

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Новосибирск-2020

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

Научный руководитель:
Доктор медицинских наук,
профессор

Сенников Сергей Витальевич

Официальные оппоненты:

Марков Олег Владимирович, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории биохимии нуклеиновых кислот, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук.

Шаповал Андрей Иванович, доктор биологических наук, исполнительный директор Российско-американского противоракового центра, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Алтайский государственный университет».

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства России, г. Москва

Защита диссертации состоится « » 2020 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 001.001.01 в НИИФКИ по адресу:
630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИИКИ и на сайте:
<https://niikim.ru/ru/наука/объявления-диссовета>

Автореферат разослан « » 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Облеухова И.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

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, Glasscock, 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- β , 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 коstimуляции CD80 и CD86, молекул активации CD40, CD83 и провоспалительных цитокинов IL-1, IL-2, IL-12, INF- γ , TNF- α . А также повышенная экспрессия ингибиторных молекул PD-L1, IDO и

иммунорегуляторных цитокинов IL-10 и TGF- β , 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 загрузки 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 загрузки ДК антигенных последовательностей молекул МНС, т.е. антигенных последовательностей основных молекул, на которые направлены трансплантационные реакции. А также более клинически приемлемым, поскольку способ загрузки 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+ Treg в культурах аутологических спленоцитов и антиген-специфично подавляют пролиферацию аутологических 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+ 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 — ECI) 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, 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.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 109 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения, заключения и выводов. Библиографический указатель включает 264 источника, из них 259 зарубежных. Работа иллюстрирована 25 рисунками, включает 2 таблицы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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.

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).

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.

ДНК-конструкции

В работе использовались следующие ДНК-конструкции:

pMHC – плазида на основе вектора pmax-Ub, кодирующая антигенные последовательности молекул МНС I класса (H-2) мышей CBA (аллель H-2k), несущие основные аминокислотные отличия от молекул МНС I класса мышей C57Bl/6 (аллель H-2b);

p5 – некодирующая контрольная плазида на основе вектора pmax-Ub;

pIL-10 - плазида на основе вектора pmax-Ub, кодирующая мышинный IL-10.

pGFP - плазида на основе вектора pmax-Ub, кодирующая зеленый флюоресцентный белок.

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.

Прилипшую фракцию ККМ культивировали в концентрации 1 млн. клеток в 1 мл полной питательной среды 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). Через трое суток культивирования клеточные культуры снимались с пластика и использовались для трансфекции.

Трансфекция дендритных клеток ДНК-конструкциями

Трансфекцию дендритных клеток 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, 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.

Цитометрическое фенотипирование дендритных клеток

Через 1 сутки после электропорации 200 тыс. клеток отбирали для анализа фенотипических характеристик ДК. Оценка фенотипических и функциональных показателей культуры ДК проводилась методом проточной цитофлуориметрии 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.

Оценка толерогенных свойств дендритных клеток

Толерогенные свойства трансфицированных ДК оценивались цитометрически по изменению относительного количества FoxP3+ Treg и IL-10+CD4+ лимфоцитов в совместных 4х дневных культурах ДК и аутоспленоцитов.

Оценка содержания FoxP3+Treg и CD4+IL-10+ лимфоцитов проводилась методом проточной цитофлуориметрии с поверхностным окрашиванием антителами CD4-PerCP, CD25-APC, и внутриклеточной окраской FoxP3-PE или IL-10-PE (Biolegend, США).

Смешанная культура лимфоцитов

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

Оценку пролиферации совместной культуры аутоспленоцитов и трансфицированных ДК в ответ на аллогенный стимул проводили с помощью нерадиоактивного колориметрического теста для определения пролиферации клеток PreMix WST-1 (Takara, Япония).

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.

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 в течение 4 суток. Каждая мышь получала однократно 100 млн клеток путем внутривенного введения в 0,5 мл физиологического раствора. Оценка показателей проводилась спустя 2 и 3 недели от момента введения. В качестве основных показателей течения РТПХ и развития иммунного ответа использовали весовые показатели селезенки, относительное содержание иммунокомпетентных клеток (CD3+, CD4+, CD8+, CD19+, FoxP3+ Treg) в селезенке мышей, подвергнутых индукции РТПХ.

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 3ое суток после реципиентам подкожно в

область операции вводили 1 млн трансфицированных ДК мышей C57Bl/6, сокультивированных с аутологичными спленоцитами в соотношении 1 к 10 в течение 4 суток. 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 7х суток после трансплантации. Кожный лоскут, некротизированный на 80% считался отторгшимся. Кожные лоскуты некротизированные до 7 суток считались неудачно трансплантированными и не включались в анализ.

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.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Эффективность трансфекции ДК ДНК-конструкциями рМНС и рIL-10

Эффективность трансфекции плазмиды рМНС, кодирующей антигенные последовательности главного комплекса гистосовместимости I класса мышей СВА, 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. Данное допущение представляется автору возможным, поскольку обе плазмиды сконструированы на основе одного вектора ртах-Ub и имеют схожий размер (рМНС – 4,58 kb, рGFP – 3,617 kb). Эффективность трансфекции ДК плазмидой рGFP, измеренная методом проточной цитометрии по флуоресценции GFP, составила 31% (медиана, 25 и 75 перцентили: 28,38% и 36,03%, соответственно) от живых электропорированных клеток. Клеточная смертность, измеренная цитометрически по включению пропидий йодида, после электропорации рGFP оставила 5,01% (медиана, 25 и 75 перцентили: 3,77% и 8,1%, соответственно) от всех электропорированных клеток.

Эффективность трансфекции ДК плазмидой рIL-10 была подтверждена методом ИФА по увеличению концентрации IL-10 в кондиционной среде трансфицированных дендритных клеток при увеличении количества плазмидной ДНК, используемой для трансфекции (Рис. 1).

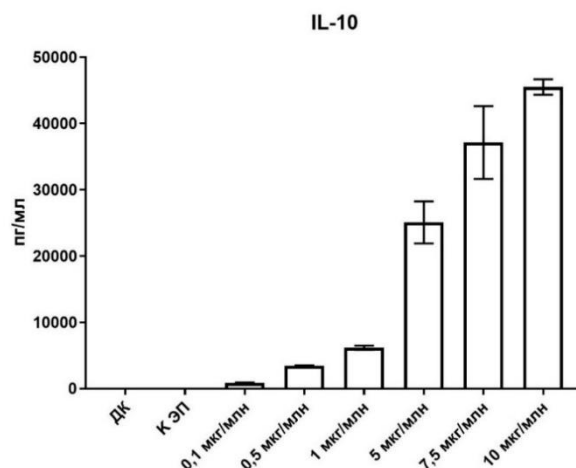


Рисунок 1 – Содержание IL-10 в кондиционной среде ДК, трансфицированных различными дозами pIL-10. Медианы и межквартильные интервалы. ДК – неэлектропорированные ДК. КЭП – ДК, электропорированные без плазмид. 0,1-10 мкг/млн – использованные для трансфекции количества pIL-10.

Фенотипическая характеристика электропорированных ДК

Анализ фенотипа ДК после электропорации плазмидами pIL-10 и pMNC, контрольной некодирующей плазмидой p5, 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 группой ДК неэлектропорированных ДК (Рис. 2).

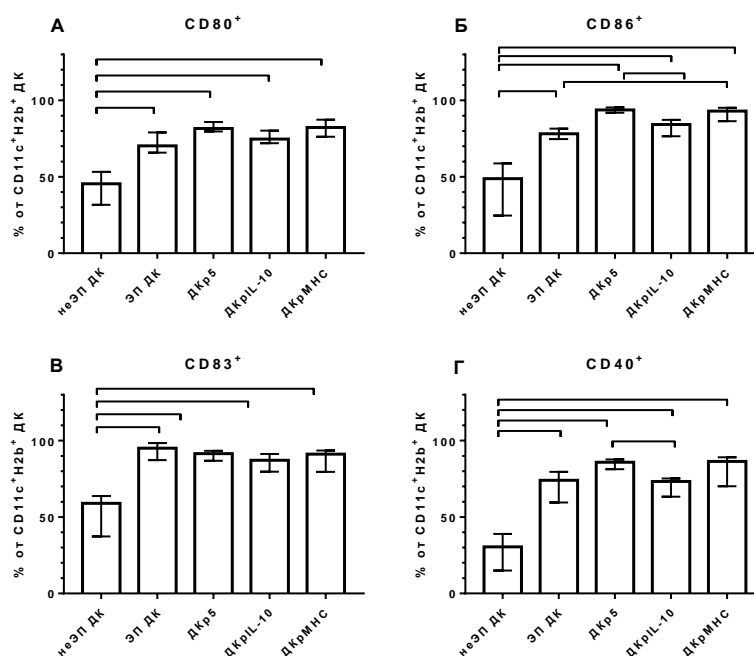


Рисунок 2 – Фенотипическая характеристика ДК, подвергнутых электропорации. неЭП ДК – неэлектропорированные ДК. ЭП ДК – ДК, электропорированные без плазмид. ДКр5 – ДК, электропорированные плазмидой p5. ДКрIL-10 – ДК, электропорированные плазмидой pIL-10. ДКрMNC – ДК, электропорированные плазмидой pMNC. (N=6-12).

Медианы и межквартильный интервал. Скобками указаны статистически значимые отличия $p \leq 0.05$, критерий Краскела-Уоллиса с множественными сравнениями Данна.

Таким образом, электропорация дендритных клеток сама по себе оказывала созревающее действие на дендритные клетки. 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]. Однако, электропорация ДК плазмидой, кодирующей IL-10, приводила к значимому снижению количества ДК, экспрессирующих, CD86 и CD40, по сравнению группой электропорации плазмидой p5 (Рис. 2). что может говорить о сдерживающем характере действия IL-10 на созревание ДК под действием электропорации.

Толерогенные свойства электропорированных ДК

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. 3 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.

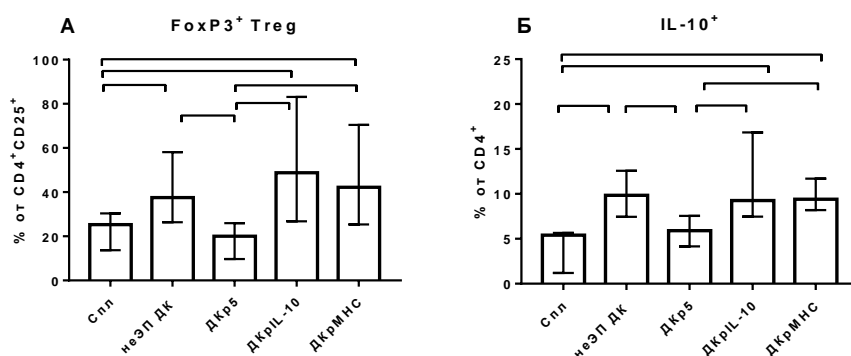


Рисунок 3 – Индукция FoxP3⁺ Treg и экспрессия IL-10 в совместных культурах трансфицированных ДК и аутологичных спленоцитов (А, Б). Спл – спленоциты, некультивированные с ДК. неЭП ДК – неэлектропорированные ДК. ЭП ДК – ДК, электропорированные без плазмид. ДКр5 – ДК, электропорированные плазмидой p5. ДКрIL-10 – 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.

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

Если повышенная индукция FoxP3⁺ Treg и IL-10⁺CD4⁺ клеток в присутствии незрелых ДК (неЭП ДК) и ДК, продуцирующих IL-10, является закономерным описанным в литературе феноменом [Lutz et al., 2000; Guindi et al, 2018; Gregori et al, 2010; Wan et al, 2017], то повышенная индукция Treg дендритными клетками, трансфицированными антигенными последовательностями MHC, 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 FoxP3⁺ Treg и IL-10+CD4⁺ клеток с помощью ДК, трансфицированных аллогенными последовательностями МНС, связана с более аффинным взаимодействием TCR лимфоцитов с комплексом собственного МНС и чужеродного пептида, что является необходимым для активации лимфоцита. При этом в других группах чужеродных пептидов не присутствовало. В литературе также встречаются данные о более эффективной индукции Treg на чужеродный антиген с помощью толерогенных дендритных клеток [Fujita et al, 2007].

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.

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

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 (Рис. 4А).

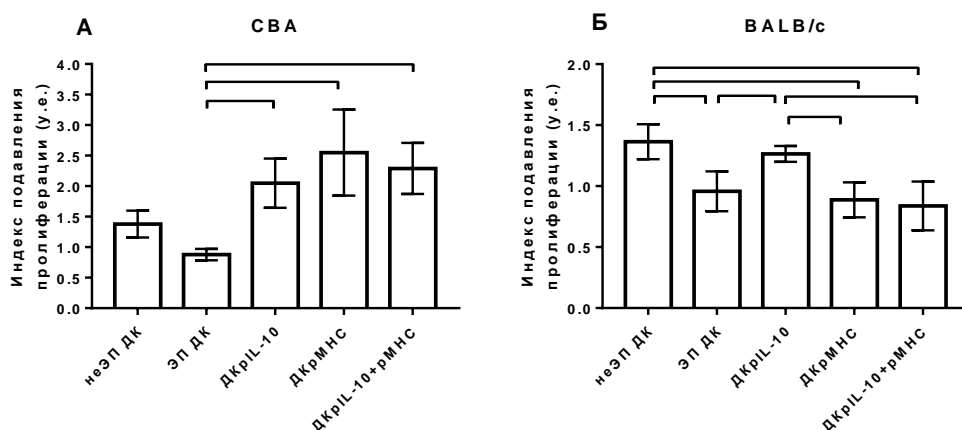


Рисунок 4 – подавление трансфицированными ДК пролиферации аутологичных спленоцитов в ответ на стимуляцию спленоцитами А – СВА (N=27), В – BALB/c (N=6). А - медианы и межквартильный интервал, скобками указаны статистически значимые отличия $p \leq 0.05$, критерий Краскела-Уоллиса с множественными сравнениями 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. 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.

Однако, способность данных групп к угнетению пролиферации значимо не отличалась от таковой группы неэлектропорированных ДК (Рис. 4 А).

Поскольку, трансфекция ДК плазмидой рМНС, 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 рМНС, кодирующей антигенные последовательности МНС мышей СВА, не способны значительно эффективнее подавлять пролиферацию аутологических спленоцитов в ответ на антигенный стимул мышей BALB/c, по сравнению с группой контрольной трансфекции р5 (Рис. 4 Б). При этом ДК, трансфицированные рIL-10, сохранили данную способность и угнетали пролиферацию значительно эффективнее групп трансфекции р5, рМНС и совместной трансфекции. Также, способность к значимо более выраженному подавлению пролиферации аутоспленоцитов на антигены мышей BALB/c проявили и неэлектропорированные ДК (Рис. 4 Б).

Таким образом, в условиях *in vitro*, ДК, трансфицированные с участием рМНС, антиген-специфично подавляли пролиферацию аутологических спленоцитов на антигены мышей СВА, а ДК, трансфицированные рIL-10, подавляли пролиферацию неспецифично на антигены мышей СВА и BALB/c. Неэлектропорированные ДК также проявили способность к подавлению пролиферации на антигены мышей СВА и, более выраженно, на антигены мышей BALB/c, что объясняется толерогенными свойствами незрелых ДК [Bhattacharya et al, 2011; Mansilla et al, 2015].

Подавление острой РТПХ с помощью дендритных клеток, трансфицированных рIL-10 и рМНС

Через 2 недели после индукции РТПХ, в группах введения спленоцитов, ДКр5, ДКрМНС и ДКрIL-10+рМНС наблюдались значимо большие массы селезенок по сравнению с группой без индукции РТПХ (введения физ. р-ра), что свидетельствовало о выраженном протекании РТПХ в данных группах [Renkonen, Näyry, 1984] (Рис. 5 А).

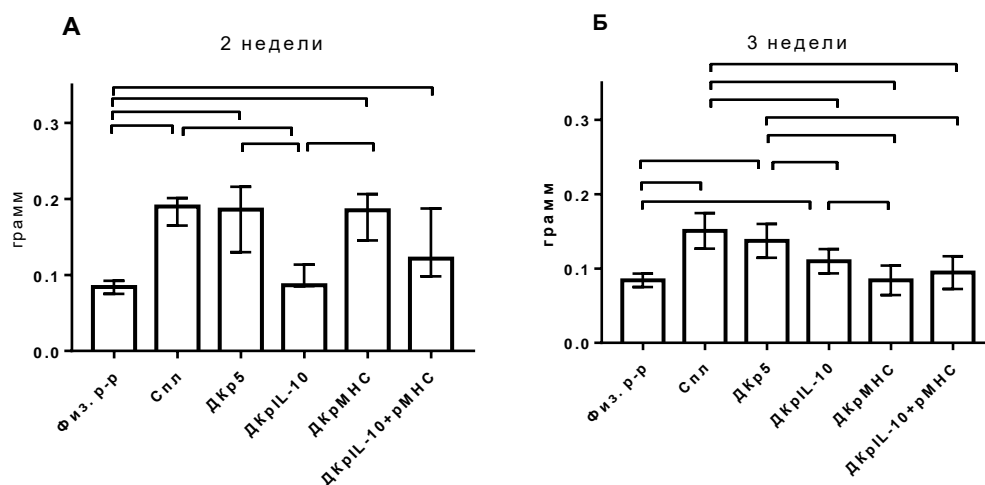


Рисунок 5 – Массы селезенок мышей СВF1(F1: C57Bl/6×СВА), подвергшихся индукции РТПХ различными группами ДК, через 2 (А) и 3 (Б) недели после ее индукции. N=10. А: медианы и межквартильный интервал, скобками указаны статистически значимые отличия $p \leq 0.05$, критерий Краскела-Уоллиса с множественными 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.

Однако, дендритные клетки, трансфицированные pIL-10, обеспечивали значимо меньшие массы селезенок по сравнению с контрольной группой индукции РТПХ (введения спленоцитов без ДК) и группой введения ДК, трансфицированных контрольной плазмидой p5 (Рис. 5А), что свидетельствовало о снижении интенсивности течения РТПХ в данной группе. При этом массы селезенок в группе трансфекции pIL-10 значимо не отличались от масс селезенок в группе без индукции РТПХ – в группе введения физиологического раствора.

Через 3 недели после индукции РТПХ достоверно меньшие массы селезенок по сравнению с контрольными группами введения спленоцитов и ДКp5 были обнаружены в группах трансфекции pIL-10, pMHC и совместной трансфекции pIL-10 и pMHC (Рис. 5 Б). Однако, массы селезенок мышей, получивших pIL-10 трансфицированные ДК, на данном сроке были значимо больше масс селезенок мышей с введением ДКpMHC. При этом массы селезенок в группах ДКpMHC и ДКpMHC+pIL-10 значимо не отличались от масс селезенок в группе без индукции РТПХ (введением физ. раствора).

Анализ субпопуляционного состава селезенок мышей через 2 недели после индукции РТПХ показал, что только группа ДК, трансфицированных pIL-10, на данном сроке способна к устранению сдвига в сторону Т-клеточного иммунного ответа, характерного для течения РТПХ [Yi et al, 2009; Voieri et al, 2017] (Рис. 6 А).

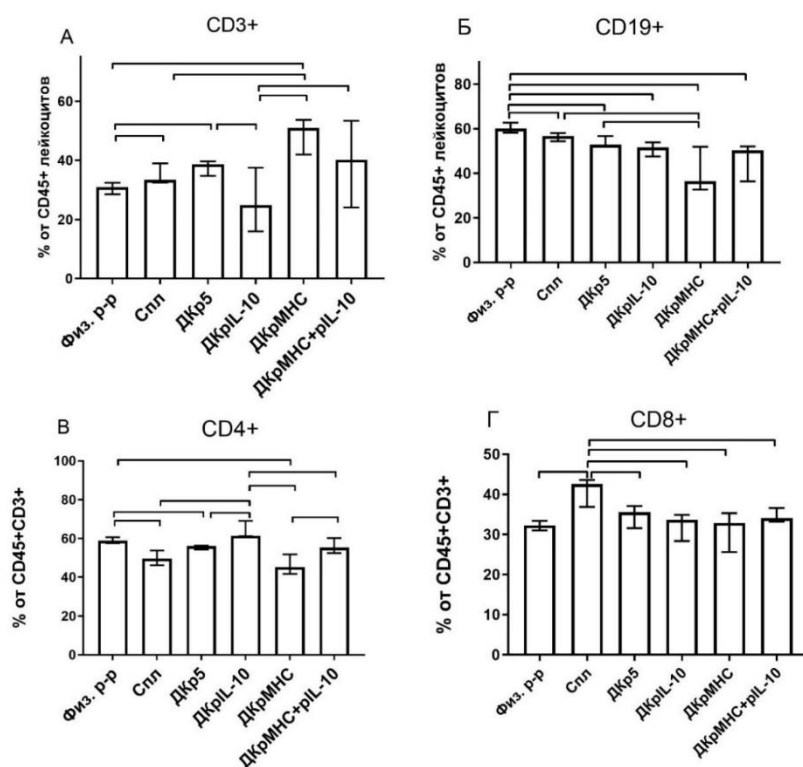


Рисунок 6 – Субпопуляционный состав селезенок мышей C57BL/6 на 2 неделе течения РТПХ. N=7. Медианы и межквартильный интервал. Скобками указаны статистически значимые отличия $p \leq 0.05$, критерий Краскела-Уоллиса с множественными сравнениями Данна. Физ. p-r – введение физиологического раствора. Спл – введение спленоцитов. 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.

Однако, в данной группе все равно наблюдалось снижение В клеточного ответа по сравнению с группой без индукции РТПХ (Рис. 6 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 6 В, Г), что свидетельствовало о подавлении Th1 цитотоксического ответа при течении РТПХ. Группа трансфекции плазмидой рМНС описанными свойствами не обладала (Рис. 6).

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. 7 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. 7 Б).

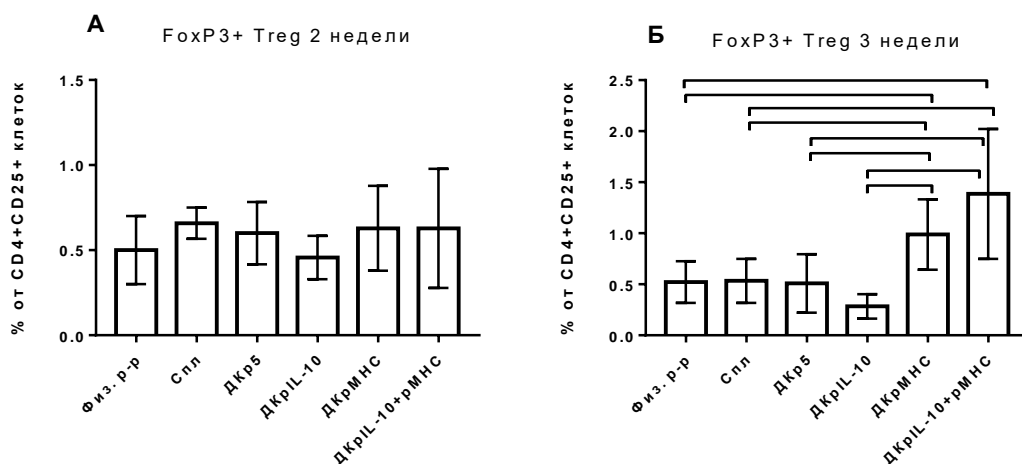


Рисунок 7 – Содержание CD4+C25+FoxP3+ Treg (А,Б) в селезенках мышей CBF1 на 2 и 3 неделе течения РТПХ. N=7. Средние и стандартные отклонения. Скобками указаны статистически значимые отличия $p \leq 0.05$, однофакторный дисперсионный анализ с множественными сравнениями Тьюки. Физ. р-р – введение физиологического 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.

Таким образом, согласно полученным данным, снижение интенсивности течения РТПХ на 2 неделе, обеспечиваемое рIL-10 трансфицированными ДК, сопровождалось подавлением цитотоксического иммунного ответа, что согласуется с литературными данными о преимущественной стимуляции Th2-ответа с помощью IL-10 [Bashyam, 2007; Coffman, 2006]. А в группе трансфекции рМНС снижение интенсивности течения РТПХ на 3 неделе сопровождалось повышенным количеством Treg клеток.

Интересно, что в условиях *in vitro* рIL-10 трансфицированные ДК были способны индуцировать генерацию FoxP3+ Treg клеток (Рис. 3), но не проявили данной способности *in vivo* при индукции РТПХ. При анализе литературных данных было отмечено, 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]. 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.

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. 8 А).

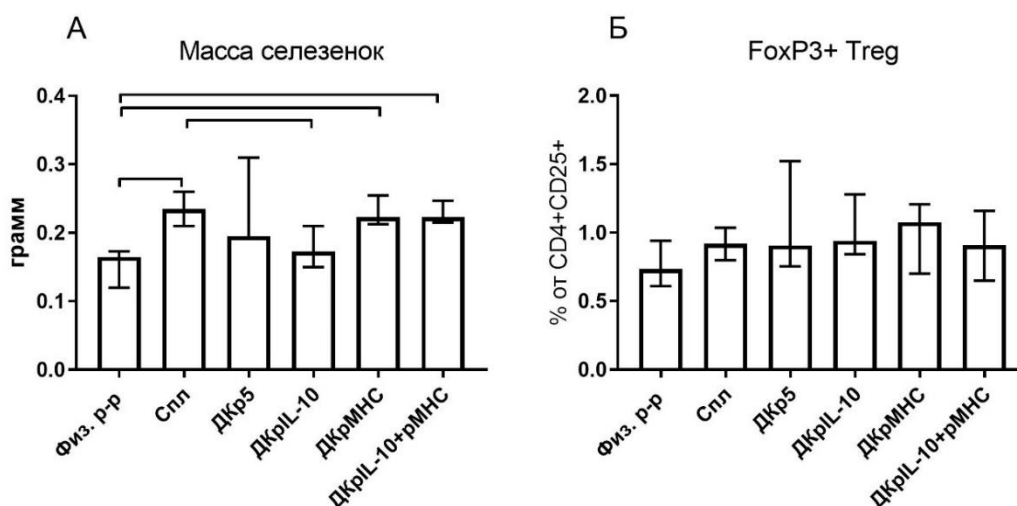


Рисунок 8 – Масса селезенок мышей BALB/c через 3 недели после индукции РТПХ (А) и относительное содержание в селезенках FoxP3+ Treg (Б). n=7. Медианы и межквартильный интервал. Скобками указаны статистически значимые отличия $p \leq 0.05$, критерий Краскела-Уоллиса с множественными сравнениями Данна. 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. 8 Б).

Таким образом, ДК, трансфицированные рIL-10, способны неспецифично подавлять острую РТПХ, направленную на антигены мышей СВА и BALB/c, 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/c, в связи с генерацией Treg клеток, механизм действия которых в современной литературе считается преимущественно антиген-специфичным [Bacher et al, 2016; Ноерпли et al, 2016].

Подавление реакции отторжения кожного лоскута с помощью дендритных клеток, трансфицированных рIL-10 и рМНС

При пересадке кожного лоскута от мышей СВА мышам C57Bl/6 отмечена способность всех экспериментальных групп, т.е. групп трансфекции рIL-10, рМНС и совместной трансфекции, значимо увеличивать медиану времени отторжения кожного

лоскута по сравнению с контрольными группами введения физ.р-ра, совместных культур спленоцитов и ДК, нетрансфицированных или трансфицированных плазмидой р5 (Табл. 1).

Таблица 1 – Медианы времени отторжения кожных лоскутов мышей СВА и BALB/c при трансплантации мышам С57Bl/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 ^{*,□}

* - статистически значимые отличия от группы введения физ. р-ра, # - статистически значимые отличия от группы введения неэлектропорированных ДК, □ - статистически значимые отличия от группы введения ДКр5. $p \leq 0.05$, Тест Мантеля-Кокса и логарифмический тест трендов

При трансплантации кожного лоскута от мышей BALB/c способность к увеличению медианы времени отторжения кожного лоскута была отмечена только для групп трансфекции рIL-10 и совместной трансфекции рМНС и рIL-10, т.е. для тех групп, где использовалась плазида, кодирующая IL-10 (Табл. 1).

Таким образом, 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 аутологических 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/c, 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/c. 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.

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 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 СВА и BALB/c, *in vivo* обуславливают подавление реакции «трансплантат против хозяина» в мышцах CBF1 (F1: CBAxС57Bl/6) и BALB/c и обуславливают увеличение времени отторжения кожного лоскута от мышей СВА 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 СВА, обуславливают подавление пролиферации аутологических спленоцитов *in vitro* в ответ на стимуляцию спленоцитами мышей СВА, но не BALB/c, *in vivo* обуславливают подавление реакции «трансплантат против хозяина» в мышцах CBF1 (F1: CBAxС57Bl/6), но не в BALB/c, и обуславливают увеличение времени отторжения кожного лоскута от мышей СВА, 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 ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Оригинальные статьи

1. Khantakova J., Silkov A., **Tereshchenko V.**, Gavrilova E., Maksyutov R., Sennikov S. Transfection of bone marrow derived cells with immunoregulatory proteins. // **Cytokine**. – 2018.

– Vol. 108. – P. 82-88. doi: 10.1016/j.cyto.2018.03.028

2. Khantakova J., **Tereshchenko V.**, Kurilin V., Silkov A., Maksyutov A., Lopatnikova J. et al. Comparison of CD4⁺CD25^{hi}FoxP3⁺ Treg Induction by pIL-10 Transfected Dendritic Cells in Different Mouse Strains. // **J Interferon Cytokine Res.** – 2019. – Vol. 39(9). – P. 531-538. doi: 10.1089/jir.2019.0031

3. Sennikov S., **Tereshchenko V.**, Kurilin V., Shevchenko J., Lopatnikova J., Silkov A. et al. Dendritic Cells Transfected with MHC Antigenic Determinants of CBA Mice Induce Antigen-Specific Tolerance in C57Bl/6 Mice. // **Journal of Immunology Research.** – 2020. - Article ID 9686143. – P. 13. doi.org/10.1155/2020/9686143.

4. Kurilin V., Khantakova J., **Tereshchenko V.**, Lopatnikova J., Obleukhova I., Sennikov S. The Effects of Immunosuppressive Factors on Primary Dendritic Cells from C57BL/6 and CBA Mice. // **Journal of Immunology Research.** – 2019. - Article ID 7029726. – P. 12. doi: 10.1155/2019/7029726

Тезисы материалов конференций

5. Khantakova J., **Tereshchenko V.**, Kurilin V., Lopatnikova J., Silkov A., Knauer N. et al. Interleukin-10 transfected dendritic cells-induced Treg cells prompt an allogenic tolerance in vitro in mice C57BL/6 but not in mice CBA. // 5th European Congress of Immunology: Abstract Book. – 2018. – P. 383.

6. Khantakova J., **Tereshchenko V.**, Silkov Maksyutov A., Sennikov S. IL-10-transfected dendritic cells stimulate IL-10-dependent tolerance in C57Bl/6 mice in vivo. // 6th Annual Meeting of the International Cytokine & Interferon Society: Abstract book. – 2018. – P. 284.

7. **Tereshchenko V.**, Khantakova J., Kurilin V., Shevchenko J., Maksyutov A., Sennikov S. Tolerogenic dendritic cells transfected with MHC epitopes prolong allograft survival and reduce GVHD. // 17th International Congress of Immunology 2019 Beijing China. European Journal of Immunology. – 2019. – Suppl. 3. – P. 1258. doi: 10.1002/eji.201970400

8. **Tereshchenko V.**, Khantakova J., Kurilin V., Silkov A., Shevchenko J., Lopatnikova J., et al. Dendritic cells transfected by H-2K epitopes induce functional Tregs and tolerance in vitro. // 5th European Congress of Immunology: Abstract Book. – 2018. – P. 385.

9. **Tereshchenko V.**, Khantakova J., Sennikov S., Kuznetsova M. Generation of tolerogenic DCs (tolDCs) in various mice strains. // 15th International Symposium on Dendritic Cells. European Journal of Immunology. – 2018. – Vol. 48. – Suppl. 1. – P. 112. doi: 10.1002/eji.201871000.

10. Курилин В., Хантакова Ю., **Терещенко В.**, Куликова Е., Мелентьев В., Облеухова И. Эффекты BAY 11-7082 на формирование дендритных клеток *in vitro*. // Материалы объединенного иммунологического форума. Новосибирск, 24-29 июня 2019. Российский иммунологический журнал. – 2019. – Том. 13(22), №2 – С. 945-947.

11. **Терещенко В.**, Хантакова Ю., Курилин В., Силков А., Максютков Р. Электропорация дендритных клеток ДНК-плазмидой, кодирующей ИЛ-10. Материалы объединенного иммунологического форума. Новосибирск, 24-29 июня 2019. – Российский иммунологический журнал. – 2019. – Том. 13(22), №2. – С. 843-845.

12. **Терещенко В.П.**, Хантакова Ю.Н., Курилин В.В., Силков А.Н., Шевченко Ю.А., Лопатникова Ю.А., Максютков А.З., Сеников С.В. Индукция регуляторных Т-клеток с помощью дендритных клеток, трансфицированных IL-10. Материалы IV национального конгресса по Регенеративной медицине. Москва, 20-23 ноября 2019. Гены и Клетки. – 2019. – Том. XIV (приложение) – С. 231-232.

Патенты

13. Пат. RU 2717011 С1 Российская Федерация, СПК А61К 35/15. Способ индукции иммунологической толерантности на трансплантационные антигены у млекопитающих. / Сенников С.В., Максютлов А.М., Лопатникова Ю.А., Хантакова Ю.Н., Курилин В.В., Силков А.Н., Шевченко Ю.А., **Терещенко В.П.**; Патентообладатель ФГБНУ «НИИФКИ», опубл. 17.03.2020, Бюл. №8. – 13с.

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 (MHC I класса) мышей CBA, несущие основные аминокислотные замены относительно гомологичных последовательностей из локуса H2 мышей C57Bl/6

pGFP - ДНК-конструкция (плазмида), кодирующая зеленый флюоресцентный белок

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

Treg – CD4+CD25^{hi}FoxP3+ Т-регуляторные клетки

TCR – Т-клеточный рецептор