topics in Microbiology and Immunology*. – 2010. – Vol. 341. – P. 97–120.
127. Klein L., Kyewski B., Allen P.M., Hogquist K.A. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). // *Nat Rev Immunol*. – 2014. – Vol. 14(6). – P. 377–391.
128. Klinman N.R. The “clonal selection hypothesis” and current concepts of B cell tolerance. // *Immunity*. – 1996. – Vol. 5. – P. 189–195.
129. Knoechel B., Lohr J., Kahn E., et al. Sequential development of interleukin 2-dependent effector and regulatory T cells in response to endogenous systemic antigen. // *J Exp Med*. – 2005. – Vol. 202. – P. 1375–1386.
130. Krenger W., Rossi S., Holländer G.A.. Apoptosis of thymocytes during acute graft-versus-host disease is independent of glucocorticoids. // *Transplantation*. – 2000. – Vol. 69. – P. 2190–2193.
131. Kretschmer K., Apostolou I., Hawiger D., et al., Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. // *Nat Immunol*. – 2005. – Vol.6(12). – P. 1219–1227.
132. Kroemer A., Xiao X., Degauque N., et al. The innate NK cells, allograft rejection, and a key role for IL-15. // *Journal of Immunology*. – 2008. – Vol. 180(12). – P. 7818–7826.

133. Kuba A., Raida L. Graft versus Host Disease: From Basic Pathogenic Principles to DNA Damage Response and Cellular Senescence. // *Mediators Inflamm.* – 2018. – 2018:9451950.
134. Kuraoka M., Snowden P.B., Nojima T., et al. BCR and Endosomal TLR Signals Synergize to Increase AID Expression and Establish Central B Cell Tolerance. // *Cell Rep.* – 2017. – Vol. 18(7). – P. 1627–1635.
135. Kuznetsova M., Lopatnikova J., Shevchenko J., et al. Cytotoxic Activity and Memory T Cell Subset Distribution of in vitro-Stimulated CD8<sup>+</sup> T Cells Specific for HER2/neu Epitopes. // *Front Immunol.* – 2019. – 10:1017.
136. Kyewski, B., Derbinski, J.. Self-representation in the thymus: an extended view. // *Nature Reviews Immunology.* – 2004. – Vol 4(9). – P. 688–698.
137. Lakkis F.G., Arakelov A., Konieczny B.T., et al. Immunologic ‘ignorance’ of vascularized organ transplants in the absence of secondary lymphoid tissue. // *Nat Med.* – 2000. – Vol. – P. 686–688.
138. Land W., Messmer K. The impact of ischemia/reperfusion injury on specific and non-specific, early and late chronic events after organ transplantation. // *Transplantation Reviews.* – 1996. – Vol. 10(4). – P. 236–253.
139. Land W.G. Innate alloimmunity: history and current knowledge. // *Experimental and Clinical Transplantation.* – 2007. – Vol. 5(1). – P. 575–584.
140. Landi A., Babiuk L. A., van Drunen Littel-van den Hurk, S. High transfection efficiency, gene expression, and viability of monocyte-derived human dendritic cells after nonviral gene transfer. // *Journal of Leukocyte Biology.* – 2007. – Vol. 82(4). – P. 849–860.
141. Lang J., Arnold B., Hammerling G., et al. Enforced Bcl-2 expression inhibits antigen-mediated clonal elimination of peripheral B cells in an antigen dose-dependent manner and promotes receptor editing in autoreactive, immature B cells. // *J Exp Med.* – 1997. – Vol. 186(9). – P. 1513–1522.
142. Laurence A., Tato C.M., Davidson T.S., et al. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. // *Immunity.* – 2007. Vol. 26(3). – P. 371–381.
143. Lechler R.I., Batchelor J.R. Immunogenicity of retransplanted rat kidney allografts. Effect of inducing chimerism in the first recipient and quantitative studies on immunosuppression of the second recipient. // *J Exp Med.* – 1982. – Vol. 156. – P. 1835–1841.
144. Lechler R.I., Batchelor J.R. Restoration of immunogenicity to passenger cell-depleted kidney allografts by the addition of donor strain dendritic cells. // *J Exp Med.* – 1982. – Vol. 155. – P. 31–41.
145. Lee H-M., Bautista J.L., Scott-Browne J., et al. A broad range of selfreactivity drives thymic regulatory T cell selection to limit responses to self. // *Immunity.* – 2012. – Vol. 37. – P. 475–486.

146. Lesueur L.L., Mir L.M., André F.M. Overcoming the Specific Toxicity of Large Plasmids Electrotransfer in Primary Cells In Vitro. // *Mol Ther Nucleic Acids*. – 2016. – Vol.5(3). – e291.
147. Li H., Wang C.C., Zhang M., et al. Statin-modified dendritic cells regulate humoral immunity in experimental autoimmune myasthenia gravis. // *Mol Cell Neurosci*. – 2015. – Vol. 68. – P. 284–92.
148. Li J., J. Park D., Foss I., et al. Thymus-homing peripheral dendritic cells constitute two of the three major subsets of dendritic cells in the steady-state thymus. // *J. Exp. Med*. – 2009. – Vol. 206. – P. 607–622.
149. Liu Q., Rojas-Canales D.M., Divito S.J., et al. Donor dendritic cell-derived exosomes promote allograft-targeting immune response. // *J Clin Invest*. – 2016. – Vol. 126. – P. 2805–2820.
150. Liu Y., Zhang P., Li J., et al. A critical function for TGF-beta signaling in the development of natural CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. // *Nat Immunol*. – 2008. – Vol. 9. – P. 632–640.
151. Lodato S., Molyneaux B.J., Zuccaro E., et al. Gene co-regulation by Fezf2 selects neurotransmitter identity and connectivity of corticospinal neurons. // *Nat Neurosci*. 2014. – Vol. 17(8). – P. 1046–1054.
152. Lohmann S., Galle K., Knop J., et al. CD83<sup>+</sup> human dendritic cells transfected with tumor peptide cDNA by electroporation induce specific T-cell responses: A potential tool for gene immunotherapy. // *Cancer Gene Therapy*. – 2000. - Vol 7(4). – P. 605–614.
153. Lohr J., Knoechel B., Abbas, A. K. Regulatory T cells in the periphery. // *Immunological Reviews*. – 2006. – Vol. 212. – P. 149–162.
154. Lovegrove E., Pettigrew G.J., Bolton E.M., et al. Epitope mapping of the indirect T cell response to allogeneic class I mhc: sequences shared by donor and recipient MHC may prime T cells that provide help for alloantibody production. // *J Immunol*. – 2001. – Vol. 167. – P. 4338–4344.
155. Luche H., Ardouin L., Teo P., et al. The earliest intrathymic precursors of CD8alpha(+) thymic dendritic cells correspond to myeloid- type double-negative 1c cells. // *Eur. J. Immunol*. – 2011. – Vol. 41. – P. 2165-2175.
156. Lutz M., Suri R., Niimi M., et al. Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival *in vivo*. // *Eur. J. Immunol*. – 2000. – Vol. 30. – P. 1813-1822.
157. Lynch K., Treacy O., Gerlach J.Q., et al. Regulating Immunogenicity and Tolerogenicity of Bone Marrow-Derived Dendritic Cells through Modulation of Cell Surface Glycosylation by Dexamethasone Treatment. // *Front Immunol*. – 2017. – Vol. 8. – P. 1427.
158. Magenau J., Runaas L., Reddy P. Advances in understanding the pathogenesis of graft-versus-host disease. // *British Journal of Haematology*. – 2016. – Vol. 173(2). – P. 190–205.

159. Mansilla M.J., Sellès-Moreno C., Fàbregas-Puig S., et al. Beneficial effect of tolerogenic dendritic cells pulsed with MOG autoantigen in experimental autoimmune encephalomyelitis. // *CNS Neurosci Ther.* – 2015. – Vol. 21. – P. 222-30.
160. Marie J.C., Liggitt D., Rudensky A.Y. Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor-beta receptor. // *Immunity.* – 2006. – Vol. 25(3). – P. 441–454.
161. Marino J., Babiker-Mohamed M.H., Crosby-Bertorini P., et al. Donor exosomes rather than passenger leukocytes initiate alloreactive T cell responses after transplantation. // *Sci Immunol.* – 2016. – 1:8759.
162. Marino J., Paster J., Benichou G. Allorecognition by T Lymphocytes and Allograft Rejection. // *Front Immunol.* – 2016. – Vol. 7. – P. 582.
163. Martin E., Capini C., Duggan E., et al. Antigen-specific suppression of established arthritis in mice by dendritic cells deficient in NF- $\kappa$ B. *Arthritis & Rheumatism.* – 2007. – Vol. 56. – P. 2255-2266.
164. Martinu T., Kinnier C.V., Sun J., et al. Allogeneic splenocyte transfer and lipopolysaccharide inhalations induce differential T cell expansion and lung injury: a novel model of pulmonary graft-versus-host disease. // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9(5). - e97951.
165. Mathis D., Benoist C. Aire. // *Annu. Rev. Immunol.* – 2009. – Vol. 27. – P. 287–312.
166. Matte C.C., Liu J., Cormier J., et al. Donor APCs are required for maximal GVHD but not for GVL. // *Nature Medicine.* – 2004. – Vol. 10. – P. 987–992.
167. McGaha T.L., Karlsson M.C. Apoptotic cell responses in the splenic marginal zone: a paradigm for immunologic reactions to apoptotic antigens with implications for autoimmunity. // *Immunol Rev.* – 2016. – Vol. 269(1). – P. 26–43.
168. McNeil L.K., Starr T.K., Hogquist K.A. A requirement for sustained ERK signaling during thymocyte positive selection in vivo. // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2005. – Vol. 102(38). – P. 13574–13579.
169. Michiels A., Tuyaerts S., Bonehill A., et al. Electroporation of immature and mature dendritic cells: implications for dendritic cell-based vaccines. // *Gene Therapy.* – 2005. – Vol. 12(9). – P. 772–782.
170. Miklos D. B., Kim H. T., Zorn E., et al. Antibody response to DBY minor histocompatibility antigen is induced after allogeneic stem cell transplantation and in healthy female donors. // *Blood.* – 2004. – Vol. 103(1). – P. :353–359.
171. Min W.P., Gorczynski R., Huang X.Y. et al. Dendritic cells genetically engineered to express Fas ligand induce donor-specific hyporesponsiveness and prolong allograft survival. // *J Immunol.* – 2000. – Vol. 164. – P. 161–167.

172. Miura T., Mizuki D., Sasaki S., et al. Host resistance to *Listeria monocytogenes* infection is enhanced but resistance to *Staphylococcus aureus* infection is reduced in acute graft-versus-host disease in mice. // *Infect Immun.* – 2000. – Vol. 68. – P.4340–4343.
173. Mullins C.S., Wegner T., Klar E., et al. Optimizing the process of nucleofection for professional antigen presenting cells. // *BMC Res Notes.* - 2015. – Vol. 8. – P. 472.
174. Munn D.H., Mellor A.L. IDO in the Tumor Microenvironment: Inflammation, Counter-Regulation, and Tolerance. // *Trends Immunol.* – 2016. – Vol.37(3). – P. 193–207.
175. Murai M., Turovskaya O., Kim G., et al. Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. // *Nat Immunol.* 2009. -Vol. 10. – P. 1178–1184.
176. Nelson R.W., Beisang D., Tubo N.J., et al. T cell receptor cross-reactivity between similar foreign and self peptides influences naive cell population size and autoimmunity. // *Immunity.* - 2015. – Vol. 42(1). – P. 95–107.
177. Nemazee D. Mechanisms of central tolerance for B cells. // *Nat Rev Immunol.* – 2017. – Vol. 17(5). – P. 281–294.
178. Oh J., Shin J.S. The Role of Dendritic Cells in Central Tolerance. // *Immune Netw.* – 2015. – Vol. 15(3). – P. 111–120.
179. Oh J., Wu N., Baravalle G., Bet al. MARCH1-mediated MHCII ubiquitination promotes dendritic cell selection of natural regulatory T cells. // *J. Exp. Med.* – 2013. – Vol. 210. -P. 1069-1077.
180. Ohnmacht C., A. Pullner S. B. King I. et al. Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity. // *J. Exp. Med.* – 2009. – Vol. 206. – Vol. 549-559.
181. Oluwole O. O., Depaz H. A., Gopinathan R., et al. Indirect Allorecognition in Acquired Thymic Tolerance: Induction of Donor-Specific Permanent Acceptance of Rat Islets by Adoptive Transfer of Allopeptide-Pulsed Host Myeloid and Thymic Dendritic Cells. // *Diabetes.* – 2001. – Vol. 50(7). – P. 1546–1552.
182. Org T., Chignola F., Hetényi C., et al. The autoimmune regulator PHD finger binds to non-methylated histone H3K4 to activate gene expression. // *EMBO Rep.* – 2008. – Vol. 9(4). – P. 370–376.
183. O'Rourke R.W., Kang S.M., Lower J.A. et al. A dendritic cell line genetically modified to express CTLA4-Ig as a means to prolong islet allograft survival. // *Transplantation.* – 2000. – Vol. 69. – P. 1440–1446.
184. Ouyang W., Beckett O., Ma Q., et al. Foxo proteins cooperatively control the differentiation of Foxp3+ regulatory T cells. // *Nat Immunol.* – 2010. – Vol. 11(7). – P. 618–627.
185. Paczesny S., Hanauer D., Sun Y., et al. New perspectives on the biology of acute GVHD. // *Bone Marrow Transplant.* – 2010. – Vol. 45(1). – P. 1–11.

186. Pêche H., Trinité B., Martinet B., et al. Prolongation of Heart Allograft Survival by Immature Dendritic Cells Generated from Recipient Type Bone Marrow Progenitors. // *American Journal of Transplantation*. – 2005. – Vol. 5. – P. 255-267.
187. Perry J.S., Lio C.W., Kau A.L., et al. Distinct contributions of Aire and antigen-presenting-cell subsets to the generation of self-tolerance in the thymus. // *Immunity*. – 2014. – Vol. 41. – P. 414–426.
188. Petersdorf E.W., Malkki M., O'HUigin C., et al. High HLA-DP Expression and Graft-versus-Host Disease. // *New England Journal of Medicine*. – 2015. – Vol. 373. – P. 599–609.
189. Ponticelli C., Glassock R.J. Prevention of complications from use of conventional immunosuppressants: a critical review. // *J Nephrol*. – 2019. - 1724-6059.
190. Proietto A. I., Zhou P., Rizzitelli A., et al. Dendritic cells in the thymus contribute to T-regulatory cell induction. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2008. – Vol. 105: 19869-19874.
191. Qian L., Qian C., Chen Y., et al. Regulatory dendritic cells program B cells to differentiate into CD19hiFcγRIIbhi regulatory B cells through IFN-β and CD40L. // *Blood*. – 2012. – Vol. 120. – P. 581–91.
192. Raker V.K., Domogalla M.P., Steinbrink K. Tolerogenic Dendritic Cells for Regulatory T Cell Induction in Man. // *Review Front Immunol*. – 2015. – Vol. 6. – P. 569.
193. Ramirez-Ortiz Z.G., Pendergraft W.F. 3rd, Prasad A., et al. The scavenger receptor SCARF1 mediates the clearance of apoptotic cells and prevents autoimmunity. // *Nat Immunol*. – 2013. – Vol. 14(9). – P. 917–926.
194. Rathmell J.C., Lindsten T., Zong W.X., et al. Deficiency in Bak and Bax perturbs thymic selection and lymphoid homeostasis. // *Nat Immunol*. – 2002. – Vol. 3. – P. 932-939.
195. Ravishankar B., Liu H., Shinde R., et al. Tolerance to apoptotic cells is regulated by indoleamine 2,3-dioxygenase. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2012. – Vol. 109(10). – P. 3909–3914.
196. Renkonen R., Häyry P. Bone marrow transplantation in the rat. I. Histologic correlations and quantitation of cellular infiltrates in acute graft-versus-host disease. // *Am J Pathol*. – 1984. – Vol. 117. – P. 462-470.
197. Richards D.M., Kyewski B., Feuerer M., Re-examining the Nature and Function of Self-Reactive T cells. // *Trends in Immunology*. – 2016. – Vol. 37. – P. 114-125.
198. Romagnani S. Regulation of the T cell response. // *Clinical & Experimental Allergy*. – 2006. – Vol. 36(11). – P. 1357–1366.
199. Sakoda Y., Hashimoto D., Asakura S. et al. Donor-derived thymic-dependent T cells cause chronic graft-versus-host disease. // *Blood*. – 2007. – Vol. 109(4). – P. 1756-1764.

200. Sano Y., Streilein J. W., Ksander B. R. Detection of minor alloantigen-specific cytotoxic T cells after rejection of murine orthotopic corneal allografts: evidence that graft antigens are recognized exclusively via the “indirect pathway”. // *Transplantation*. – 1999. – Vol. 68. – P. 963–970.
201. Sansom S.N., Shikama-Dorn N., Zhanybekova S., et al. Population and single-cell genomics reveal the Aire dependency, relief from Polycomb silencing, and distribution of self-antigen expression in thymic epithelia. // *Genome Res*. – 2014. – Vol. 24(12). – P. 1918–1931.
202. Sarantopoulos S., Stevenson K. E., Kim H. T., et al. Altered B-cell homeostasis and excess BAFF in human chronic graft-versus-host disease. // *Blood*. – 2009. – Vol. 113(16). – P. 3865–3874.
203. Schallenberg S., Tsai P-Y., Riewaldt J., et al. Identification of an immediate Foxp3(-) precursor to Foxp3(+) regulatory T cells in peripheral lymphoid organs of nonmanipulated mice. // *J Exp Med*. – 2010. – Vol. 207(7). – P. 1393–1407.
204. Schram B.R., Lina E. T., Laura B. et al. B Cell Receptor Basal Signaling Regulates Antigen-Induced Ig Light Chain Rearrangements. // *The Journal of Immunology*. – 2008. – Vol. 180(7). – P. 4728-4741.
205. Schwartz R.H. T cell anergy. // *Annu Rev Immunol*. – 2003. – Vol. 21. – P. 305-334.
206. Sela U., Olds P., Park A., et al. Dendritic cells induce antigen-specific regulatory T cells that prevent graft versus host disease and persist in mice. // *J Exp Med*. – 2011. – Vol. 208. – P. 2489-2496.
207. Semple K., Nguyen A., Yu Y., et al. Strong CD28 costimulation suppresses induction of regulatory T cells from naive precursors through Lck signaling. // *Blood*. – 2011. -Vol. 117(11). – P. 3096–3103.
208. Sennikov S.V., Khantakova J.N., Kulikova E.V. et al. Modern strategies and capabilities for activation of the immune response against tumor cells. // *Tumour Biol*. — 2017. — Vol. 39. — № 5.
209. Sennikov S.V., Shevchenko J.A., Kurilin V.V. et al. Induction of an antitumor response using dendritic cells transfected with DNA constructs encoding the HLA-A\*02:01-restricted epitopes of tumor-associated antigens in culture of mononuclear cells of breast cancer patients. // *Immunologic Research*. — 2016. — Vol. 64. — №1. — P.171–180.
210. Sharma M.D., Hou D.Y., Liu Y., et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase controls conversion of Foxp3+ Tregs to TH17-like cells in tumor-draining lymph nodes. // *Blood*. – 2009. – Vol. 113. – P. 6102–6111.
211. Sharma S., Campbell A.M., Chan J., et al. Suppression of systemic autoimmunity by the innate immune adaptor STING. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2015. – Vol. 112(7). – P. 710–717.

212. Shevchenko J.A., Khristin A.A., Kurilin V.V., et al. Autologous dendritic cells and activated cytotoxic T-cells as combination therapy for breast cancer. // *Oncol Rep.* – 2020. – Vol. 43. – P. 671-680.
213. Shlomchik W.D., Couzens M.S., Tang C.B., et al. Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. // *Science.* – 1999. – Vol. 285. – P. 412–415.
214. Siu J.H.Y., Surendrakumar V., Richards J.A., et al. T cell Allorecognition Pathways in Solid Organ Transplantation. // *Front Immunol.* – 2018. – Vol. 9. – P. 2548.
215. Son C., Bae J., Shin D. Y., et al. Enhanced Maturation and Function of Dendritic Cells Using Hydrogel Coated Plate and Antigen Electroporation. // *Immunological Investigations.* – 2013. – Vol. 42. – P. 341–355.
216. Song S., Yuan P., Chen J., et al. TGF- $\beta$  favors bone marrow-derived dendritic cells to acquire tolerogenic properties. // *Immunological Investigations.* – 2014. – Vol. 43(4). – P. 360-369.
217. Srinivasan L., Sasaki Y., Calado D.P., et al. PI3 kinase signals BCR-dependent mature B cell survival. // *Cell.* – 2009. – Vol.139(3). – P. 573–586.
218. St.Pierre C., Trofimov A., Brochu S., et al. Differential Features of AIRE-Induced and AIRE-Independent Promiscuous Gene Expression in Thymic Epithelial Cells. // *The Journal of Immunology.* – 2015. – Vol. 195(2). – P. 498-506.
219. Steinman R.M., Hawiger D., Nussenzweig M.C. Tolerogenic Dendritic Cells. // *Annual Review of Immunology.* – 2003. – Vol. 21(1). – P. 685-711.
220. Stepanek O., Prabhakar A.S., Osswald C., et al. Coreceptor scanning by the T cell receptor provides a mechanism for T cell tolerance. // *Cell.* – 2014. – Vol. 159. – P. 333–345.
221. Strasser A., Harris A.W., Cory S. Bcl-2 transgene inhibits T cell death and perturbs thymic self-censorship. // *Cell.* – 1991. – Vol. 67. – P. 889-899.
222. Strobel I., Berchtold S., Götze A et al. Human dendritic cells transfected with either RNA or DNA encoding influenza matrix protein M1 differ in their ability to stimulate cytotoxic T lymphocytes. // *Gene Therapy.* – 2000. – Vol. 7(23). – P. 2028–2035.
223. Suss G., Shortman K. A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis. // *J. Exp. Med.* – 1996. – Vol. 183. – P. 1789–1796.
224. Suthers A. N., Sarantopoulos S. TLR7/TLR9- and B cell receptor-signaling crosstalk: promotion of potentially dangerous B cells. // *Frontiers in Immunology.* – 2017.8 doi: 10.3389/fimmu.2017.00775.
225. Svegliati S., Olivieri A., Campelli N., et al. Stimulatory autoantibodies to PDGF receptor in patients with extensive chronic graft-versus-host disease. // *Blood.* – 2007. – Vol. 110(1). – P. 237–241.

226. Tai X., Erman B., Alag A., et al. Foxp3 transcription factor is proapoptotic and lethal to developing regulatory T cells unless counterbalanced by cytokine survival signals. // *Immunity*. 2013. – Vol.38. – P. 1116-1128.
227. Takaba H., Morishita Y., Tomofuji Y., et al, Fezf2 Orchestrates a Thymic Program of Self-Antigen Expression for Immune Tolerance. // *Cell*. – 2015. – Vol. 163. – P. 975-987.
228. Takaba H., Takayanagi H. The Mechanisms of T Cell Selection in the Thymus. // *Trends in Immunology*. – 2017. – Volume 38. – P. 805-816.
229. Takahashi T., Kuniyasu Y., Toda M., et al., Immunologic selftolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. // *International Immunology*. – 1998. – Vol. 10. – P.1969–1980.
230. Tiegs S.L., Russell D.M., Nemazee D. Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. // *J Exp Med*. – 1993. – Vol. 177. – P. 1009–1020.
231. Toubai T., Mathewson N. D., Magenau J., et al. Danger signals and graft-versus-host disease: current understanding and future perspectives. // *Frontiers in Immunology*. – 2016. - doi: 10.3389/fimmu.2016.00539.
232. Turnquist H.R., Raimondi G., Zahorchak A.F., et al.. Rapamycin-conditioned dendritic cells are poor stimulators of allogeneic CD4+ T cells, but enrich for antigen-specific Foxp3+ T regulatory cells and promote organ transplant tolerance. // *J Immunol*. – 2007. – Vol. 178.
233. Van Leeuwen E. B. M., Cloosen S., Senden-Gijsbers B. L. M. G., et al. Transduction with a fiber-modified adenoviral vector is superior to non-viral nucleofection for expressing tumor-associated Ag mucin-1 in human DC. // *Cytherapy*. – 2006. – Vol. 8(1). – P. 36–46.
234. Van Meerwijk J. P., Marguerat S., Lees R.K., et al. Quantitative impact of thymic clonal deletion on the T cell repertoire. // *J. Exp. Med*. – 1997. – Vol. 185. – P. 377-383
235. Van Nieuwenhuijze A, Liston A. The Molecular Control of Regulatory T Cell Induction. // *Prog Mol Biol Transl Sci*. – 2015. – Vol. 136. – P. 69-97.
236. Van Tendeloo V. F. I., Ponsaerts P., Lardon F., et al. Highly efficient gene delivery by mRNA electroporation in human hematopoietic cells: superiority to lipofection and passive pulsing of mRNA and to electroporation of plasmid cDNA for tumor antigen loading of dendritic cells. // *Blood*. – 2001. – Vol. 98(1). – P. 49–56.
237. Van Tendeloo V., Snoeck H.-W., Lardon F., et al. Nonviral transfection of distinct types of human dendritic cells: high-efficiency gene transfer by electroporation into hematopoietic progenitor-but not monocyte-derived dendritic cells. // *Gene Therapy*. – 1998. – Vol. 5(5). – P. 700–707.
238. Vander Lugt B., Beck Z.T., Fuhlbrigge R.C., et al. TGF- $\beta$  suppresses  $\beta$ -catenin-dependent tolerogenic activation program in dendritic cells. // *PLoS One*. – 2011. – Vol. 6(5).

239. Volchenkov R., Karlsen M., Jonsson R., et al. Type 1 regulatory T cells and regulatory B cells induced by tolerogenic dendritic cells. // *Scand J Immunol.* – 2013. – Vol. 77. – P. 246–54.
240. Wan J., Huang F., Hao S., et al. Interleukin-10 Gene-Modified Dendritic Cell-Induced Type 1 Regulatory T Cells Induce Transplant-Tolerance and Impede Graft Versus Host Disease After Allogeneic Stem Cell Transplantation. // *Cell Physiol Biochem.* – 2017. – Vol. 43(1). – P. 353-366.
241. Wang J., Bao N., Paris L.L., et al. (2008). Detection of kinase translocation using microfluidic electroporative flow cytometry. // *Anal. Chem.* 2008. – Vol. 80. – P. 1087–1093.
242. Wardemann H., Hammersen J., Nussenzweig M.C. Human autoantibody silencing by immunoglobulin light chains. // *J Exp Med.* – 2004. – Vol. 200. – P. 191–199.
243. Watanabe N., Wang Y. H., Lee H. K et al. Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4 + CD25 + regulatory T cells in human thymus. // *Nature.* – 2005. – Vol. 436. – P. 1181-1185.
244. Waterfield M., Khan I.S., Cortez J.T., et al. The transcriptional regulator Aire coopts the repressive ATF7ip-MBD1 complex for the induction of immunotolerance. // *Nat Immunol.* – 2014. – Vol. 15(3). – P. 258–265.
245. Wermeling F., Chen Y., Pikkarainen T., et al. Class A scavenger receptors regulate tolerance against apoptotic cells, and autoantibodies against these receptors are predictive of systemic lupus. // *J Exp Med.* – 2007. – Vol. 204(10). P. 2259–2265.
246. Williams C.B., Engle D.L., Kersh G.J., et al. A kinetic threshold between negative and positive selection based on the longevity of the T cell receptor–ligand complex. // *J. Exp. Med.* – 1999. – Vol. 189. – P. 1531–1544.
247. Wurbel M. A., Philippe J. M., Nguyen C., et al.. The chemokine TECK is expressed by thymic and intestinal epithelial cells and attracts double- and single-positive thymocytes expressing the TECK receptor CCR9. // *Eur. J. Immunol.* – 2000. – Vol. 30. – P. 262–271.
248. Wynn T. A., Ramalingam T. R. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. // *Nature Medicine.* – 2012. – Vol. 18(7). – P. 1028–1040.
249. Xie Q., Luo J., Zhu Z., et al. Nucleofection of a DNA vaccine into human monocyte-derived dendritic cells. // *Cellular Immunology.* – 2012. – Vol. 276(1-2). – P. 135–143.
250. Xu D.L., Liu Y., Tan J.M., et al. Marked prolongation of murine cardiac allograft survival using recipient immature dendritic cells loaded with donor-derived apoptotic cells. // *Scand J Immunol.* – 2004. – Vol. 59. – P. 536–544.
251. Xu Y., Tang X., Yang M., et al. Interleukin 10 gene-modified bone marrow derived dendritic cells attenuate liver fibrosis in mice by inducing regulatory T cells and inhibiting the TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway. // *Mediators Inflamm.* – 2019. – P.15.

252. Yadav M., Louvet C., Davini D., et al. Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo. // J Exp Med. – 2012. – Vol. 209(10). – P. 1713–1719.
253. Yamazaki S., Iyoda T., Tarbell K., et al. Direct expansion of functional CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. // J Exp Med. -2003. – Vol. 2. – P. 235–247.
254. Yamazaki S., Inaba K., Tarbell K.V., et al. Dendritic cells expand antigen-specific Foxp3<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T cells including suppressors of alloreactivity. // Immunol Rev. – 2006. – Vol. 212. – P. 314–329.
255. Yi T., Chen Y., Wang L., et al. Reciprocal differentiation and tissue-specific pathogenesis of Th1, Th2, and Th17 cells in graft-versus-host disease. // Blood. – 2009. – Vol. 114. – P. 3101–3112.
256. Zehn D., Bevan M.J. T cells with low avidity for a tissue-restricted antigen routinely evade central and peripheral tolerance and cause autoimmunity. // Immunity. – 2006. – Vol.25(2). – P. 261–70.
257. Zeng M., Guinet E., Nouri-Shirazi M. B7-1 and B7-2 differentially control peripheral homeostasis of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. // Transplant Immunology. – 2009. – Vol. 20. – P. 171–179.
258. Zhou F., Lauretti E., di Meco A., et al. Intravenous transfer of apoptotic cell-treated dendritic cells leads to immune tolerance by blocking Th17 cell activity. // Immunobiology. 2013. – Vol. 218(8). – P. 1069–1076.
259. Zhou F., Zhang G.X., Rostami A. Apoptotic cell-treated dendritic cells induce immune tolerance by specifically inhibiting development of CD4<sup>+</sup> effector memory T cells. // Immunol Res. – 2016. – Vol. 64(1). – P. 73–81.
260. Biorad Protocol Finder (Электронный ресурс). URL: [http://biorad-ads.com/transfection\\_protocols/](http://biorad-ads.com/transfection_protocols/)
261. BTX protocol database (Электронный ресурс). URL: <https://www.btxonline.com/technical-resources/protocol-database.html>
262. Mouse Genomes Project (Электронный ресурс). URL: <http://www.sanger.ac.uk/science/data/mouse-genomes-project>
263. UniProtKB P18893 (Электронный ресурс). URL: <https://www.uniprot.org/uniprot/P18893>
264. Immune epitope database and analysis resource (Электронный ресурс). URL: <http://www.iedb.org/>