

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини
Національна академія наук України

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

КІСЄЛЬОВА ГАННА ГЕННАДІЇВНА

УДК 611.018.83:611.018.46.086.13:616.72-002.77-08-092.4

ДИСЕРТАЦІЯ

Обґрунтування використання толерогенних дендритних клітин, отриманих з
кріоконсервованих попередників, у лікуванні аутоімунних захворювань
(експериментальне дослідження)

22- Охорона здоров'я

222 - Медицина

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Кісельова Г.Г.

Науковий керівник

Гольцев Анатолій Миколайович,

академік НАН України,

доктор медичних наук, професор,

головний науковий співробітник

відділу кріопатофізіології і імунології ІПКіК НАН України

Харків – 2023

АНОТАЦІЯ

Кісельова Г.Г. Обґрунтування використання толерогенних дендритних клітин, отриманих з кріоконсервованих попередників, у лікуванні аутоімунних захворювань (експериментальне дослідження). Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 222 «Медицина» (галузь знань 22 «Охорона здоров'я»). – Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, 2023.

Дисертаційна робота присвячена вивченню особливостей впливу кріоконсервування за різними режимами на структурні і функціональні характеристики моноклеарів (МНК) кісткового мозку та дендритних клітин (ДК) отриманих з них *in vitro*. Суттєва увага в роботі приділяється оцінці толерогенного потенціалу отриманих з кріоконсервованих МНК ДК, а саме, здатності мінімізувати прояви у мишей ад'ювантного артриту (АА) як експериментальної моделі ревматоїдного артриту (РА) у людини.

В роботі були використані наступні сучасні методи досліджень: кріоконсервування, культивування *in vitro*, проточна цитофлуориметрія, ПЛР в реальному часі, імуномагнітне сортування клітин, інвертована та світлова мікроскопія.

Відпрацьовано метод виділення з кісткового мозку мишей СВА/Н 20-тижневого віку МНК у градієнті тразографу, який дозволяє отримати більш ніж 40 % клітин, серед яких 12 % становили CD14⁺-моноцити – попередники ДК.

Визначені умови отримання з МНК кісткового мозку ДК з толерогенними властивостями методом культивування *in vitro* в присутності ГМ-КСФ (20 нг/мл), ІЛ-4 (5 нг/мл) та дексаметозону (0,4 мкг/мл). Це дозволило одержати 96% клітин – кандидатів у ДК з високим рівнем життєздатності (92%).

Для підтвердження незрілого толерогенного фенотипу ДК, отриманих в культурі, було підібрано панель маркерів для цитофлуориментричного аналізу.

Встановлено, що диференціювання моноцитів у незрілі ДК супроводжується появою характерного для цих клітин маркера – CD11b, втратою CD14-антигена і мінімізацією рівня експресії костимуляторних молекул CD80, CD86.

Продемонстровано, що важливою складовою патогенезу АА є дисрегуляція функції імунної системи на тлі розбалансування цитокинового профілю з переважним зростанням вмісту прозапальних цитокінів (ІЛ-6, ФНП- α , ІФН- γ) і дисфункції Т-регуляторної (Трег) ланки імунітету. Такі зміни супроводжувались підвищенням клініко-лабораторних показників: рівня сіалових кислот, серомукоїдів, та індексу артриту (ІА).

Вивчено вплив різних режимів (Р) кріоконсервування під захистом 10% ДМСО з повільною швидкістю охолодження: 1 град / хв до -80°C (Р1); до -40°C (Р2); до -25°C (Р3) з наступним зануренням у кожному випадку у рідкий азот (-196°C) на структурні та функціональні властивості МНК кісткового мозку. Показано, що змінюючи умови кріоконсервування можна збільшити толерогенний потенціал отриманих для імунотерапії ДК.

Вперше доведено, що кріоконсервування МНК за розробленим режимом (Р2) у порівнянні із загальноприйнятим (Р1) забезпечував максимальні показники їх життєздатності, метаболічної активності, та вмісту CD14⁺ - попередників ДК, разом з високою експресією білків теплового шоку Hsp70 – індукторів їх толерогенної активності.

Оцінка функціонального потенціалу ДК отриманих *in vitro* з кріоконсервованих МНК за Р2 продемонструвала більш високу їх толерогенну активність. Підтверджено, що підвищення вмісту Hsp70 в них сприяло збільшенню формування Т-регуляторних клітин (CD4⁺CD25⁺ та FOXP3⁺) і їх функціонального потенціалу за рахунок активації гена *foxp3*. Це призводило до зниження клінічної маніфестації аутоімунної патології у тварин. Встановлено

пролонгований ефект імунотерапії дендритними клітинами, отриманими з кріоконсервованих за P2 МНК.

Аналіз вмісту $CD4^+CD25^+$ - та $FOXP3^+$ -клітин, рівня експресії гена *foxp3* і ІА на 7 і 14 добу після застосування різного виду толДК показав, що покращення клінічного статусу тварин з АА більшою мірою корелює з вмістом $FOXP3^+$ Т-регуляторних клітин, ніж рівнем експресії гена *foxp3*.

Продемонстрована здатність толДК отриманих з кріоконсервованих МНК корегувати порушений цитокіновий профіль з переважним стимулюванням продукції протизапальних цитокінів (ІЛ-4, ІЛ-10) і нормалізацією клінічного стану тварин з АА. Зіставлення ступеня інгібіції прозапальних і стимуляції протизапальних цитокінів після різного виду толДК-терапії свідчить про їхню здатність реалізувати різноспрямовану і з різним ступенем активність по відношенню до цих цитокінів.

Вперше встановлені переваги ДК з кріоконсервованих попередників, особливо за режимом 2 в прояві імункорегуючої дії в порівнянні з ДК отриманими з нативних МНК.

Отримані в роботі результати можуть бути використані лікарями-клініцистами які опановують і впроваджують методи клітинно-тканинної терапії в практику лікування АІЗ, в тому числі РА. Представлений матеріал демонструє можливість використання ультранизьких температур як «інструмента», що здатний спрямовано керувати толерогенним потенціалом ДК, отриманих з клітин-попередників.

Ключові слова: кріоконсервування, кріопротектор, ДМСО, ультранизькі температури, моонуклеари, дендритні клітини, Т-регуляторні клітини, Толл-подібні рецептори, аутоімунні захворювання, цитокіни, імунітет.

ANNOTATION

Kisielova Hanna. Rationale for the use of tolerogenic dendritic cells, obtained from cryopreserved progenitors, in the treatment of autoimmune diseases (experimental study). Qualifying scientific work on rights of a manuscript.

Dissertation for obtaining the scientific degree of Doctor of Philosophy in specialty 222 "Medicine" (field of knowledge 22 "Health care"). – Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, 2023.

The dissertation is devoted to the study of the features of the cryopreservation effect under different regimes on the structural and functional characteristics of bone marrow mononuclear cells (MNC) and dendritic cells (DC) obtained from them in vitro. Considerable attention is paid to the assessment of the tolerogenic potential of DCs obtained from cryopreserved MNCs, namely, the ability to minimize the manifestations of adjuvant arthritis (AA) in mice as an experimental model of rheumatoid arthritis (RA) in humans.

The following modern research methods were used in the work: cryopreservation, in vitro cultivation, flow cytofluorimetry, real-time PCR, immunomagnetic cell sorting, inverted and light microscopy.

A method of isolating MNCs from the bone marrow of 20-week-old SBA/H mice in a trasograph gradient was developed, which allows obtaining more than 40% of cells, among which 12% were CD14⁺ monocytes - DC precursors.

Were determined the conditions for obtaining DCs with tolerogenic properties from bone marrow MNCs by the method of in vitro cultivation in the presence of GM-CSF (20 ng/ml), IL-4 (5 ng/ml) and dexamethasone (0.4 µg/ml). This made possible to obtain 96% of cells - candidates for DC with a high level of viability (92%).

To confirm the immature tolerogenic phenotype of DCs obtained in culture, a panel of markers was selected for cytofluorimetric analysis.

It was established that the differentiation of monocytes into immature DCs is accompanied by the appearance of a marker characteristic for these cells - CD11b, the loss of the CD14 antigen and the minimization of the level of expression of costimulatory molecules CD80, CD86. It has been demonstrated that an important component of the pathogenesis of AA is the dysregulation of the function of the immune system (IS) against the background of an imbalance of the cytokine profile with a predominant increase in the content of pro-inflammatory cytokines (IL-6, TNF- α , IFN- γ) and dysfunction of the T-regulatory (Treg) link of immunity. Such changes were accompanied by an increase in clinical and laboratory indicators: the level of sialic acids, seromucoids, and the index of arthritis (IA).

The influence of different modes (P) of cryopreservation under the protection of 10% DMSO with a slow cooling rate was studied: 1 degree / min to - 80°C (P1); up to - 40°C (P2); to -25°C (P3) followed by immersion in liquid nitrogen (-196°C) in each case for the structural and functional properties of bone marrow MNC. It is shown that changing the conditions of cryopreservation can increase the tolerogenic potential of DCs obtained for immunotherapy.

For the first time, it was proved that cryopreservation of MNCs according to the developed regime (P2) in comparison with the generally accepted one (P1) provided the maximum indicators of their viability, metabolic activity, and the content of CD14⁺ - precursors of DCs, along with high expression of heat shock proteins Hsp70 - inducers of their tolerogenic activity.

Assessment of the functional potential of DCs obtained in vitro from cryopreserved MNCs according to P2 demonstrated their higher tolerogenic activity. It was confirmed that the increase in Hsp70 content in them contributed to the increase in the formation of T-regulatory cells (CD4⁺CD25⁺ and FOXP3⁺) and their functional potential due to the activation of the *foxp3* gene. This led to a decrease in

the clinical manifestation of autoimmune pathology in animals. Installed prolonged effect of immunotherapy with dendritic cells obtained from P2 cryopreserved MNCs.

The analysis of the content of CD4⁺CD25⁺ and FOXP3⁺ cells, the expression level of the *foxp3* gene and IA on the 7th and 14th day after the application of different types of tolDC showed that the improvement of the clinical status of animals with AA is more correlated with the content of FOXP3⁺ T-regulatory cells than with the expression level *foxp3* gene.

The demonstrated ability of tolDC obtained from cryopreserved MNCs to correct the disturbed cytokine profile with predominant stimulation of the production of anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-10), normalization of the clinical condition of animals with AA. A comparison of the degree of inhibition of pro-inflammatory and stimulation of anti-inflammatory cytokines after different types of tolDK therapy indicates their ability to realize multidirectional and varying degrees of activity in relation to these cytokines.

For the first time, the advantages of DCs from cryopreserved precursors, especially according to mode 2 in the manifestation of immunocorrective action compared to DCs obtained from native MNCs, were established. The results obtained in the work can be used by clinicians who master and implement the methods of cell-tissue therapy in the practice of treating AIZ, including RA. The presented material demonstrates the possibility of using ultra-low temperatures as a "tool" capable of directing the tolerogenic potential of DCs obtained from progenitor cells.

Key words: cryopreservation, cryoprotector, DMSO, ultra-low temperatures, mononuclear cells, dendritic cells, T-regulatory cells, Toll-like receptors, autoimmune diseases, cytokines, immunity.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації

Статті у фахових журналах, внесених у міжнародну базу Scopus i WOS

1. Goltsev AM, Yampolska KYe, **Kisielova HG**, Ostankov MV, Dubrava TG, Babenko NM, et al. Cryopreservation as Biotechnological Application of Dendritic Cells in Clinical Practice. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2021;31(4):289–303. DOI:[10.15407/cryo31.04.289](https://doi.org/10.15407/cryo31.04.289)
2. **Kysielova H**, Yampolska K, Dubrava T, Lutsenko O, Bondarovich M, Babenko N, et al. Improvement of bone marrow mononuclear cells cryopreservation methods to increase the efficiency of dendritic cell production. *Cryobiology*. 2022;106:122-30. DOI: [10.1016/j.cryobiol.2022.02.004](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2022.02.004)
3. Goltsev AM, **Kisielova HH**. . Justification of therapeutic efficacy of dendritic cells derived from cryopreserved precursors in an adjuvant arthritis model. *World of Medicine and Biology*. 2023; 2(84):197–202. DOI: [10.26724/2079-8334-2023-2-84-197-202](https://doi.org/10.26724/2079-8334-2023-2-84-197-202)
4. **Kisielova HG**, Dubrava TG, Goltsev AM, Heat Shock Proteins as Key Triggers to Form Cryopreserved Progenitors-Derived Tolerogenic Dendritic Cells. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2023; 33(2):144–149. DOI:[10.15407/cryo33.02.0](https://doi.org/10.15407/cryo33.02.0).
5. **Кісєльова ГГ**, Дубрава ТГ, Гольцев АМ. Порухений цитокіновий профіль при ад'ювантному артриті – терапевтична мішень для дендритних клітин, що отримані з кріоконсервованих попередників. *Innov Biosyst Bioeng*. 2023;7(3):32–43. DOI: [10.20535/ibb.2023.7.3.285432](https://doi.org/10.20535/ibb.2023.7.3.285432)

Глава в монографії за матеріалами дисертації

6. Гольцев АМ, Дубрава ТГ, Останков МВ, Ямпольська КЄ, **Кісєльова ГГ.**, Бабенко НМ, Гаєвська ЮО, Бондарович МО, Луценко ОД. Умови кріоконсервування визначають толерогенні властивості дендритних клітин для застосування їх в імунотерапії. В: Петренко О.Ю., редактор. Холод в біології та медицині: сучасний стан і перспективи. Київ: Наукова думка, 2023. С.204-212.

Корисна модель за матеріалами дисертації

7. Гольцев АМ, Останков МВ, Ямпольська КЄ, Дубрава ТГ, **Кісєльова ГГ**. Спосіб кріоконсервування моноклеарів кісткового мозку. Пат. України на корисну модель UA 149361, МПК A01N 1/02 (2006.01), G01N 1/42 (2006.01). Заявл. 08.06.2021 № и 202103139;. Заявник та патентовласник ІПКіК НАН України. опубл. 10.11.2021, Бюл. № 45.
<https://base.uipv.org/searchINV/search.php?action=viewdetails&IdClaim=278973>

Наукові праці які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

8. Гольцев АМ, Дубрава ТГ, Ямпольська КЄ, Останков МВ, Бабенко НМ, Гаєвська ЮО, Бондарович МО, **Кісєльова ГГ**. Кріоконсервування моноклеарів кісткового мозку з метою одержання *ex vivo* дендритних клітин для терапії аутоімунних захворювань. / Тези VIII Національного конгреса з патофізіології. Одеса, Україна, 13-15 травня 2020 р. – С.57.
9. Гольцев АМ, **Кісєльова ГГ**, Дубрава ТГ, Ямпольська КЄ. Особливості впливу кріоконсервування на структурні й функціональні характеристики моноклеарів кісткового мозку з метою одержання з них *ex vivo* дендритних клітин. / Тези Конф. мол. вчених. Харків, Україна, 19 травня 2020 р. Problems of Cryobiology and Cryomedicine 30 (3), 289.
10. Goltsev AM, Yampolska KYe, Dubrava TG, Ostankov MV, Babenko NM, Gaevska YuO, Bondarovych MO, **Kyselyova GG**. Implementation of tolerogenic potential of dendritic cells *ex vivo* obtained from cryopreserved bone marrow mononuclear cells. CRYO 2020 the 57th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, Chicago, USA P.10. 21-23 July 2020, Cryobiology. – 2020. December 2020, Vol. 97. – P.288.
11. Гольцев АМ, **Кісєльова ГГ**, Ямпольська КЄ, Дубрава ТГ, Луценко ОД. Дослідження клініко-діагностичних показників тварин з ад'ювантним артритом. Матеріали науково-практичної міжнародної дистанційної конференції «Сучасні досягнення та перспективи клінічної лабораторної медицини у діагностиці хвороб людини та тварин», Харків, 17 березня 2021 р., Т.2. – С.57-59.

12. **Кісельова ГГ**, Гольцев АМ, Дубрава ТГ, Ямпольська КЄ, Бабенко НМ, Гаєвська ЮО, Бондарович МО. Толерогенні дендритні клітини в імунотерапії ревматоїдного артриту. Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції Перші читання, присвячені Д.О.Альперну: «Актуальні питання патологічної фізіології» (до 150-річчя кафедри загальної та клінічної патофізіології імені Д.О.Альперна), 26 березня 2021, Харків, Україна С. 63.
13. Гольцев АМ, **Кісельова ГГ**, Дубрава ТГ, Ямпольська КЄ, Останков МВ, Луценко ОД, Бабенко НМ, Гаєвська ЮО, Бондарович МО. Відновлення цитокінового профілю у тварин з ад'ювантним артритом після застосування дендритних клітин. Збірник матеріалів VIII Національного конгресу патофізіологів України з міжнародною участю «Патологічна фізіологія – охороні здоров'я України» присвяченого 120-річчю Одеської патологічної школи, 6-8 жовтня 2021, Одеса, Україна. С.23.
14. Goltsev A, **Kysielova H**, Dubrava T, Lutsenko O, Ostankov M. The role of cryopreservation in the activation of tolerogenic activity of dendritic cells. Abstracts in person and virtual meeting of the Society for Cryobiology and the Society for Low Temperature Biology, July 19-22, 2022, Dublin, Ireland. // Cryobiology, 2022, Volume 109, P.64. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2022.11.206>.
15. **Кісельова ГГ**, Дубрава ТГ, Ямпольська КЄ, Бабенко НМ, Гаєвська ЮО, Бондарович МО, Останков МВ, Гольцев АМ. Роль білків теплового шоку у реалізації толерогенної активності дендритних клітин після кріоконсервування / Збірник тез Міжнародної наукової конф. студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» м.Львів, 6-7 жовтня 2022 р., С.123-124.
16. Гольцев АМ, Дубрава ТГ, Луценко ОД, Ямпольська КЄ, **Кісельова ГГ**, Бабенко НМ, Гаєвська ЮО, Бондарович МО, Останков МВ. Імунотерапія аутоімунних захворювань толерогенними дендритними клітинами, отриманими з кріоконсервованих попередників кісткового мозку / Збірник тез V науково-практичної internet-конференції з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їх фармакологічна корекція». 2022, 17 листопада, м. Харків. С.111-113.

17. Goltsev AM, Dubrava TG, **Kysielova HH**, Lutsenko OD, Ostankov MV, Bondarovych MO, Gaevska YO, Babenko NM. The role of hsp70 in the regulation of the tolerogenic potential of dendritic cells derived from cryopreserved progenitors of bone marrow origin. Abstract book of the 60th Annual Meeting of the Society for Cryobiology «CRYO2023». July 25-27th, 2023, Minneapolis USA. P.112.
18. Гольцев АМ, Дубрава ТГ, **Кісельова ГГ**, Луценко ОД, Останков МВ, Бабенко НМ, Гаєвська ЮО, Бондарович МО. Можливі механізми активації толерогенного потенціалу дендритних клітин під впливом кріоконсервування / Збірник тез III Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології», 2023, 24 березня, м. Харків. С.143-144.

ЗМІСТ

	Стор.
АНОТАЦІЯ.....	2
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	15
ВСТУП	17
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	27
1.1 Патогенез аутоімунних захворювань.....	27
1.1.1 Загальна характеристика.....	27
1.1.2. Імунопатогенез.....	30
1.2 Дендритні клітини і їхня роль в імунних процесах.....	33
1.2.1 Фенотипова та функціональна гетерогенність дендритних клітин.....	34
1.2.2 Одержання і визначення біомаркерів толерогенних дендритних клітин.....	41
1.2.3. Кріоконсервування як методологічний підхід спрямованого формування структурних та функціональних характеристик мононукліарів кісткового мозку з метою одержання з них <i>in vitro</i> дендритних клітин з толерогенним потенціалом.....	45
1.3 Сучасні підходи до терапії аутоімунних захворювань.....	52
1.3.1 Терапія аутоімунних захворювань на сьогоднішній день.....	52
1.3.2 Застосування толерогенних дендритних клітин як сучасний підхід формування імунотолерантності.....	54
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	57
2.1 Загальні положення.....	57
2.2 Експериментальні тварини.....	57
2.3 Виділення клітин кісткового мозку.....	58
2.4 Виділення мононуклеарів кісткового мозку.....	58
2.5 Кріоконсервування мононуклеарів кісткового мозку	58

2.6 Оцінка структурних та функціональних характеристик мононуклеарів після кріоконсервування.....	59
2.7 Отримання <i>in vitro</i> толерогенних дендритних клітин з кріоконсервованих мононуклеарів.....	60
2.8 Оцінка структурних та функціональних характеристик клітин, отриманих <i>in vitro</i> з нативних і кріоконсервованих мононуклеарів.....	61
2.9 Індукція ад'ювантного артриту.....	62
2.10 Визначення запальних медіаторів при ад'ювантному артриті.....	62
2.11 Введення толерогенних дендритних клітин, що вирощені з кріоконсервованих мононуклеарів, тваринам з ад'ювантним артритом...	62
2.12 Вміст цитокінів в сироватці крові тварин.....	63
2.13 Оцінка <i>in vitro</i> толерогенної функції дендритних клітин.....	63
2.14 Оцінка <i>in vivo</i> толерогенної функції дендритних клітин.....	64
2.15 Статистична обробка отриманих результатів.....	66
РОЗДІЛ 3 ОТРИМАННЯ <i>IN VITRO</i> ДЕНДРИТНИХ КЛІТИН	67
3.1 Відпрацювання умов отримання дендритних клітин з толерогенними властивостями з попередників кісткового мозку експериментальних тварин.....	67
3.2 Підтвердження толерогенної активності ДК, що вирощені в культурі з мононуклеарів кісткового мозку на моделі ад'ювантного артриту у мишей.....	71
3.2.1. Оцінка фенотипових ознак дендритних клітин отриманих з попередників кісткового мозку.....	71
3.2.2. Атестація вмісту Т-регуляторних клітин в селезінці тварин з ад'ювантним артритом після введення дендритних клітин.....	73
3.2.3. Порівняльний аналіз клініко-лабораторних показників: вмісту серомукоїдів, сіалової кислоти та індексу артриту.....	75
РОЗДІЛ 4 ДОСЛІДЖЕННЯ ОСОБЛИВОСТЕЙ ВПЛИВУ РІЗНИХ РЕЖИМІВ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ НА СТРУКТУРНІ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТОЛЕРОГЕННИХ	

ДЕНДРИТНИХ КЛІТИН, ЩО ОТРИМАНІ <i>IN VITRO</i> З КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ПОПЕРЕДНИКІВ КІСТКОВОГО МОЗКУ	79
4.1 Порівняльний аналіз впливу різних режимів кріоконсервування на структурні та функціональні показники моноклеарів кісткового мозку.....	79
4.1.1 Кількість клітин та їх схоронність.....	79
4.1.2 Метаболічна активність.....	81
4.1.3 Вміст білків теплового шоку.....	82
4.2 Оцінка структурних та функціональних характеристик дендритних клітин, що отримані з кріоконсервованих моноклеарів кісткового мозку	85
4.2.1 Фенотипові характеристики.....	85
4.2.2 Метаболічна активність.....	89
4.2.3 Вміст білків теплового шоку.....	90
4.2.4 Оцінка толерогенного потенціалу дендритних клітин за їх здатністю <i>in vitro</i> до індукції Т-регуляторних клітин (FOXP3 ⁺) у CD4 ⁺ - фракції спленоцитів мишей з ад'ювантним артритом.....	92
РОЗДІЛ 5 ДОСЛІДЖЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ЗАСТОСУВАННЯ ДЕНДРИТНИХ КЛІТИН, ОТРИМАНИХ З КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ПОПЕРЕДНИКІВ В МОДЕЛІ АД'ЮВАНТНОГО АРТРИТУ	96
5.1 Дослідження вмісту цитокінів у реципієнтів з ад'ювантним артритом після введення дендритних клітин	96
5.2 Визначення вмісту Т-регуляторних клітин і рівня експресії гену <i>foxp3</i> в них у реципієнтів з ад'ювантним артритом після застосування толерогенних дендритних клітин.....	104
УЗАГАЛЬНЕННЯ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.	110
ВИСНОВКИ.....	119
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	121
Додаток А.....	142
Додаток Б.....	146

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АА – ад’ювантний артрит

АІЗ – аутоімунні захворювання

АПК – антигенпрезентуючі клітини

БТШ (HSP) – білки теплового шоку

ГКГ-II (MHC-II) – головний комплекс гістосумісності II класу

ГМ-КСФ (GM-CSF) – гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор

Декс – дексаметазон

ДК – дендритні клітини

ЕТС – ембріональна теляча сироватка

ІДО (IDO) – індоламін-2,3-діоксигеназа

ІКК – імунокомпетентні клітини

ІЛ (IL) – інтерлейкін

ІС – імунна система

ІФН- γ – інтерферон- γ

КМ – кістковий мозок

КріоДК – кріоконсервовані дендритні клітини

КріоМНК – кріоконсервовані мононуклеарні клітини

КріоМОН – кріоконсервовані моноцити

ЛПС (LPS) – ліпополісахарід

МАТ – моноклональні антитіла

мДК – мієлоїдні дендритні клітини

М-КСФ (M-CSF) – макрофагальний колонієстимулюючий фактор

МНК – мононуклеарні клітини

ММП (MMP) – матриксні металопротеїнази

НатДК – нативні дендритні клітини

НатМНК – нативні мононуклеарні клітини

НатМОН – нативні моноцити

пДК – плазмоцитоїдні дендритні клітини

ПГЕ-2 (PGE-2) – простагландин E-2

РА – ревматоїдний артрит

СІФ – середня інтенсивність флуоресценції

ТКР (TCR) – Т-клітинний рецептор

толДК – толерогенні дендритні клітини

Трег (Treg) – Т-регуляторні клітини

ТРФ- β (TGF- β) – трансформуючий ростовий фактор – β

Тх (Th) – Т-хелпер

ФНП- α (TNF- α) – фактор некроза пухлини – α

GILZ – глюкокортикоїд-індукована лейцинова застібка

PI – прорідій йодід

FOXP3 – forkhead box protein 3

foxp3 – ген, що відповідає за супресорну функцію Трег

NF- κ B, NFAT, AP-1 – нуклеарні фактори

TLR – tool-like rceptor

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження

Проблема лікування аутоімунних захворювань (АІЗ) і, зокрема ревматоїдного артриту (РА), залишається однією з найбільш актуальних. Незважаючи на багатовекторність досліджень з визначення причин, механізмів розвитку і лікування РА, багато питань залишається не до кінця з'ясованими. Загальна імуносупресія під дією фармакологічних препаратів хоча і запобігає прогресуванню захворювань, однак супроводжується високим ризиком розвитку онкологічних та інфекційних ускладнень [1; 2]. Тому, останнім часом спостерігається інтенсивне розширення спектра препаратів для клітинної та тканинної терапії патологій аутоімунного генезу.

Одна з терапевтичних стратегій лікування АІЗ базується на відновленні імунної толерантності шляхом введення аутологічних дендритних клітин з толерогенною функцією (толДК), генерованих *in vitro* [3; 4]. Найчастіше в клінічних дослідженнях використовують протокол одержання незрілих ДК шляхом диференціювання моноклеарів або моноцитів, виділених з периферичної крові, в присутності GM-CSF і IL-4 протягом 5-7 днів [5; 6]. При цьому використовують різні концентрації GM-CSF і IL-4 без досить обґрунтованої аргументації, що свідчить про різний діапазон їх активності. Важливо, що використання широкого спектра ростових факторів для диференціювання ДК може приводити до одержання різних за фенотипом і функцією субпопуляцій ДК. Тому необхідність досліджень по оптимізації умов виділення й культивування МНК, з метою формування незрілих ДК *in vitro* і оцінка їх фенотипічної приналежності є актуальним.

Імунотерапія ДК не одержала широкого використання в клінічній практиці насамперед через відсутність стандартних протоколів одержання і контролю якості терапевтичних препаратів на їх основі [7]. Однак результати експериментальних і пілотних клінічних досліджень свідчать про високий

імунотерапевтичний потенціал вирощених *in vitro* толДК в терапії АІЗ. Вони реалізують свою толерогенну функцію через стимуляцію Т-регуляторної (Трег) ланки імунітету, дисфункція якої спостерігається в умовах розвитку АІЗ [8; 9]. Важливою складовою патогенезу АІЗ і, зокрема РА, є також дисрегуляція функції імунної системи на тлі розбалансування цитокінового профілю з підвищенням вмісту прозапальних цитокінів [10], що потребує корегування. Отже, з огляду на дані проблеми, перспективним напрямком є відновлення імунної толерантності за допомогою аутологічних ДК.

Вдосконалення методик одержання *in vitro* толДК, визначення їх надійних біомаркерів та способів підвищення толерогенного потенціалу є однією з найважливіх складових імунотерапевтичних підходів до лікування патологій аутоімунного генезу.

Відомо, що ДК представляють мінорну клітинну популяцію мононуклеарів (МНК) та є професійними антигенпрезентуючими клітинами кістковомозкового походження. Необхідність застосування толДК у терапії АІЗ потребує розробки ефективних способів їх кріоконсервування. Толерогенні ДК дуже вразливі до дії факторів кріоконсервування, що і обумовило пошук більш стійких до його впливу клітин, з яких можливо *in vitro* отримувати ДК. Основними джерелами одержання ДК є мононуклеарні клітини (МНК), а також моноцити периферичної крові або кісткового мозку [11]. Актуальним є пошук адекватних способів їх заморожування для отримання з них функціонально повноцінних ДК з толерогенним потенціалом. Тому, визначення характеру кріовпливу на функціональні властивості ДК, а саме: їх толерогенну функцію за здатністю до стимулювання Трег і відновлення цитокінового профілю в організмі з аутоімунною патологією, є необхідним і обґрунтованим завданням.

Відомо, що за умов кріоконсервування в різний спосіб змінюються як структурні характеристики, так і функціональний потенціал клітин і тканин, що може впливати на ефективність їх застосування в терапевтичних цілях [12; 13]. Дендритні клітини не є винятком. Існують всі підстави вважати, що кріоконсервування може виступати в ролі індукційного фактора набуття ДК

толерогенного потенціалу. Згідно з даними літератури, кріоконсервування індукує незрілий фенотип ДК, обмежуючи можливість їх дозрівання як за рахунок шедінга, так і зниження рівня експресії TLR4 і, можливо, інших в умовах інтегральної інгібіції метаболічних процесів в клітинах після їхнього розморожування [11; 14; 13; 15].

Так, від умов кріоконсервування може залежати зміна рецепторного репертуару ДК, які формуються *in vitro* з МНК кісткового мозку. Особлива увага в зміні функціонального стану клітин після кріоконсервування звертається на білки теплового шоку (БТШ), зокрема сімейства Hsp70, яким відводиться роль активаторів протизапального процесу [16; 17]. У роботах [17; 18] підтверджено, що Hsp70 має потужні протизапальні функції: інгібує відповіді Т-клітин, затримує процес дозрівання ДК та індукує розвиток імуносупресивних регуляторних Т-клітин. Але ця активність була також пов'язана з механізмом ухилення пухлин від імунної відповіді та залучена до модуляції імунної реактивності при деяких аутоімунних захворюваннях та клінічних станах, пов'язаних з трансплантацією [18; 17]. Отже, роль Hsp70 в імунному регулюванні неоднозначна і вимагає подальшого вивчення.

Оцінка вмісту БТШ, а саме Hsp70 [16] в ДК, отриманих *in vitro* з МНК кріоконсервованих за різними режимами, є показовими для підтвердження їхньої здатності до стимулювання Трег-клітин і відновлення цитокінового профілю при імунотерапії АІЗ, зокрема ад'ювантного артриту (АА) – експериментального аналогу РА у людини. Проте механізм, що забезпечує прояв незрілого фенотипу й толерогенної функції ДК під дією кріоконсервування, до кінця не з'ясований і потребує експериментального підтвердження.

Зв'язок з науковими програмами, планами, темами.

Дисертація виконана у відділі кріопатофізіології і імунології Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (ІПКіК НАН України) в рамках НДР: «Вивчення молекулярних механізмів толерогенної активності

кріоконсервованих дендритних клітин за їх адаптивного застосування» (шифр – 2.2.6.116, № державної реєстрації – 0117U000852, 2017-2021, науковий керівник НДР - к.б.н., пров.н.с. Дубрава Т.Г.); «Вивчення механізмів активації толерогенної активності дендритних клітин під впливом кріоконсервування і компонентів кордової крові (шифр – 2.2.6.144, № державної реєстрації – 0121U113326, 2022-2026, науковий керівник НДР к.б.н., пров.н.с. Дубрава Т.Г.).

Мета і завдання дослідження

Мета роботи — вивчення особливостей впливу кріоконсервування за різними режимами на структурні і функціональні характеристики мононуклеарів кісткового мозку та дендритних клітин, отриманих з них *in vitro*, з подальшою оцінкою їх толерогенного потенціалу на експериментальній моделі ад'ювантного артриту.

Відповідно до поставленої мети передбачалося вирішити такі **завдання**:

1. Відпрацювати умови отримання дендритних клітин з толерогенними властивостями з попередників кісткового мозку експериментальних тварин;
2. Підтвердити толерогенну активність дендритних клітин, що вирощені в культурі з мононуклеарів кісткового мозку на моделі ад'ювантного артриту у мишей;
3. Провести порівняльний аналіз впливу різних режимів кріоконсервування на структурні та функціональні показники мононуклеарів кісткового мозку;
4. Оцінити структурні та функціональні характеристики дендритних клітин, що отримані з кріоконсервованих мононуклеарів кісткового мозку;
5. Дослідити вміст цитокінів у реципієнтів з ад'ювантним артритом до і після введення толерогенних дендритних клітин, отриманих з кріоконсервованих за різними режимами попередників кісткового мозку;
6. Визначити вміст Т-регуляторних клітин і рівня експресії гену *foxp3* в них у реципієнтів з ад'ювантним артритом до і після застосування толерогенних ДК, вирощених з кріоконсервованих за різними режимами попередників кісткового мозку.

Об'єкт дослідження — мононуклеарні клітини кісткового мозку до і після кріоконсервування та дендритні клітини, отримані з них *in vitro*.

Предмет дослідження — структурні характеристики та функціональні властивості мононуклеарних клітин кісткового мозку після кріоконсервування і дендритних клітин, що отримані з них *in vitro*.

Методи дослідження. У роботі було використано наступні сучасні методи досліджень: кріоконсервування, культивування *in vitro*, МТТ-тест, проточна цитофлуориметрія, ПЛР в реальному часі, імуномагнітне сортування клітин, інвертована та світлова мікроскопія.

Наукова новизна отриманих результатів

Вперше продемонстровано, що різні режими кріоконсервування мононуклеарів кісткового мозку під захистом 10% ДМСО з повільною швидкістю охолодження 1 град / хв: а) до - 80 ° – Р1; б) до - 40 ° – Р2; в) до - 25 °С – Р3 з наступним зануренням у кожному випадку в рідкий азот (-196 °С), в різний ступінь збільшують здатність мононуклеарів формувати *in vitro* толерогенні дендритні клітини, що використовуються в імунотерапії ад'ювантного артриту. Доведено, що розроблений в роботі метод кріоконсервування мононуклеарів за режимом Р2 забезпечував максимальні показники їх життєздатності, метаболічної активності, та вмісту CD14⁺ - попередників дендритних клітин у порівнянні з загальноприйнятим режимом кріоконсервування (Р1). Вперше встановлено, що стимулювання толерогенної активності дендритних клітин, отриманих *in vitro* з кріоконсервованих мононуклеарів за Р2 визначається підвищеним вмістом цитозольних Hsp70. Виконана робота і отримані в ній результати підкреслюють ефективність застосування толерогенних дендритних клітин отриманих з кріоконсервованих попередників, особливо за режимом Р2, в лікуванні ад'ювантного артриту як експериментальної моделі ревматоїдного артриту у людини. Вперше встановлено переваги застосування кріоконсервованих толерогенних дендритних клітин в порівнянні з нативними в корекції стану Т-регуляторних

клітин, а також розбалансованого цитокінового профілю зі значним підвищенням рівня протизапальних цитокінів у тварин з ад'ювантним артритом, що сприяло нормалізації показників їх клінічного стану. Представлений матеріал демонструє можливість використання ультранизьких температур як «інструмента», що здатний спрямовано керувати толерогенним потенціалом дендритних клітин, отриманих з клітин-попередників.

Практичне значення отриманих результатів

Вивчення в експериментальних дослідженнях на клітинному і молекулярному рівнях механізмів, які формують і забезпечують підвищення толерогенної активності дендритних клітин за рахунок застосування оригінальних підходів кріоконсервування їх попередників, буде сприяти створенню принципово нових і покращенню існуючих у клінічній імунології підходів до лікування аутоімунних захворювань.

Особистий внесок здобувача

Здобувачем самостійно проведено патентний та інформаційний пошук, проаналізовано джерела літератури за темою дисертаційної роботи, написано всі розділи дисертації. За допомогою наукового керівника здобувачем визначено мету й завдання роботи. Автором особисто отримано експериментальні результати, проведено їх аналіз, статистичну обробку та зроблено попередні висновки. Спільно з науковим керівником були інтерпретовані результати та зроблені остаточні висновки.

Здобувачем спільно з к.б.н. Коваленком І. Г. за допомогою світлового мікроскопа (Axio Observer Z1, Zeiss) проведено фотодокументацію отримання *in vitro* дендритних клітин з нативних та кріоконсервованих за різними режимами мононуклеарів кісткового мозку.

Спільно з к.б.н. Zubovim П.М. на проточному цитофлуориметрі «FACS Calibur» було оцінено вміст CD14⁺-попередників дендритних клітин, вміст білків теплового шоку hsp70 в складі мононуклеарів кісткового мозку до та після кріоконсервування та дендритних клітинах, отриманих з них;

приналежність дендритних клітин до толерогенних за характерними фенотиповими маркерами (CD11b, CD80, CD86) та Т-регуляторних клітин ($CD4^+CD25^+$, $FOXP3^+$) в селезінці мишей до та після ДК-терапії.

Спільно з к.б.н Луценко О.Д. методом ЗТ-ПЛР було оцінено вміст транскриптів гена *foxp3* в клітинах селезінки тварин з АА після введення толерогенних дендритних клітин.

В опублікованих у співавторстві роботах особистий внесок здобувача полягає:

Goltsev AM, Yampolska KYe, Kisielova HH, Ostankov MV, Dubrava TG, Babenko NM, et al. Cryopreservation as Biotechnological Application of Dendritic Cells in Clinical Practice. *Problems Cryobiol Cryomed.* 2021;31(4):289–303. DOI:[10.15407/cryo31.04.289](https://doi.org/10.15407/cryo31.04.289). (Видання включене до бази Scopus; здобувач брав участь у написанні, обговоренні та підготовці оглядової статті до друку).

Kysielova H, Yampolska K, Dubrava T, Lutsenko O, Bondarovich M, Babenko N, et al. Improvement of bone marrow mononuclear cells cryopreservation methods to increase the efficiency of dendritic cell production. *Cryobiology.* 2022;106:122-30. DOI: [10.1016/j.cryobiol.2022.02.004](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2022.02.004). (Видання включене до бази Scopus; здобувач проводив експерименти з порівняльної оцінки морфофункціональних властивостей мононуклеарів кісткового мозку до та після кріоконсервування за різними режимами за кількістю, життєздатністю, метаболічною активністю, вмістом $CD14^+$ -, $hsp70^+$ -клітин одразу після розморожування, та після культивування з індукторами дендритних клітин; провів оцінку фенотипових маркерів дендритних клітин, отриманих в культурі та їх толерогенної функції за стимуляцією формування Т-регуляторних клітин; здійснював статистичну обробку результатів і підготовку матеріалів до друку).

Гольцев А.М., Дубрава Т.Г., Останков М.В., Ямпольська К.Є., Кісельова Г.Г., Бабенко Н.М., Гаєвська Ю.О., Бондарович М.О., Луценко О.Д. Умови кріоконсервування визначають толерогенні властивості дендритних клітин для застосування їх в імунотерапії. В: Петренко О.Ю., редактор. Холод в біології та медицині: сучасний стан і перспективи. Київ: Наукова думка, 2023. С.204-212.

(Здобувач провів експерименти з визначення життєздатності, метаболічної активності, вмісту CD14⁺-, hsp70⁺-клітин серед моноклеарів кісткового відразу після розморожування, та після культивування з індукторами дендритних клітин; провів оцінку фенотипових маркерів дендритних клітин, отриманих в культурі; здійснював статистичну обробку результатів, і підготовку матеріалів до друку).

A.M. Goltsev, H.H. Kisielova. Justification of therapeutic efficacy of dendritic cells derived from cryopreserved precursors in an adjuvant arthritis model. *World of Medicine and Biology*. 2023; 2(84):197–202. DOI: 10.26724/2079-8334-2023-2-84-197-202. (Видання включене до бази WOS; здобувач проводив експерименти з оцінки толерогенної функції дендритних клітин отриманих з кріоконсервованих за різними режимами моноклеарів кісткового мозку за стимуляцією формування Т-регуляторних клітин в селезінці реципієнтів з ад'ювантним артритом; визначив рівень експресії гена *foxp3* в Т-регуляторних клітинах; здійснював статистичну обробку результатів, брав участь в обговоренні і узагальненні результатів, підготовці матеріалів до друку).

Kisielova HG, Dubrava TG, Goltsev AM, Heat Shock Proteins as Key Triggers to Form Cryopreserved Progenitors-Derived Tolerogenic Dendritic Cells. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2023; 33(2):144–149. DOI:10.15407/cryo33.02.0. (Видання включене до бази Scopus; здобувач оцінив вміст білків теплового шоку в кріоконсервованих за різними режимами моноклеарах кісткового мозку і дендритних клітинах, вирощених з них, провів атестацію вмісту про- і протизапальних цитокінів в сироватці крові тварин з ад'ювантним артритом після введення дендритних клітин отриманих з кріоконсервованих попередників кісткового мозку; здійснював статистичну обробку результатів і підготовку матеріалів до друку).

Кісельова Г.Г., Дубрава Т.Г., Гольцев А.М.. Порухений цитокіновий профіль при ад'ювантному артриті – терапевтична мішень для дендритних клітин, що отримані з кріоконсервованих попередників. *Innov Biosyst Bioeng*. 2023;7(3):32–43. DOI: 10.20535/ibb.2023.7.3.285432 (Видання включене до бази Scopus;

здобувач проводив експерименти з оцінки вмісту про- і протизапальних цитокінів в сироватці крові тварин з а'дювантним артритом після введення дендритних клітин отриманих з кріоконсервованих попередників кісткового мозку; оцінив клініко-лабораторні показники у тварин з патологією та індекс артриту після імунотерапії дендритними клітинами; здійснював статистичну обробку результатів і підготовку матеріалів до друку).

Апробація матеріалів дисертації.

Результати дисертаційної роботи були представлені на наукових форумах: VIII Національному конгресі з патофізіології (Одеса, Україна, 2020); науково-практичної конференції молодих вчених за участю міжнародних спеціалістів, присвяченої Дню науки, «Сучасна медицина очима молоді: проблеми і перспективи вирішення» (Харків, Україна, 2020); CRYO 2020 the 57th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, (Chicago, USA, 2020); науково-практичної міжнародної дистанційної конференції «Сучасні досягнення та перспективи клінічної лабораторної медицини у діагностиці хвороб людини та тварин» (Харків, Україна, 2021); Всеукраїнської науково-практичної конференції «Актуальні питання патологічної фізіології» до 150-річчя кафедри загальної та клінічної патофізіології імені Д.О.Альперна (Харків, Україна, 2021); VIII Національному конгресі патофізіологів України з міжнародною участю «Патологічна фізіологія – охороні здоров'я України» присвяченого 120-річчю Одеської патологічної школи (Одеса, Україна, 2021); Virtual meeting of the Society for Cryobiology and the Society for Low Temperature Biology, (Dublin, Ireland, 2022); Міжнародної наукової конф. студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, Україна, 2022); V науково-практичної internet-конференції з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їх фармакологічна корекція» (Харків, Україна, 2022); III Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології» (Харків, Україна, 2023); the 60th Annual Meeting of the Society for Cryobiology «CRYO2023» (Minneapolis, USA, 2023).

Публікації.

За матеріалами дисертації опубліковано 18 робіт, з них статі, внесені у міжнародну базу Scopus та WOS – 5; глава в монографії за тематикою дисертаційного дослідження – 1; патент на корисну модель – 1; тези у матеріалах науково-практичних конференцій та конгресів – 11.

Структура та обсяг дисертації.

Дисертація викладена на 147 сторінках друкованого тексту й складається з таких розділів: анотація, вступ, огляд літератури, матеріали та методи, три розділи результатів досліджень, узагальнення та обговорення результатів, висновки, список використаних джерел, додатки. Список використаних джерел включає 167 найменувань, розміщених на 20 сторінках. Робота проілюстрована 23 рисунками, 2 фотографіями та 7 таблицями.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Патогенез аутоімунних захворювань

1.1.1 Загальна характеристика

Аутоімунні захворювання (АІЗ) є органоспецифічними і системними захворюваннями, етіопатогенез яких до теперішнього часу залишається до кінця не з'ясованим. Взагалі, він пов'язаний з активацією відповіді субстратів імунної системи (ІС) на антигени власних тканин організму. У розвитку АІЗ рівнозначна роль як генетичної схильності, так і факторів зовнішнього середовища,

Про точні причини розвитку АІЗ немає однозначної відповіді, однак, відомо, що найчастіше хворіють жінки; має значення сімейний анамнез – багато АІЗ найчастіше вражають членів однієї сім'ї; деякі патології можуть передаватися у спадок, наприклад, вовчак; у людей із надмірною масою тіла та ожирінням підвищений ризик розвитку ревматоїдного та псоріатичного артрити; шкідливі звички та фактори зовнішнього середовища підвищують ризик розвитку вовчаку, ревматоїдного артрити, гіпертиреозу, розсіяного склерозу, деякі антибіотики та засоби для зниження артеріального тиску можуть призводити до вовчаку, а препарати для зниження рівня холестерину в крові, за деякими даними, здатні стати причиною міозиту – рідкісної хвороби, що виявляється у вигляді м'язової слабкості [19;12]. Все це свідчить про складну взаємодію між генетичною сприйнятливістю та зовнішніми впливами у розвитку АІЗ. В останній час обговорюється ймовірність того, що стрес і розлади, пов'язані зі стресом, можуть викликати АІЗ [20]. Передбачається, що гормони нейроендокринної ланки, які запускаються стресом, призводять до порушення стану імунітету, що зрештою призводить до АІЗ шляхом зміни продукції цитокінів [21].

Локалізація патологічного процесу лежить в основі класифікації АІЗ. Спираючись на це, вони розділяються на: органоспецифічні, коли аутоантитіла синтезуються до антигенів одного органа (гемоцитопенії, атрофічний гастрит, тиреоїдит, ендокринопатії; органонеспецифічні (ревматоїдний артрит, системний червоний вовчак); проміжні, для яких характерні обидві ознаки [22].

Класичними гіпотезами патогенезу АІЗ вважаються існування молекулярної мімікрії, обумовленої наявністю аналогічних епітопів чужорідних і власних антигенів, поліклональна активація Т- і В-лімфоцитів на бактеріальні полісахариди, віруси, ад'ювантний ефект мікрооточення [15], дефекти механізмів супресії [23], «зрив» імунної толерантності [10]. Актуальною є концепція порушення презентації власних антигенів Т-клітинам у результаті аберантної експресії молекул МНС класу II в умовах запалення *in situ* [24]. Одна з гіпотез механізму розвитку АІЗ — поширення спектру імуногенних епітопів внаслідок модифікації четвертинної структури власних білків організму на тлі формування активних форм кисню, обумовленого хронізацією запалення, «цитокіновим штормом» [25]. В теперешній час приділяється увага та інтенсивно досліджуються порушення епігенетичної регуляції транскрипції генів у клітинах при АІЗ [26]. Вивчається роль сигнального медіатора — запального Cold-inducible RNA-binding protein [27], який з'являється при різних стресових впливах, виконуючи функцію шаперону у забезпеченні трансляції білків.

До механізмів індукції аутоімунної відповіді (аутосенсibilізації) відносять утворення аутоантигенів, виникнення чи депресія клонів Т- і В-лімфоцитів, що несуть рецептори до детермінант власних тканин, експансія в організмі мікробів та інших паразитів, до складу яких входять перехресно реагуючі антигени [28]. Ушкодження, індуковані екзоалергенами (гіперчутливість термінового типу, гіперчутливість уповільненого типу), аналогічні механізмам імунного ушкодження тканин. Тож, можна вважати, усі клітини і тканини за відповідних умов можуть стати мішенню для аутоантитіл або сенсibilізованих лімфоцитів.

Клінічна картина АІЗ залежить від різноманітних механізмів індукції аутоімунної відповіді та механізмів імунного ушкодження і визначають різноманітність та труднощі при їх диференціації від патологій іншої природи. Аутоімунний патогенез встановлено або передбачається при значній кількості захворювань крові, внутрішніх органів, сполучної тканини (колагенози), при офтальмії, тиреоїдиті Хашимото, енцефаломієліті, розсіяному склерозі, гемолітичній анемії, гломерулонефриті, гепатиті [22]. До АІЗ відносять також системний червоний вовчак, хворобу Аддисона, хворобу Крона, міастенію гравіс, неспецифічний коліт, інсулінорезистентну форму діабету тощо.

Одним з найбільш агресивних АІЗ є ревматоїдний артрит (РА). Ревматоїдний артрит є системним аутоімунним захворюванням, етіологія якого залишається мало відомою, а його поширеність досягає 1% серед населення Землі. В основі патогенезу РА лежить хронічне запалення суглобів, характерною особливістю якого є формування пухлиноподібної гіперплазії синовіальної оболонки - пануса, що призводить до руйнування структур суглобів [29]. Запалення синовіальної оболонки лежить в основі кардинальних проявів цього захворювання, до яких відносяться: біль, набряк і хворобливість із наступною деструкцією хряща, ерозією кістки й деформацією суглоба. Крім того, у розвиток РА залучаються процеси за участю каскаду патогенетичних змін, які ще більше обтяжують перебіг хвороби [30]. Дійсно, аутоімунний стан часто передуює розвитку клінічних симптомів, у результаті чого спостерігається повільна еволюція захворювання.

Хоча етіологія РА невідома, результати багатьох досліджень дозволяють припустити, що як і у більшості АІЗ умови навколишнього середовища й генетичні фактори залучені в його розвиток,. У роботі Яременко О. Б. вказується [31], що це захворювання розвивається в генетично схильних осіб під дією різних зовнішніх або внутрішніх впливів - вірусної або бактеріальної інфекції, травми, психо-емоційного стресу, медикаментозного втручання, вікової гормональної перебудови тощо. Існує думка, що сигаретний дим, продукти життєдіяльності бактерій, вірусні компоненти й інші екологічні

стимули можуть сприяти розвитку РА. Клітини вродженого імунітету в осіб генетично схильних до розвитку аутоагресії експресують Fc-рецептори, які розпізнають бактеріальні антигени, що сприяє розвитку швидкої запальної відповіді [32].

При розвитку РА відбуваються постійні зміни певних субпопуляцій імунокомпетентних клітин (ІКК), що може прискорювати руйнування суглобів. Особливості експресії деяких генів, у тому числі антигенів II класу головного комплексу гістосумісності (МНС), цитокінового промотору поліморфізму тощо беруть участь у розвитку РА [33]. Як вже згадувалося вище, установленний факт родинної схильності до АІЗ. У близьких родичей хворих на РА захворювання розбудовується в 3-8% випадків, що в кілька разів вище, ніж у загальній популяції [34]. Вважається, що генетичний внесок в етіологію РА відносно незначний – у межах 15-30% [31]. Отже, якщо в генетично схильного індивідуума порушується регуляція імунної відповіді, це може виявитися в «затримці» завершення гострого запального процесу в суглобах (клінічно явного або схованого). Гостре запалення трансформується в хронічне, яке надалі протікає по аутоімунним механізмам. У суб'єктів, генетично схильних до РА, патологічний процес на тлі нормальної регуляції ІС може закінчитися повним одужанням [31].

1.1.2. Імунопатогенез

Численні дані підтверджують активну роль зрілих ІКК у підтримці запалення у хворих на АІЗ. Це стосується макрофагів, які виявляють стійкість до апоптозу, сприяючи тим самим подовженню імунозапального процесу [35], натуральних клітин-кілерів — $CD16^+$, $CD56^+$, що продукують підвищені рівні ІЛ-22 і ФНО α в синовіальній рідині пацієнтів з РА [36], $CD16/32^+$ -клітин, які залучені до хронізації захворювання у тварин в моделі ад'ювантного артриту (АА) аналога РА у людини [37]. Відомо, що під час розвитку АІЗ порушується функціональний стан гемопоетичних стовбурових клітин [38]. У кістковому мозку тварин з АА відбувається перерозподіл субпопуляційного складу

гемопоетичних попередників різного ступеня диференціювання в бік підвищення вмісту більш патентних [38; 40]. Слід підкреслити можливість посилення згаданих відхилень у стані гемо- та імунопрофілю організму при АІЗ в умовах важкого навантаження на організм.

Ідентифікація біомаркерів є актуальним сучасним напрямком вивчення етіопатогенеза АІЗ. Окрім уже відомих антитіл до циклічного пептиду, що містить цитрулін (АСРА), у сироватці крові хворих на РА виявлені антитіла до карбамільованих білків, які мають вищу специфічність порівняно з АСРА [41]. Встановлено, що N-глікани IgG у сироватці крові людини пов'язані з прозапальною активністю антитіл [42].

Імунопатогенез, зокрема РА можна розділити на п'ять стадій.

Перша стадія - невідомий етіологічний агент, імовірно із кровотоку, проникає в суглоб, з'являється гіперемія й набряк субсиновіальної тканини. Починається периваскулярна інфільтрація синовіальної тканини запальними клітинами, синтез і секреція запальних цитокінів. Клінічно стадія проявляється набряком суглоба й почервонінням шкіри над ним.

Друга стадія - медіаторна, коли клітини виділяють білки, які підтримують запальний процес [28]. Медіатори запалення такі, як матриксні металопротеїнази (ММР) і молекули клітинної адгезії, цитокіни, такі, як фактор некрозу пухлини-альфа (ФНП- α) і інтерлейкин-1 (ІЛ-1), приводять до деструкції суглобів у пацієнтів з РА [43]. Активовані макрофаги продукують простагландіни, колагеназу тощо. Спостерігається стимуляція синовіальними фібробластами продукції активатора плазміногена.

Третя стадія - лімфоїдна, для якої характерно підвищення синтезу ауто-антитіл, утворення лімфоїдних фолікулів, гіперпродукція протеолітичних ферментів і імунних комплексів, які фагоцитуються нейтрофілами.

Четверта стадія - агресивна, коли відбувається активна проліферація фібробластів, деградація суглобного хряща й розростання ревматоїдного пануса.

П'ята стадія - деструктивна, коли запальний панус проникає в кістку під хрящем. Фібозна грануляційна тканина заміщує хрящ і кістку, що призводить до порушення рухливості суглоба. Остеопороз, підвивих і зміни в суглобі через тиск синовіальної рідини визначають клінічну картину його деформації [28].

Істотним проривом для розуміння імунопатогенезу АІЗ стало визначення ролі регуляторних Т-клітин (Трег) у підтримці толерантності [44]. Ці клітини продукують протизапальні фактори та цитокіни (ІЛ-10, ІЛ-35, ТРФ- β , galectin-1), або здійснюють пряму цитотоксичну дію шляхом продукції гранзиму В і перфоринів [45]. Важливою структурно-функціональною ознакою Трег є експресія на мембрані клітини кластера CD25 який є рецептором ІЛ-2, що дозволяє Трег зв'язувати ІЛ-2. По-перше, це знижує рівень цього запального медіатора, по-друге, взаємодія ІЛ-2 з CD25 на Т-клітинах індукує експресію в них білка Foxp3, за допомогою якого саме і формуються клітини з протизапальним профілем, тобто — Трег [44; 46; 47]. Для багатьох АІЗ людини, та їх експериментальних моделей у тварин, характерне зниження кількості Трег та/або їх супресорної функції [48; 47].

Рівень супресорної активності Трег у значній мірі визначається експресією гена транскрипційного фактора forkhead box protein 3 (Foxp3), яка необхідна для нормального функціонування й розвитку Трег [49]. Foxp3 належить до великої родини функціонально різних факторів транскрипції й має ДНК-з'єднальну область (fork-head box – Fox). Зв'язуючись із ДНК, Foxp3 діє як репресор транскрипції, виступаючи антагоністом функції NFAT (nuclear factor of activated T-cells) за рахунок конкуренції за місця зв'язування із ДНК. У результаті Foxp3 інгібує продукцію прозапальних цитокінів. Була показана висока експресія Foxp3 в CD25⁺CD4⁺ Трег і низька – в інших Т-клітинах. Розвиток Трег-клітин критично залежить від експресії Foxp3. Менш 10% CD25⁺CD4⁺ Т-клітин експресують Foxp3 і відповідають на стимуляцію через TCR експресією CD25 і Foxp3^{hi}, здобуваючи активність Трег-клітин. Але їх походження й зв'язок з CD25⁺ Трег-клітинами не вивчені. Таким чином, був відкритий спеціальний генетичний механізм домінантної толерантності,

опосередкованої білком FOXP3, що захищає організм від АІЗ і хронічних інфекцій [49].

Отже, у хворих на РА спостерігається зниження кількості супресорних клітин з активною експресією гена Foxp3 [23; 50]. Одним з механізмів, цього процесу, може бути порушення балансу продукції про- і протизапальних цитокінів. Так, наприклад, відомо, що при РА спостерігається підвищення вмісту прозапальних: ФНП- α , ІЛ-6, ІЛ-1 β , ІЛ-17 і зниження - протизапальних цитокінів: ІЛ-10, ІЛ-4 та інші [51; 10]. Необмежена продукція запального ІЛ-17 Th17-клітинами спонукає розвитку таких АІЗ як розсіяний склероз, хвороби кишечника, РА, системний червоний вовчак та інших [52]. Згідно з літературними даними [53], прозапальний цитокін ФНП- α здатний стимулювати продукцію іншого фактора запалення – ІЛ-6. Він бере участь у регуляції балансу субпопуляцій — Th17 та Трег, які виявляють різнонаправлений ефект на процеси запалення і відіграють важливу роль, як в ініціації, так і в підтримці розвитку АІЗ [51]. Збільшення кількості Th17-клітин сприяє посиленню аутоімунного процесу. Трег виявляють супресорний вплив на підвищену активність Th17-клітин і, отже, на запалення [51]. Показане, що ІЛ-6 разом з ТГФ- β стимулює генерацію прозапальних Th17 і виявляє інгібуючий вплив на диференціювання Трег. Причому основний механізм дії ІЛ-6 на цей процес – супресія транскрипційної активності гена Foxp3 [53].

Підвищений вміст зазначених інтерлейкінів сприяє зниженню рівня протизапальних цитокінів, зокрема ІЛ-10 [10]. Тому слід очікувати, що зниження рівня прозапальних цитокінів може сприяти відновленню супресорної функції Трег. Треба зазначити, що роботи, у яких показаний зв'язок зміни цитокінового статусу з відновленням супресорної функції цих клітин, нечисленні, а молекулярні механізми корекції патологічного процесу при РА до кінця не з'ясовані.

1.2 Дендритні клітини і їхня роль в імунних процесах

1.2.1 Фенотипова та функціональна гетерогенність дендритних клітин

На початку 1960-х років стало зрозумілим, що макрофаги не є єдиним типом антигенпрезентуючих клітин (АПК). У 1973 р. Р. Стайнман (R. M. Steinman) і З. Кон (Z. A. Cohn) описали «деревовидні клітини» в периферичних лімфоїдних органах миші та назвали їх дендритними [54]. На сьогодні дендритні клітини (ДК) вважаються «професійними» АПК, які запускають адаптивну імунну відповідь та її інтеграцію з вродженим імунітетом. Основна функція ДК полягає в поглинанні патологічних субстратів, їхньому перетравленні і презентації антигенних пептидів з цих субстратів на власній поверхні в комплексі з молекулами головного комплексу гістосумісності I і II класу (МНС-I і МНС-II). У такому вигляді антигени розпізнаються Т-лімфоцитами за допомогою Т-клітинного рецептора (TCR) і наявністю коstimуляторних і адгезивних молекул (CD80, CD86, CD40) на поверхні клітин. За умови наявності різних цитокінів формуються типи імунної відповіді: ІЛ-12, ІФН γ - Th1 відповідь, ІЛ-4 - Th2 відповідь, ІЛ-23 - Th17 відповідь. Крім того, при взаємодії з ДК наївні Т-лімфоцити можуть диференціюватися в Трег і цим вони відрізняються від макрофагів [55].

Існує кілька субпопуляцій ДК, що розрізняються походженням, фенотипом, локалізацією, шляхами міграції і функціями, і, як наслідок, впливом на вроджений і адаптивний імунітет [56]. Загальна популяція ДК формується з гемопоетичних стовбурових попередників кісткового мозку (КМ), що при дозріванні втрачають потенціал розвитку в клітини інших типів [57].

Ґрунтуючись на експериментальних даних, було виявлено, що всі субпопуляції ДК ссавців можна розділити на 2 основних класи – мієлоїдні й плазмоцитоїдні, що відрізняються транскрипційною програмою, фенотипом та імунними функціями [58]. Так, ДК із поверхневим фенотипом CD11c⁺CD123l^{ow} мають моноцитарне походження й відносяться до мієлоїдних ДК (мДК), а з фенотипом CD11c⁻CD123^{hi} – до плазмоцитоїдних (пДК) [59]. Мієлоїдні ДК

походять від загального мієлоїдного гемопоетичного попередника. Для їх росту й розвитку необхідний гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор (ГМ-КСФ – GM-CSF). Мієлоїдні ДК здатні до захоплення антигену й активації Т-клітин, секреції ІЛ-12 і ІЛ-18. Цей клас ДК складається переважно з периферичних клітин. Їхня роль подібна сенсорам - вони вловлюють сигнали, що надходять від різних клітин і ініціюють розвиток адекватної імунної реакції на ці сигнали. Мієлоїдні ДК захоплюють антигени, локалізовані в різних органах і тканинах, шляхом піно- і фагоцитозу, після чого експресують антигенну детермінанту в комплексі з молекулами МНС II класу на своїй поверхні. *In vivo* мДК перебувають у циркулюючій крові, вторинних лімфоїдних органах і шкірі. Особливо багато мДК в епітелії слизових оболонок, де вони тісно контактують із навколишнім середовищем (наприклад, у стінках кишечника й дихальних шляхів).

Мієлоїдні ДК шкіри діляться на клітини Лангерганса й інтерстиціальні ДК. Епідермальні клітини Лангерганса експресують CD1c, лангерин та Е-кадгерін; на інтерстиціальних ДК експресується DC-SIGN, CD11b, CD14. При зв'язуванні з антигеном, мДК мігрують у регіонарні лімфатичні вузли, де відбувається його презентація. У нормі презентація чужорідного антигену Т-клітині приводить до активної проліферації й диференціації антигенспецифічних Т-лімфоцитів, що забезпечують формування імунної відповіді.

Плазмоцитоїдні ДК мають лімфоїдне походження й морфологічно нагадують плазматичні клітини. Для їх диференціювання з CD11c-попередників у периферичній крові необхідний ІЛ-3. Плазмоцитоїдні ДК характеризуються низькою експресією рецептора до GM-CSF, відсутністю мієлоїдних маркерів CD14, CD13, і CD33, манозних рецепторів і експресією CD123. Вони експресують TLR-9, лігандами якого є CpG-олігонуклеотиди (специфічні маркери ДНК бактерій), відрізняються низькою експресією МНС II і слабкою здатністю до стимуляції Т-лімфоцитів, у порівнянні з мДК. Плазмоцитоїдні ДК крові експресують L-селектін (CD62L), що дозволяє їм проникати через

кровоносні судини в лімфатичні вузли, селезінку й тимус. Незважаючи на те, що їх вміст у периферичній крові менше 1%, вони відіграють помітну роль у формуванні імунної відповіді. Так, особливістю пДК є їхня здатність продукувати інтерферони I типу (α і β) у відповідь на вірусні інфекції, ІЛ-4 і ІЛ-10, необхідні для перемикання диференціації незрілих Т-хелперів у Т-хелпери 2 типу. До маркерів пДК відносять молекули CD303 і CD304. [60]. Dzieńek A. і співавт. [61] описали нові маркери для пДК периферичної крові: BDCA-1 (CD1c) і BDCA-3 (CD141) серед субпопуляцій мієлоїдного походження й BDCA-2 (CD303) і BDCA-4 (CD304), характерні для лімфоїдних / пДК. Було показано, що BDCA-1 (CD1c) антиген експресується на субпопуляції ДК людини, які за морфологічними ознаками подібні моноцитам периферичної крові. Ці клітини охарактеризовані як $CD4^+$, Lin^- , $CD11c^{bright}$, $CD123^{dim}$, $CD45RO^+$, $CD2^+$ з вираженою експресією мієлоїдних маркерів ($CD13^+$, $CD33^+$). Крім того, вони експресують Fc-рецептори (CD32, CD64) [61]. BDCA-2 молекула має специфічність і виявляється на лімфоїдних пДК людини в комбінації з експресією $CD4^+$, Lin^- , $CD11c^-$, $CD123^{bright}$, $CD45RA^+$, $CD2^-$ без мієлоїдних компонентів ($CD13^-CD33^-$) і Fc-рецепторів. Ці клітини циркулюють у периферичній крові й мігрують у лімфоїдні й нелімфоїдні тканини [62]. BDCA-3 антиген експресується на $CD11c^+$, $CD123^-$ мДК. BDCA-4⁺ ДК відповідають імунофенотипу лімфоїдних / пДК з високою експресією $CD123^{hi}$ і відсутністю на клітинах CD11c мієлоїдного антигену [61]. Разом з тим у літературі обговорюється характеристика ДК периферичної крові по експресії інших маркерів, таких як CD33, CD16, CD2, CD1, CD85, IL-3Ra, тощо. Macdonald K.P. і соавт. [63] використовували широкий спектр моноклональних антитіл (МАТ) й виділили в периферичній крові п'ять підтипів ДК, що не перекриваються, з різним рівнем експресії CD123, CD1b/c, CD16, BDCA-3 і CD34 антигенів. Безсумнівно, це дослідження розширило класифікацію ДК периферичної крові, однак, їхні функції й етап розвитку не були визначені [63].

В природних умовах (steady-state) ДК периферичних тканин перебувають у незрілому стані. Під впливом PAMP і DAMP-сигналів, пов'язаних з інфекцією

або ушкодженням тканин, ДК дозрівають, диференціюючись у антиген, презентуючи клітини. Зрілі ДК, навантажені антигеном, мігрують у вторинні лімфоїдні органи, де презентують антиген у комплексі з молекулами МНС-II – «сигнал 1», і костимуляторними молекулами CD80 і CD-86 – «сигнал 2» наївним Т-клітинам, а також Т-лімфоцитам пам'яті. У результаті презентації антигену в лімфатичному вузлі відбувається збільшення чисельності антиген-специфічних ефекторних Т-клітин. Під час презентації ДК продукують певні цитокіни, що моделюють імунну відповідь – так званий «сигнал 3». Класичним прикладом «сигналу 3» є продукція зрілими ДК ІЛ-12 при презентації антигенів деяких мікроорганізмів. У такому випадку ІЛ-12 направляє розвиток наївних Т-клітин у Т-х1. Велике значення має той факт, що «сигнал 3» – лабільний, й залежить від безлічі факторів мікрооточення. Відомо, що різні PAMP і DAMP можуть змінювати природу «сигналу 3», а саме, силу й спрямованість імунної відповіді.

У більш пізніх роботах ДК представлені як зрілі й незрілі, CD11b⁻, що продукують ІЛ-12 і CD11b⁺, що не продукують ІЛ-12 [64]. Виходячи з того, до якого результату призводить активність ДК, умовно їх можна розділяти на імунні й толерогенні ДК. Толерогенні ДК пригнічують імунну відповідь, причому усередині цієї групи також є певна гетерогенність. Зокрема, можна виділяти такі класи, як незрілі ДК із толерогенною активністю й «модульовані» ДК, що здобувають толерогенні властивості в результаті додаткової стимуляції [65; 66]. Незрілі ДК мають властивість індукції анергії й, отже, виступають як клітини з толерогенною активністю [67]. Толерогенні ДК не втрачають здатності до презентації антигену, але характеризуються зниженням експресії костимуляторних молекул (CD40, CD80, CD83) і прозапальних цитокінів (ІЛ-12), підвищенням експресії інгібіторних молекул (PDL1, CD95L, IDO) і протизапальних цитокінів (TGF-β, ІЛ-10), а також стійкістю до впливу сигналів до дозрівання. У той же час для цих клітин характерна більш висока експресія PRRs (pathogen recognizing receptors), зокрема TLR (toll-like receptors), RLRs (retinoic acid inducible gene I (RIG-I)-like receptors), NLRs (nucleic-binding

oligomerization domain (NOD)-like receptors), Fcγ-рецепторів, рецепторів комплементу, скавенджер-рецепторів і рецепторів до фосфатиділсерину [67]. Показано, що алогенні Т-клітини, що культивувались з незрілими ДК, можуть здобувати рефрактерність до антигенних стимулів, у тому числі отриманих від зрілих ДК [64; 68] запропонували виділяти проміжну групу ДК, напівзрілу, толерогенну, на клітинах якої виявляється високий рівень МНС II і коstimуляторних молекул, але на відміну від зрілих ДК, напівзрілі форми характеризуються низьким рівнем продукції ІЛ-1β, ІЛ-6, TNF-α і ІЛ-12. Часткове дозрівання ДК у результаті позитивної регуляції МНС і коstimуляторних молекул, зустріч із Т-клітинами в їхніх анатомічних Т-залежних зонах лімфатичних вузлів сприяла зміцненню терміну «напівзрілі» ДК [68]. У декількох дослідженнях [69; 70] переконливо показана толерогенна спрямованість імунної відповіді «напівзрілими» мДК. Крім того, продемонстровані кількісні відмінності в експресії генів в «напівзрілих» і «зрілих» ДК. Pletinckx К. і співавт. [71] порівняли експресію генів в «напівзрілих» ДК з повністю зрілими ДК під впливом ліпополісахариду (LPS). Автори одержали кількісні відмінності між цими формами. Загальним виявилася експресія 24 генів прозапальних цитокінів, що характерні для «напівзрілих» ДК від майже 5000 генів, які регулюються LPS в зрілих ДК.

Проте, останнім часом стало зрозуміло, що статус дозрівання ДК далеко не завжди корелює з їхньою імунно- і толерогенністю. Наприклад, відомо, що зрілі ДК можуть активно підвищувати кількість Трег-клітин. Більш того, деякі молекули бактеріального/вірусного походження стимулюють диференціацію ДК у клітини з характерними фенотипічними маркерами зрілих ДК (зокрема, з високим рівнем експресії МНС-II й коstimуляторних молекул), які, однак, продукують протизапальний цитокін ІЛ-10. Так, зимозан дріжджових грибків, продукти *Y. pestis*, *Schistosoma mansoni*, *Bordetella pertussis*, що зв'язуються з TLR2, TLR4 або TLR6, продукти *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus casei*, *Mycobacterium*, *H. pylori*, що зв'язуються з DC362 SIGN, здатні індукувати

регуляторну активність ДК, пов'язану з індукцією Трег і пригніченням Т-клітинної активації, однак потрібне детальне дослідження точних механізмів.

На сьогоднішній день встановлено, що зрілі ДК можуть проявляти толерогенні властивості в умовах *in vitro* під впливом певних сигналів. У якості толерогенизуючих факторів можуть бути використані імуносупресивні цитокіни (ІЛ-10, TGF- β), або деякі молекули патогенного походження (LPS тощо). [72]. Так, клітини, що формують мікрооточення ДК, здатні створювати умови для генерації ДК з регуляторною активністю. Такого роду активність показана, зокрема, для стромы селезінки, легенів і печінки, а також для пухлинного мікрооточення [73]. Секреція стромальними клітинами TGF- β і макрофагального колонієстимулюючого фактора (M-CSF) призводить до генерації CD11b^{high}Ta^{low} ДК, що володіють регуляторною активністю. Цей тип ДК здатний пригнічувати проліферацію Т-клітин за рахунок секреції NO або PGE2.

Слизова оболонка кишки може розглядатися в якості особливого варіанту тканинного мікрооточення за рахунок наявності безлічі факторів, що виділяються власними клітинами організму, бактеріями, які населяють шлунковокишковий тракт, а також надходять із їжею. Фактори, що виділяються кишковими епітеліоцитами (ретіноєва кислота, TGF- β , ІЛ-25) індують толерогенні властивості ДК за рахунок зниження продукції ними ІЛ-12 і ІЛ-23 і підвищення продукції ІЛ-10, приводячи до пригнічення генерації Th1 клітин і індукції Трег [74].

Речовини, що надходять в організм ззовні, також можуть модулювати активність ДК, при цьому ефекти можуть бути прямо протилежними. CD103⁺-ДК кишкової слизової, що володіють толерогенною активністю, експресують на своїй поверхні рецептор ароматичних вуглеводнів AhR (aryl hydrocarbon receptor), лігандами якого є такі ксенобіотики, як бензпирен, діоксіни, індол-3-карбінол та його похідне, що утворює в шлунково-кишковому тракті у кислих умовах 3,3 ϕ -дііндолілметан (DIM). При використанні таких лігандів AhR, як метиловий ефір 2-(1 ϕ -Н-індол-3 ϕ -карбоніл)-тіазол-4-ової кислоти (ITE) або

VAF347, відзначався позитивний ефект на індукцію толерогенних ДК [75]. У той же час інші ліганди, наприклад 3,3 ϕ -дііндолілметан (DIM), мають інгібіторну активність стосовно толерогенних ДК (толДК). В експерименті *in vitro* було показано, що DIM не тільки інгібує утворення CD11c⁺CD103⁺ -ДК із клітин КМ, але й пригнічує експресію молекул, пов'язаних з диференціюванням і функціонуванням ДК – IDO, транскрипційних факторів Id2 і E2-2. Однак при цьому експресія TGF- β значно не змінюється. Відзначалося також зниження рівня фосфорилування білків STAT3 і STAT5, важливих учасників сигнальних шляхів, що регулюють диференціювання ДК [76].

У певних умовах значимим компонентом оточення ДК можуть стати апоптотичні клітини. Їхнє розпізнавання й поглинання може призводити до пригнічення презентації антигена і дозрівання ДК, шляхом зниження експресії коstimуляторної молекули CD86 і IL-12, а також індукції секреції TGF- β і IL-10 [77]. Не менш важливим фактором індукції й підтримки толерогенних властивостей ДК є контакт із Трег-клітинами. При делеції Трег відзначалося збільшення кількості ДК посилення експресії поверхневих маркерів CD40, CD80, CD86 [78]. При цьому відомо, що для пригнічення активації ДК Трег-клітинами необхідна наявність прямої взаємодії TCR і молекул МНС II. Описано кілька механізмів, завдяки яким Трег здатні впливати на ДК. Молекули CTLA-4 і LAG3, що експресують Трег, взаємодіючи з поверхневими маркерами ДК, призводять до пригнічення їхньої активації. Вплив CTLA-4 приводить до зниження експресії молекул CD80, CD86 і стимуляції секреції IDO і LAG3. Взаємодія коstimуляторних молекул з молекулами МНС II на поверхні ДК, також пригнічує їхню активацію через залучення інгібіторних сигнальних шляхів. Інший механізм пов'язаний із прямою цитотоксичною дією Трег на ДК за участю перфорин-залежних механізмів. Крім того, Трег секретують цитокіни з імуносупресорною активністю (TGF- β), що пригнічують дозрівання ДК. [73].

Таким чином, різні види ДК можуть ініціювати (іmunні ДК), або пригнічувати (толДК) іmunну відповідь [79]. При цьому дуалістичний характер

імунної відповіді та її маніфестація зумовлені гістогенетичним походженням, зрілістю і функціональною активністю ДК. Оптимальний баланс між обома видами ДК має найсуттєвіше значення для запобігання аутореактивної відповіді або забезпечення ауто толерантності. Саме толДК сприяють підтримці стану толерантності на периферії за допомогою декількох механізмів. Звертається увага на те, що дефекти активностей толДК призводять до порушення природньої толерантності і розвитку АІЗ [60; 67]. Необхідність стратегії формування толерантності при АІЗ за участю толДК у вигляді компонента адаптивної терапії обумовлює важливість розширення джерел їх отримання та розробки способів їхнього генерування.

1.2.2 Одержання і визначення біомаркерів толерогенних дендритних клітин

Проблема лікування аутоімунних захворювань (АІЗ) є однією з найбільш актуальних у біомедицині протягом останніх десятиліть. Одним з найпрогресивніших методів лікування АІЗ є адаптивна імунотерапія з використанням ДК.

Ідея використання вирощених *ex vivo* ДК з толерогенними властивостями для імунотерапії АІЗ теоретично виправдана, так як в фізіологічних умовах за відсутності інфекційного агента в організмі людини переважно відбуваються процеси пригнічення імунної реакції. Незалежно від способу одержання, толДК відіграють надзвичайно важливу роль у підтримці імунного гомеостазу шляхом індукції імунологічної толерантності, механізми якої пов'язані з генерацією Трег-клітин, інгібуванням Т-клітинної відповіді й індукцією апоптоза Т-ефекторів [60; 73].

Необхідність вдосконалення способів генерації толДК *ex vivo* з метою підвищення ефективності лікування АІЗ, обумовила необхідність розширення джерел отримання попередників толДК, а саме, мононукліарів (МНК), моноцитів периферичної крові або кісткового мозку [64; 80; 81]. В культурі *in vitro* додавання гранулоцитарно-макрофагального колонієстимулюючого

фактору (GM-CSF) і інтерлейкіну-4 (ІЛ-4), або GM-CSF і інтерферону- α (IFN- α) приводить до диференціювання клітин-попередників саме у незрілі ДК, а не у макрофаги [82]. Однак даний підхід стикається з низкою проблем. Так, до кінця не вирішене питання: ДК з якими характеристиками слід вважати толерогенними: незрілі ДК, напівзрілі ДК, або існує окрема субпопуляція ДК зі стійкими толерогенними властивостями, що сприяють формуванню Трег-клітин. Контакт незрілих ДК з Трег, а також з протизапальними медіаторами, приводить до стабілізації певних ознак незрілості ДК і формуванню стійкого толерогенного фенотипу [83]. Отримання толДК з таким фенотипом при вирощуванні *ex vivo* потребує використання низки речовин, які володіють толерогенною активністю, зокрема ІЛ-10, ТРФ- β , вітаміну Д3, дексаметазону, ретіноевої кислоти, вазоактивного кишкового пептиду (VIP) тощо [84]. Першою і найбільш докладно вивченою речовиною, що сприяє отриманню ДК з толерогенними властивостями, є протизапальний цитокін ІЛ-10. Точний механізм такого впливу залишається невідомим. Сьогодні немає сумнівів у тому, що імуносупресивні речовини, зокрема глюкокортикоїди, сприяють формуванню толерогенного фенотипу ДК. Такі толДК, оброблені імуносупресантами, широко використовуються в адоптивній терапії АІЗ на експериментальних моделях. Зокрема, глюкокортикоид дексаметазон індукуює розвиток толДК, здатних направляти наївні Т-лімфоцити по Т-регуляторному шляху. Механізм дії полягає у зв'язуванні дексаметазона із глюкокортикоїдним рецептором на ДК (GR), що регулює активацію ДК за допомогою глюкокортикоїд-відповідаючого елемента (GRE, gluc. respons element). GRE негативно регулює NF- $\kappa\beta$ -шлях, наробку прозапальних цитокінів, хемокінів, а також їх рецепторів. До того ж, GRE пригнічує антиген-презентуючу здатність ДК [8]. У ДК, що вирощені з використанням дексаметазону, зберігається високий рівень експресії ІЛ-10, при низькому рівні експресії ІЛ-12. Крім цього, дексаметазон індукуює продукцію цілого ряду протизапальних цитокінів і аттрактантів, включаючи GITRL, IDO, CCL2(MPC-1), CCL8(MPC2), CCR2, CCL9 (MPC-1c), CCL12 (MIP-2). Це збільшує здатність ДК до міграції й сприяє

придбання ними толерогенного фенотипу. Результатом вищевказаних реакцій є пригнічення дозрівання ДК, тобто збереження незрілого фенотипу і толерогенних властивостей.

Іншим розповсюдженим протоколом є обробка ДК моноцитарного походження за допомогою вітаміну Д3, що призводить до їхнього дозрівання в напівстиглий фенотип з низькою експресією костимуляторних молекул, але підвищеною здатністю до продукції ферменту індоламін 2,3-діоксигенази (IDO), IL-10, PDL-1, останній з яких є критичним для індукції Трег [85]. Клітини, оброблені активною формою вітаміну D3, проявляють типові для напівстиглих ДК властивості: низький рівень експресії МНС-II, середній – костимуляторних молекул, активну продукцію IL-10 і відсутність експресії IL-12. Відомо, що вітамін Д3 здатний не тільки впливати на диференціацію ДК, але й зрушувати розвиток наївних Т-клітин у напрямку Трег та індукувати апоптоз ефektorних Т-клітин. Більш ефективним є комбіноване використання вітаміна Д3 і дексаметозона, що було доведено рядом досліджень [86]. Показано, що отримані у такий спосіб ДК пригноблювали прояви коліту у мишей більшою мірою, ніж IL-10-індуковані ДК.

Дослідники університету Н'ю-Кастла для одержання ДК використовували дексаметазон і вітамін Д3, а також імуномодулятор монофосфоріл ліпід А. Отримані в їхній присутності ДК мали стабільний толерогенний фенотип (у т.ч. в умовах запального мікрооточення). До введення ДК в організм реципієнта клітини були прокультивовані з аутологічною синовіальною рідиною – джерелом аутоантигенів. [72].

Група дослідників із Квинсленда отримувала толДК в культурі із інгібітором NF- κ B - сигнального шляху – ВАУ 11-7082 [87]. У цієї роботи також були використані антигени (білки синовіальної рідини). Отримані в дослідженні ДК були CD40⁺, але експресували високий рівень CD86.

Вкрай важливе значення в оцінці функціональних властивостей вирощених *ex vivo* ДК має ідентифікація біомаркерів, притаманних саме толДК. Відомо, що для них характерні низька експресія костимуляторних (CD80,

CD86, CD83) і HLA молекул, а також підвищена — CD11b-молекули класу інтегринів [64; 73], через яку вони інгібують диференціювання Th17 і активацію Т-клітин [88]. Були проаналізовані різні протоколи генерації толДК людини з метою з'ясування транскрипційних маркерів, що визначають їх толерогенність [89; 90]. Заслуговує на увагу, встановлена здатність глюкокортикоїдів індукувати експресію в ДК білка, відомого як глюкокортикоїд-індукована лейцінових застібка (GILZ) [90; 91; 92]. Його протизапальна активність реалізується через інгібіцію функції таких транскрипційних факторів як NF-κB, AP-1, PD-L1, що сприяє збільшенню продукції ІЛ-10. Суттєво, що експресія GILZ в ДК супроводжується індукцією Трег з високою експресією транскрипційного фактора Foxp3, який відповідає за їх супресивний потенціал [90]. В толДК, індукованих дексаметазоном, були відзначені підвищений рівень експресії гену IDO1, що контролює індукцію імунної толерантності через активацію супресорної ланки імунітету [93]. Було визначено кілька генів як кандидатів в біомаркери для толДК, індукованих рапаміцином, це анексін-ANXA1 (анексін 1), C1QC, CTSC (катепсін С), GILZ і неімунні гени - GPX1 (Glutathione Peroxidase 1), IMDH2, OSF1 (плейотрофін) і TPP1 (тріпептиділпептідаза 1) [89] . Цікаво, що всі ці гени також були описані й у випадку атестації толДК індукованих дексаметазоном [94].

Отже, не існує єдиного біомаркера, який може функціонально характеризувати або, принаймні, ідентифікувати толДК за різними протоколами. Проте, враховуючи велику різноманітність підходів до ідентифікації толДК, з'явилися шанси на виявлення загального біомаркера . В цілому вважається, що визначення геномно-післягеномного профілю ДК, є одним з найбільш прийнятних біомаркерів для ідентифікації їх типу, тобто, толерогенного чи імунного потенціалу [89; 90]. Незважаючи на велику різноманітність протоколів для індукції *in vitro* толДК, все ж були визначені їхні транскрипційні біомаркери. Так у більшості індукованих толДК була відмічена підвищена експресія IDO1, GILZ, ANXA1 і знижена – генів, що кодують прозапальний цитокін ІЛ-12 [89; 90].

Таким чином, перспектива застосування толДК у клінічній практиці обумовлює відпрацьовування стандартного методу їх одержання, визначення основних біомаркерів, підтвердження стабільності толерогенного фенотипу, для ефективності й безпеки використання в імунорегенеративній терапії АІЗ. Інтенсифікація досліджень у цьому напрямку дозволить не тільки оцінити якість отриманих в культурі ДК, але й вивчити молекулярні механізми їхньої толерогенної активності при адоптивному застосуванні на експериментальних моделях АІЗ.

1.2.3 Кріоконсервування як методологічний підхід спрямованого формування структурних та функціональних характеристик мононукліарів кісткового мозку з метою одержання з них *in vitro* дендритних клітин з толерогенним потенціалом

Потреба у використанні ДК в програмах терапії АІЗ передбачає як створення їх запасів, так і довгострокового зберігання при ультранизких температурах. На сьогодні немає єдиного протоколу заморожування ДК. Даний факт зумовлений низкою причин. Неодноразово підкреслювалося, що ефективність кріоконсервування будь-якого виду біологічних об'єктів визначається його вихідним станом [12]. У цьому плані не є винятком і ДК, що представляють собою гетерогенний пул клітин з різними вихідними структурними і функціональними характеристиками. Обидві ці характеристики ДК визначаються ступенем їх зрілості, а отже і різною кріолабільністю.

Основними джерелами отримання ДК, як вже вказувалося вище, є CD14- моноцити (МОН) або мононуклеари (МНК), виділені в градієнті щільності з периферичної крові людини, КМ або гемопоетичних органів експериментальних тварин [11; 95; 96]. Аналіз опублікованих робіт по кріоконсервуванню ДК свідчить про те, що на початкових етапах, як експериментальних так і клінічних досліджень заморожування ДК проводилося під захистом 1М або 2М ДМСО з різними швидкостями: 0,3; 1,5; 10; 20; 70; 150

град/хв до - 60 °С з наступним зануренням у рідкий азот [95]. Було встановлено, що максимальне збереження ДК відзначалося при повільних швидкостях заморожування - 0,3; 1,5 град/хв і становило 57% для ДК щурів і 72% - для ДК людини. Цікаво, що ДК виявилися більш чутливими до заморожування, ніж лімфоцити і макрофаги виділені з селезінки людини або щура. Низький рівень збереження ДК після кріоконсервування був підтверджений і роботами Mendoza L. і співавт. [97]. Так, збереження ДК отриманих з МНК периферичної крові людини або КМ мишей C57Bl / 6 і заморожених зі швидкістю 1 град/ хв до - 70 °С з наступним зануренням у рідкий азот, не перевищувала 40%. В цьому ж циклі досліджень в порівняльному аспекті були оцінені фенотипічні характеристики нативних (натДК) і кріоконсервованих ДК (кріоДК). Після розморожування і прекультивування протягом 7 діб автори оцінювали показники середньої інтенсивності флюоресценції (СІФ) таких мембранних молекул як: МНС I, МНС II, CD80, CD86, CD11b, CD11c, CD54, CD205. З восьми досліджених маркерів кріоДК зниження СІФ в порівнянні з натДК було відмічено по п'яти наступним маркерам: МНС II - в 1,3; CD80 - в 1,4; CD86 – в 1,2; CD11c і CD54 - в 3 рази. Даний факт, перш за все, демонструє зниження ступеня експресії коstimуляторних молекул, що може свідчити про зниження диференціовального потенціалу кріоДК і, як наслідок, зниження їх антигенпрезентуючої здатності.

Раніше ми відзначали, що саме початковий стан біооб'єкту, тобто структура і функція клітин, тканин, органів у своєму початковому стані, визначає ступінь їх кріолабільності [12]. Цієї ж точки зору дотримуються Hayden H. і співавт. [96], які заморожували під захистом 10% ДМСО зі швидкістю 1 град/ хв до -80° моноцити (МОН) периферичної крові людини і вирощені з них незрілі (н/з) і полузрілі (п/з) ДК. Автори зробили висновок, що найбільш кріостійкими виявилися МОН, а найменш стійкими – п/з ДК. Кожен вид клітин з вищезазначеного переліку (МОН, н/з, п/з ДК) відрізняється від іншого, як за структурою, так і функцією, що безумовно відбивається і на формуванні їх кріолабільності / кріостабільності.

З огляду на затребуваність переважно кріоконсервованих зрілих ДК для посилення протипухлинної активності імунної системи, виникає необхідність відпрацювання підходів отримання функціонально повноцінних імуногенних ДК. У роботі Radhakrishnan AK і співав. [98] саме МОН використовують для кріоконсервування з подальшим (після розморожування) їх диференціюванням *in vitro* в зрілі ДК. В роботі Hayden H. і співавт. [96] звертає на себе увагу інший цікавий факт, який свідчить про особливості відповіді кріоМОН, н/з кріоДК на фактори, що індукують дозрівання ДК (TNF- α , IFN- γ і LPS). Автори показали, що з кріоМОН більш ефективно, ніж з н/з кріоДК формувалися зрілі ДК. Більш того, подальша оцінка функціональних властивостей отриманих саме з кріоМОН зрілих ДК встановила підвищену їх здатність індукувати експресію FOXP3-білка, тобто формувати Трег в CD3⁺ - фракції лімфоцитів периферичної крові в порівнянні з ДК, що були отримані з натМОН. Крім того, процедура заморожування і відтавання здійснювала інгібуючий вплив на продукцію цими ДК запальних цитокінів ІЛ-12 і ІНФ- γ . До того ж, при сокультивуванні CD3⁺ Т-клітин пацієнтів з усіма видами отриманих з кріоМОН ДК спостерігалось зниження проліферативної активності цих Т-клітин. Дійсно, характер впливу кріоконсервування на МНК та МОН – попередників ДК, залишається до кінця не вивченим, хоча представляє безумовну цікавість узагальнення даних по їх кріоконсервуванню з оцінкою потенціалу подальшого їх диференціювання в ДК.

Більшість дослідників одностайні у виборі програми кріоконсервування МОН та МНК з використанням повільної швидкості заморожування – 1 град / хв до - 80 °С з наступним зануренням у рідкий азот [11; 96; 98; 99] і відігрівання при 37 °С, яку Buhl T. і співавт. назвали стандартною [100].

Вказується на можливість деякого варіювання компонентами середовища кріоконсервування, що в різних роботах складається з аутологічної або ембріональної телячої сироватки - ЕТС (90%) і ДМСО (10%) або RPMI-1640 (40 - 70%), ЕТС (20 - 40%) і ДМСО (10 -20%). Зокрема, в роботі Hayden H. і

співав. [96] вказується, що заморожування МОН в середовищі RPMI з 20% сироваткою і 10% ДМСО більш ефективно, ніж з 90% сироваткою. На думку деяких авторів, [101] вплив температури розморожування, а саме, кімнатної протягом 10 хв. або 37 °C протягом 1 хв, виявився менш важливим для забезпечення схоронності клітин.

У ранній роботі Makino M. та співав. [102] було запропоновано кріоконсервування МНК периферичної крові людини зі швидкістю охолодження 1 град/хв до кінцевої температури -70 °C в середовищі для кріоконсервування, яке містило різні співвідношення ЕТС (20-30%) і ДМСО (8-12%). Було показано, що кріоМНК під захистом 12% ДМСО зберігали здатність генерувати *ex vivo* зрілі імуногенні ДК, порівняно з нативним матеріалом. Дендритні клітини, отримані в цьому дослідженні з кріоМНК експресували високі рівні HLA-DR, HLA-DQ, CD80 і CD86 молекул, як і ДК, генеровані з нативних МНК. Дані інших авторів також свідчать на користь порівнянності показників життєздатності і рівня експресії поверхневих клітинних маркерів зрілих ДК, диференційованих з кріоМНК з показниками нативних ДК [101; 103]. Про це говорить і той факт, що в ряді робіт отримані дані про те, що і після кріоконсервування МОН по, так званій, «стандартній програмі» [100] функціональний потенціал генерованих з них ДК співпадав з ДК, що були отримані з натМОН [101; 104]. Однак існує ряд суперечливих повідомлень про зниження швидкості диференціювання кріоМНК в зрілі ДК при стимуляції LPS [96; 99; 11] показали, що у ДК, отриманих *in vitro* з кріоМОН був знижений рівень експресії CD83 і CD86 молекул, а обробка LPS не викликала збільшення продукції ними прозапальних цитокінів ІЛ-12 і TNF α . На думку Hayden H і співавт., [96] саме знижений рівень продукції ІЛ-12 такими ДК пояснює і меншу швидкість проліферації сокультивованих з ними Т-клітин в змішаній культурі лімфоцитів. Це узгоджується з даними Messmer D. [105] про те, що рівень ІЛ-12 в супернатантах ДК, отриманих з кріоМОН був нижче, ніж в нативних. Отже, вирощені з кріоМНК ДК знижують здатність продукувати критичний медіатор запального каскаду - ІЛ -12. В супернатантах ДК,

вирощених з кріоМОН спостерігалась підвищена концентрація в порівнянні з нативним контролем протизапального ІЛ-10, асоційованого з функцією незрілих ДК. Даний факт переконливо свідчить про те, що після кріоконсервування, МОН набувають потенціал отримання з них *ex vivo* незрілих толДК [96; 99].

Дискутабельним залишається питання щодо механізму індукції під впливом кріоконсервування з МОН та МНК ДК з толерогенною функцією. Так, в роботі Silveira і співавт. [11] показано, що після кріоконсервування, МОН мали меншу, ніж нативні клітини інтенсивність формування н/з ДК. У свою чергу, н/з ДК мали меншу швидкість дозрівання і інтенсивність секреції цитокінів / хемокинів у відповідь на LPS в порівнянні з нативними. Зниження інтенсивності формування н/з ДК з кріоМОН автори пояснюють інгібіцією експресії рецепторів до GM-CSF (CD116) і IL-4 (CD124) або їх «сходження» (shedding) з мембрани МОН, що часто спостерігається в процесі кріоконсервування клітинних суспензій різного типу [106]. Подібний характер зміни експресії може відбуватися і з TLR4, що пояснює зниження швидкості дозрівання кріоДК в присутності LPS, який є лігандом для TLR4. Як відомо, при зв'язуванні TLR4 з LPS відбувається активація ряду адаптерних білків і киназ, які беруть участь в індукції ключових прозапальних факторів, що сприяють дозріванню ДК [107]. Таким чином, є підстави стверджувати, що кріоконсервування індукує формування саме незрілого фенотипу ДК, обмежуючи можливість їх подальшого дозрівання. Причиною цього може бути шеддінг, або зниження рівня експресії TLR4 та інших рецептурних структур в умовах інтегральної інгібіції метаболічних процесів в клітинах після їх розморожування. При цьому механізм формування незрілого фенотипу ДК і властивої їм толерогенної функції до кінця не з'ясований і вимагає подальшого всебічного вивчення.

Загальновідомий факт модифікації під дією кріоконсервування рецепторного репертуару клітин, в тому числі через шедінг рецепторів [106; 108] інгібіції синтезу одних видів білків і підвищення рівня інших, наприклад,

білків теплового шоку – БТШ [109]. Так, було показано збільшення вмісту цитозольного Hsp70 після заморожування / відігрівання мієлоїдних попередників, моноцитів і ДК. У ряді робіт вказується, що цей білок володіє імуносупресивним потенціалом [18; 110]. Конкретизуючи такого роду активність, автори показали, що Hsp70 сприяє модуляції фенотипу ДК в бік толерогенного, що супроводжувалося підвищенням продукції ними ІЛ-10 - ключового медіатора, що обумовлює активацію і реалізацію імуносупресивного вектора в цілому [18; 111]. Показано, що в ДК, Hsp70 пригнічує напрацювання і експресію таких мембранних костимуляторних структур як CD86 і МНСІІ на тлі зниження продукції TNF- α . Також Hsp70 здатний пригнічувати вироблення МОН запального цитокіну IFN- γ , що, в свою чергу, змінює баланс, про- і протизапальних цитокінів у бік підвищення рівня останніх [111]. До того ж, Hsp70 при зв'язуванні з ендоепітарним рецептором, а далі через TLR2 передає сигнал активації гену мієлоїдного диференціювання MyD88 [16]. Наступне фосфорилювання регуляторної кінази ERK може ініціювати активацію фактора транскрипції, який буде зв'язуватися з промотором гена *il-10*, підвищуючи продукцію ключового протизапального медіатора - ІЛ-10. Шляхом активації STAT3-чутливих генів і / або інгібіції активності NF- κ B і MAPK, ІЛ-10 інгібує транскрипцію генів прозапальних цитокінів в активованих макрофагах, а також експресію МНС ІІ і костимуляторних молекул, пригнічуючи при цьому здатність мієлоїдних клітин ефективно представляти антигени Т-клітинам і активувати їх. Важливо, що БТШ мають відношення і до перепрофілювання функціонального статусу ДК, а саме, переходу від імунних до толерогенних. У зв'язку з цим, досить актуальною, якщо не необхідною, може бути оцінка вмісту цитозольних Hsp70 в ДК, отриманих з кріомНК. Роль цих білків в індукції толерантності ДК є багатогранною і вельми важливою, маючи на увазі стимуляцію Т-регуляторного ланки імунітету, як основоположного в лікуванні найширшого спектра АІЗ.

Згадуючи події, що каскадно розвиваються в кріоконсервованих клітинах (МОН, МНК, ДК різного ступеня зрілості), не можна не акцентувати

увагу на вплив низьких і ультранизьких температур на зміни під дією цих факторів стану геномного і постгеномного профілів різних видів клітин людини і тварин. Підтвердженням цьому є безліч робіт про вплив кріоконсервування на рівень експресії широкого спектру генів [106; 112; 113; 114]. Ступінь такого впливу залежить від найдрібніших деталей умов кріоконсервування. Так, варіюючи тими чи іншими компонентами технологічного процесу кріоконсервування МНК або МОН, можна «під замовлення» отримувати з них толерогенні або імуногенні ДК. Треба погодитися з тим, що перевага перепрофілювання функції МОН та МНК після вищезазначених процедур залишається все ж за кріоконсервуванням.

Як було згадано вище, в індукції толерогенної функції ДК важливу, а може, і визначальну роль грає транскрипційний фактор GILZ, збільшення експресії якого пригнічує дозрівання і реалізацію презентуючої функції ДК [91; 93]. Вельми цікавим залишається питання: чи може кріоконсервування індукувати підвищення експресії GILZ. Безумовно, в даному випадку мова може йти про те, що будучи потужним стрес-індукуючим фактором, кріоконсервування здатно активувати / пригнічувати експресію генів і структур постгеномного каскаду, що відповідають за продукцію GILZ і, як наслідок, толерогенний плацдарм організму. Схоже, що такого роду події розвиваються при експансії іншого стресіндукуючого фактора, про який ми говорили вище, а саме, запального процесу. Саме в даному випадку, глюкокортикоїди, що застосовуються як протизапальні засоби в руслі формування толДК, сприяють їх «прагненню перевести дисрегуляторний стан ІС організму в спокійний».

Отже, кріоконсервування індукує формування незрілого фенотипу ДК і властивої їм толерогенної функції, при цьому, обмежуючи можливість їх подальшого дозрівання. У зв'язку з цим, безперечний інтерес може представляти оцінка до і після кріоконсервування рівня експресії генів, що відповідають за толерогенний потенціал ДК в поєднанні з оцінкою ряду їх структурних і функціональних характеристик. Це може бути критерієм

прогнозування терапевтичного потенціалу цього матеріалу при лікуванні різних патологій людини, в тому числі і АІЗ.

1.3 Сучасні підходи до терапії аутоімунних захворювань

1.3.1 Терапія аутоімунних захворювань на сьогоднішній день

Лікування АІЗ до теперішнього часу залишається однією з найбільш актуальних проблем медицини. Незважаючи на здобутки в цьому напрямку, відсутні стратегічні медичні програми подолання цієї хвороби. Загальна імуносупресія під дією фармакологічних препаратів хоча і запобігає прогресуванню аутоімунних реакцій, однак супроводжується ризиком розвитку онкологічних та інфекційних захворювань [115]. Дійсно, застосування при РА препарату базисної терапії — метотрексату [116] підвищує кількість і супресорну активність Трег-клітин [4; 116]. При цьому, пригнічується продукція прозапальних цитокінів ($\text{TNF}\alpha$, IL6, IL1 β , IL17 та інш.) [117]. Більш того, терапія метотрексоматом дуже рідко призводить до стійкого покращення стану пацієнтів з АІЗ і повної відмови від медикаментів [118]. Між тим, вказується, що ефективність монотерапії метотрексоматом можна підвищити шляхом проведення короткого курсу лікування глюкокортикоїдами (ГК) у низьких дозах [1; 2]. Механізми, залучені в глюкокортикоїд-опосередковану терапію, складаються в основному зі зниження TCR-сигналінга і супроводжуються порушенням продукції і активності нуклеарних факторів: NF-k β , NFAT і AP-1. Дослідження на мишах зі Т-специфічною делецією у гені глюкокортикоїдного рецептора виявили, що Th17-лімфоцити є ключовими мішенями для терапії ГК при розсіяному склерозі й РА [2]. Ці результати можуть пояснити механізми здатності ГК пригнічувати розвиток аутоімунної і запальної реакції, але призводять до небажаних ефектів: прогресуванню остеопорозу, ризику інфекційних, серцево-судинних ускладнень, що є основною причиною негативного відношення багатьох клініцистів до терапії ГК [119].

До розповсюджених методів лікування АІЗ можна віднести и застосування блокаторів прозапальних цитокінів [120; 121]. Наприклад, препарат інфліксимаб, що являє собою химерні моноклональні антитіла до ФНП- α , застосування яких в терапії РА призводить до інгібіції синтезу ФНП- α з подальшим стримуванням синовіальної гіперплазії, збільшенням синтезу ІЛ-10 або перепрофілюванням експресії клітин з фенотипом Th1 і Th2. Однак, використання інфліксимаба може привести до збільшення ризику інфекцій і злоякісних новоутворень [120; 121; 122]. Останнім часом перелік засобів лікування АІЗ збільшився застосуванням внутрішньовенного імуноглобуліну (IVIg) [123]. Основні механізми його дії — це блокада Fc γ R та інгібування FcRn і комплементу. Проте, використання IVIg зберігає обмежені проблеми потенційної нестачі та високої вартості [123].

Мультифакторіальність АІЗ зумовлює труднощі не тільки їхньої діагностики, але і лікування [12; 124]. Порушення взаєморегулюючої активності різних популяцій і субпопуляцій ІКК, відхилення від фізіологічного рівня плейотропних цитокінів, що вони продукують, може призводити до розбалансування взаємодії систем, що складають так званий «золотий трикутник» бодіомеостазу людини та іменується як нейро-імуно-ендокринний блок (НІЕБ) [12; 125]. Тому для корекції систем НІЕБ перспективним може бути використання препаратів клітинної та тканинної терапії, що володіють надсистемною регуляцією [125; 126]. Успішному розвитку цих досліджень сприяли експериментальні роботи, з оцінки ефективності лікування АІЗ продуктами фетоплацентарного комплексу [12].

Особливе місце в дослідженнях стосовно розвитку АІЗ займає вивчення Трег, кількість і супресорна функція яких знижена при цих хворобах [4]. Виходячи з цього, в останні роки поглиблюються експериментальні дослідження, спрямовані на можливість індукції та посилення функції Трег *in vivo* [127]. Було показано, що дауринол, природний арилнафтолід, підвищує стабільність клітин Трег шляхом індукції деметилування ДНК у промоторній області Foxp3 [128]. Для підвищення функціональної стабільності Трег

використовуються також технології, що включають редагування їх геному з використанням РНК-керованих ендонуклеаз (технологія CRISPR/Cas-9) [129]. Показано, що нокаут гена *Stub1* збільшує експресію *Foxp3*, тоді як підвищення експресії *CTLA-4*, *PD-1* і *BACH2* є гарантом стабільності Трег-клітин [130].

Незважаючи на наявність публікацій стосовно використання Трег, при АІЗ опубліковані результати не завжди однозначні, що обмежує їх успішне застосування у терапії АІЗ [131].

В даний час досліджуються інші типи регуляторних/імуносупресивних клітин, включаючи незрілі супресорні клітини мієлоїдного походження (MDSC) та регуляторні макрофаги (Мрег), індуковані сигналами мікрооточення, толДК, що діють через ІДО, ІЛ-10, ТРФβ і здатні інгібувати активовані Т-клітини, пригнічувати їх проліферацію та перетворювати наївні Т-клітини на Трег [9; 132; 133].

1.3.2 Застосування толерогенних дендрітних клітин як сучасний підхід формування імунотолерантності

Одна з терапевтичних стратегій лікування АІЗ базується на відновленні імунної толерантності шляхом введення аутологічних толДК, сформованих *ex vivo* [4; 9; 134].

Механізми, завдяки яким толДК індукують толерантність - це делеція Т-клітин; зміна цитокінового профілю Т-лімфоцитів (наприклад, від Th1 до Th2); і індукція Трег. Основна перевага терапії толДК у порівнянні з імуносупресивною терапією, що використовується в цей час - це можливість специфічно впливати на аутореактивні Т-клітини. Новий терапевтичний підхід повинен бути спрямований на ослаблення запалення й стимулювання толерантності до артритних ауто-антигенів для захисту імунітету хазяїна [2].

Клінічним випробуванням толДК передували дослідження на експериментальних моделях АІЗ: РА, трансплантаційної хвороби, алергічної астми тощо. [133; 134; 135; 136].

Що стосується використання толДК в практичній медицині, на сьогодні опубліковані результати кількох клінічних випробувань I-ї фази, в яких робилися спроби терапії АІЗ за допомогою цих клітин. Так, опубліковані результати введення толДК, отриманих *in vitro*, пацієнтам з розсіяним склерозом з метою пригнічення аутоімунної відповіді [137]. Випробування пройшли досить успішно, було відзначено зниження титру антитіл до мієліну, збільшення числа Трег в крові. Крім того, опубліковані результати перших клінічних випробувань вакцини на основі толДК для лікування пацієнтів з цукровим діабетом 1-го типу [138]. Дослідження показали безпеку і відсутність серйозних побічних ефектів даної терапії.

Ряд клінічних досліджень було проведено на пацієнтах з РА. Так Hilkens CM і співав. [72] використовуючи дексаметазон, вітамін Д3 і імуномодулятор монофосфат ліпід А, отримали *in vitro* ДК, що мали стабільний толерогенний фенотип. До введення ДК в організм реципієнта клітини були прокультивовані з аутологічною синовіальною рідиною – джерелом аутоантигенів. Отриманий препарат одержав назву “Autodecra”. Клінічні випробування препарату в пацієнтів з РА показали його істотні переваги в порівнянні із терапією імуносупресантами. Nickdel M.B. і співав. [87] в терапії пацієнтів з РА також використовували ДК, одержані в культурі із інгібітором NF- κ B - сигнального шляху – ВАУ 11-7082. Їх застосування дало наступні результати: нормальна переносимість більшістю пацієнтів; зменшення кількості ефекторних Т-клітин; збільшення кількості Трег-клітин (ефект зберігався більше місяця).

Однак, повноцінно оцінити клінічну ефективність застосування толДК не виявилось можливим, насамперед, у зв'язку з подальшим пошуком критеріїв такого роду лікування. Крім того, ряд питань, що обмежують застосування толДК ще потребують подальшого вирішення. А саме: доза ДК; метод введення; частота введення для досягнення пролонгованого терапевтичного ефекту; побічні ефекти, зокрема, викликані перетворенням толДК у зрілі імунні ДК, тощо.

Незважаючи на це, багато дослідників і клініцистів вважають, що хоча терапія на основі аутологічних толДК, отриманих *in vitro*, коштовна і забирає багато часу, її перевага полягає у таргетному впливі толДК на аутореактивні Т-клітини з одночасною індукцією формування Трег [4; 134].

Таким чином, результати експериментальних досліджень дозволили перейти до клінічних випробувань толДК з позитивними результатами лікування захворювань аутоімунного генезу : цукрового діабету I типу, РА, хвороби Крона та розсіяного склерозу [9].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Загальні положення

Дисертація виконана у відділі кріопатофізіології і імунології Інституту проблем кріобіології і кріомедицини (ІПКіК) НАН України в рамках науково-дослідних робіт «Вивчення молекулярних механізмів толерогенної активності кріоконсервованих дендритних клітин за їх адаптивного застосування» (шифр – 2.2.6.116, № державної реєстрації – 0117U000852, НАН України, 2017-2021; «Вивчення механізмів активації толерогенної активності дендритних клітин під впливом кріоконсервування і компонентів кордової крові (шифр – 2.2.6.144, № державної реєстрації – 0121U113326, НАН України, 2022-2026)

2.2 Експериментальні тварини

Експерименти виконували на мишах лінії СВА/Н 20-тижневого віку масою 24 – 26 г. Миші були отримані з підприємства "Біомодельсервіс", м. Києва з наступним розведенням в стандартних умовах віварію Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. Дослідження проводили відповідно до «Загальних принципів експериментів на тваринах», схваленими V Національним конгресом по біоетиці (Київ, 2013) і погодженими з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовують для експериментальних і інших наукових цілей» (Страсбург, 1986). а також відповідно до Закону України «Про охорону тварин від жорстокого поводження» (№3447-IV від 21.02.2006). Тварин виводили з експерименту під ефірним наркозом шляхом цервікальної дислокації.

2.3 Виділення клітин кісткового мозку

Кістковий мозок (КМ) вимивали зі стегнових кісток мишей середовищем RPMI-1640 («Biowest», Франція) з додаванням 3% ембріональної телячої сироватки - ЕТС («Biowest», Франція) і 2% цитрату натрію (Sigma-Aldrich, США) (далі в тексті – робоче середовище) и ресуспендували шляхом пропускання через голки діаметру, що зменшувався (0,7 мм, 0,6 мм, 0,55 мм). Після цього суспензію клітин КМ пропускали через нейлоновий фільтр з діаметром пор 100 мкм (Falcon, США), центрифугували при 300g протягом 10 хв. і ресуспендували у робочому середовищі.

2.4 Виділення мононуклеарів кісткового мозку

Мононуклеарні клітини (МНК) виділяли за допомогою центрифугування суспензії КМ в градієнті щільності (1,077 г/мл) Тразографа («Юнік Фармасьютикал Лабораторіз», Індія) [139].

2.5 Кріоконсервування мононуклеарів кісткового мозку

Розчин для кріоконсервування МНК (далі в тексті – кріорозчин) являв собою середовище RPMI-1640 з 20% ЕТС і 20% диметилсульфоксиду (ДМСО) («Артеріум», Україна). До суспензії МНК по краплях додавали кріорозчин у співвідношенні 1:1 протягом 2-3 хв при кімнатній температурі (кінцева концентрація кріопротектору склала 10%) і поміщали в пластикові ампули об'ємом 1,8 мл («Nunc», Німеччина) з концентрацією $5-7 \times 10^6$ кл/мл. Експозицію клітин в кріорозчині проводили протягом 10 хв при тій же температурі.

Заморожування МНК здійснювали на програмному заморожувачі з повільною швидкістю охолодження: 1 град / хв: до - 80 °С – Р1; до - 40 °С – Р2; до - 25 °С – Р3, з наступним зануренням у кожному випадку в рідкий азот (-

196 °C). P1 найчастіше застосовується для кріоконсервування МНК або моноцитів периферичної крові людини [100]; P2 - сприяє зниженню кріодеструкції клітин при заморожуванні-відігріванні, оскільки дозволяє проходити евтектичну точку кристалізації 10% розчину ДМСО (-66,7°C) з більшою швидкістю охолодження (від -40°C до -196°C), на відміну від P1. [140; 141]. Цей режим дозволяє пройти з більшою швидкістю (.) евтектики - 66,7 °C для даної концентрації ДМСО (10%) і знизити термопружну напругу. Показано, що в області евтектичної температури розчину криопротектора, кращими для морфофункціональної схоронності клітин виявляються високі швидкості охолодження. P3 – є теоретично розрахованим і рекомендованим для будь-яких клітин [142]. Його зазвичай використовують для кріоконсервування гемопоетичних стовбурових клітин. Він був опробований нами, оскільки відомо, що ДК формуються з CD14⁺ -попередників кісткового мозку.

Зразки відігрівали на водяній бані при температурі 40 °C до зникнення твердої фази. Клітини одноразово відмивали від ДМСО шляхом повільного додавання подвійного об'єму робочого середовища і подальшого 10-хвилинного центрифугування (300g). Після видалення надосаду, осад ресуспендували у робочому середовищі після чого проводили оцінку структурної та функціональної повноцінності МНК.

2.6 Оцінка структурних та функціональних характеристик мононуклеарів після кріоконсервування

Вміст ядровмісних клітин підраховували в камері Горяєва, життєздатність - на проточному цитофлуориметрі «FACS Calibur» («Becton Dickinson», США) з використанням пропідія йодиду (PI).

Метаболічну активність оцінювали за допомогою МТТ-колориметричного тесту [143] з використанням набору Cell growth determination kit MTT based (Sigma, USA) згідно з інструкцією виробника. Метод заснований на здатності НАДФ-Н-залежних клітинних оксидоредуктазних ферментів

життєздатних клітин відновлювати тетразолієвий барвник (диметилтіазол-дифенілтетразоліумбромід) у нерозчинний формазан, який має пурпурове забарвлення.. Коротко: до 1×10^6 МНК в 100 мкл фізіологічного розчину додавали 50 мкл МТТ - реагента і інкубували 3 годин в CO_2 -інкубаторі при 37 °С. Далі до клітин додавали 0,5 мл стоп-реагенту (ДМСО 100%), ретельно піпетували й витримували ще протягом 15 хв при кімнатній температурі. Після цього центрифугували при 1500 об/хв 3 хв. Надосадову рідину зливали в кюветку і вимірювали оптичну щільність розчину формазану за допомогою спектрофотометра «Lambda 465» (США) при довжині хвилі 560 нм. Як контроль, використовували фізіологічний розчин.

Вміст CD14^+ -клітин в складі МНК оцінювали на проточному цитофлуориметрі «FACS Calibur» («Becton Dickinson», США) за допомогою моноклональних антимишачих антитіл: CD14 FITC («BD Biosciences», США) згідно з інструкцією фірми виробника. Ізотип-відповідні антитіла («BD Biosciences», США) були використані як негативний контроль.

Вміст білків теплового шоку hsp70 визначали із застосуванням hsp70 FITC (Abcam, UK) згідно з інструкцією виробника. Ізотип-відповідні антитіла («BD Biosciences», США) були використані як негативний контроль. Статистичний облік даних, отриманих при цитофлуориметричному аналізі, здійснювали за допомогою програми «WinMDi 2.8.» (Joseph Trotter, Scripps Institute, La Jolla, США).

2.7 Отримання *in vitro* толерогенних дендритних клітин з кріоконсервованих моноклеарів

МНК у концентрації $3\text{-}5 \times 10^6$ кл/мл культивували в пластикових чашках Петрі з діаметром 3 см у середовищі RPMI-1640 з додаванням 10% ЕТС і 1%-ного розчину антибіотиків (100 од./мл пеніциліну, 0.1 мг/мл стрептоміцину). Клітини культивували при 37 °С у атмосфері 5%-ного CO_2 . На 0 добу у культуральне середовище додавали мишачі рекомбінантні GM-CSF (Sigma-

Aldrich, Англія) - 20 нг/мл, IL-4 (Sigma-Aldrich, Англія) - 5 нг/мл [139] та дексаметозон (Dex) - 0,4 мкг/мл (Sigma-Aldrich, Англія) [84] для отримання толерогенних дендритних клітин (толДК). Через 3 доби додавали свіжу порцію культурального середовища з цими ж компонентами. На етапах культивування за зростанням клітин спостерігали за допомогою інвертованого мікроскопа (Axiovert 40C, Zeiss), фотодокументацію здійснювали за допомогою світлового мікроскопа (Axio Observer Z1, Zeiss). На 7 добу з чашок збирали неадгезовані і слабоадгезовані клітини – кандидати в ДК [139] центрифугували при 300g протягом 10 хв. і ресуспендували у робочому середовищі для подальшого цитофлуориметричного аналізу та оцінки функціонального потенціалу.

Для простоти сприйняття, клітини, отримані *in vitro* з нативних МНК (НатМНК) та кріоконсервованих МНК за Р1 (КріоР1МНК) і Р2 (КріоР2МНК) в подальшому ми будемо називати відповідно НатДК, КріоР1ДК, КріоР2ДК.

2.8 Оцінка структурних та функціональних характеристик клітин, отриманих *in vitro* з нативних і кріоконсервованих мононуклеарів

Вміст ядровмісних клітин у неадгезованій і слабоадгезованій фракції, що були отримані на 7 добу культивування МНК підраховували в камері Горяєва, *життєздатність* - на проточному цитофлуориметрі «FACS Calibur» («Becton Dickinson», США) з використанням пропідія йодида (PI).

Метаболічну активність оцінювали за допомогою МТТ-тесту [143], як було описано раніше.

Фенотипову оцінку клітин здійснювали на проточному цитофлуориметрі «FACS Calibur» («Becton Dickinson», США) з використанням моноклональних антимішачих антитіл: CD11b FITC, CD14 FITC, CD83 FITC, CD80 FITC і CD86 FITC та ізотипічних контролів до них («BD Biosciences», США) згідно з інструкціями виробника. Рівень експресії фенотипічних маркерів оцінювали за середньою інтенсивністю флуоресценції (СІФ), який розраховувався, як кількість клітин, що експресують маркер, помножену на СІФ. Вміст білків

теплового шоку визначали із застосуванням hsp70 FITC (Abcam, UK) згідно з інструкцією виробника. Статистичний облік даних, отриманих цитофлуориметричним аналізом, здійснювали за допомогою програми «WinMDI 2.8.» (J. Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA) («BD Biosciences», США).

2.9 Індукція ад'ювантного артриту

Ад'ювантний артрит (АА) індукували у мишей лінії СВА/Н субплантарним введенням повного ад'юванта Фрейнда (ПАФ) (Santa Cruz, USA) у дозі 0,1 мл/на мишу [144]. Розвиток та тяжкість перебігу АА у тварин оцінювали за допомогою індексу артриту (ІА), який є відношенням довжини окружності дослідного суглоба до окружності контрольного - контрлатерального. У здорових тварин ІА було прийнято за 1,0.

2.10 Визначення запальних медіаторів при ад'ювантному артриті

Вміст серомукоїда в сироватці крові тварин з АА й після введення толДК визначали турбодиметричним методом за допомогою набору реактивів (ТОВ НПП Філісит-Діагностика, Україна) згідно з інструкцією виробника й оцінювали в одиницях помутніння (S-N) по Shank і Hoagland. Кількість сіалових кислот визначали по методу Гессе й оцінювали в умовних одиницях [145].

2.11 Введення толерогенних дендритних клітин, що вирощені з кріоконсервованих мононуклеарів, тваринам з ад'ювантним артритом

ТолДК, отримані *in vitro* з нативних (НатМНК) або кріоконсервованих (КріоМНК) за дослідженими режимами МНК у дозі 5×10^5 кл/на мишу [3] в 0,2 мл робочого середовища вводили мишам внутрішньовенно на 14-у добу

розвитку АА [4]. Через 7 та 14 діб після їх введення визначали ІА, вміст прозапальних медіаторів, Т-рег клітин в селезінці і вміст цитокінів в сироватці крові тварин всіх дослідних груп. У якості контролю адоптивної терапії толДК, тваринам у той же термін розвитку АА внутрішньовенно вводили фармакологічний препарат Дексаметазон (KRKA, Словенія) 0,022 мг/мишу в 0,2 мл фізіологічного розчину [146].

2.12 Вміст цитокінів в сироватці крові тварин

Вміст про- (ІЛ-6, ІФН- γ , ФНП- α) і протизапальних (ІЛ-4, ІЛ-10) цитокінів в сироватці крові нелікованих, а також тварин з АА після введення толДК, отриманих з нативних або кріоконсервованих за різними режимами МНК визначали за допомогою набору Cytometric Bead Array Th1/Th2/Th17 (mouse) Kit IL-10 set («BD Biosciences», США) згідно з інструкцією виробника.

З метою більш показової оцінки цитокінового профілю, було введено коефіцієнт (умов. од.) зміни продукції цитокінів, що є співвідношенням їх вмісту (пг/мл) на різних етапах розвитку АА, а також після введення різних видів ДК тваринам з патологією, до відповідного показника в інтактному контролі, який було прийнято за «1».

2.13 Оцінка *in vitro* толерогенної функції дендритних клітин

Виділення $CD4^{+}$ -клітин, як потенційних для утворення Трег, при їх сокультивуванні з ДК, здійснювали на магнітному сортері (BD™ Imagnet) з використанням anti-mouse $CD4$ Magnetic Particles – DM (BD) за протоколом фірми-виробника. Чистота виділення $CD4^{+}$ -клітин становила $82 \pm 12\%$.

Толерогенну функцію ДК визначали за індукцією Трег (FOXP3 $^{+}$ -клітин), які формуються з $CD4^{+}$ -клітин під дією ДК. Свіжоізолювані $CD4^{+}$ -клітини селезінки ($2,5 \times 10^6$) тварин з АА сокультивували з ДК ($0,5 \times 10^6$) отриманими з КріоМНК у середовищі RPMI-1640 з 10% ЕТС без додавання цитокінів [96].

Виділені CD4⁺ -клітини, що культивували без ДК, використовували як контроль. Через 4 доби культивування в CO₂-інкубаторі при 37 °С клітини збирали, центрифугували при 300g протягом 10 хв. і ресуспендували в PBS, пермеабілізували за допомогою набору BD Cytofix/CytopermTM Fixation/Permeabilization Kit (№554714) та визначали кількість Трег (FOXP3⁺) флуоресцентним методом застосовуючи МАТ до FOXP3 (PE) (Becton Dickinson) згідно з протоколом фірми-виробника.

2.14 Оцінка *in vivo* толерогенної функції дендритних клітин

Фенотипову оцінку Трег-клітин в селезінці тварин з АА після введення толДК, отриманих з кріоконсервованих за різними режимами МНК кісткового мозку здійснювали на проточному цитофлуориметрі «FACS Calibur» («Becton Dickinson», США) за допомогою моноклональних антимишачих антитіл: CD4 FITC, CD25 PE, FOXP3 PE («BD Biosciences», США) згідно з інструкцією виробника. Статистичний облік даних, отриманих при цитофлуориметричному аналізі, здійснювали за допомогою програми «Winmdi 2.8.» (J.Trotter).

Вміст транскриптів гена *foxp3* оцінювали в клітинах селезінки тварин з АА після введення толДК методом ЗТ-ПЛР. В ПЛР використовували пари праймерів до гену *foxp3* і гену «домашнього хазяйства» - *β-actin*, які були сконструйовані на основі бази даних на сайті «GenBank» Національного центру біотехнологічної інформації (NCBI BLAST, USA). Були використані праймери: до гену *foxp3* - NM_054039.2 (довжина фрагмента 220 п.н.) F: CCTCTCGGACCCGGCCCAAG, R: CCCAGTGATGGGAAGGAACA; до гену *β-actin*- NR_007393.3 (довжина фрагмента 113 п.н.) F: CACTGCCGCATCCTCTTCCT, R: AGGAAGGCTGGAAAAGAGCC, які були синтезовані в фірмі «Metabion» (ТОВ «БІОЛАБТЕХ», Україна). (Табл. 2.14.1).

Таблиця 2.14.1 – Характеристика праймерів генів: *Foxp3*, і «домашнього господарства» - *β-actin*

Назва гену і	Форвардний (F)	і реверсний	Довжина	Кількість
--------------	----------------	-------------	---------	-----------

номер «GenBank»	в (R) праймери	продукту ампліфікації	циклів ПЛР	в
<i>Foxp3</i>	F:	220	40	
NM_054039.2	CCTCTCGGACCCGGCCCAAG, R: CCCAGTGATGGGAAGGAACA			
β -actin	F:	113	40	
NR_007393.3	CACTGCCGCATCCTCTTCCT, R: AGGAAGGCTGGAAAAGAGCC			

Лізис клітин, отримання тотальної клітинної РНК, видалення геномної ДНК, ампліфікацію кДНК здійснювали методом ПЛР за допомогою набору для RT-ПЛР Luna Cell Ready One-Step RT-qPCR Kit E3030S (ТОВ «БІОЛАБТЕХ», Україна). Зворотню транскрипцію і ампліфікацію здійснювали в аналізаторі нуклеїнових кислот АНК-16. Умови проведення реакції представлені в таблиці 2.14.2.

Таблиця 2.14.2 – Умови проведення реакції ПЛР

Етап	Температура	Час	Кількість циклів
Зворотня транскрипція	55 ⁰ С	10 хвилин	1
Початкова денатурація	95 ⁰ С	1 хвилина	1
Денатурація	95 ⁰ С	10 секунд	
Елонгація	60 ⁰ С	30 секунд	40

Відносний рівень експресії генів (R) обчислювали методом $\Delta\Delta C_t$ [147]:

$$(E_{target})^{\Delta C_p target (інтакт - дослід)}$$

$$R = \frac{E_{\beta-actin}}{(E_{\beta-actin})^{\Delta C_p \beta-actin (інтакт - дослід)}},$$

де R – відносний рівень експресії таргетного гена (*foxp3*); E_{target} і $E_{\beta-actin}$ – ефективність ПЛР кДНК таргетного гена (*foxp3*) і *β -actin*, відповідно; ΔC_p_{target} і $\Delta C_p_{\beta-actin}$ – відхилення C_p (інтактні – дослід.) кДНК гена *foxp3* і *β -actin* відповідно. Ефективність ампліфікації і для *foxp3*, і для *β -actin* складала 95-96%.

2.15 Статистична обробка отриманих результатів

Статистична обробка даних проводилася з використанням пакету програм SPSS (Statistics 17.0, США). Отримані експериментальні дані представлені як середнє значення $\pm$ стандартне відхилення. Достовірність відмінностей між групами оцінювали за методом Манна-Уїтні. Відмінності вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

Дані також обробляли за методом Манна-Уїтні із застосуванням комп'ютерної програми Statistica 10.0 ("StatSoft, Inc.", США). Дані наведені у вигляді медіани з нижнім та верхнім квантилями (Me [LQ; UQ]). Відмінності вважалися статистично значущими при $p < 0,01$ за U-критерієм Манна-Уїтні з урахуванням поправки Бонферроні.

РОЗДІЛ 3

ОТРИМАННЯ *IN VITRO* ДЕНДРИТНИХ КЛІТИН

3.1 Відпрацювання умов отримання дендритних клітин з толерогенними властивостями з попередників кісткового мозку експериментальних тварин

Джерело отримання ДК в клініці – це МНК або моноцити периферичної крові людини. В експериментальних дослідженнях це кістковий мозок (КМ) або селезінка. Мононуклеарні клітини у клініці виділяють з периферичної крові шляхом центрифугування в градієнті щільності Ficoll-Paque Premium, Nystopaque-1077, GE Healthcare, урографіна або верографіна [148]. Найчастіше для виділення лімфоцитів із цільної крові використовують розчин Фікола-урографіна із щільністю 1,077 г/мл. Принцип методу заснований на відмінності в плавучій щільності формених елементів крові. Суміш полісахарида фікола й рентгеноконтрастної речовини урографіна створює градієнт із такою щільністю, яка дозволяє при центрифугуванні розділити клітини периферичної крові або КМ на МНК, куди входять лімфоцити, моноцити, бластні гемопоетичні клітини; макрофаги мають меншу, ніж градієнт щільність і розташовуються над градієнтом; гранулоцити й еритроцити мають більшу щільність, ніж градієнт, тому опускаються на дно пробірки [148].

Незрілі ДК отримують *in vitro* з МНК при додаванні гранулоцитарно-макрофагального колонієстимулюючого фактору (ГМ-КСФ / GM-CSF) і інтерлейкіну-4 (ІЛ-4). Це призводить до диференціювання клітин-попередників саме у незрілі ДК, а не у макрофаги [4]. Незрілі ДК, здатні володіти деякими толерогенними функціями, але все ж не можуть застосовуватися як терапевтичний субстрат при аутоімунних захворюваннях за умови відсутності стійкості до прозапальних стимулів [89]. Тому в якості толерогенного індуктора

в наших дослідженнях був використан дексаметазон, що забезпечує стабілізацію їх толерогенного фенотипу.

У нашій роботі МНК виділяли з КМ мишей лінії СВА/Н, з використанням розчину Тразографа, аналога Урографіна, який у цей час знято з виробництва. Було одержанно МНК при нашаровуванні суспензії КМ на розчин Тразографа при його розведенні 1:3 дистильованою водою (рис. 3.1.1). У такий спосіб було отримано $40 \pm 4,8\%$ МНК.

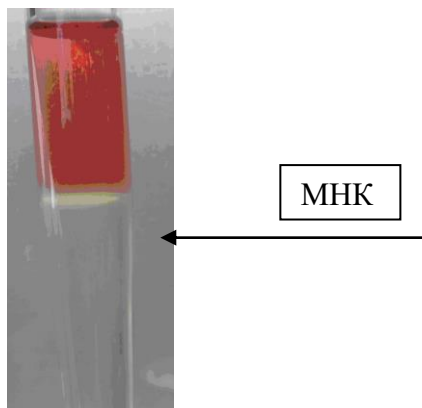


Рис. 3.1.1 Одержання моноклеарів кісткового мозку з використанням розчину Тразографа.

Для одержання ДК *in vitro* важливим моментом є визначення серед МНК вмісту моноцитів ($CD14^+$) – попередників ДК. Вміст $CD14^+$ -клітин у виділеній фракції МНК з використанням розчину Тразографа становив $12,3 \pm 1,3\%$.

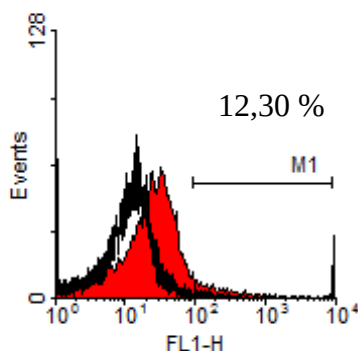


Рисунок 3.1.2 Гістограма вмісту $CD14^+$ -клітин у МНК одержаних з суспензії кісткового мозку.

Культивування МНК здійснювали на пластикових чашках Петрі в середовищі RPMI-1640 с 10% ЕТС без (рис. 3.1.2. А, С) і в присутності ГМ-КСФ, ІЛ-4 і дексаметазона (Декс) (рис. 3.1.3 Б, Д) протягом 7 діб.

На 3 добу у культурі МНК без факторів і Декс в основному були присутні округлі клітини різного діаметру й незначна кількість фібробластоподібних і полігональних клітин (рис. 3.1.3. А). На 7 добу не спостерігалось проліферації культури, вона була представлена дрібними округлими й розріджено розташованими фібробластоподібними клітинами (рис. 3.1.3. С).

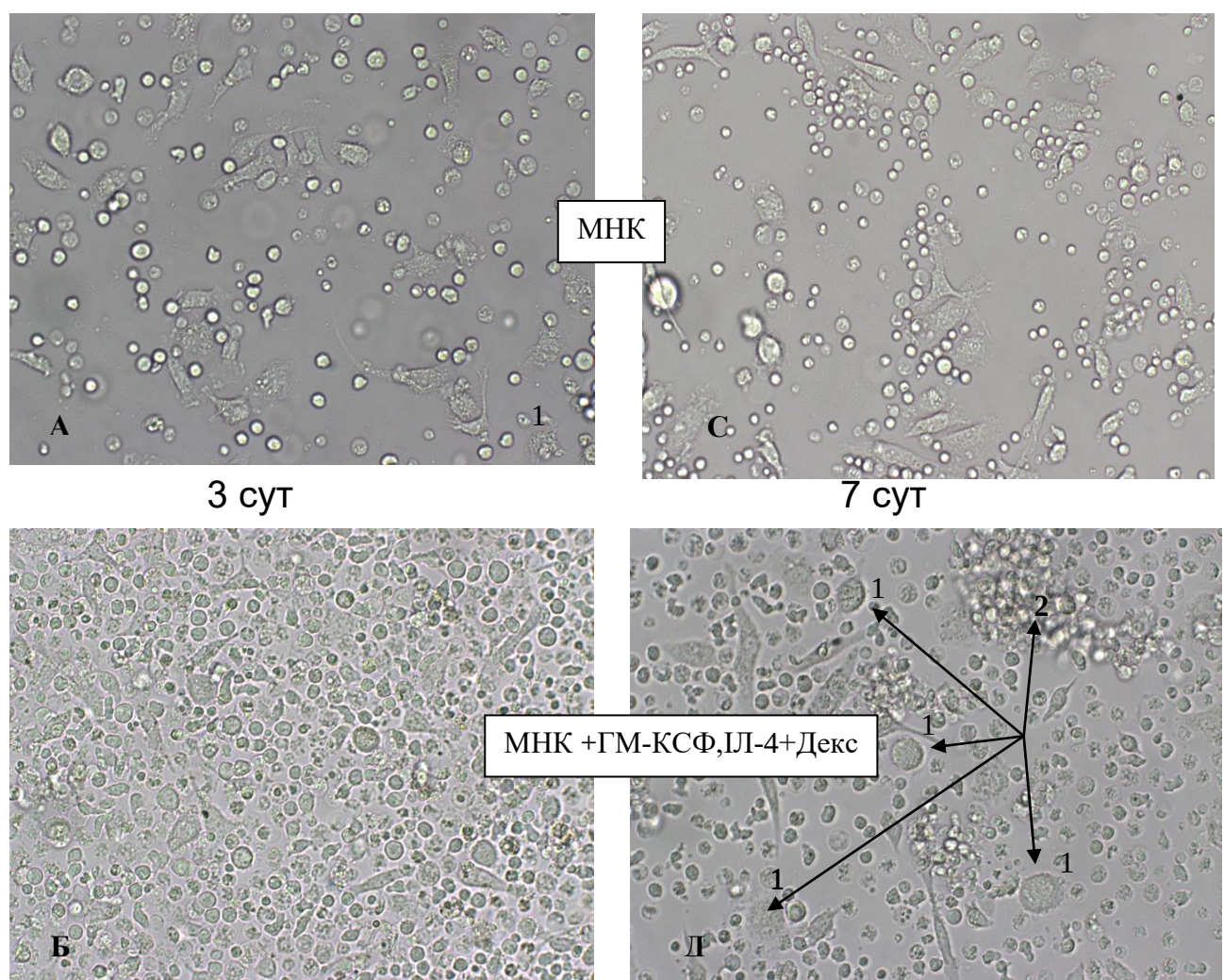


Рис. 3.1.3 Прижиттєве зображення 3-х (А, Б) й 7-добових (С, Д) культур МНК без (А, С) і с додаванням ГМ-КСФ, ІЛ-4 і Декс (Б, Д). Зб. х 40.

Примітки: неадгезуючі й слабо адгезуючі клітини (Д): 1 – клітини з $d=20$ мкм (потенційні ДК); 2 - флуктуючі агрегати-колонії з цих клітин.

У культурі із ГМ-КСФ, ІЛ-4 і Декс на 3 добу клітини активно пролиферували утворюючи конфлюентний моношар, що складався з округлих і полігональних клітин різного розміру з незначними відростками (рис. 3.1.3 Б). Протягом культивування до 7 діб збільшувалася, в порівнянні із 3 добою, кількість полігональних і фібробластоподібних клітин, і з'являлися великі округлі клітини діаметром 20 мкм з ацентрично розташованим ядром і вуалеподібною цитоплазмою (кандидати в ДК), частина з яких залишалася прикріпленою до пластику, а інша – відкріплювалася, утворюючи флуктуючі агрегати-колонії (рис. 3.1.3. Д).

На 7 добу не адгезуючи й слабо адгезуючи клітини відбирали, визначали життєздатність методом цитофлюориметричного аналізу за допомогою пропідія йодида (PI) і підраховували їх кількість. На табл. представлено кількість отриманих клітин – кандидатів в толДК – при культивуванні без (гр. 1) і с ГМ-КСФ, ІЛ-4 і Декс (гр. 2). Показано, що в 2 гр. було отримано майже у 2 рази більше клітин ніж в гр. 1 ($96,00 \pm 8,92\%$ і $51,00 \pm 4,43\%$ відповідно) в порівнянні з початковою кількістю посаджених на пластик МНК. При цьому серед них кількість $CD14^+$ -клітин протягом 7 діб культивування в 1 гр. зменшувалась в 1,8 раза, тоді, як в гр. 2 – в 3 рази, що вказує на їх більш швидке диференціювання у ДК, на яких цей маркер відсутній.

Таблиця. 3.1 Показники, що характеризують полічені в культурі ДК

Умови культивування	Кількість посаджених на чашку клітин, $\times 10^6$ (0 доба культивування)	Вміст $CD14^+$ -клітин, при культивуванні		Кількість отриманих на 7 добу клітин – кандидатів в ДК			
		0 доба	7 доба	абсолютна, $\times 10^6$	% від посаджених на чашку	життєздатні клітини, % (за PI)	
1гр. МНК	$15,00 \pm 1,08$	$12,30 \pm 1,32$	$6,64 \pm 0,45$	$7,65 \pm 0,62$	$51,00 \pm 4,43$	$70,00 \pm 6,60$	
2 гр. МНК+ ГМ-КСФ, ІЛ-4, Декс	$15,00 \pm 1,08$	$12,30 \pm 1,30$	$4,1 \pm 0,35^*$	$14,4 \pm 1,12^*$	$96,00 \pm 8,92^*$	$91,88 \pm 9,82^*$	

Примітка: * - показники мають достовірні відмінності від гр.1 ($P < 0,05$)

Аналіз життєздатності показав, що після культивування МНК у присутності ГМ-КСФ, ІЛ-4 і Декс було отримано 96,00% клітин – кандидатів в ДК з життєздатністю $91,88 \pm 9,82\%$, що було підтверджено методом цитофлуориметричного аналізу за допомогою пропідія йодіда – PI.

Критерієм контролю якості отриманих на 7 добу клітин – кандидатів в ДК поряд з їх кількістю і життєздатністю є імунофенотип та функціональна (толерогенна) активність.

3.2 Підтвердження толерогенної активності дендритних клітин, що вирощені в культурі з моноклеарів кісткового мозку на моделі ад'ювантного артрити у мишей

3.2.1. Оцінка фенотипових ознак дендритних клітин отриманих з попередників кісткового мозку

В останні кілька років проводяться спроби класифікувати ДК по різноманітності їх фенотипу, функціональному статусу тощо, однак дотепер це питання залишається дискутабельним. Виявлені імунні й толерогенні, зрілі й незрілі імунофенотипи, відповідно $CD11b^-$ продукуючи ІЛ-12 і $CD11b^+$, непродукуючи ІЛ-12 [101].

Аналіз літератури дозволив нам вибрати низку моноклональних антитіл: для проточної цитофлуориметрії для коректного визначення приналежності отриманих ДК до толерогенних, а саме: CD14 – глікопротеїновий рецептор, що експресується на мієлоїдних попередниках ДК, моноцитах, макрофагах, клітинах Купфера, лейкоцитах; CD83 – молекула, імуноглобулінової суперродини, експресується на зрілих ДК та активованих Т-лімфоцитах і відсутня або слабо експресується на толерогенних ДК; CD80/86 – молекули коstimуляційного сигналу. Особливий інтерес представляє CD11b – інтегрин

Mac-1, молекула, що експресується на незрілих й толерогенних і відсутня на зрілих імунних ДК [101].

Використання різного спектру ростових факторів і цитокінів для диференціювання ДК може призводити до отримання різних за фенотипом і функцією їх субпопуляцій. В нашому дослідженні результати цитофлуориметричного аналізу клітин отриманих у 7-добової культурі МНК представлені на рис. 3.2.1.1. В культурі з ГМ-КСФ, ІЛ-4 і Декс порівняно з культурою без додавання факторів вірогідно знижувався вміст $CD14^+$ клітин у 1,6 рази, $CD14^+CD83^+$ - в 2,5 рази. Вміст $CD11b^+$ -клітин збільшувався в 1,6 раза, що характерно для толерогенних ДК (рис. 3.2.1.2). Спостерігалася також тенденція до зниження експресії коstimуляторних молекул $CD80$ та $CD86$ на відміну від клітин, що отримані в культурі без ГМ-КСФ, ІЛ-4 та Декс (рис. 3.2.1.1).

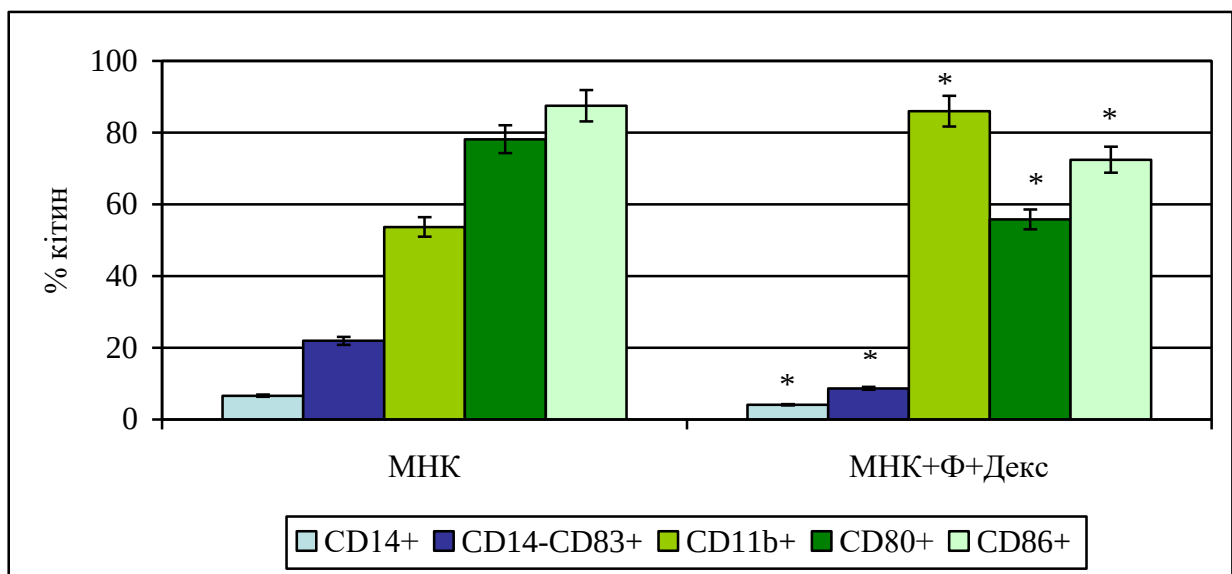


Рис. 3.2.1.1 Особливості експресії фенотипових маркерів клітин, отриманих в культурі моноклеарів кісткового мозку без і з толерогеніндуцибельними факторами (ГМ-КСФ, ІЛ-4, Декс).

Примітка: * - показники мають достовірні відмінності від МНК, що культивувалися без ГМ-КСФ, ІЛ-4 і Декс ($P < 0,05$).

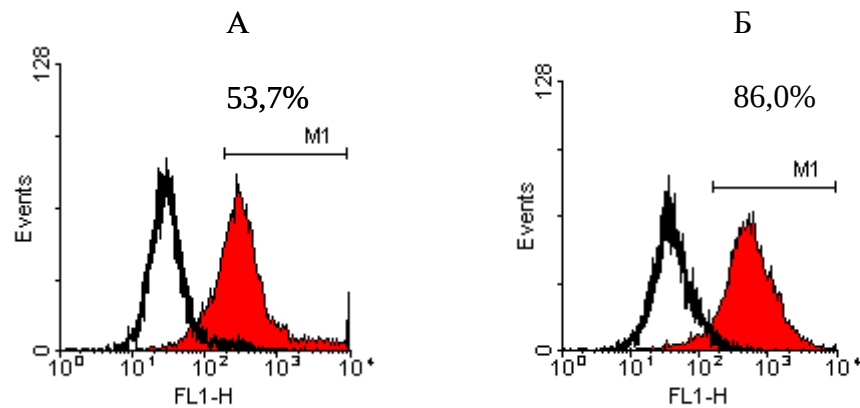


Рис. 3.2.1.2 Вміст CD11b⁺-клітин, отриманих в культурі моноклеарів кісткового мозку без (А) і з толерогеніндуцибельними факторами (ГМ-КСФ, ІЛ-4, Декс) (Б).

Таким чином, диференціація *in vitro* моноцитів в незрілі толерогенні ДК супроводжувалося втратою CD14 антигену, низьким рівнем експресії CD83 маркера і коstimуляторних молекул (CD80/86), а також високим рівнем маркерної для цих клітин молекули CD11b.

3.2.2. Атестація вмісту Т-регуляторних клітин в селезінці тварин з ад'ювантним артритом після введення дендритних клітин

Як відомо, при АА спостерігається зниження вмісту і функціонального потенціалу Трег [23]. Рівень супресорної активності Трег у значній мірі визначається експресією гена транскрипційного фактора FOXP3, який обумовлює нормальне функціонування й розвиток Трег [46]. Толерогенні ДК становлять особливий інтерес у світлі пошуку нових підходів до корекції Т-регуляторної ланки імунітету при лікуванні аутоімунних захворювань, зокрема РА.

Тому наступним етапом дослідження була апробація толерогенної функції ДК отриманих у культурі на моделі ад'ювантного артриту (АА) у мишей. А саме, визначення їх здатності до індукції Трег-клітин у

прозапальному середовищі організму реципієнтів з патологією. Зокрема, стійкість до дозрівання *in vivo* при АІЗ, імовірно, є найважливішою особливістю серед усіх інших характерних ознак толДК [149].

Толерогенні ДК вводили на 14 добу розвитку АА [4]. Через тиждень (21 доба) визначали вміст Трег ($CD4^+CD25^+$ і $FOXP3^+$) в селезінці мишей до та після введення толДК (рис.3.2.2.1). У якості контролю адоптивної терапії толДК, тваринам у той же термін розвитку АА вводили фармакологічний препарат Дексаметазон (KRKA, Словенія).

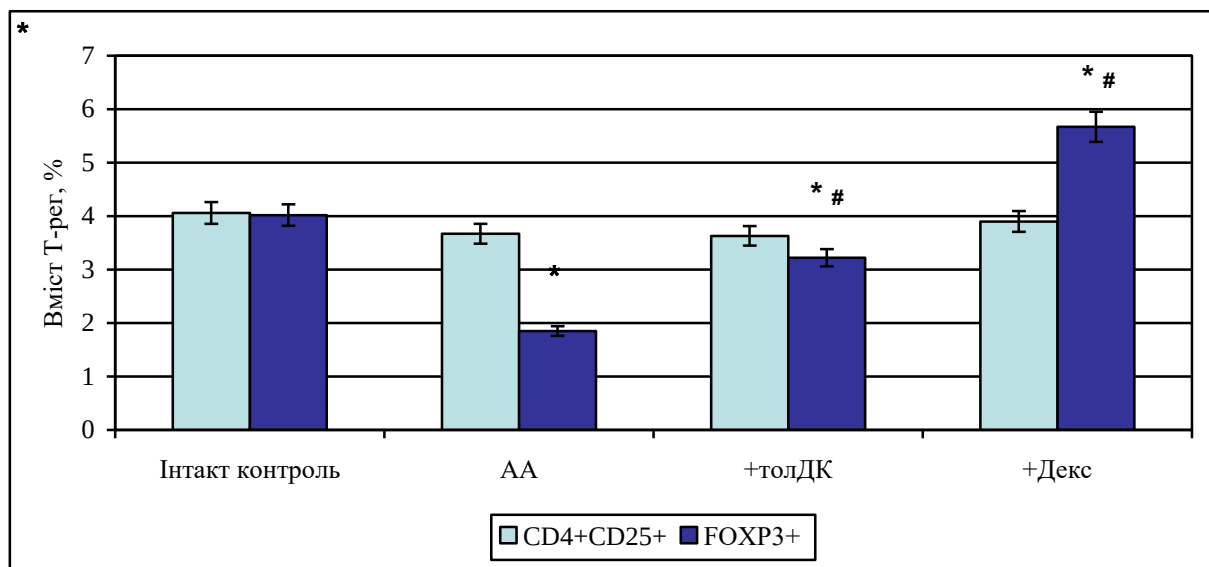


Рис.3.2.2 Вміст Трег ($CD4^+CD25^+$ і $FOXP3^+$) в селезінці мишей до та після введення толДК.

Примітки: толДК вводили тваринам на 14 добу розвитку АА; атестацію проводили через тиждень після їх введення (21 доба); * - показники мають статистично значущі відмінності від групи інтактних тварин (контроль); # - від групи тварин з АА ($P < 0,05$).

У інтактних тварин (контроль) вміст $CD4^+CD25^+$ - і $FOXP3^+$ -клітин був однаковим, тобто всі $CD4^+CD25^+$ -клітини були $FOXP3$ -позитивними (рис. 3.2.2.1). Звертає на себе увагу, суттєве «розбалансування» концентраційних взаємовідносин $CD4^+CD25^+$ - і $FOXP3^+$ -клітин у тварин з АА. Так, вміст $CD4^+CD25^+$ -клітин не відрізнявся від інтактного контролю, тоді як вміст $FOXP3^+$ – знижувався майже вдвічі, що свідчить про інгібіцію напрацювання цього протеїну при АА. Через 7 діб після застосування толДК при незмінній

кількості $CD4^+CD25^+$ -клітин майже вдвічі збільшувалась кількість $FOXP3^+$ -клітин у порівнянні з показником тварин з АА, що підкреслює підвищення їхньої функціональної активності. Після введення мишам з АА Декс ми також відмічали збільшення вмісту $FOXP3^+$ -клітин (у 3 рази), але воно було на багато більше ніж при ДК-терапії. Крім того, як зазначено Prado С. і співавт. [150] здатність дексаметазону підсилювати експресію $FOXP3$ -білка в Трег не корелювала з їхньою регуляторною активністю. Крім того відзначено, що кортикостероїди, до яких відноситься Декс є потужними імунодепресантами [151].

Слід зазначити, що критерієм оцінки терапевтичної ефективності толДК є клінічний статус тварин. Аналіз вмісту Трег і їх функціонального потенціалу разом з клініко-лабораторними показниками і індексом артриту може бути тест-системою ефективності лікування АА.

3.2.3. Порівняльний аналіз клініко-лабораторних показників: вмісту серомукоїдів, сілової кислоти та індексу артриту

Як відомо, найбільш манифестною ознакою початку розвитку АА в гризунів є набряк регіональної до місця введення повного адьюванта Фрейнда (ПАФ) кінцівки. Субплантарне введення ПАФ викликало у мишей дослідних груп появу місцевої запальної реакції, яка клінічно проявлялася у вигляді набряку суглоба [152], величину якого характеризує індекс артриту (ІА).

Максимального значення ІА набував на 7-у добу після індукції патології ($1,70 \pm 0,058$), після чого відмічалось його повільне зниження, хоча на протязі всього строку спостереження він залишався значно вище контрольного показника (рис. 3.2.3.1).

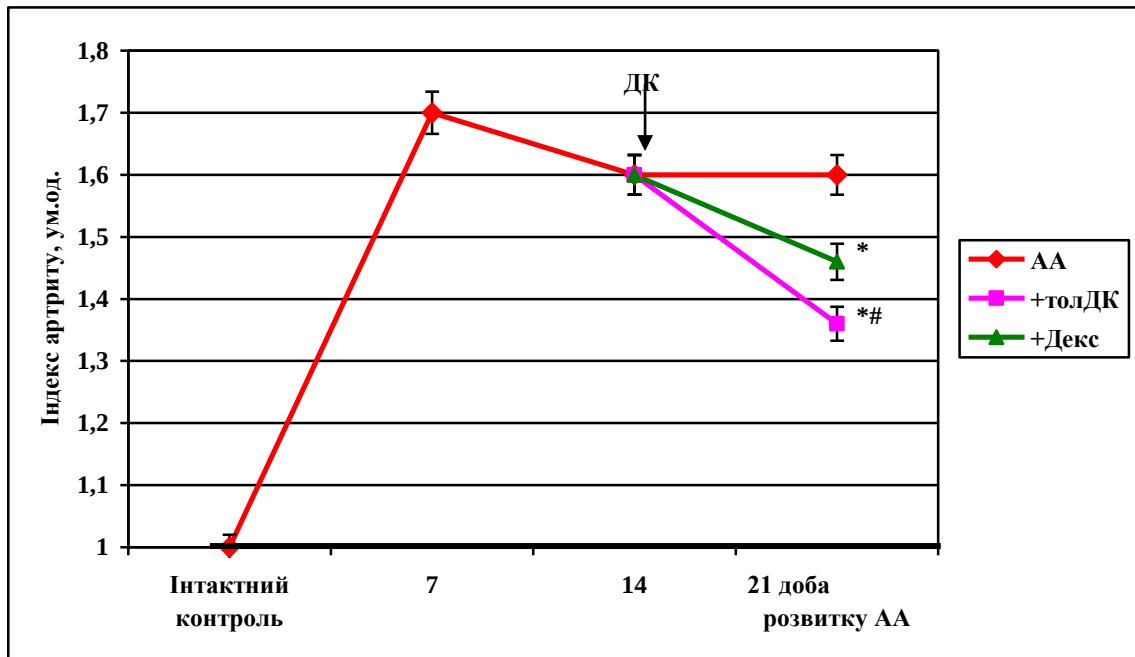


Рис. 3.2.3.1 Індекс артриту (ІА) у тварин з АА до та після введення ДК, що отримані *in vitro* з нативних МНК.

Примітки: ДК вводили на 14 добу розвитку АА. ІА оцінювали через 7 діб (21 доба розвитку патології) після введення ДК; * – показники мають статистично значущі відмінності від групи тварин з АА; # – від групи тварин з АА+Декс; ІА у інтактних тварин (інтактний контроль) було прийняте за «1».

На 14 добу розвитку АА клінічний статус відбивав імунозапальний процес у тварин, що співпадало з дисфункцією Трег-клітин (рис.3.2.2.1).

Дані, що представлені на рис. 3.2.3.1 демонструють здатність ДК-терапії мінімізувати прояви розвитку АА. Так, через тиждень після введення толДК (21 доба) ми спостерігали зниження ІА як основного клініко-діагностичного показника АА, порівняно з неліченими тваринами ($1,36 \pm 0,01$ і $1,60 \pm 0,02$ у.о. відповідно). Причому після введення толДК цей показник знижувався більшою мірою в порівнянні з групою тварин, яким вводили Декс, що становило $1,46 \pm 0,02$ у.о.

Відомо, що РА супроводжується деструкцією сполучної тканини суглобів, до складу якої входять глікопротеїни, рівень яких визначають за вмістом сіалових кислот і серомукоїдів. Вже на 7-у добу після індукції АА в сироватці крові тварин максимально збільшувався вміст серомукоїдів (рис.

3.2.3.2 А) і сіалових кислот (рис. 3.2.3.2 Б), що співпадало з максимальним показником ІА. У подальший період ці показники знижувалися, однак до 28-ої доби залишалися вище рівня контрольних значень.

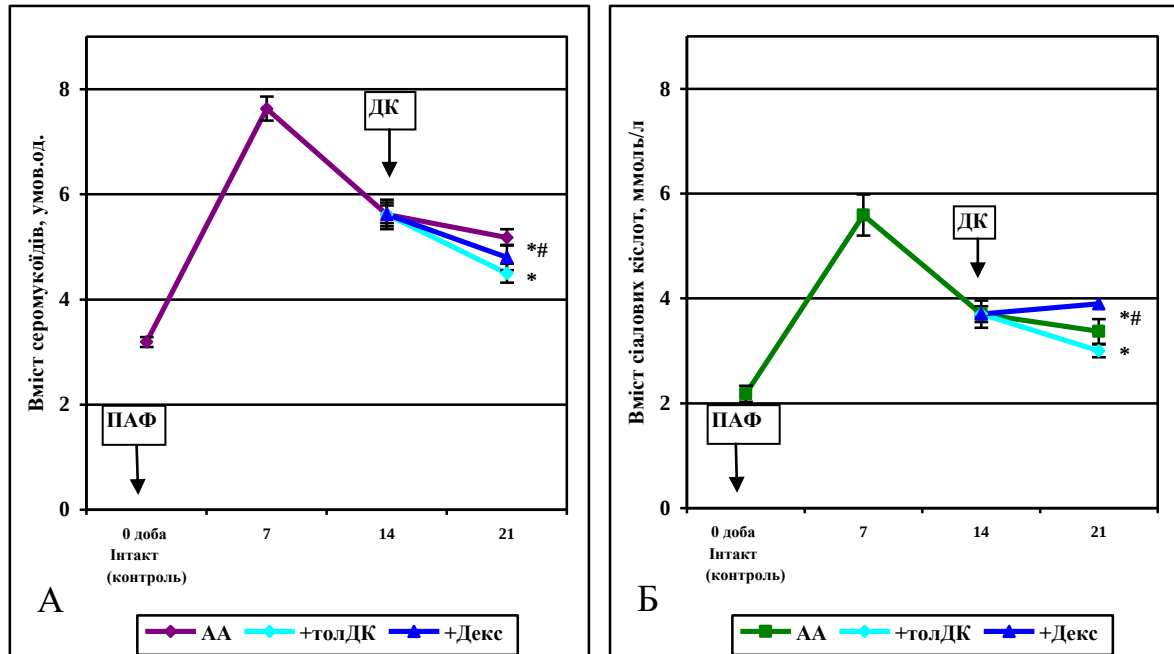


Рис. 3.2.3.2 Динаміка зміни клініко-лабораторних показників у тварин з АА до та після ДК-терапії: вміст серомукоїдів (А) і сіалових кислот (Б) в сироватці крові тварин.

Примітки: ПАФ – повний ад’ювант Фрейнда; ДК – дендритні клітини; * – показники мають статистично значущі відмінності від групи тварин з АА; # – від гр. тварин + толДК ($P < 0,05$).

Через тиждень після ДК-терапії вміст сіалових кислот і серомукоїдів в сироватці крові тварин з АА також знижувався, що співпадало і зі зниженням ІА в цій групі тварин (рис. 3.2.3.1). Дивно, але застосування Декс у меншій мірі знижувало ці показники на відміну від толДК.

Аналізуючи взаємозв'язок клінічних показників зі станом Т-регуляторної ланки імунітету (рис. 3.2.2.1) тварин до та після введення толДК, слід зазначити, що вони коригували вміст і функціональний потенціал Трег у реципієнтів з АА, що сприяло нормалізації їх клінічного статусу.

Цікаво що застосування Декс, як потужного протизапального засобу, майже не впливало на показники $CD4^+CD25^+$ -клітин, хоча значно підвищувало

вміст FOXP3⁺-клітин, але в меншій мірі, ніж толДК знижувало ІА. Це може бути обумовлене тим, що Декс агравує зростання FOXP3⁺-клітин з низькою концентрацією цього протеїну, якої недостатньо для інгібіції клінічного стану тварин з АА. Складається враження, що для покращення клінічного статусу тварин з АА велике значення має ситуація, коли всім CD4⁺25⁺-клітини притаманна експресія FOXP3-білку, тобто їх «гармонійне» співвідношення, як і в контролі. Саме це ми спостерігали при введенні толДК тваринам з АА.

Таким чином, толДК коригували дисфункційний стан Трег-клітин у реципієнтів з АА і сприяли нормалізації їх клінічного статусу, що свідчить про ефективність адоптивної ДК-терапії.

РОЗДІЛ 4

ДОСЛІДЖЕННЯ ОСОБЛИВОСТЕЙ ВПЛИВУ РІЗНИХ РЕЖИМІВ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ НА СТРУКТУРНІ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТОЛЕРОГЕННИХ ДЕНДРИТНИХ КЛІТИН, ЩО ОТРИМАНІ *IN VITRO* З КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ПОПЕРЕДНИКІВ КІСТКОВОГО МОЗКУ

4.1 Порівняльний аналіз впливу різних режимів кріоконсервування на структурні та функціональні показники мононуклеарів кісткового мозку

Було оцінено вплив різних умов кріоконсервування під захистом 10% ДМСО з повільною швидкістю охолодження 1 град/хв до - 80°C (P1); до - 40°C (P2); до - 25°C (P3) з наступним зануренням у кожному випадку у рідкий азот (- 196°C), на структурні й функціональні показники МНК кісткового мозку з метою одержання з них *in vitro* після розморожування толДК.

4.1.1 Кількість клітин та їх схоронність

Оцінка безпосередньо після розморожування та відмивання від кріопротектора кріоконсервованих за різними режимами МНК показала, що кількість та життєздатність кріоконсервованих за режимом 2 МНК (КріоP2МНК) були вищими порівняно з КріоP1МНК і КріоP3МНК (табл. 4.1.1). Кількість і життєздатність КріоP2МНК після заморожування не мали достовірних відмінностей порівняно з НатМНК (контроль), тоді як при використанні P1 та P3 ці показники зменшувались на 24% і 19,6%, та 34,4% і 44,7% відповідно. Вони також достовірно відрізнялися і від цих показників КріоP2МНК. Заморожування МНК за P3 призводило до різкого зниження як їх кількості так і життєздатності.

Таблиця 4.1.1 Кількість і життєздатність кріоконсервованих за різними режимами МНК, Ме [LQ; UQ]

Групи	МНК	
	кількість, $\times 10^7$	життєздатність, %
НатМНК (контроль)	0,96 [0,94; 1,10]	97,0 [96,0; 97,0]
КріоP1МНК	0,73 [0,71; 0,75]* #	78,0 [77,0; 79,0]*
КріоP2МНК	0,85 [0,84; 0,94]	88,0 [85,0; 91,0]
КріоP3МНК	0,63 [0,59; 0,62]*#	53,6 [50,0; 57,0]*#

Примітка: * - показники мають достовірні відмінності від НатМНК; # - від КріоP2МНК ($p < 0,01$ за U-критерієм Манна-Уїтні з урахуванням поправки Бонферроні).

Одже, оцінка кріоконсервованих за різними режимами МНК після розморожування й відмивання від кріопротектору свідчить про перевагу P2 в забезпеченні як кількості, так і життєздатності у порівнянні з P1 і P3.

До та після кріоконсервування за різними режимами був оцінений вміст в МНК CD14⁺ -клітин – попередників ДК. Гістограми вмісту CD14⁺ -клітин у МНК одразу після заморожування та відмивання від кріопротектора було отримано методом проточної цитометрії і представлено на рис. 4.1.1. Було встановлено, що після кріоконсервування за P2 вміст CD14⁺-клітин був вищим (18,00%) як у порівнянні з нативним контролем (12,3%), так і P1 (15,80%) та P3 (11,09%). Не виключено, що після кріоконсервування збільшення кількості CD14⁺-клітин в МНК при застосуванні P1 і P2 відбувалося не тільки за рахунок загибелі і перерасподілу інших клітин, але й може бути обумовлено стимулюванням експресії цього маркера на CD14⁺ - попередниках моноцитопоезу. Раніше такий феномен «суперекспресії» поверхневих маркерів після кріоконсервування був встановлений і на інших клітинах гетерогенних суспензій [12].

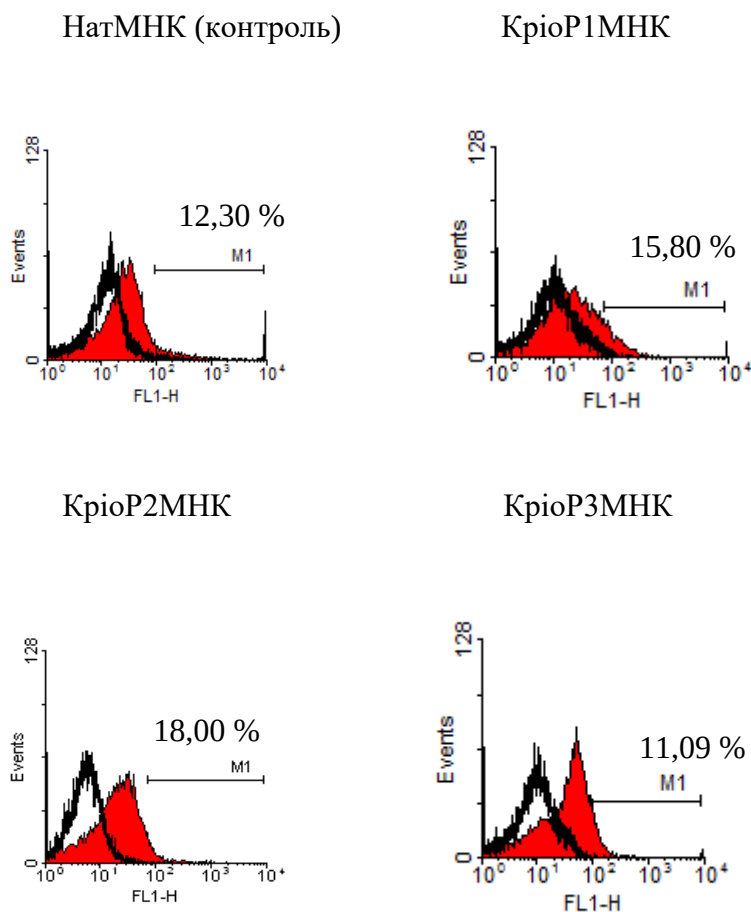


Рис. 4.1.1 Гістограми вмісту $CD14^{+}$ -клітин у МНК одразу після розморожування та відмивання від кріопротектора, отримані методом проточної цитометрії.

Отримані результати дозволяють припустити, що генерація ДК із МНК заморожених за Р2 буде протікати швидше, ніж при використанні Р1 і Р3.

4.1.2 Метаболічна активність

Для визначення функціональної повноцінності кріоконсервованих МНК за різними режимами відразу після розморожування й відмивання від кріопротектору була також оцінена їхня метаболічна активність за допомогою МТТ- колориметричного тесту.

Отримані результати продемонстрували відсутність підвищення метаболічної активності клітин незалежно від режиму заморожування (рис. 4.1.2).. Проте P2 все одно мав перевагу над P1 та тим більше P3 за цим показником.

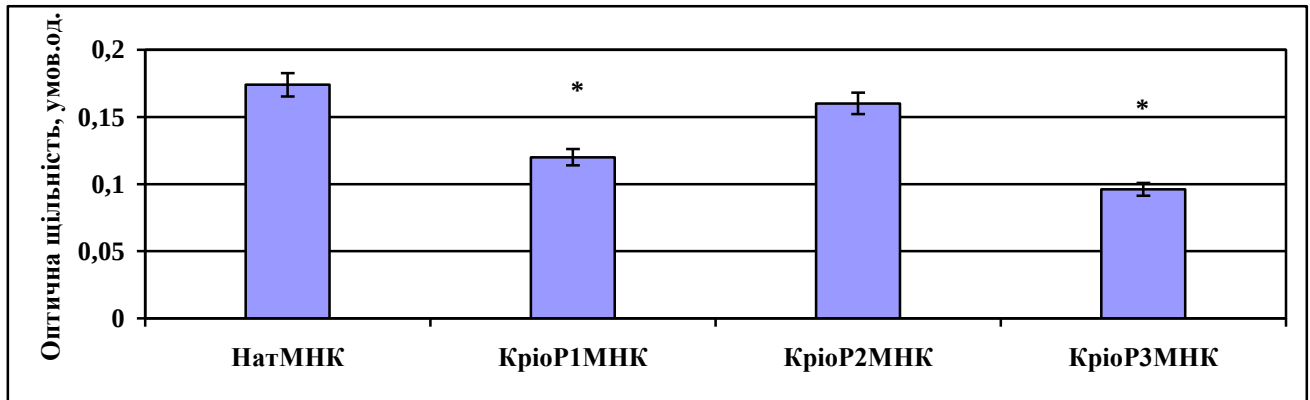


Рис. 4.1.2 Метаболічна активність нативних і кріоконсервованих за різними режимами МНК відразу після розморожування і відмивання від кріопротектору.

Примітка: * - показники мають достовірні відмінності від НатМНК ($P < 0,05$).

У КріоP1МНК відразу після розморожування метаболічна активність знижувалася на 31%, у КріоP3МНК – на 44,8%, тоді як у КріоP2МНК вона достовірно не відрізнялася від НатМНК.

4.1.3 Вміст білків теплового шоку

Як вже підкреслювалось, зараз активно вивчається протизапальний ефект білків теплового шоку, зокрема сімейства Hsp70 [17; 18]. Підвищення внутрішньоклітинного синтезу білків теплового шоку (БТШ), зокрема Hsp70, відбувається не тільки на тепловий шок, але й на будь-який стресовий вплив, яким є кріоконсервування.

Враховуючи цей факт, нами, був визначений вміст hsp70⁺-клітин у МНК після кріоконсервування за різними режимами. Показано в різному ступені

збільшення їх вмісту одразу після заморожування-відігрівання у порівнянні з нативним контролем (НатМНК) по всіх використаних режимах (рис. 4.1.3.1). При Р1 і Р2 на тлі зниження вмісту МНК на 24% і 12%, кількість hsp70⁺-клітин збільшувалася в 1,7 і 2,3 рази відповідно. Триразове їх збільшення у порівнянні з НатМНК було відзначено при кріоконсервуванні МНК за Р3 на фоні зниження кількості МНК на 34%.

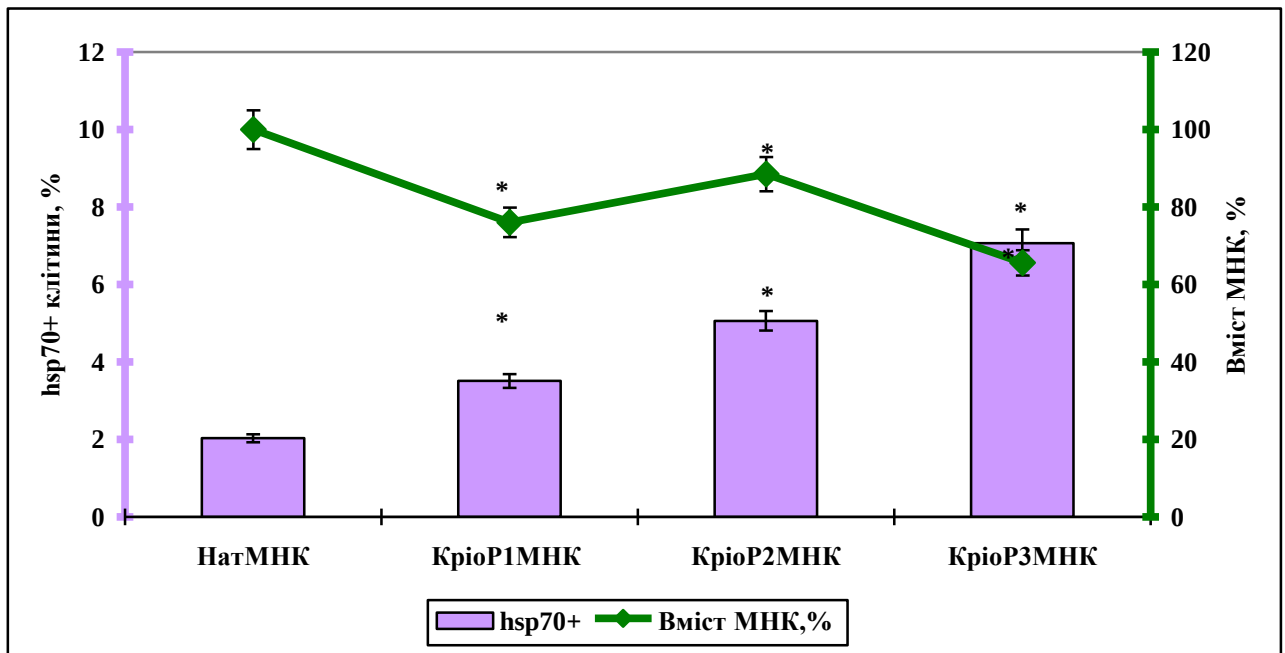


Рис. 4.1.3.1 Вміст hsp70⁺-клітин в МНК після кріоконсервування за різними режимами.

Примітка: * - показники мають достовірні відмінності від НатМНК (P<0,05).

На рис. 4.1.3.2 представлено гістограми, отримані методом проточної цитометрії, що демонструють вміст hsp70⁺-клітин у МНК, а також ступінь експресії цього білка за середньою інтенсивністю флуоресценції (СІФ). Цей показник є свідком функціональної активності hsp70⁺-клітин. Слід зазначити, що після кріоконсервування МНК за Р1 і Р2 СІФ hsp70⁺-клітин серед них незначно знижувалася порівняно із цим показником в hsp70⁺-НатМНК на 13% і 19% відповідно на фоні підвищення загальної кількості МНК після розморожування (рис. 4.1.3.2). В той же час в КріоР3МНК СІФ hsp70⁺-клітин знижувався на 41% (СІФ - 61,32 у. о.). Цей факт може свідчити про низький

ступінь експресії білка Hsp70 в цих клітинах, одже знижену їх функціональну активність незважаючи на збільшення вмісту hsp70⁺-КріоРЗМНК.

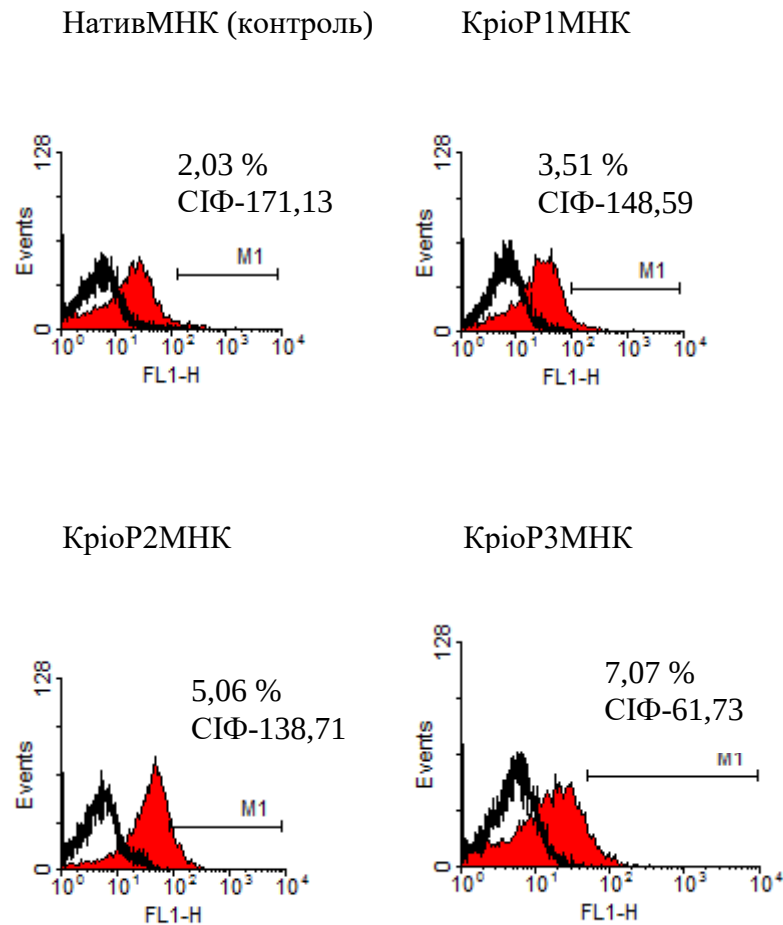


Рис. 4.1.3.2 Гістограми вмісту hsp70⁺-клітин у МНК одразу після розморожування та відмивання від кріопротектора отримані методом проточної цитометрії.

Таке збільшення hsp70⁺-клітин в КріоРЗМНК не призводило до збільшення метаболічної активності цих клітин, що була видзначена в МТТ-тесті (рис. 4.1.2). Крім того є дані, що надекспресія Hsp70 індукує секрецію прозапальних цитокінів ІЛ-6, ІЛ-12, ІЛ-15 моноцитами людини за допомогою передачі сигналів через CD14 і р38 MARK, поряд з підвищеною експресією ФНП-а й оксиду азоту [153].

Протизапальна роль Hsp70 описана в багатьох оглядах [16; 17; 18]. Авторами наводяться можливі механізми імуносупресивної дії Hsp70. На їхню

думку, ці білки зв'язуються з ендоцитарними рецепторами на мієлоїдних клітинах-супресорах і моноцитах, ДК, модулюючи їх клітинний фенотип до толерогенного, що призводить до продукції IL-10 і, отже, до імуносупресії.

Слід зазначити, що після кріоконсервування МНК за різними режимами, важливо враховувати не тільки те, щоб їх вміст і життєздатність вірогідно не відрізнялися від нативного контролю. Також дуже важливим є збільшення таких показників як вміст CD14⁺-моноцитів - попередників ДК і експресія hsp70, який має протизапальний ефект за рахунок підвищення продукції IL-10 і стимуляції Трег- клітин у тварин з АІЗ.

Отже, переконливо продемонстровано, що КріоР2МНК за показниками збереження, життєздатності, вмісту CD14⁺-клітин, метаболічної активності та оптимального вмісту hsp70⁺-клітин та їх СІФ порівняно з Нат-, КріоР1- та КріоР3МНК мають всі підстави для формування з них *in vitro* ДК з підвищеним толерогенним потенціалом.

4.2 Оцінка структурних та функціональних характеристик дендритних клітин, що отримані з кріоконсервованих моноклеарів кісткового мозку

4.2.1 Фенотипові характеристики

Для генерації ДК з кріоконсервованих за різними режимами МНК одразу після розморожування і відмивання від кріопротектору їх культивували протягом 7 діб на пластикових чашках в середовищі RPMI-1640 з 10% ЕТС і ростовими факторами та Декс – індуктором незрілих толерогенних ДК (рис. 4.2.1.1).

На 7-у добу в культурі нативних (рис. 4.2.1.1А) та кріоконсервованих за різними режимами МНК (рис. 4.2.1.1.Б, С, Д) утворювався моношар з округлих, полігональних і фібробластоподібних клітин. При культивуванні КріоР2МНК (рис. 4.2.1.1.С) щільність моношару не відрізнялась від НатМНК (рис. 4.2.1.1.А) і була більшою на відміну і КріоР1МНК (рис. 4.2.1.1.Б) ($3,45 \times 10^3$ кл/см² і

1,85x10³ кл/см² відповідно), що становило 3,0x10³ кл/см². При культивуванні КріоР3МНК утворювався розріджений моношар клітин з дуже низькою щільністю (0,85 кл/см²). У всіх групах з'являлися у різній кількості великі округлі клітини до 20 мкм з ацентрично розташованим ядром - кандидати у ДК.

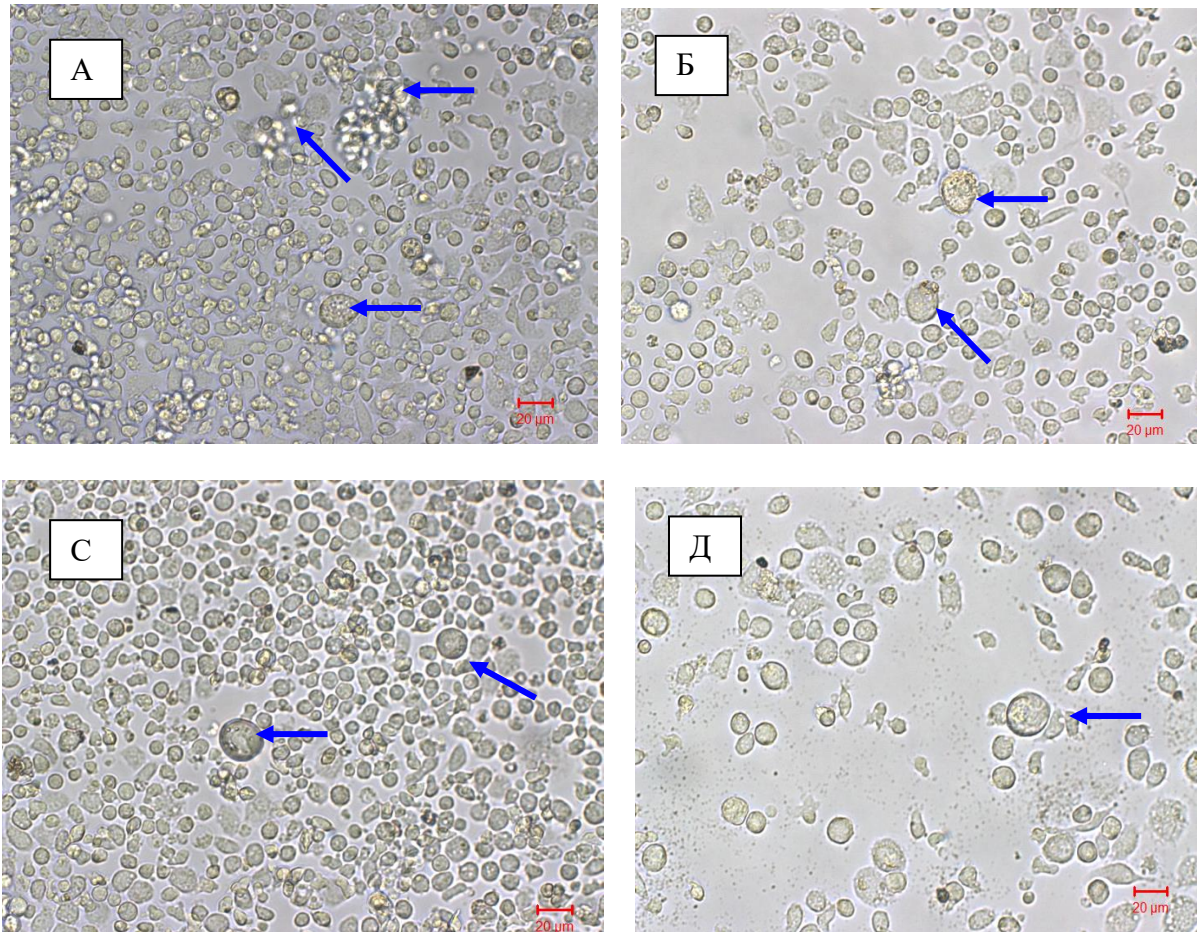


Рис.4.2.1.1 Прижиттєве зображення 7-добової культури ДК (КріоДК), генерованих з кріоконсервованих за різними режимами МНК.

Примітки: А - з НатМНК; Б – з КріоР1МНК; С – з КріоР2МНК; Д – з КріоР3МНК. 36. х 40. Стрілками позначені ДК за характерними морфологічними ознаками та розміром.

Після 7 діб культивування МНК, неадгезивні і слабоадгезивні клітини, які є кандидатами в ДК [139;3], збирали з чашок для подальшого аналізу їхньої кількості, життєздатності, фенотипової приналежності та оцінки функціонального потенціалу.

Таблиця. 4.2.1.1 Показники отриманих з КріоМНК на 7 добу *in vitro* клітин в неадгезивної і слабоадгезивної фракції.

Групи МНК, з яких <i>in vitro</i> отримували ДК	Кількість посаджених на чашку клітин, $\times 10^6$ (0 доба культивування)	Кількість отриманих на 7 добу культивування ДК			
		групи	абсолютна, $\times 10^6$	% від посаджених на чашку	Життєздатність, % за РІ
НатМНК (контроль)	10,00±2,04	НатДК (контроль)	5,57± 0,22	55,70	89,00
КріоР1МНК	10,00±1,20	КріоР1ДК	5,13± 0,30	51,30	77,17*
КріоР2МНК	10,00±1,35	КріоР2ДК	6,67± 0,23*	66,70*	74,04*
КріоР3МНК	10±1,05	КріоР3ДК	2,15±0,35	21,50*	47,32*

Примітка: * - показники мають достовірні відмінності від НатДК ($P < 0,05$).

Як показано в таблиці 4.2.1.1 кількість отриманих ДК через 7 діб культивування КріоР2МНК була вище, ніж при культивуванні Нат-, КріоР1- і КріоР3МНК. Їх вміст становив 66,7% від посаджених на чашку МНК, життєздатність була знижена всього на 15% від нативного контролю і не відрізнялась від цього показника клітин, отриманих при культивуванні КріоР1МНК. Застосування Р3 при заморожуванні МНК призводило до різкого зниження, як кількості отриманих на 7 добу культивування ДК, так і їх життєздатності (табл. 4.2.1.1). Тому для подальшої фенотипової оцінки і функціонального потенціалу ми обрали клітини, кандидати в ДК, отримані тільки з Нат-, КріоР1- і КріоР2МНК.

Критерієм контролю якості отриманих на 7 добу КріоДК поряд з життєздатністю, є їх імунофенотип. Тому на даному етапі досліджень в наше завдання входило підтвердити за характерними фенотиповими ознаками приналежність отриманих у процесі культивування клітин до незрілих ДК. Першочерговий інтерес представляє експресія молекул, безпосередньо асоційованих з їхньою функцією. Толерогенні властивості ДК звичайно зв'язують із низьким рівнем експресії молекул МНС II, костимуляційних

CD80/CD86 і наявністю вираженої експресії інтегрину CD11b – Mac-1 молекули, що експресується на незрілих й толерогенних і відсутня на зрілих імуногенних ДК [101].

Результати цитофлуориметричного аналізу, отриманого у культурі ДК, представлені в табл. 4.2.1.2. Так після культивування КріоМНК протягом 7 діб з індукторами ДК, вміст клітин, що були досліджені серед КріоДК суттєво змінюється у порівнянні з НатДК. А саме, вміст CD11b⁺-КріоДК був нижче у порівнянні з НатДК, однак показник СІФ, що відображає їх функціональну активність, значно збільшувався. При цьому важливо, що вміст CD11b⁺-КріоP2ДК у порівнянні з КріоP1ДК був вище (67,10% і 53,30% відповідно). Важливо, що незалежно від режиму у КріоДК вміст CD80⁺ і CD86⁺-клітин суттєво знижувався в порівнянні з НатДК, при чому, при P2 – в більшому ступені. Це свідчить про обмеження КріоДК можливості реалізувати кооперативні взаємодії з Т-ефекторними клітинами, тобто імунної функції. Звертає на себе увагу той факт, що після кріоконсервування змінювалося співвідношення сформованих клітин, що експресують маркер суто толДК (CD11b⁺) і тих, що відносять до зрілих ДК (CD14⁺CD83⁺, CD80⁺, CD86⁺). Цей показник становив для НатДК – 0,63 умов.од., для КріоP1ДК – 0,83 умов.од., а для КріоP2ДК був найбільшим – 1,29 умов.од, що також свідчить про збільшення їх толерогенного потенціалу.

Таблиця. 4.2.1.2 Імунофенотипові характеристики, отриманих з КріоМНК *in vitro* ДК.

Маркер, що експре- сується	Джерело отримання ДК					
	з НатМНК (НатДК)		з КріоP1МНК (КріоP1ДК)		з КріоP2МНК (КріоP2ДК)	
	Вміст клітин %	СІФ, умов.од.	Вміст клітин %	СІФ, умов.од.	Вміст клітин %	СІФ, умов.од.
CD11b ⁺	85,4 [83,7; 86,4]	215,3 [197,6; 222,4]	53,3 [51,9; 55,3]*	871,4 [854,3;899,2]*	67,1 [62,2; 68,8]*#	864,4 [854,4; 14,3]*
CD80 ⁺	55,8 [54,6; 56,3]	281,3 [269,4; 287,1]	26,3 [26,1; 28,3]*	339,7 [327,1; 41,4]*	19,7 [19,4; 21,6]*#	346,2 [324,2; 69,4]*

CD86 ⁺	70,3 [65,3; 71,3]	239,4 [231,4; 241,6]	29,7 [27,2; 31,4]*	283,6 [261,1;287,3]*	23,5 [21,3; 23,8]*#	309,2 [285,4;324,1]*
CD14 ⁻ CD83 ⁺	8,7 [8,3; 8,9]	342,5 [335,1; 369,3]	8,2 [7,7; 8,3]	371,3 [354,3; 378,4]	6,9 [6,8; 7,2]*#	357,3 [352,1; 369,5]

Примітка: * - показники мають достовірні відмінності від НатМНК; # - від КріоP2МНК ($p < 0,01$ за U-критерієм Манна-Уїтні з урахуванням поправки Бонферроні).

У сукупності ці дані демонструють перевагу режиму кріоконсервування P2 над P1 для отримання незрілих толДК.

Отже, ДК (КріоДК), отримані з КріоМНК за обома режимами, характеризувалися схожою динамікою змін фенотипових показників. Так, порівняно з НатДК після кріоконсервування значно знижувався рівень антигенів диференціювання CD80 та CD86, що визначають ступінь зрілості ДК. Кількість клітин з маркером термінального диференціювання – CD14⁻CD83⁺ мали тенденцію до зменшення порівняно з НатДК. У той же час кількість клітин з маркером CD11b була на досить високому рівні, хоча і поступалася НатДК. Як вже було зазначено, вміст цих клітин у КріоP2ДК був в 1,3 рази вище, ніж у КріоP1ДК. Дослідження фенотипових ознак клітин, отриманих *in vitro* з Нат- і КріоДК підтверджує той факт, що після кріоконсервування ми отримуємо ДК, які знаходяться в недиференційованому стані і зберігають незрілий толерогенний фенотип.

4.2.2 Метаболічна активність

Через 7 діб після отримання *in vitro* Нат- або КріоДК за допомогою МТТ-тесту була оцінена їх метаболічна активність (рис. 4.2.2). Було встановлено її підвищення в КріоP1ДК і КріоP2ДК у 2 і 3 рази відповідно у порівнянні з метаболічною активністю НатДК.

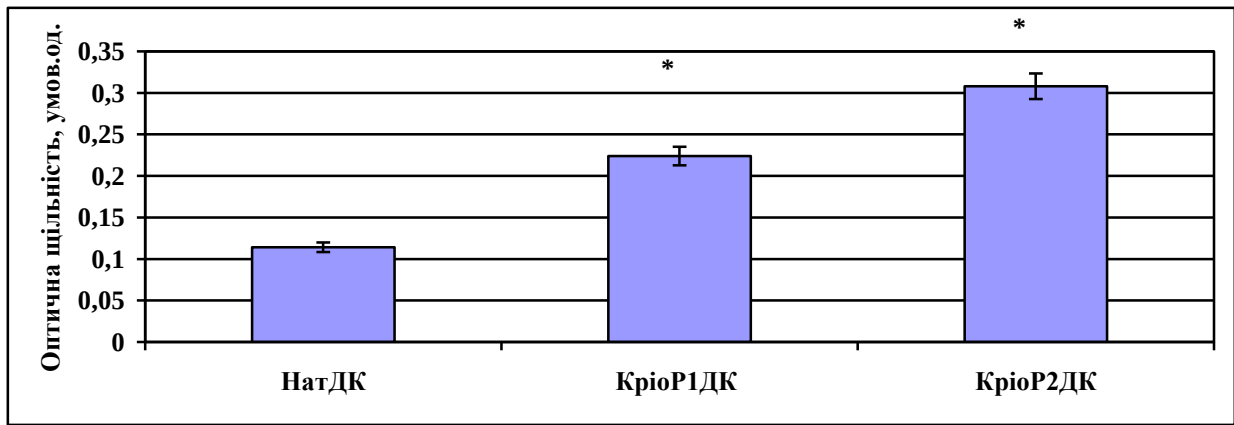


Рис.4.2.2 Метаболічна активність ДК, що отримані *in vitro* з КріоМНК за різними режимами.

Примітка: * - показники мають достовірні від нативДК ($P < 0,05$).

Цей факт може свідчити й про їх підвищену функціональну активність, яка надалі була досліджена *in vitro*.

4.2.3 Вміст білків теплового шоку

Оцінка вмісту БТШ, а саме Hsp70 в ДК отриманих *in vitro* з МНК кріоконсервованих за різними режимами є показовими для підтвердження їхньої здатності до протизапальної дії і стимулювання Трег-клітин.

Було встановлено збільшення вмісту hsp70⁺-КріоP2ДК майже в 2 рази відносно НатДК та КріоP1ДК (рис. 4.2.3.1), що може обумовлювати підвищення їх протизапального ефекту при АА. Важливо, що це підвищення вмісту hsp70⁺-КріоP2ДК відбувалося на тлі збільшення загальної кількості ДК, отриманих в культурі КріоP2МНК.

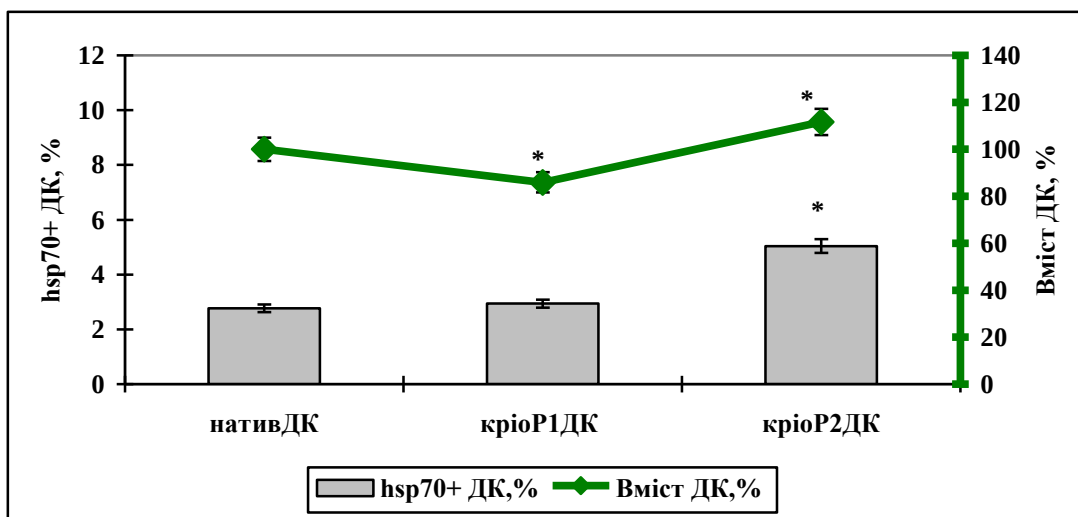


Рис. 4.2.3.1 Вміст hsp70⁺-клітин в ДК (КріоДК), отриманих з КріоМНК за різними режимами.

Примітка: * - показники мають достовірні відмінності від нативДК (P<0,05).

Крім того було доведено, що експресія Hsp70 білку в КріоР2ДК, судячи з їх СІФ (рис. 4.2.3.2) також була вище в hsp70⁺-КріоР2ДК в порівнянні з КріоР1ДК. Тобто режим Р2 може сприяти збільшенню толерогенного потенціалу ДК (КріоР2ДК) отриманих з КріоР2МНК.

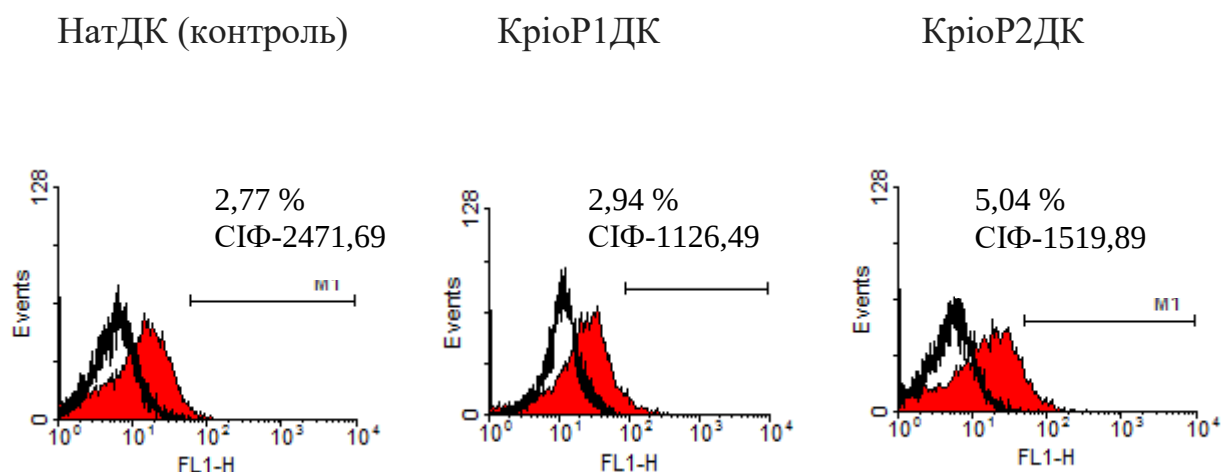


Рис. 4.2.3.2 Гістограми вмісту hsp70+-клітин і їх СІФ у ДК, вирощених з КріоМНК після 7-добового культивування з індукторами ДК, отримані методом проточної цитометрії.

Для підтвердження або скасування цього припущення толерогенний потенціал отриманих з КріоМНК дендритних клітин був протестований *in vitro*.

4.2.4 Оцінка толерогенного потенціалу дендритних клітин, за їх здатністю *in vitro* до індукції Т-регуляторних клітин (FOXP3+) у CD4+-фракції спленоцитів мишей з ад'ювантним артритом

Відомо, що одним з критеріїв толерогенної здатності ДК є формування під їх впливом Трег-клітин [110]. Враховуючи здатність толДК перетворювати наївні Т-клітини в Трег, що секретують супресивні толерогенні чинники такі, як ІЛ-10, ТРФ- β , ретиноева кислота і ліганди програмованої смерті [8; 4], нами було досліджено толерогенний потенціал ДК отриманих з КріоМНК кісткового мозку.

Апробація толерогенних властивостей ДК, генерованих з кріоконсервованих за різними режимами МНК, було атестовано по їх здатності до індукції Трег- клітин – FOXP3⁺ при сумісному культивуванні з CD4⁺ - спленоцитами мишей з АА.

На магнітному сортері було отримано CD4⁺-фракцію клітин селезінки інтактних мишей СВА та мишей з АА на 14 добу розвитку патології (АА-14). Абсолютний вміст виділених на магнітному сортері CD4⁺-клітин із селезінок інтактних мишей (контроль) і тварин з АА представлено в таблиці, що становило 7,8% й 16,9 % відповідно.

Як показано в табл. 4.2.4 абсолютна кількість виділених CD4⁺-клітин з селезінки тварин з АА перевищувала контрольні показники більш ніж у 2 рази, що свідчить про розвиток імунозапального процесу при АА, тобто про стимулювання Т-ефекторів, які власно і підтримують запальний процес.

Таблиця. 4.2.4 Виділення фракції CD4⁺-клітин з селезенки мишей до та після індукції АА

№ групи	Групи тварин	Похідна кількість клітин перед магнітним сортуванням, $\times 10^7$	CD4 ⁺ -фракція	
			абсолютна кількість виділених клітин, $\times 10^7$	%
1	Інтактний контроль	10,5±0,10	0,82±0,06	7,8
2	АА-14	12,7±0,14*	2,15±0,20*	16,9*

Примітка: * - показники мають достовірні відмінності від НатДК ($P < 0,05$).

Чистота виділення CD4⁺-клітин з інтактної селезінки мишей складала 79,54%, з селезінки мишей з АА-14 – 84,69% (рис. 4.2.4.1).

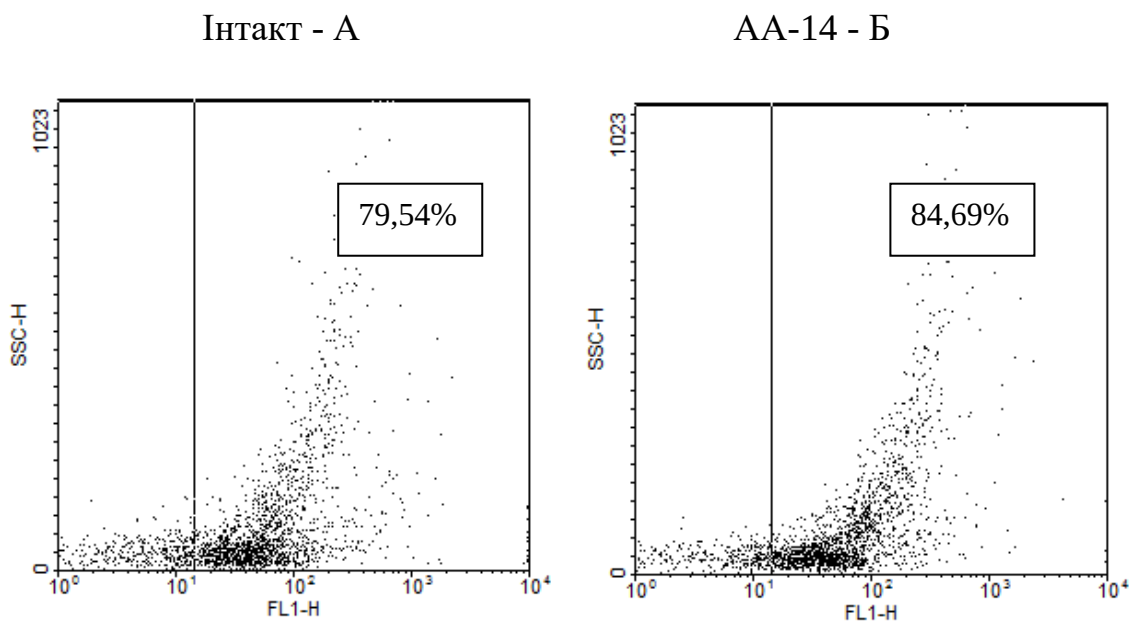


Рис.4.2.4.1 Чистота виділення CD4⁺-клітин методом магнітного сортування з інтактної селезінки мишей СВА – (А), з селезінки мишей з АА-14 – (Б).

При сумісному культивуванні Нат- та КріоДК з $CD4^+$ -клітинами селезінки мишей з АА в них було зазначено стимуляція експресії FOXP3 маркеру (рис. 4.2.4.2). В фракції $CD4^+$ -клітин селезінки тварин з АА без ДК (контроль) вміст FOXP3⁺-клітин становив 4,24%. При сокультуванні з НатДК він зростав в 1,4 рази і складав 6,01%. КріоР1ДК та КріоР2ДК стимулювали експресію FOXP3-білка в Трег в 3,5 и 5 разів відповідно від нативного контролю, що становило 14,94% та 22,18%. Цей факт переконливо свідчить про толерогенні властивості отриманих в культурі Нат- або КріоДК. Слід зазначити, що найбільшим толерогенним потенціалом володіли КріоР2ДК, які стимулювали утворення FOXP3⁺ -клітин в популяції $CD4^+$ - спленоцитів переводячи їх в категорію Трег.

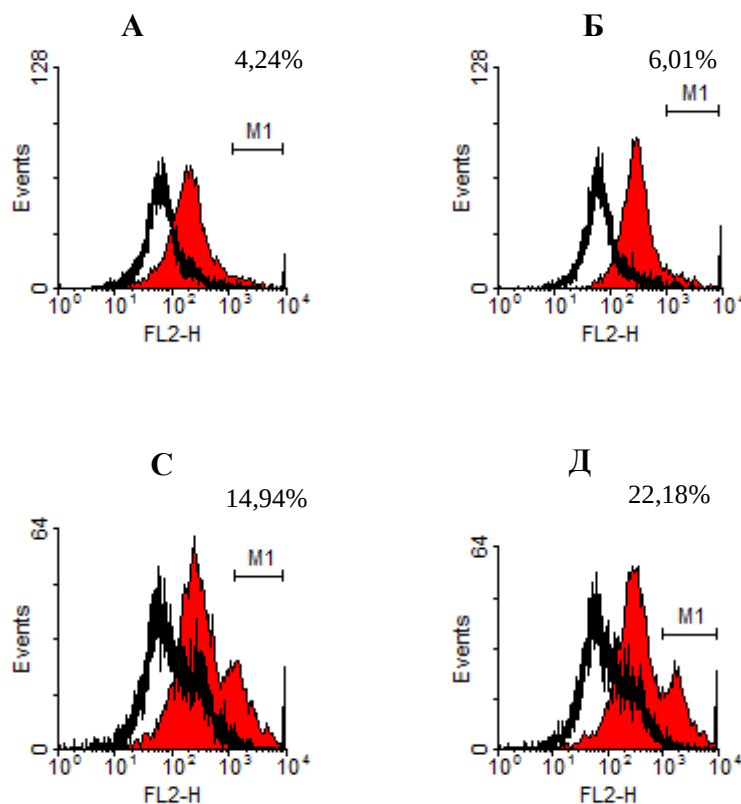


Рис. 4.2.4.2 Гістограми експресії FOXP3-маркера у фракції $CD4^+$ -клітин селезінки тварин з АА через 4 доби після їх сокультування *in vitro* із НатДК або КріоДК.

Примітка: Контролем були CD4⁺-клітини селезінки мишей з АА-14 без додавання ДК (А); сокультивування з НатДК (Б); з КріоР1ДК (С); з КріоР2ДК (Д).

Не можна не враховувати внесок hsp70 в реалізацію толерогенного ефекту КріоР2ДК. Саме збільшення в 1,8 рази вмісту hsp70 в КріоР2ДК (рис. 4.2.3.2.) призводило до максимального стимулювання утворення Трег (FOXP3⁺) *in vitro*. В огляді Borges T.J. [16] також йдеться про тісний зв'язок Hsp70 і Трег.

Дослідження *in vivo* протизапального ефекту КріоДК і корекції Т-регуляторної ланки ІС у мишей з АА представлено у наступному РОЗДІЛІ 5.

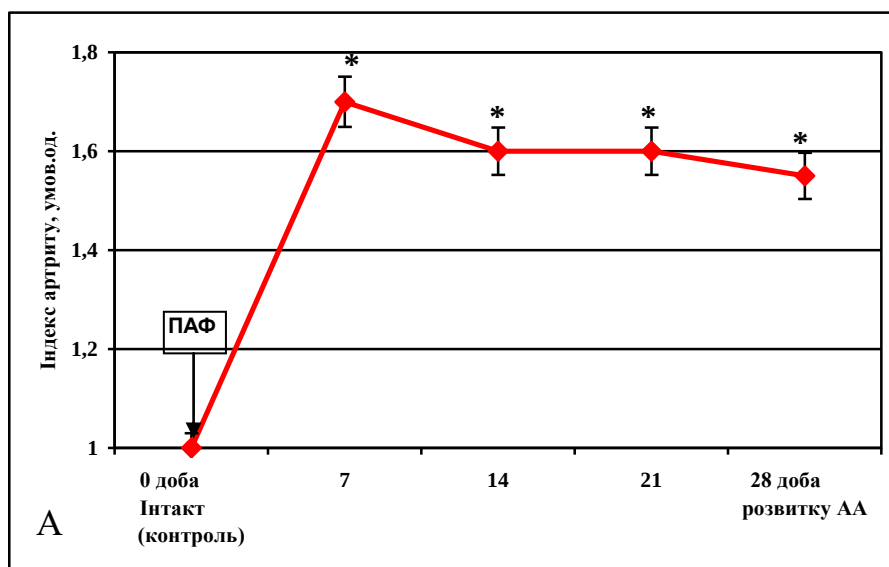
РОЗДІЛ 5

ДОСЛІДЖЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ЗАСТОСУВАННЯ ДЕНДРИТНИХ КЛІТИН, ОТРИМАНИХ З КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ПОПЕРЕДНИКІВ В МОДЕЛІ АД'ЮВАНТНОГО АРТРИТУ

5.1 Дослідження вмісту цитокінів у реципієнтів з ад'ювантним артритом після введення дендритних клітин

Незважаючи на багатовекторність досліджень з визначення причин, механізмів розвитку і лікування РА, багато питань залишається не до кінця з'ясованими. Важливою складовою патогенезу РА є дисрегуляція функції ІС на тлі розбалансування цитокінового профіля з підвищенням вмісту прозапальних цитокінів [10].

По перше, найбільш суттєвою ознакою клінічного прояву АА у гризунів, як вже зазначалося, є набряк регіонального до місця введення ПАФ суглоба, який характеризується як індекс артриту (ІА) (рис. 5.1.1 А). Максимального значення він набував на 7-у добу після індукції патології ($1,70 \pm 0,058$), після чого знижувався, хоча протягом всього терміну спостереження залишався значно вище контрольного показника.



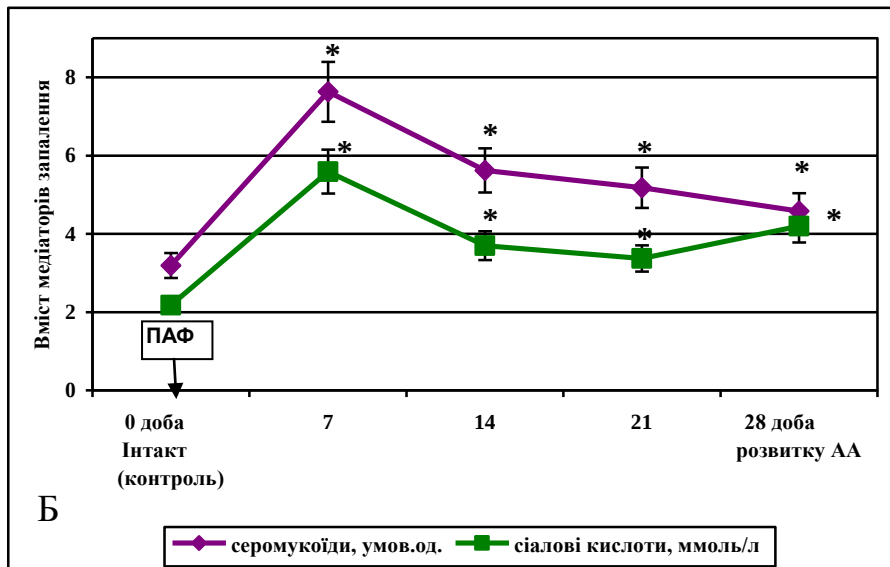


Рис. 5.1.1 Динаміка зміни клініко-лабораторних показників при AA: індекс артрити (ІА) (А); вміст серомукоїдів і сіалових кислот в сироватці крові тварин (Б).

Примітки: ПАФ – повний ад’ювант Фрейнда; індекс артрити у інтактних тварин було прийняте за «1»; * – показники мають статистично значущі відмінності від групи інтактних тварин (контроль) ($P < 0,05$).

По друге, розвиток запальної реакції при розвитку AA супроводжується підвищенням вмісту сіалових кислот і серомукоїдів в сироватці тварин. Дійсно, вже на 7-у добу після індукції AA максимально збільшувався вміст серомукоїдів і сіалових кислот (рис. 5.1.1 Б), що співпадало з максимальним показником ІА. У подальший період ці показники знижувалися, однак до 28-ої доби залишалися вище рівня контрольних значень як і ІА.

Данні, що представлені на рис. 5.1.2 свідчать про суттєвий дисбаланс про- та протизапальних цитокінів, що супроводжує перебіг запальної реакції у тварин з AA. Так, з 7-ої до 21-ої доби розвитку патології концентрація прозапальних цитокінів ФНП- α , ІЛ-6 достовірно перевищувала показники тварин контрольної групи (рис. 5.1.2 А). Несподівано, але рівень ІФН- γ ні в один із термінів спостереження не перевищував контрольні показники.

З метою більш показової оцінки цитокінового профілю було введено коефіцієнт (умов. од.) зміни продукції цитокінів, що є співвідношенням їх

вмісту (пг/мл) на різних етапах розвитку АА (табл. 5.1.1), а також після введення різних видів ДК тваринам з патологією, до відповідного показника в інтактному контролі, який було прийнято за «1»

Максимальні значення вмісту ФНП- α , ІЛ-6, що були вище контрольних і визначалися коефіцієнтом зміни продукції цих цитокінів, що становило 3,65 і 2,82 умов. од. відповідно, визначалися на 21 добу розвитку патології (рис. 5.1.2 А, табл. 5.1.1). В цей же термін відмічався і максимальний сумарний коефіцієнт зміни продукції прозапальних цитокінів (7,26 умов. од.) в порівнянні з контрольним (3 умов. од.).

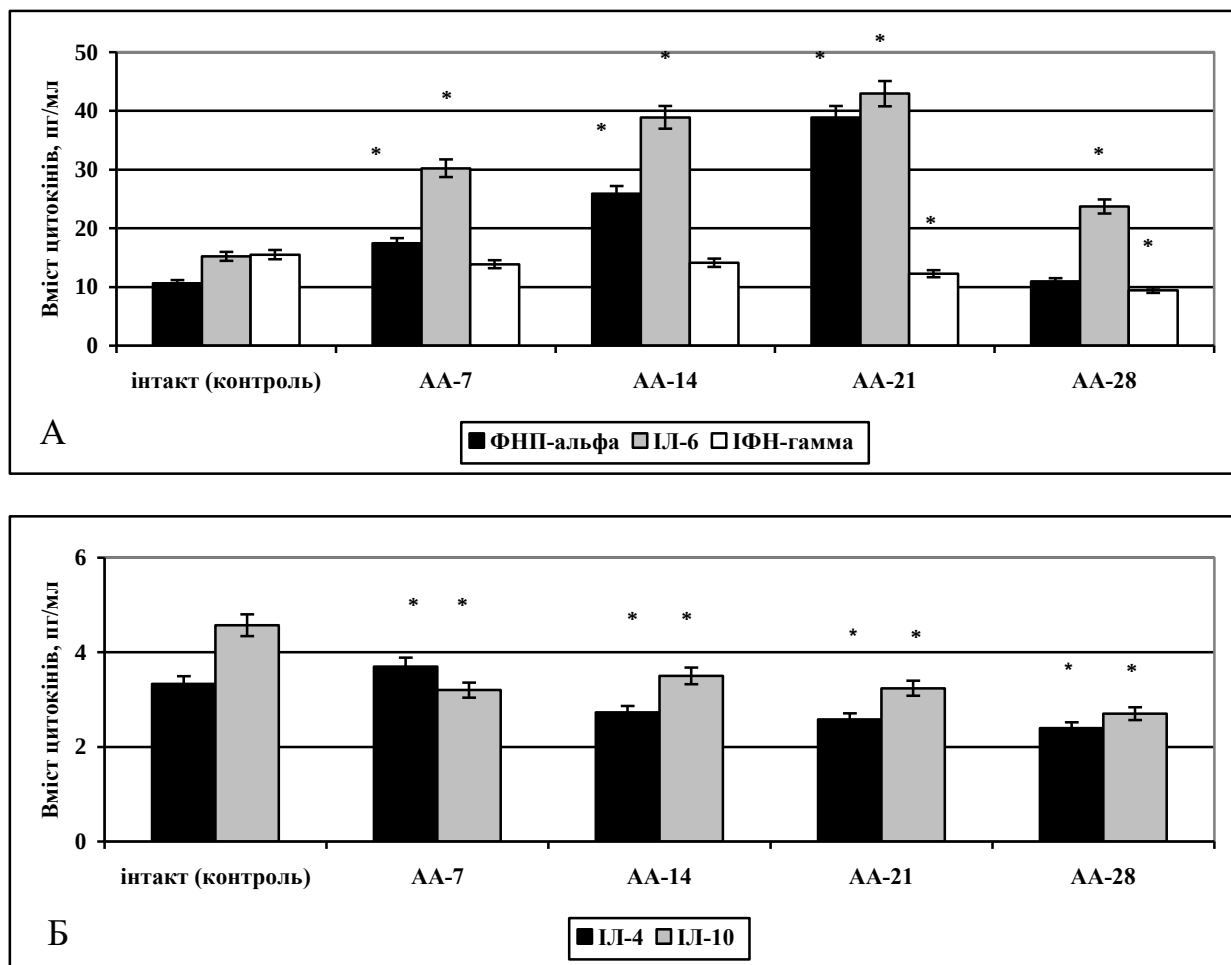


Рис. 5.1.2 Вміст прозапальних (А) і протизапальних (Б) цитокінів в сироватці крові тварин на різних етапах розвитку АА.

Примітка: * – показники мають статистично значущі відмінності від групи інтактних тварин (контроль) ($P < 0,05$).

На 28-у добу рівень кожного з прозапальних цитокінів знижувався, але з різним ступенем. Для ІФН- γ ці зміни були не суттєвими, тоді як зниження

вмісту ФНП- α і ІЛ-6 було більш виразним, причому концентрація ІЛ-6 і в цей термін залишалася на майже в півтори рази вищому рівні, ніж в контролі (рис. 5.1.2 А , табл. 5.1.1). Враховуючи збереження в цей термін ознак розвитку АА (ІА – $1,55 \pm 0,01$) і підвищений рівень у сироватці крові серомукоїдів і сіалових кіслот (рис. 5.1.1) очевидна роль ІЛ-6 як ключового гравця підтримки запальних процесів при розвитку АА.

Таблиця 5.1.1 Коефіцієнти зміни продукції цитокінів в сироватці крові тварин в динаміці розвитку АА.

Показник, умов. од.	Інтактний контроль	АА-7	АА-14	АА-21	АА-28
ФНП- α	1	1,64	2,43	3,65	1,02
ІЛ-6	1	1,98	2,55	2,82	1,56
ІФН- γ	1	0,89	0,91	0,79	0,61
Сумарний коефіцієнт зміни продукції прозапальних цитокінів, умов. од.	3	4,51	5,89	7,26	3,19
ІЛ-4	1	1,11	0,82	0,77	0,72
ІЛ-10	1	0,70	0,76	0,71	0,59
Сумарний коефіцієнт зміни продукції протизапальних цитокінів, умов. од.	2	1,81	1,58	1,48	1,31

Примітка: Коефіцієнт (умов. од.), що характеризує зміну продукції цитокінів в сироватці крові тварин, є співвідношенням вмісту цитокінів в пг/мл на різних етапах розвитку АА до відповідного показника в інтактному контролі, який було прийнято за «1».

Як зазначалося вище і відображено на рис. 5.1.2 Б і табл. 5.1.1, на фоні підвищення рівня прозапальних ІЛ-6 і ФНП- α , розвиток АА супроводжувався

достовірним зниженням рівня протизапальних цитокінів – ІЛ-4 та ІЛ-10 на всіх етапах спостереження (за виключенням ІЛ- 4 на 7 добу). При цьому, на 28-у добу коефіцієнт зміни продукції ІЛ-4 та ІЛ-10 в порівнянні з контролем становив 0,72 і 0,59 умов. од. відповідно (табл. 5.1.1). Порівняльний аналіз свідчить про те, що і наприкінці терміну спостереження розвитку АА (28-а доба) концентрація прозапальних цитокінів майже в 2,5 рази перевищувала концентрацію протизапальних.

Застосування імунотерапії у вигляді різних видів ДК продемонструвало, перш за все, здатність ДК мінімізувати прояви розвитку АА (рис. 5.1.3). Так, через тиждень після введення ДК (21 доба), що отримані як з нативних, так і кріоконсервованих за різними режимами МНК, знижувався ІА, як основний клініко-діагностичний показник АА. При цьому, лікувальний ефект ДК, що отримані з кріоконсервованих попередників переважав ефект ДК, що отримані з нативних МНК. Максимальне зниження ІА відбувалося після введення КріоР2ДК ($1,16 \pm 0,02$ умов. од.) .

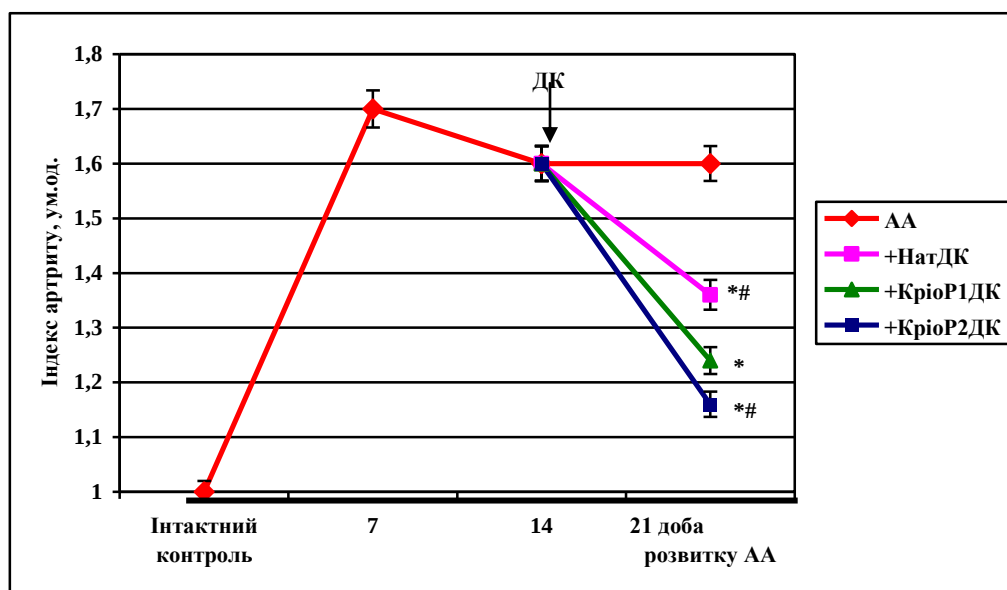


Рис. 5.1.3 Індекс артриту (ІА) у тварин з АА до і після введення ДК, що отримані *in vitro* з нативних або кріоконсервованих за різними режимами МНК.

Примітки: ДК вводили на 14 добу розвитку АА. ІА оцінювали через 7 діб (21 доба розвитку патології) після введення ДК; * — показники мають статистично значущі відмінності від групи тварин з АА; # — від групи тварин з АА+КріоР1ДК ($P < 0,05$); ІА у інтактних тварин (інтактний контроль) було прийняте за «1».

Вміст сіалових кислот і серомукоїдів в сироватці крові тварин з АА через тиждень після ДК-терапії також максимально знижувався після введення КріоР2ДК (рис. 5.1.4), що співпадало і з максимальним зниженням ІА в цій групі тварин (рис. 5.1.3).

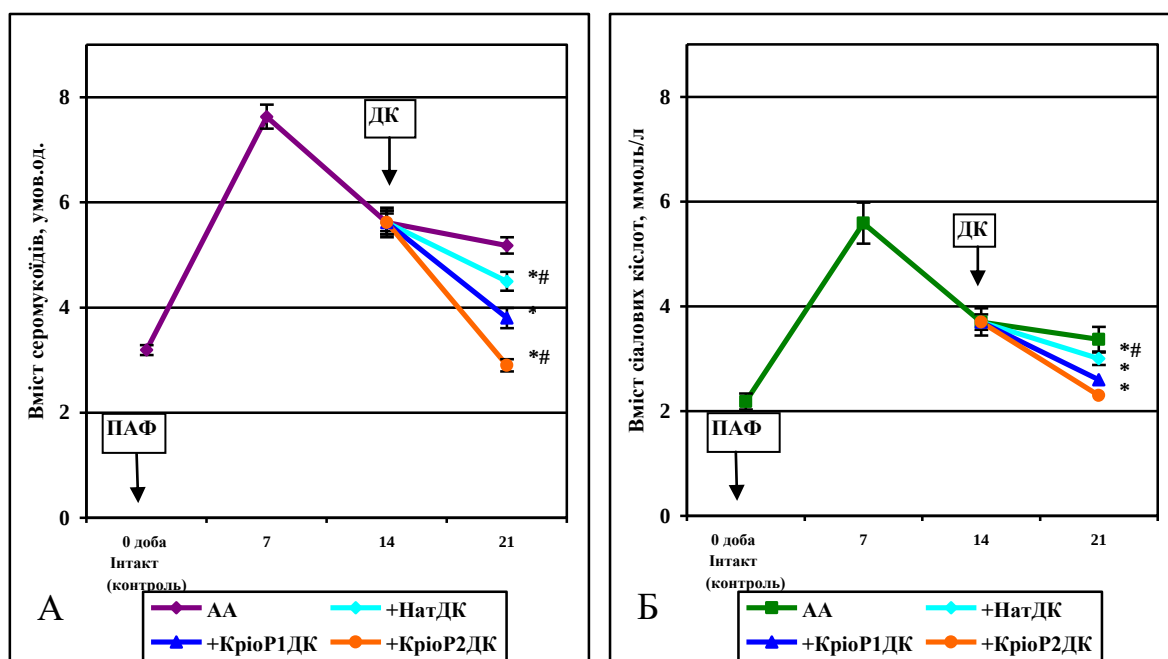
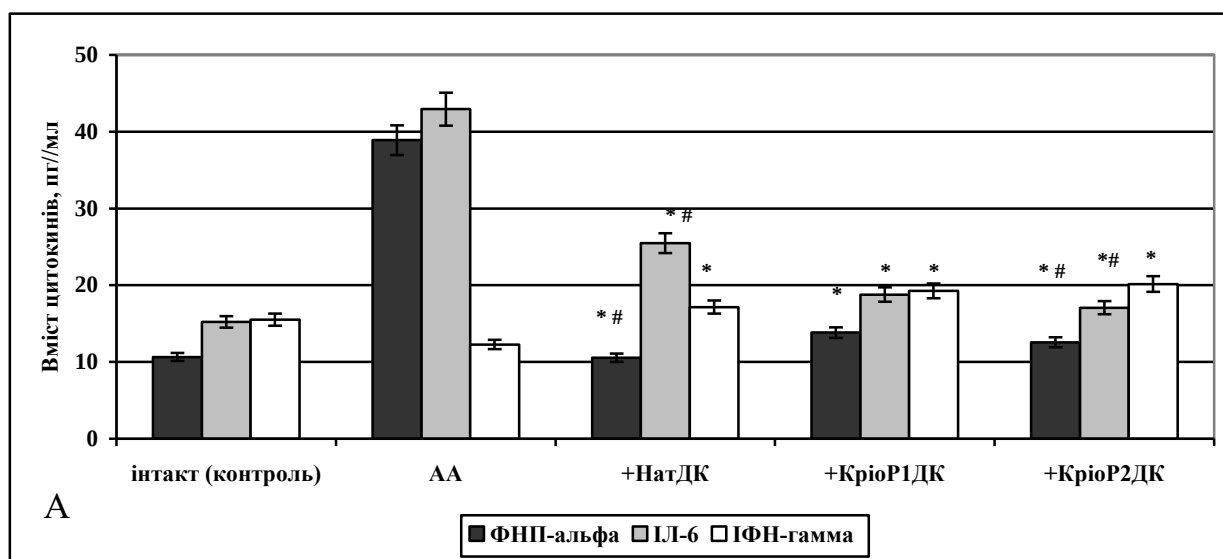


Рис. 5.1.4 Динаміка зміни клініко-лабораторних показників у тварин з АА після ДК-терапії: вміст серомукоїдів (А) і сіалових кислот (Б) в сироватці крові тварин.

Примітки: ПАФ – повний ад’ювант Фрейнда; ДК – дендритні клітини; * – показники мають статистично значущі відмінності від групи тварин з АА; # – від гр. тварин +КріоР1ДК ($P < 0,05$).

Зіставлення показників цитокінового профілю з ІА і клініко-лабораторними показниками як тест-системи оцінки ефективності лікування АА, свідчить, що найкращий терапевтичний ефект спостерігався при максимальному зниженні запальних ІЛ-6 і ФНП- α та максимальному зростанні протизапальних ІЛ-4 та ІЛ-10. Саме такого рівня корекція відбувалася після застосування ДК, отриманих з МНК кріоконсервованих за режимом Р2. При цьому слід зазначити перевагу корегуючого ефекту цитокінового профілю обох

видів КріоДК над НатДК. В першу чергу це стосується зниження рівня ІЛ-6 (рис. 5.1.5 А і табл. 5.1.2). Крім того, порівняння між собою корегуючого ефекту КріоДК свідчить про перевагу КріоР2ДК не тільки в корекції, але і в співвідношенні – гармонізації складу ключових прозапальних цитокінів. Звертає на себе увагу підвищення концентрації ІФН-γ після введення ДК у порівнянні з показниками не лікованих тварин. З точки зору лікувального ефекту вкрай важливим був стимулюючий вплив ДК на протизапальні цитокіни (рис. 5.1.5 Б). Вкрай важливо, що всі три види ДК (Нат-, КріоР1- і КріоР2ДК) стимулювали продукцію протизапальних цитокінів в більшій мірі, ніж інгібували продукцію прозапальних цитокінів, про що свідчать сумарні коефіцієнти зміни продукції цитокінів (табл. 5.1.2). І в цьому випадку КріоР2ДК мали перевагу над КріоР1ДК. Так, КріоР2ДК втричі в порівнянні з інтактним контролем підвищували вміст ІЛ-4 і ІЛ-10 в сироватці тварин з АА (рис. 5.1.5 Б, табл. 5.1.2), що супроводжувалося, як зазначалося вище, максимальним зниженням ІА (рис. 5.1.3).



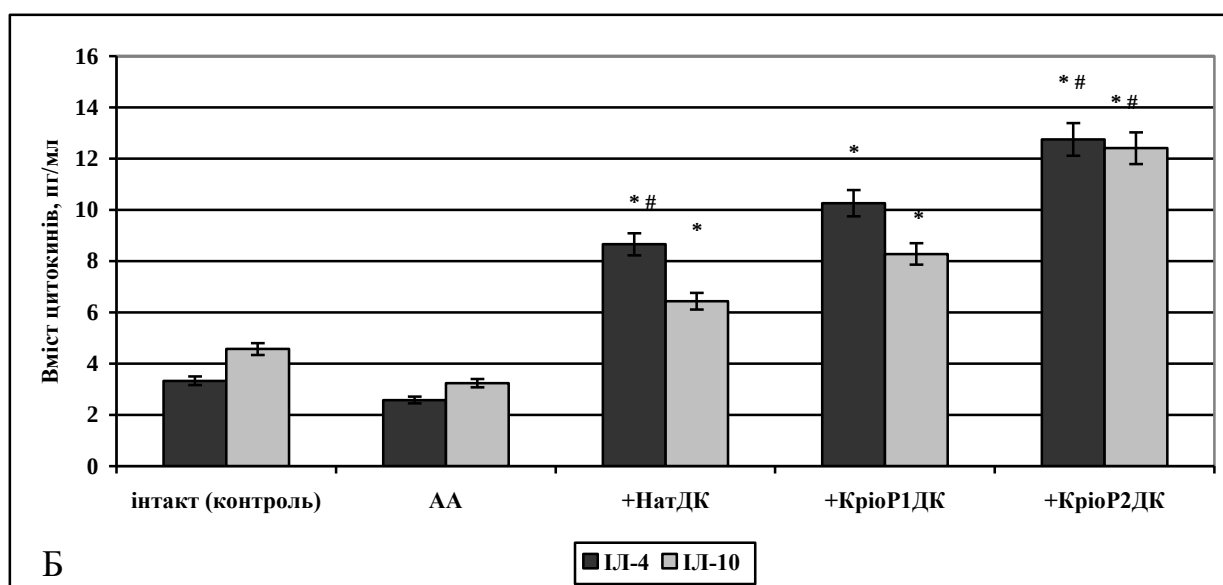


Рис. 5.1.5 Вміст прозапальних (А) і протизапальних (Б) цитокінів в сироватці крові тварин з АА до і після введення НатДК або КріоДК.

Примітки: ДК вводили на 14 добу розвитку АА. Вміст цитокінів оцінювали через 7 діб (21 доба розвитку патології) після введення ДК; * – показники мають статистично значущі відмінності від групи тварин з АА; # – від гр. тварин з АА+ КріоP1ДК ($P < 0,05$).

Таблиця 5.1.2 Коефіцієнти зміни продукції цитокінів в сироватці крові тварин до та після різних видів ДК-терапії.

Показник, умов. од.	Інтактний контроль	АА	НатДК	КріоP1ДК	КріоP2ДК
ФНП-α	1	3,65	0,99	1,3	1,18
ІЛ-6	1	2,82	1,67	1,21	1,12
ІФН-γ	1	0,79	1,11	1,24	1,30
Сумарний коефіцієнт зміни продукції прозапальних цитокінів	3	7,26	3,77	3,75	3,6
ІЛ-4	1	0,77	2,60	3,08	3,83
ІЛ-10	1	0,71	1,41	1,81	2,71
Сумарний коефіцієнт зміни продукції протизапальних цитокінів	2	1,48	4,01	4,89	6,54

Примітка: Коефіцієнт (умов. од.), що характеризує зміну продукції цитокінів в сироватці крові тварин до і після введення нативних (НатДК) або кріоконсервованих ДК (КріоР1ДК, КріоР2ДК), з співвідношенням вмісту цитокінів в пг/мл в кожній групі до відповідного показника в інтактному контролі, який було прийнято за «1».

Представлені результати свідчать про можливість корегування цитокінового профілю тварин з індукованим АА за допомогою ДК, що отримані з кріоконсервованих попередників. Доведена перевага таких ДК в реалізації лікувального ефекту в порівнянні з похідними нативних попередників. Так, обидва види КріоДК в більшій мірі ніж НатДК корегували рівень про- і протизапальних цитокінів, а також показників клінічного стану тварин з АА. Застосування таких ДК, особливо КріоР2ДК, супроводжувалося синхронізацією позитивних змін лабораторно-діагностичних показників: сермукоїдів, сіалових кислот і ІА – клінічного показника маніфестації АА.

Раніше в дослідженні *in vitro* ми довели (РОЗДІЛ 4), що така ситуація супроводжується максимальним підвищенням вмісту FOXP3⁺ Трег-клітин в популяції CD4⁺ - спленоцитів тварин з АА при їх сокультуванні з КріоР2ДК. Це обумовлюється стимуляцією продукції ІЛ-10 (рис.5.1.5.Б).

У наступному дослідженні було вивчено ефективність ДК-терапії за корекцією, як вмісту, так і функціонального потенціалу Трег-клітин в селезінці тварин з АА.

5.2 Визначення вмісту Т-регуляторних клітин і рівня експресії гену *foxp3* в них у реципієнтів з ад'ювантним артритом після застосування толерогенних ДК

Введення ДК, отриманих *in vitro* з нативних або кріоконсервованих за різними режимами МНК, здійснювали на 14 добу після індукції АА у мишей. Атестація вмісту Трег в селезінці реципієнтів проводили через 7 і 14 діб після застосування різного виду толДК.

Представлені на рис. 5.2.1 дані свідчать про суттєву зміну кількісних і якісних показників Трег, які забезпечують стан імунної толерантності у ссавців і експресують маркери CD4CD25 та FOXP3 [23].

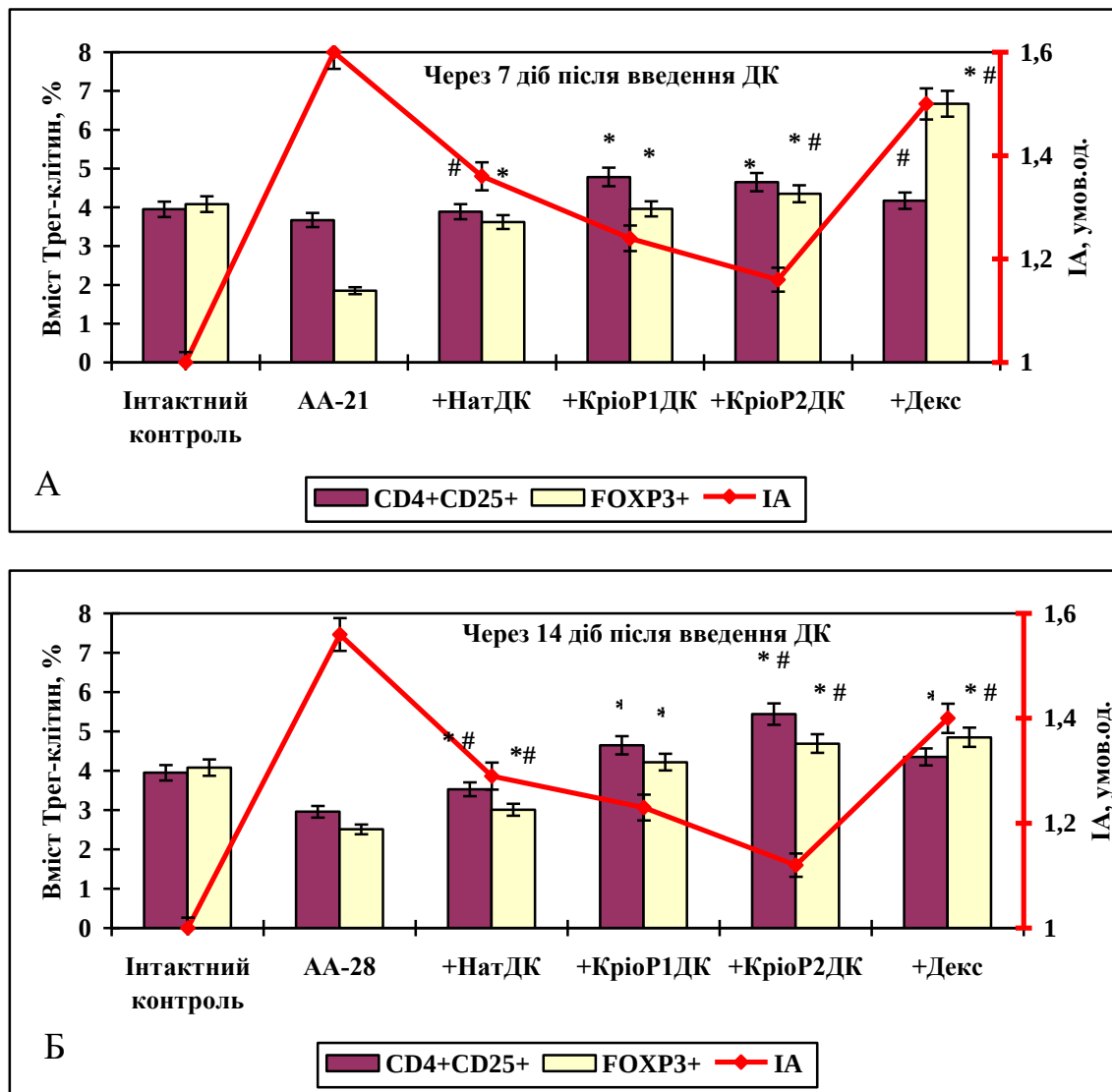


Рис. 5.2.1 Вміст Трег-клітин ($CD4^+CD25^+$ і $FOXP3^+$) та ІА до та після введення НатДК або КріоДК тваринам з АА.

Примітка: А - введення ДК на 14 добу АА, атестація через 7 дів (21 доба розвитку АА); Б - введення ДК на 14 добу АА, атестація через 14 дів (28 доба розвитку АА); ІА у інтактних тварин (контроль) було прийнято за «1»; * — показники мають статистично значущі відмінності від відповідної групи тварин з АА; # — від гр. тварин з АА+ КріоP1ДК ($P < 0.05$).

На 21 добу розвитку патології (АА-21) показник ІА в 1.6 рази перевищував контрольний (рис. 5.2.1 А). При цьому привертає увагу суттєве «розбалансування» концентраційних взаємовідносин $CD4^+CD25^-$ і $FOXP3^+$ -клітин. Вміст $CD4^+CD25^-$ -клітин не відрізнявся від інтактного контролю, тоді як вміст $FOXP3^+$ – знижувався майже вдвічі, що свідчить про інгібіцію напрацювання цього протеїну при АА. Необхідно підкреслити, що в інтактному контролі обидві оцінені субпопуляції Трег знаходяться в певному концентраційному балансі, тобто, в «гармонізованому» імунпросторі. Цей баланс підтверджує «індекс співвідношення» $CD4^+CD25^-$ до $FOXP3^+$ -клітин (1.0 умов. од.). Як видно, цей стан суттєво змінюється в умовах розвитку АА (індекс співвідношення – 1.98 умов. од.).

Через 7 діб після застосування ДК (рис. 5.2.1 А) вказані показники суттєво змінювались, але по-різному: в залежності від виду ДК. Так, НатДК майже вдвічі збільшували кількість $FOXP3^+$ -клітин і не впливали на кількість $CD4^+CD25^-$ -клітин, що супроводжувалося зниженням ІА у порівнянні з тваринами з АА (1.36 ± 0.03 і 1.60 ± 0.03 умов. од. відповідно). Складається враження, що для покращення клінічного статусу тварин з АА більше значення має підвищення вмісту серед загального пулу Трег саме субпопуляції $FOXP3^+$ -клітин. Відповідно до ІА, як головного свідка лікувального ефекту, КріоР1- і КріоР2ДК переважали НатДК в мінімізації цього показника. На відміну від НатДК, обидва види КріоДК індукували збільшення вмісту як $CD4^+CD25^-$ так і $FOXP3^+$ -клітин, причому в кожному разі з привалюванням зростання $CD4^+CD25^-$ -клітин. Тобто, очевидна «гармонізація» співвідношення цих субпопуляцій при введенні КріоР1- або КріоР2ДК (індекс співвідношення – 1.20 і 1.07 умов. од. відповідно) у порівнянні з АА (індекс співвідношення – 1.98 умов. од.). Отримані данні свідчать, що через 7 діб після введення КріоР1ДК ІА достовірно знижувався у порівнянні з застосуванням НатДК. Цікаво, що зменшення ІА відбувалося на фоні певного підвищення концентрації обох субпопуляцій Трег. Максимальна інгібіція ІА була притаманна КріоР2ДК, підкреслюючи найбільшу їх імуносупресивну

активність. Виходячи з вищенаведеного, вірогідним поясненням більшої в порівнянні з КріоР1ДК коригуюче-лікувальної дії КріоР2ДК може бути їх підвищена активність формувати в клітинах FOXP3-білок. Цікаво що застосування Декс, як потужного протизапального засобу, майже не впливало на показники CD4⁺CD25⁺-клітин та ІА, хоча значно підвищувало вміст FOXP3⁺-клітин. Це може бути обумовлене декількома причинами. По-перше, зростання вмісту FOXP3⁺-клітин ще не свідчить про здатність реалізувати ними супресивний ефект. Для цього потрібна певна концентрація цього протеїну в клітині. Більш схоже, що Декс стимулює зростання FOXP3⁺-клітин з низькою концентрацією цього протеїну, якої недостатньо для інгібіції АА.

На 28 добу розвитку патології (АА-28) спостерігалось зниження вмісту CD4⁺CD25⁺ - в 1,2 рази при незмінній кількості FOXP3⁺ -клітин (рис. 5.2.1.Б) на відміну від цих показників на 21 добу розвитку АА (АА-21). При цьому ІА у тварин на 21-у и 28-у добу розвитку патології не відрізнявся (1.6 ± 0.03 і 1.56 ± 0.02 умов. од. відповідно).

Через 14 діб (рис. 5.2.1.Б) після введення НатДК зменшення ІА відбувалося на фоні незначного зниження вмісту FOXP3⁺-клітин у порівнянні з 7-ю добою (1.29 ± 0.02 і 1.36 ± 0.03 відповідно). В той же час після введення КріоР1ДК ІА не змінювався, як і не змінювався вміст CD4⁺CD25⁺- і FOXP3⁺-клітин в порівнянні з цими показниками через 7 діб після введення. Вражає лікувальний ефект КріоР2ДК при пролонгації терміну його атестації (з 7 по 14 добу). На відміну від КріоР1ДК, КрР2ДК і через два тижні після застосування були здатні максимально індукувати формування CD4⁺CD25⁺- і FOXP3⁺-клітин в «гармонізованому» співвідношенні (індекс співвідношення - 1,16). Очевидно, що саме це сприяло максимальному зниженню клінічного прояву патології за ІА (1.12 ± 0.02 умов. од.) і більшою мірою наближав його до показника інтактного контролю (1.00 ± 0.02 умов. од.). Ці дані свідчать, що розроблений режим кріоконсервування МНК – Р2 забезпечує формування з них ДК з пролонгованою толерогенізуючою функцією.

При цьому дослідження рівня експресії гену *foxp3*, що контролює напрацювання FOXP3-протеїну, може бути показовим для підтвердження супресорної активності Трег. При розвитку АА вміст FOXP3⁺ -клітин мав зворотну залежність від рівня експресії гену *foxp3* (рис. 5.2.2) в клітинах селезінки тварин, що може бути наслідком компенсації їх функціональної активності. Чітка кореляція між рівнем експресії гену *foxp3* і вмістом FOXP3⁺ -Трег присутня не завжди, що узгоджується з даними McInnes IB і Schett G. [154], якими зазначено, що порушення імунологічної толерантності при АІЗ призводить до зміни в сигналах мікрооточення й цитокінової мережі. Це може негативно впливати на транскрипційну й епігенетичну регуляцію гену *foxp3*, що відображається на генерації й супресорної функції Трег.

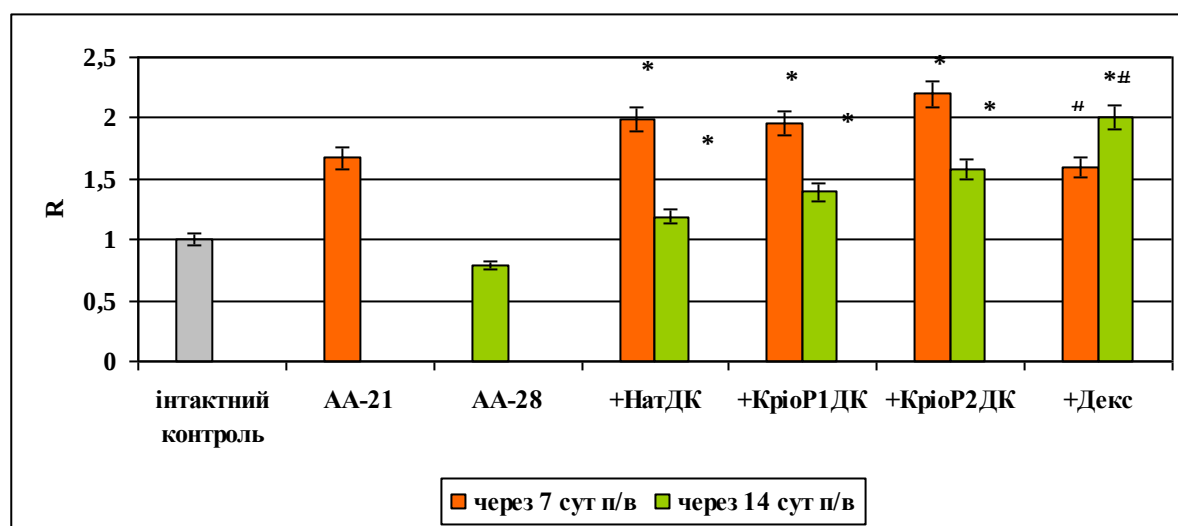


Рис. 5.2.2 Відносний рівень експресії (R) гену *foxp3* в клітинах селезінки тварин з АА через 7 та 14 діб після введення (п/в) НатДК або КріоДК.

Примітки: за 1 прийнятий показник R в групі інтактних тварин (інтактний контроль); * – показники мають статистично значущі відмінності від груп тварин з АА; # – від гр. тварин з АА+КріоP1ДК відносно відповідних строків після введення ($P < 0.05$).

Слід зазначити, що рівень експресії гену *foxp3* через 7 і 14 діб після введення НатДК або КріоДК за різними режимами був вище у порівнянні з показником інтактних тварин і тварин з АА. Введення НатДК і КріоP1ДК через 7 діб індукували однакову експресію гену *foxp3* і продукцію транскрипційного

фактору (FOXP3-білку) в клітинах селезінки тварин з АА. Однак, щодо показника ІА, то він був різним. Отже, на клінічний статус тварин можуть впливати і другі чинники, наприклад, дисбаланс цитокінів, що було показано в нашому дослідженні і підтверджено іншими авторами [155; 156]. І навпаки, незважаючи на те, що рівень експресії досліджуваного гена в групі з введенням Декс у цей термін був нижче, ніж в інших групах, вміст FOXP3⁺-клітин був високим. В міру пролонгації часу після ДК-терапії з 7 по 14 добу рівень експресії гена *foxp3* знижувався у всіх групах за винятком групи тварин з введенням Декс. Якщо на 7 добу рівень експресії гена *foxp3* в цій групі не відрізнявся від показника тварин з АА, то на 14 добу, коли у всіх групах відбувалося його зниження – навпаки, збільшувався. Справа в тому, що кортикостероїди є потужними імунодепресантами, що може призводити до збільшення продукції FOXP3-білка. Однак, супресорна функція Трег, що індукує Декс як на 7-у так і 14-у добу після його введення не призводила до значного зниження ІА.

Найбільшу експресію гена *foxp3* в клітинах селезінці тварин з АА після ДК-терапії індукували Кріор2ДК як на 7-у так і 14-у добу після їх введення. Це відбувалося на збільшенні продукції FOXP3-білка в Трег-клітинах і призводило до максимального зниження ІА.

УЗАГАЛЬНЕННЯ І ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Аутоімунні захворювання на сьогоднішній день займають третє місце у рейтингу найрозповсюдженіших недугів у світі. Їх відносять до мультифакторіальних хвороб, хоча головною причиною вважається порушення природної толерантності імунної системи до власних антигенів [19]. Агравація ситуації обумовлюється також неоднозначністю етіологічних факторів розвитку АІЗ і неординарністю їх клінічної маніфестації [125; 155; 154]. Враховуючи відсутність ефективних методів лікування АІЗ, вочевидь необхідність удосконалення методів їх діагностики, а також пошуку і впровадження передових технологій терапії. Одним з найбільш прогресивних методів лікування АІЗ є адоптивна імунотерапія з використанням ДК, що володіють толерогенним потенціалом [3; 4].

Найчастіше в клінічних дослідженнях використовують протокол одержання незрілих ДК шляхом диференціювання МНК або моноцитів, виділених з периферичної крові, в присутності ГМ-КСФ і ІЛ-4 [5; 6]. Однак, використання різних концентрацій ГМ-КСФ і ІЛ-4 без досить обґрунтованої аргументації унеможливорює отримання однакового діапазону їх активності. Більше того, використання широкого спектра ростових факторів для диференціювання ДК не виключає можливості одержання різних за фенотипом і функцією субпопуляцій ДК. Тому необхідність досліджень по оптимізації умов виділення й культивування МНК, з метою формування незрілих ДК *in vitro* і оцінка їх фенотипової приналежності є актуальним.

Вдосконалення методології і технологічного процесу одержання *in vitro* толДК, визначення притаманних їм біомаркерів та способів підвищення толерогенного потенціалу є однією з найважливих складових імунотерапевтичних підходів до лікування патологій аутоімунного генезу.

На підставі аналізу даних літератури й власного досліду було сформульоване завдання визначити спосіб одержання толДК із МНК

експериментальних тварин і їх фенотипової приналежності до цього типу клітин.

В представленому дослідженні було відпрацьовано метод виділення з кісткового мозку мишей за допомогою центрифугування в градієнті щільності (1,077 г/мл) «Тразографа» («Юнік Фармасьютикал Лабораторіз», Індія) близько 40% МНК, серед яких 12 % становили CD14⁺-моноцити – попередники ДК.

Відомо, що диференціювання толДК *in vitro* з попередників кісткового мозку відбувається в присутності ГМ-КСФ, ІЛ-4, а також певного агента, що індукує толерантність. З цією метою найчастіше використовують глюкокортикоїди, зокрема дексаметазон (Декс) [84; 157]. Механізм його толерогеніндукуючої дії пов'язаний з активацією глюкокортикоїдного рецептора (glucocorticoid receptor, GR) і ядерного рецептора (nuclear receptor, NR) типу I з подальшою індукцією експресії фактора транскрипції, індукованого глюкокортикоїдами лейцинової застібки (GILZ) [158]. Авторами було показано, що GILZ є необхідним і достатнім для глюкокортикоїдіндукованого толерогенного генерування ДК. Реалізація такого каскадного процесу забезпечує можливість не тільки одержання незрілих толДК, але й стабілізації їх толерогенного фенотипу. Такий стан не дозволяє толДК диференціюватися в імунні ДК в умовах прозапального оточення *in vivo* в організмі реципієнта з АІЗ. Зважаючи на це, в якості індуктора толерогенного стану ДК в наших дослідженнях був використаний саме Декс.

Отже, в роботі були визначені конкретні умови культивування МНК в присутності ГМ-КСФ (20 нг/мл), ІЛ-4 (5 нг/мл) і Декс (0,4 мкг/мл) протягом 5-7 діб. Культивування, у такий спосіб, дозволило отримати 96,00% клітин – кандидатів в ДК з життєздатністю 91,88±9,82%, що було підтверджено методом цитофлуориметричного аналізу за допомогою пропідія йодиду – PI.

Критерієм контролю якості отриманих клітин – кандидатів в ДК окрім їх кількості та життєздатності була оцінка імунофенотипових ознак і функціональної (толерогенної) активності. Була підібрана панель фенотипових маркерів для підтвердження їх приналежності саме до толДК. Встановлено, що

диференціювання МНК у толДК супроводжується експресією на мембрані молекули CD11b, втратою CD14-рецептора і мінімізацією рівня експресії коstimуляторних CD80 і CD86 молекул.

Необхідність застосування толДК у терапії АІЗ потребує розробки ефективних способів їх кріоконсервування. Відомо, що толДК дуже вразливі до дії факторів кріоконсервування [96; 97]. Це обумовило пошук більш стійких до кріовпливу клітин, а саме, різного походження МНК, з яких, як відомо, отримують *in vitro* ДК.

Тому на наступному етапі нашого дослідження була проведена оцінка впливу кріоконсервування на МНК кісткового мозку мишей лінії СВА/Н. Були апробовані різні режими кріоконсервування МНК під захистом 10% ДМСО з повільною швидкістю охолодження, а саме: 1 град/хв до - 80°C (P1); до - 40°C (P2); до - 25°C (P3) з наступним зануренням у кожному випадку у рідкий азот (-196°C), на структурні й функціональні показники МНК з метою одержання з них *in vitro* після розморожування толДК. Отримані результати свідчать, що різні режими кріоконсервування МНК в різному ступені змінювали їх структурні і функціональні показники. Була продемонстрована переконлива перевага режиму P2 за показниками збереження, життєздатності, вмісту CD14⁺-клітин і метаболічної активності МНК одразу після розморожування і відмивання від кріопротектору.

На сьогодні активно вивчається протизапальний ефект білків теплового шоку, зокрема сімейства Hsp70 [17; 18]. Білки цього класу є дуже чутливими до будь-яких стресових впливів і, у тому числі до кріоконсервування, що супроводжується підвищенням їх внутрішньоклітинного синтезу [17] .

Враховуючи цей факт, нами була проведена атестація вмісту hsp70⁺-клітин серед МНК після їх кріоконсервування за різними режимами. Показано в різному ступені в залежності від умов заморожування збільшення їх вмісту одразу після відігрівання у порівнянні з нативним контролем (НатМНК). При використанні режимів P1 і P2 на фоні зниження вмісту МНК на 24% і 12%, кількість hsp70⁺-клітин збільшувалася в 1,7 і 2,3 рази відповідно. Триразове їх

збільшення у порівнянні з НатМНК було відзначено при кріоконсервуванні МНК за Р3 на фоні зниження кількості МНК на 34%. Суттєво, що таке збільшення hsp70^+ -клітин в КріоР3МНК не призводило до підвищення їх метаболічної активності. Крім того Zhou J., An H. [153] одержали результати, які свідчать, що надекспресія Hsp70 індукує секрецію прозапальних цитокінів ІЛ-6, ІЛ-12, ІЛ-15 моноцитами людини за допомогою передачі сигналів через CD14 і p38 MARK, поряд з підвищеною експресією ФНП-а й оксиду азоту.

Слід зазначити, що ефективність кріоконсервування МНК визначається не тільки схоронністю кількості і життєздатністю. Відносно подальшого отримання з них ДК надто важливим є також збільшення таких показників: вмісту CD14^+ -моноцитів, як попередників ДК, а також експресії в них Hsp70. Попит на такі клітини обумовлений їх протизапальною активністю внаслідок підвищення продукції ІЛ-10 і стимуляції Трег- клітин у тварин з АІЗ.

Отже, Р2 забезпечував в МНК оптимальний вміст hsp70^+ -клітин порівняно з Нат-, КріоР1- та КріоР3МНК, що має всі підстави для формування з них *in vitro* ДК з високим толерогенним потенціалом.

Для генерації ДК з кріоконсервованих за різними режимами МНК їх культивували протягом 7 діб в пластикових чашках в середовищі RPMI-1640 с 10% ЕТС і ростовими факторами. Результати роботи показали, що кількість отриманих ДК на 7 добу культивування КріоР2МНК була вище, ніж при культивуванні Нат-, КріоР1- і КріоР3МНК. Їх вміст становив 66,7% від кількості посаджених на чашку МНК при життєздатності всього на 15% нижче від нативного контролю і не відрізнялась від цього показника клітин, отриманих при культивуванні КріоР1МНК. Застосування режиму Р3 при заморожуванні МНК призводило до суттєвого зниження, як кількості отриманих на 7 добу культивування ДК, так і їх життєздатності. Зважаючи на це, для подальшої оцінки фенотипових характеристик і функціонального потенціалу були обрані клітини – кандидати в ДК, отримані тільки з Нат-, КріоР1- і КріоР2МНК.

За допомогою МТТ-тесту була оцінена метаболічна активність НатДК і КріоДК. Отримані результати свідчать про підвищення метаболічної активності в КріоР1ДК і КріоР2ДК у 2 і 3 рази відповідно, у порівнянні з НатДК.

Крім того, було доведено, що експресія Hsp70 білка в hsp70⁺-КріоР2ДК з використанням показника СІФ була вище в порівнянні з hsp70⁺-КріоР1ДК. Тобто, є всі підстави вважати, що умови кріоконсервування режиму Р2 сприяють збільшенню синтезу Hsp70 і відповідно толерогенного потенціалу ДК (КріоР2ДК) отриманих з КріоР2МНК.

Результати [16] свідчать, що вміст БТШ, а саме, Hsp70 в ДК отриманих *in vitro* з МНК кріоконсервованих за різними режимами, є показовим для підтвердження їхньої здатності до стимулювання Трег-клітин і відновлення цитокінового профілю при імунотерапії АІЗ, зокрема ад'ювантного артриту (АА). Використання АА як експериментальної моделі РА [159] дозволяє вирішити питання відносно особливостей розвитку і прояву цієї патології, а також методів її лікування ДК, що отримані *in vitro* з кріоконсервованих попередників кісткового мозку.

Одержані в роботі результати свідчать, що важливою складовою патогенезу АА є дисрегуляція функції імунної системи на фоні розбалансування цитокінового профілю з переважним зростанням вмісту прозапальних цитокінів (ІЛ-6, ФНП- α , ІФН- γ) і дисфункції Т-регуляторної (Трег) ланки імунітету. Наші дані узгоджуються з даними інших авторів [10; 23; 46]. Встановлені нами зміни клітинної ланки імунітету і цитокінового профілю при АА супроводжувались підвищенням клініко-лабораторних показників: рівня сіалових кіслот, серомукоїдів, та індексу артриту (ІА). Встановлений нами збіг динаміки зміни лабораторно-діагностичних показників зі змінами клінічної маніфестації АА за ІА співпадають з даними інших авторів [159; 160].

Застосування адоптивної толДК-терапії з метою стимулювання Трег при АІЗ є трендовим напрямком сучасної експериментально-клінічної імунології. Певна увага при цьому звертається на дослідження рівня експресії гену *foxp3*,

що контролює напрацювання однойменного протеїну, який підвищує супресорну активність Трег.

В представлених результатах даного розділу роботи основна увага сфокусована на оцінці характеру кріовпливу на здатність вирощених з кріоконсервованих попередників толДК стимулювати формування Трег в організмі з аутоімунною патологією у вигляді АА.

Вперше встановлено, що розроблений спосіб кріоконсервування МНК кісткового мозку за режимом P2, забезпечує значуще підвищення у порівнянні з P1вмісту Трег-клітин ($CD4^+CD25^+$, $FOXP3^+$). Очевидно, що така активація формування Трег є результатом встановленого підвищення рівня експресії в цих клітинах гена *foxp3*.

Застосування отриманих за таких умов ДК призводило до суттєвого зниження важливого клініко-діагностичного показника для цієї патології – ІА.

Важливо, що підвищення вмісту цитозольних Hsp70 в КріоP2ДК співпадало з максимальною активацією їх толерогенної активності, оціненою за здатністю формувати Трег з найбільшим рівнем експресії гена *foxp3*. Саме КріоP2ДК забезпечували нормалізацією клінічної маніфестації аутоімунної патології в моделі АА. Важливо також, що такі ДК володіли більш пролонгованим лікувальним ефектом у порівнянні з НатДК. Крім того, аналіз вмісту $CD4^+CD25^+$ - та $FOXP3^+$ -клітин, рівня експресії гена *foxp3* і ІА на 7 і 14 добу після застосування толДК різного виду в моделі АА показав, що покращення клінічного статусу тварин більшою мірою корелює з вмістом $FOXP3^+$ Т-регуляторних клітин, ніж рівнем експресії гена *foxp3*.

Вкрай важливою є проведена в роботі оцінка цитокінового профілю організму експериментальних тварин. Отримані результати сприяють більш детальному вивченню патогенеза РА. Ці дослідження є актуальними і інформативними для подальшого розуміння і удосконалення стратегії лікування цієї патології в цілому. Доведено, що ступінь тяжкості перебігу запальної реакції в суглобах тварин з АА обумовлений і базується на фоні системного дисбалансу про- та протизапальних цитокінів [161; 162]. Клінічні

спостереження свідчать, що у якості основних патогенетично значущих прозапальних цитокінів, які, безпосередньо, мають відношення до ініціації і підтримки розвитку РА є ФНП- α і ІЛ-6. Саме ці цитокіни відповідають за розвиток системних проявів захворювання і пошкодження тканини суглобів [162]. Разом з тим, такі протизапальні цитокіни як ІЛ-10 і ІЛ-4, мають виражені властивості сповільнювати деструкцію суглобів [163].

В нашому дослідженні відзначено зростання концентрації ФНП- α і ІЛ-6 в процесі розвитку АА, що чітко узгоджується з характером їхньої дії при АІЗ [164]. На відміну від інших запальних цитокінів, ІЛ-6 є головним активатором синтезу більшості гострофазових білків в печінці, тоді як ФНП- α стимулює лише синтез окремих білків, хоча діє в цьому випадку опосередковано через ІЛ-6 [164]. Наші дані дійсно свідчать про більш високу концентрацію ІЛ-6 в порівнянні з ФНП- α в сироватці крові тварин з АА у всі терміни визначення, що підкреслює ключову роль ІЛ-6 в підтримці запальних процесів при розвитку АА. Це узгоджується з результатами клінічних досліджень, що також свідчать про високий рівень ІЛ-6 і ФНП- α в синовіальній рідині і сироватці крові пацієнтів з РА [165]. Одним з прозапальних цитокінів є ІФН- γ , рівень якого в наших дослідженнях, однак, не перевищував показники інтактного контролю у всі терміни спостереження при розвитку АА. В той же час відомо, що ІФН- γ здатен збільшувати продукцію медіаторів, що активують апоптотичні процеси і через механізми стимуляції ІДО індукують Трег-клітини і послаблюють диференціювання деяких імунокомпетентних клітин (Th17), а також остеокластів [160]. В експериментальних моделях АІЗ показано, що при низьких рівнях ІФН- γ , або його рецепторів на клітинах, збільшується сприйнятливість до запальних процесів і їх тяжкість [166]. В той же час, відносний рівень мРНК ІФН- γ був знижений в тканинах суглобів мишей з колаген-індукованим артритом. Відомо про виразний лікувальний ефект антитіл до ІФН- γ у хворих на РА [166]. Складається враження, що в залежності від умов навколишнього середовища і концентрації, ІФН- γ може реалізувати не однотипні ефекти. Тобто, встановлене нами зниження в порівнянні з контролем

рівня ІФН- γ в сироватці крові тварин на всіх етапах розвитку АА може бути цілком не парадоксальним.

Результати виконаної нами роботи продемонстрували можливість позитивного коригування цитокінового профілю тварин з АА за допомогою використання ДК, що отримані з кріоконсервованих попередників кісткового мозку. Більш того, наші дані свідчать про деякі переваги КріоДК. Суттєво, що обидва види КріоДК коригували розбалансований стан як про-, так і протизапальних цитокінів в сироватці крові тварин з АА. В світлі зазначеної вище значущості зниження вмісту запального ІФН- γ при АІЗ, звертає на себе увагу підвищення його концентрації після введення ДК у порівнянні з показниками не лікованих тварин, що співпадає зі зниженням ступеня тяжкості патології і узгоджується з даними [167]. Ці автори також довели, що підвищення продукції ендогенного ІФН- γ безпосередньо пов'язано зі зниженням ступеня тяжкості захворювання у пацієнтів з РА. Важливим є і факт інгібіції під впливом застосованої ДК-терапії продукції запальних цитокінів ФНП- α та ІЛ-6. Мова йде про формування більш «гармонізованого», тобто, наближеного до контрольних показників, профілю цих цитокінів з більшим ефектом КріоДК, а саме, КріоР2ДК у порівнянні з НатДК. Особливу увагу звертає на себе потенціал толДК підвищувати у тварин з АА рівень протизапальних цитокінів – ІЛ-4 і ІЛ-10. Слід зазначити, що всі види ДК (НатДК, КріоР1ДК і КріоР2ДК) в більшому ступені стимулювали продукцію протизапальних цитокінів, ніж гальмували продукцію прозапальних. При цьому КріоР2ДК мали перевагу над КріоР1ДК і НатДК у «гармонізації» співвідношення різних видів про- і протизапальних цитокінів, тобто наближеного до показників інтактного контролю.

Одже, доведена здатність толДК, що отримані з кріоконсервованих попередників кісткового мозку, в найбільшій мірі корегувати розбалансований цитокіновий профіль тварин з ад'ювантним артритом. При цьому, доведені переваги таких ДК стимулювати продукцію протизапальних цитокінів, рівень

яких суттєво знижений при більшості аутоімунних захворювань, включно з ад'ювантним артритом.

Таким чином, виконана робота і отримані в ній результати підкреслюють ефективність застосування толерогенних дендритних клітин отриманих з кріоконсервованих попередників в лікуванні ад'ювантного артриту як експериментальної моделі ревматоїдного артриту у людини. Вперше встановлено переваги застосування кріоконсервованих толерогенних дендритних клітин в порівнянні з нативними в корекції стану Т-регуляторних клітин, а також розбалансованого цитокінового профілю зі значним підвищенням рівня протизапальних цитокінів у тварин з ад'ювантним артритом, що сприяло нормалізації показників їх клінічного стану. Отримані в роботі результати можуть бути враховані і використані лікарями-клініцистами, які опановують і впроваджують методи клітинно-тканинної терапії в лікування аутоімунних захворювань, зокрема ревматоїдний артрит. Представлений матеріал демонструє можливість використання ультранизьких температур як «інструмента», що спрямовано керує толерогенним потенціалом дендритних клітин, що отримані з клітин-попередників.

ВИСНОВКИ

1. Відпрацьовано метод виділення з кісткового мозку мишей в градієнті “Тразографа” $40,46 \pm 3,04\%$ мононуклеарів, серед яких $12,92 \pm 2,32\%$ становили CD14+-моноцити.

2. Визначені умови культивування мононуклеарів в присутності ГМ-КСФ, ІЛ-4 і дексаметазону і отримання з них 55,70% дендритних клітин з толерогенними властивостями від посаджених на чашку мононуклеарів.

3. Підібрана панель фенотипових маркерів толерогенних дендритних клітин, що отримані *in vitro* з мононуклеарів. Встановлено, що диференціювання мононуклеарів у толерогенні дендритні клітини супроводжується експресією на мембрані молекули CD11b (90,0%), а також втратою CD14-рецептора (8,45%) і мінімізацією рівня експресії коstimуляторних CD80 і CD86 молекул, що становило 70,34% і 72,45% відповідно.

4. Продемонстровано, що різні режими кріоконсервування мононуклеарів кісткового мозку під захистом 10% ДМСО з повільною швидкістю охолодження 1 град / хв: до -80° – P1; до -40° – P2; до -25°C – P3 з наступним зануренням у кожному випадку в рідкий азот (-196°C), в різний ступінь збільшують здатність мононуклеарів формувати *in vitro* толерогенні дендритні клітини, що використовуються в терапії ад’ювантного артриту, як експериментальної моделі ревматоїдного артриту у людини.

5. Доведено, що застосований в роботі метод кріоконсервування мононуклеарів за режимом P2 забезпечував максимальні показники їх життєздатності (84,3%), метаболічної активності (91,9%), та вмісту CD14+ - попередників дендритних клітин (18,0%) у порівнянні з загальноприйнятим режимом кріоконсервування (P1), що становило 80,1%, 74,7%, 15,8% відповідно.

6. В дендритних клітинах, що отримані *in vitro* з кріоконсервованих мононуклеарів за P2, визначався підвищений вміст цитозольних білків теплового шоку Hsp70 (5,04%), на відміну від кріоконсервованих за P1 і нативних мононуклеарів (2,94% і 2,77% відповідно). Це співпадало, зі збільшенням їх толерогенної активності, оціненої в моделі ад’ювантного артриту за здатністю формування Т-регуляторних клітин (що становило: CD4+CD25+ - 5,44% та FOXP3+ - 4,69%) з найбільшим рівнем експресії гена *foxp3* і зниженням клінічної маніфестації аутоімунної патології за індексом артриту (1,12 умов.од.).

7. Доведена здатність толерогенних дендритних клітин, що отримані з кріоконсервованих, особливо за Р2, попередників кісткового мозку, в найбільшій мірі корегувати розбалансований цитокіновий профіль тварин з ад'ювантним артритом. При цьому, доведені переваги КріоР2ДК стимулювати продукцію протизапальних цитокінів, рівень яких суттєво знижений при більшості аутоімунних захворювань. Так рівень ІЛ-10 після введення КріоР2ДК збільшувався у порівнянні з КріоР1ДК і НатДК в 1,5 і 1,9 рази, а ІЛ-4 – в 1,2 і 1,47 рази відповідно.

Вивчення в експериментальних дослідженнях на клітинному і молекулярному рівнях механізмів, які формують і забезпечують підвищення толерогенної активності дендритних клітин за рахунок застосування оригінальних підходів кріоконсервування їх попередників, буде сприяти створенню принципово нових і покращенню існуючих у клінічній імунології підходів до лікування аутоімунних захворювань.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Angelotti F, Parma A, Cafaro G. One year in review 2017: pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2017; 35(3): 368–78. PMID: 28631608.
2. Bevaart L, Vervoordeldonk MJ, Tak PP. Evaluation of therapeutic targets in animal models of arthritis: how does it relate to rheumatoid arthritis? *Arthritis Rheum*. 2010;62: 2192–205. DOI: [10.1002/art.27503](https://doi.org/10.1002/art.27503)
3. Yang J, Yang Y, Ren Y, Xie R, Zou H, Fan H. A Mouse model of adoptive immunotherapeutic targeting of autoimmune arthritis using allo-tolerogenic dendritic cells. *PLoS ONE*. 2013;8(Issue 10). journal.pone.0077729. e77729. DOI: [10.1371/journal.pone.0077729](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077729)
4. Goltsev A, Dubrava T, Yampolska K, Lutsenko O, Gaevska Yu, Babenko N., Bondarovich M. The substantiation of adoptive transfer of tolerogenic dendritic cells for treatment of rheumatoid arthritis in mice. *Cell and Organ Transplantation*. 2019;7(2):125-131. DOI: [10.22494/cot.v7i2.99](https://doi.org/10.22494/cot.v7i2.99)
5. Thurner B, Röder C, Dieckmann, Heuer DM, Kruse M, Glaser A, et al. Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application. *J Immunol Methods*. 1999;223:1–15. DOI: [10.1016/s0022-1759\(98\)00208-7](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(98)00208-7)
6. Hettihewa LM. Prolonged expression of MHC class I - peptide expression in bone marrow derived retrovirus transfected matured dendritic cells by continuous centrifugation in the presence of IL-4. *Indian J Med Res*. 2011;134(5): 672—678. DOI: [10.4103/0971-5916.90993](https://doi.org/10.4103/0971-5916.90993)
7. Gordon JR, Ma Y, Churchman L, Gordon SA, Dawicki W. Regulatory dendritic cells for immunotherapy in immunologic diseases. *Front Immunol*. 2014;5:Article7. DOI: [10.3389/fimmu.2014.00007](https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00007)
8. Maldonado RA, von Andrian UH. How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells. *Adv Immunol*. 2010; 108: 111–65. DOI: [10.1016/B978-0-12-380995-7.00004-5](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380995-7.00004-5)

9. Cauwels A, Tavernier J. Tolerizing strategies for the treatment of autoimmune diseases: from ex vivo to in vivo strategies. *Front Immunol* [internet]. 2020 May 14 [cited 2020 Nov 10]; 11:674. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.00674/full>
10. Kondo N, Kuroda T, Kobayashi D. Cytokine Networks in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Int J Mol Sci*. 2021;22(20):10922. DOI: [10.3390/ijms222010922](https://doi.org/10.3390/ijms222010922)
11. Silveira GF, Wowk PF, Machado AMB, dos Santos CDD, Bordignon J. Immature dendritic cells generated from cryopreserved human monocytes show impaired ability to respond to LPS and to induce allogeneic lymphocyte proliferation. *PLoS One*. 2013; 8: 2–9. DOI: [10.1371/journal.pone.0071291](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071291)
12. Гольцев АН, Останкова ЛВ, Дубрава ТГ, Луценко ЕД, Останков МВ, Гаевская ЮА, и др. Криоконсервирование как фактор модификации структурно-функционального состояния и механизма реализации лечебного эффекта клеток стволового компартмента в условиях развития патологий аутоиммунного генеза. В: Гольцев АН, редактор. *Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины*. Харьков: ИПКиК НАНУ; 2012, с. 501–612
13. Martikainen MV, Roponen M. Cryopreservation affected the levels of immune responses of PBMCs and antigen-presenting cells. *Toxicology in Vitro*. 2020; 67:104918. DOI: [10.1016/j.tiv.2020.104918](https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104918)
14. Zhou Q. Mature dendritic cell derived from cryopreserved immature dendritic cell shows impaired homing ability and reduced anti-viral therapeutic effects. *Sci Rep*. 2016;6:1-12. DOI: [10.1038/srep39071](https://doi.org/10.1038/srep39071)
15. Usero L., Miralles L., Esteban I., et al. Feasibility of using monocyte-derived dendritic cells obtained from cryopreserved cells for DC-based vaccines. *Journal of Immunological Methods*. 2021;498:113-133. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2021.113133>

16. Borges TJ, Wieten L, van Herwijnen MJ, Broere F, van der Zee R, Bonorino C, van Eden W. et al. The anti-inflammatory mechanisms of Hsp70. *Front Immunol.* 2012; 4 (3): 95. DOI: [10.3389/fimmu.2012.00095](https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00095)
17. Tukai S. Heat shock protein 70 as a double agent acting inside and outside the cell: Insights into Autoimmunity. *Int J Mol Sci.* 2020;21(15):5298. DOI: [10.3390/ijms21155298](https://doi.org/10.3390/ijms21155298)
18. Stocki P., Dickinson A.M. The immunosuppressive activity of heat shock protein 70. *Autoimmune Dis* [internet]. 2012 Dec 17 [cited 2020 Dec 07]; 2012: 617213. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/ad/2012/617213>. DOI: [10.1155/2012/617213](https://doi.org/10.1155/2012/617213)
19. Bellone M. Autoimmune Disease: *Pathogenesis.* eLS. 2015. DOI: [10.1002/9780470015902.a0001276.pub4](https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0001276.pub4)
20. Song H, Fang F, Tomasson G, Arnberg FK, Mataix-Cols D, Fernández de la Cruz L, et al. Association of Stress-Related Disorders With Subsequent Autoimmune Disease. *JAMA.* 2018;319(23):2388-400. DOI: [10.1001/jama.2018.7028](https://doi.org/10.1001/jama.2018.7028)
21. Gozhenko AI, Zukow W, Polovynko IS, Zajats LM, Yanchij RI, Portnichenko VI, Popovych IL. Individual Immune Responses to Chronic Stress and their NeuroEndocrine Accompaniment. Torun'. *Nicolaus Copernicus University*; 2019: 163 p. DOI: <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.3470144>
22. Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. *Иммунология*. Пер. с англ. – М.: Мир, 2000. – 592 с.
23. Dominguez-Villar M, Hafler DA. Regulatory T cells in autoimmune disease. *Nat Immunol.* 2018; 19: 665–73. DOI: [10.1038/s41590-018-0120-4](https://doi.org/10.1038/s41590-018-0120-4).
24. Lu JG, Ji P, French SW The Major Histocompatibility Complex Class II–CD4 Immunologic Synapse in Alcoholic Hepatitis and Autoimmune Liver Pathology: The Role of Aberrant Major Histocompatibility Complex Class II in Hepatocytes. *The American Journal of Pathology.* 2020;190(1);25-32. DOI: [10.1016/j.ajpath.2019.09.019](https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2019.09.019)

25. Goltsev AM, Fuller BJ, Bondarovich MO, Babenko NM, Gaevska YO, Buriak IA, et al. COVID-19 as a Potential Target for Cryobiology and Cryomedicine. *Probl Cryobiol Cryomed.* 2020;30(2):107–31. DOI: <https://doi.org/10.15407/cryo30.02.107>
26. Mazzone R, Zwergel C, Artico M, et al. The emerging role of epigenetics in human autoimmune disorders. *Clin Epigenet* [Internet]. 2019 Feb 26 [Cited 1.12. 2022]; 11: 34. Available from: <https://clinicalepigeneticsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13148-019-0632-2>
27. Kim YS, Hong S. Controversial roles of cold-inducible RNA-binding protein in human cancer (Review). *Int J Oncol* [Internet]. 2021 Sep 24 [Cited 1.12.2022]; 59(5): 91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34558638/> DOI: [10.3892/ijo.2021.5271](https://doi.org/10.3892/ijo.2021.5271)
28. Клінічна імунологія та алергологія: Підручник / Г. М. Драннік, О. С. Прилуцький, Ю. І. Бажора та ін. – К.: Здоров'я, 2006. – 888 с.; Toivanen P. From reactive arthritis to rheumatoid arthritis. *J. Autoimmun.* 2001;16(3):369-71. DOI: [10.1006/jaut.2000.0496](https://doi.org/10.1006/jaut.2000.0496)
29. Ребров БО, Касинець СС, Комарова ОБ. Нові можливості у діагностиці та лікування раннього ревматоїдного артрити. *Український ревматологічний журнал.* 2013;53(3):35-39
30. Williams RO, Aletaha D, Redlich K. What have we learned about the pathogenesis of rheumatoid arthritis from TNF-targeted therapy? *ISRN Immunology.* 2012;(3):4-18. DOI:[10.5402/2012/652739](https://doi.org/10.5402/2012/652739)
31. Яременко О.Б. Етиология и иммунопатогенез ревматоидного артрита // *Клінічна імунологія. Алергологія. Інфектологія.* 2005;1(1):48-51
32. Свінцицький А.С. 2007. Свінцицький АС. Ревматоїдний артрит: вчора, сьогодні, завтра. *Здоров'я України.* 2007; 1(12):81-83
33. Firestein GS, Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Journal of Clinical Rheumatology.* 2005;11(3):39-44. DOI:[10.1097/01.rhu.0000166673.34461.33](https://doi.org/10.1097/01.rhu.0000166673.34461.33)

34. Imboden JB. The Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Annu Rev Pathol.*2009;(4):417-434.DOI: [10.1146/annurev.pathol.4.110807.092254](https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092254)
35. Гольцев АН, Ямпольская Е.Е. Апоптоз клеток моноцитарно-фагоцитарной системы и механизмы его регуляции. *Проблемы криобиологии* 2006;16(4):408-420.
36. Ren J, Feng Z, Lv Z, Chen X, Li J. Natural killer-22 cells in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis are an innate source of interleukin 22 and tumor necrosis factor- α . *J Rheumatol.* 2011;38(10):2112-8. Epub 2011 Jul 15. PMID: 21765110. DOI:[10.3899/jrheum.101377](https://doi.org/10.3899/jrheum.101377)
37. Гольцев АН, Луценко ЕД, Останков МВ. Состояние естественных киллерных клеток (ЕКК) при адъювантном артрите и после введения криоконсервированных клеток плаценты. *Практична медицина: Науково-практичний журнал.* 2008;14(2):262-263
38. Гольцев АН, Гаевская ЮА, Дубрава ТГ, Останкова, ЛВ. Влияние криоконсервирования на функциональный статус стволовых кроветворных и мезенхимальных клеток костного мозга животных с аутоиммунной патологией. *Проблемы криобиологии и криомедицины.* 2016; 26 (1): 63-72
39. Mills T, Rabe JL. Rheumatoid arthritis causes hematopoietic stem cell reprogramming to maintain functionality. *Blood.* 2018;132(1):2573. DOI:[10.1182/blood-2018-99-120272](https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-120272)
40. Lutsenko ED, Ostankov MV, Bondarovich N.A, Goltsev AN. Influence of Application of Cryopreserved Placental Cell Suspension on Indices of Peripheral Blood and Bone Marrow of Animals With Adjuvant Arthritis. *Probl Cryobiol Cryome.* . 2019: 29(1): 28–43. DOI: <https://doi.org/10.15407/cryo29.01.028>
41. Pecans A, Alessandri C. Prevalence, sensitivity and specificity of antibodies against carbamylated proteins in a monocentric cohort of patients with rheumatoid arthritis and other autoimmune rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther* [Internet]. 2016 Nov 26 [Cited 1.12.2022]18: 276. Available from:

<https://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13075-016-1173-0>
<https://doi.org/10.1186/s13075-016-1173-0>

42. Flevaris K, Kontoravdi C. Immunoglobulin G N-glycan biomarkers for autoimmune diseases: current state and a glycoinformatics perspective. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2022 May 6 [Cited 1.09.2022]; 23(9): 5180. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9100869/>
DOI: [10.3390/ijms23095180](https://doi.org/10.3390/ijms23095180)
43. Haleagrahara N, Miranda-Hernandez S, Alim MA, Hayes L, Bird G, Ketheesan N. Therapeutic effect of quercetin in collagen-induced arthritis. *Biomed. Pharmacother.* 2017;90:38–46.DOI: [10.1016/j.biopha.2017.03.026](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.03.026)
44. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell.* 2008;133(5):775-87.
DOI: [10.1016/j.cell.2008.05.009](https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.05.009)
45. Wang Ya, Li XL, Mo YZ, Fan C-M, Tang L, Xiong F, et al. Effects of tumor metabolic microenvironment on regulatory T cells. *Mol Cancer.* 2018;17:168.
<https://doi.org/10.1186/s12943-018-0913-y>
46. Lu L, Barbi J, Pan F. The regulation of immune tolerance by FOXP3. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(11):703–717. DOI:[10.1038/nri.2017.75](https://doi.org/10.1038/nri.2017.75)
47. Гольцев АМ, Дубрава ТГ, Луценко ОД, Порожан ЄО, Бабенко НМ, Гаєвська ЮО, Дімітров ОЮ. Молекулярні механізми імунокоригувальної дії препаратів фетоплацентарного комплексу в умовах розвитку автоімунних захворювань. *Одеський медичний журнал.* 2013; 138(4):13–8
48. Nagy G, Huszthy PC, Fossum E, Konttinen Y., Nakken B.,Szodoray P. Selected aspects in the pathogenesis of autoimmune diseases. *Hindawi Publishing Corporation Mediators of Inflammation.* Volume 2015, Article ID 351732, 11 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2015/351732>
49. Colamatteo A, Carbone F, Bruzzaniti S, Galgani M, Fusco C, Maniscalco GT, et al. Molecular Mechanisms controlling Foxp3 expression in health and

- autoimmunity: from epigenetic to post-translational regulation. *Front. Immunol.* REVIEW published: 03 February 2020. DOI: [10.3389/fimmu.2019.03136](https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03136)
50. Han GM, O'Neil-Andersen NJ, Zurier RB, Lawrence DA. CD4CD25 high T cell numbers are enriched in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Cell Immunol.* 2008;253:92–101
 51. Noack M, Miossec P. Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmun Rev.* 2014;13(6):668–77. DOI: [10.1016/j.autrev.2013.12.004](https://doi.org/10.1016/j.autrev.2013.12.004)
 52. Robert H, Shmerling MD, Senior Faculty Editor, Autoimmune disease and stress: Is there a link? October 27, 2020 *Harvard Health Publishing* <https://www.health.harvard.edu/blog/autoimmune-disease-and-stress-is-there-a-link-2018071114230>
 53. Ryba-Stanisławowska M, Skrzypkowska M, Myśliwska J, Myśliwiec M. The serum IL-6 profile and Treg/Th17 peripheral cell populations in patients with 1 type diabetes. *Mediators Inflamm.* 2013;20(13): 205-284. DOI: [10.1155/2013/205284](https://doi.org/10.1155/2013/205284)
 54. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I Morphology, quantification, tissue distribution. *J Exp Med.* 1973;137(5):1142-1162. DOI: [10.1084/jem.137.5.1142](https://doi.org/10.1084/jem.137.5.1142)
 55. Schlitzer A., McGovern N, Teo P, Zelante T, Atarashi K, Low D, et al. IRF4 transcription factor-dependent CD11b⁺ dendritic cells in human and mouse control mucosal IL-17 cytokine responses. *Immunity.* 2013;38(5):970-83. DOI: [10.1016/j.immuni.2013.04.011](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.04.011)
 56. Ueno H, Schmitt N, Klechevsky E, Pedroza-Gonzalez A, Matsui T, Zurawski G. et al. Harnessing human dendritic cell subsets for medicine. *Immunol Rev.* 2010; 234(1): 199-212. DOI: [10.1111/j.0105-2896.2009.00884.x](https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2009.00884.x)
 57. Liu K, Victorica GD, Schwickert TA, Guermonprez P, Meredith MM, Yao K. et al. In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science.* 2009;324(5925):392-7. DOI: [10.1126/science.1170540](https://doi.org/10.1126/science.1170540)

58. Heger L, Hofer TP, Bigley V, de Vries JM, Dalod M, Dudziak D, et al. of CD1c+ DCs: Dendritic Cell Versus Monocyte Lineage. *Front Immunol* [Internet]. 2020;11:559166 .DOI: [10.3389/fimmu.2020.559166](https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.559166)
59. Redecke V, Wu R, Zhou J, Finkelstein D, Chaturvedi V, High AA, et al. Hematopoietic progenitor cell lines with myeloid and lymphoid potential. *Nat Methods*. 2013;10(8):795-803.DOI: [10.1038/nmeth.2510](https://doi.org/10.1038/nmeth.2510)
60. Ueno H, Klechevsky E, Morita R, Aspod C, Cao T, Matsui T, et al. Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol Rev*. 2007;219:118-42.
DOI: [10.1111/j.1600-065X.2007.00551.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2007.00551.x)
61. Dzionek A, Fuchs A, Schmidt P, Cremer S, Zysk M, Miltenyi S. et al. BDCA-2, BDCA-3 and BDCA-4: Three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol*. 2000; 165(11):6037-46.
DOI: [10.4049/jimmunol.165.11.6037](https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.11.6037)
62. Jähn PS, Zänker KS, Schmitz J, Dzionek A. BDCA-2 signaling inhibits TLR-9-agonist-induced plasmacytoid dendritic cell activation and antigen presentation. *Cell Immunol*. 2010;265(1);15-22.DOI: [10.1016/j.cellimm.2010.06.005](https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2010.06.005)
63. MacDonald KP, Munster DJ, Clark GJ. et al. Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood*. 2002;100(13): 4512-4520.
DOI: [10.1182/blood-2001-11-0097](https://doi.org/10.1182/blood-2001-11-0097)
64. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:685-711.
DOI: [10.1146/annurev.immunol.21.120601.141040](https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141040)
65. Mahnke K, Schmitt E, Bonifaz L, Henk A, Jonuleit H. Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells. *Immunol Cell Biol*. 2002;80(5):477-483
66. O'Neill HC. Dendritic Cell Therapy for Tolerance Induction to Stem Cell Transplants. *Current Stem Cell Research & Therapy* 2006;1(1):121-5.
DOI:[10.2174/157488806775269160](https://doi.org/10.2174/157488806775269160)
67. Manicassamy S, Pulendran B. Dendritic cell control of tolerogenic responses. *Immunol Rev*. 2011;241(1):206-227.DOI: [10.1111/j.1600-065X.2011.01015.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01015.x)

68. Lutz MB, Schuler G. Immature, semi-immature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity. *Trend Immunol.* 2002;23(9):445-449. DOI: [10.1016/s1471-4906\(02\)02281-0](https://doi.org/10.1016/s1471-4906(02)02281-0)
69. Frick J S, Grunebach F, Autenrieth IB. Immunomodulation by semi-mature dendritic cells: a novel role of Toll-like receptors and interleukin-6. *Int J Med Microbiol.* 2010;300(1):19-24.DOI: [10.1016/j.ijmm.2009.08.010](https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2009.08.010)
70. Morel PA, Turner MS. Designing the optimal vaccine: the importance of cytokines and dendritic cells. *Open Vaccine J.* 2010;3():7-17. DOI: [10.2174/1875035401003010007](https://doi.org/10.2174/1875035401003010007)
71. Pletinckx K, Stijlemans B, Pavlovic V, Laube R, Brandl C, Kneitz S, et al. Similar inflammatory DC maturation signatures induced by TNF or Trypanosoma brucei antigens instruct default Th2-cell responses. *Eur J Immunol.* 2011;41(12):3479-3494.DOI: [10.1002/eji.201141631](https://doi.org/10.1002/eji.201141631)
72. Hilkens CM, Isaacs JD, Thomson AW. Development of DC-based immunotherapy for autoimmunity. *Int. Rev. Immunol.* 2010;29(2):156-183. DOI: [10.3109/08830180903281193](https://doi.org/10.3109/08830180903281193)
73. Liu J, Cao X. Regulatory dendritic cells in autoimmunity: a comprehensive review. *J Autoimmun.* 2015;63:1-12.DOI: [10.1016/j.jaut.2015.07.011](https://doi.org/10.1016/j.jaut.2015.07.011)
74. Iliev ID., Spadoni I, Mileti E, Mileti E, Matteoli G, Sonzogni A, Sampietro GM, et al. Human intestinal epithelial cells promote the differentiation of tolerogenic dendritic cells. *Gut.* 2009;58(11):1481-1489. DOI: [10.1136/gut.2008.175166](https://doi.org/10.1136/gut.2008.175166)
75. Park JH, Choi AJ, Kim SJ, Jeong SY. 3,3'-Diindolylmethane Inhibits Flt3L/GM-CSF-induced-bone Marrow-derived CD103(+) Dendritic Cell Differentiation Regulating Phosphorylation of STAT3 and STAT5. *Immune Netw.* 2015;15(6):278-290.DOI: [10.4110/in.2015.15.6.278](https://doi.org/10.4110/in.2015.15.6.278)
76. Lan Z, Ge W, Arp J, Jiang J, Liu W, Gordon D, et al. Induction of kidney allograft tolerance by soluble CD83 associated with prevalence of tolerogenic dendritic cells and indoleamine 2,3-dioxygenase. *Transplantation.* 2010;90(12):1286-1293.DOI: [10.1097/TP.0b013e3182007bbf](https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3182007bbf)

77. Stuart LM, Lucas M, Simpson C, Simpson C, Lamb J, Savill J, Lacy-Hulbert A. Inhibitory effects of apoptotic cell ingestion upon endotoxin-driven myeloid dendritic cell maturation. *J Immunol.* 2002;168(4):1627-1635.
DOI: [10.4049/jimmunol.168.4.1627](https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.4.1627)
78. Probst HC, Muth S, Schild H. Regulation of the tolerogenic function of steady-state DCs. *Eur J Immunol.* 2014;44(4):927-933.
<https://doi.org/10.1002/eji.201343862>
79. Nam J-H, Lee J-H. Functional Ambivalence of Dendritic Cells: Tolerogenicity and Immunogenicity. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 April 23 [Cited 1.12.2022] 22: 4430. Available from: <https://www.mdpi.com/14220067/22/9/4430>
<https://doi.org/10.3390/ijms22094430>
80. Kruisbeek AM. In vitro assays for mouse lymphocyte function. *Current Protocols in Immunology.* 2003;55(1):1.DOI: [10.1002/0471142735.im0300s55](https://doi.org/10.1002/0471142735.im0300s55)
81. Obermaier B, Dauer M, Herten J, Schad K, Endres S, Eigleret A. Development of a new protocol for 2-day generation of mature dendritic cells from human monocytes. *Biol. Proced. Online.* 2003;5(1):197-203.DOI: [10.1251/bpo62](https://doi.org/10.1251/bpo62)
82. Boks M.A., Kager-Groenland J.R., Haasjes M.S.P., Zwaginga J.J., van Ham S.M., Ten Brinke A. IL-10-generated tolerogenic dendritic cells are optimal for functional regulatory T cell induction—acomparative study of human clinical-applicable DC. *Clin Immunol.* 2012;142(3):332–342. DOI:[10.1016/j.clim.2011.11.011](https://doi.org/10.1016/j.clim.2011.11.011)
83. Hubert P, Jacobs N, Caberg JH. The cross-talk between dendritic and regulatory T cells: good or evil? *J Leukoc Biol.* 2007;82(4):781-794.
DOI: [10.1189/jlb.1106694](https://doi.org/10.1189/jlb.1106694)
84. Anderson AE, Swan DJ, Wong OY, Buck M, Eltherington O, Harry RA, et al. Tolerogenic dendritic cells generated with dexamethasone and vitamin D3 regulate rheumatoid arthritis CD4⁺ T-cells partly via TGF- β 1. *Clin Exp Immunol.* 2017;187(1):113-23.DOI: [10.1111/cei.12870](https://doi.org/10.1111/cei.12870)

85. Unger WWJ, Laban S, Kleijwegt FS, van der Slik AR, Roep BO. Induction of Treg by monocyte-derived DC modulated by vitamin D3 or dexamethasone: differential role for PD-L1. *Eur J Immunol*. 2009;39(11):3147–3159.
DOI: [10.1002/eji.200839103](https://doi.org/10.1002/eji.200839103)
86. Nikolic T, Roep BO. Regulatory multitasking of tolDC – lessons taken from vitamin D3-treated tolDC. *Front Immunol*. 2013;4:113.DOI:[10.3389/fimmu.2013.00113](https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00113)
87. Nickdel MB, Conigliaro P, Valesini G, Hutchison S, Benson R, Bundick RV, et al. Dissecting the contribution of innate and antigen-specific pathways to the breach of self-tolerance observed in a murine model of arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2009;68(6):1059-1066.DOI: [10.1136/ard.2008.089300](https://doi.org/10.1136/ard.2008.089300)
88. Yang M, Xu W, Wang Yu, Jiang X, Li Y, Yang Y, Yuanet H. CD11b-activated Src signal attenuates neuroinflammatory pain by orchestrating inflammatory and anti-inflammatory cytokines in microglia. *Mol Pain*. [Internet]. 2018 Jan-Dec [Cited 1.12. 2022]; 14:1744806918808150. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6311569/>
DOI: [10.1177/1744806918808150](https://doi.org/10.1177/1744806918808150)
89. Navarro-Barriuso J, Mansilla MJ, Martínez-Cáceres EM. Searching for the Transcriptomic Signature of Immune Tolerance Induction—Biomarkers of Safety and Functionality for Tolerogenic Dendritic Cells and Regulatory Macrophages. *Frontiers in immunology*. published: 19 September 2018:1-14.
DOI:[10.3389/fimmu.2018.02062](https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02062)
90. Cannarile L, Delfino DV, Adorisio S, Riccardi C, Ayroldi E. Implicating the role of GILZ in glucocorticoid modulation of T-cell activation. *Front Immunol* [Internet]. 2019 August 7 [Cited 9.12.2021];10:1823.Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.01823/full>:
DOI:[10.3389/fimmu.2019.01823](https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01823)
91. Ronchetti S, Migliorati G, Riccardi C. GILZ as a Mediator of the Anti-Inflammatory Effects of Glucocorticoids. *Front Endocrinol* (Lausanne) [internet] 2015;6:170.DOI: [10.3389/fendo.2015.00170](https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00170)

92. Vétillard M, Schlecht-Louf G. Glucocorticoid-induced leucine zipper: fine-tuning of dendritic cells function. *Front Immunol* [internet]. 2018 Jun 4[cited 2020 Dec 07]; 9:1232. DOI: [10.3389/fimmu.2018.01232](https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01232)
93. García-González PA, Schinnerling K, Sepúlveda-Gutiérrez A, Maggi J, Mehdi AM, Nel H.J, et al. Dexamethasone and monophosphoryl lipid A induce a distinctive profile on monocyte-derived dendritic cells through transcriptional modulation of genes associated with essential processes of the immune response. *Front Immunol*. 2017;8:1350. DOI: [10.3389/fimmu.2017.01350](https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01350)
94. Zimmer A, Bouley J, Le Mignon M, Pliquet E, Horiot S, Turfkruyer M, et al. A regulatory dendritic cell signature correlates with the clinical efficacy of allergen-specific sublingual immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129(4):1020-30. DOI: [10.1016/j.jaci.2012.02.014](https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.02.014)
95. Taylor MJ, London NJ, Thirdborough SM, Lake SP, James RF. The cryobiology of rat and human dendritic cells: preservation and destruction of membrane integrity by freezing. *Cryobiology*. 1990;27(3):269-78. DOI: [10.1016/0011-2240\(90\)90026-z](https://doi.org/10.1016/0011-2240(90)90026-z)
96. Hayden H, Friedl J, Dettke M, Sachet M, Hassler M, Dubsky P, et al. Cryopreservation of monocytes is superior to cryopreservation of immature or semi-mature dendritic cells for dendritic cell-based immunotherapy. *J Immunother*. 2009;32(6):638–54. DOI: [10.1097/CJI.0b013e3181a5bc13](https://doi.org/10.1097/CJI.0b013e3181a5bc13)
97. Mendoza L, Bubeník J, Indrová M, et al. Freezing and thawing of murine bone marrow-derived dendritic cells does not alter their immunophenotype and antigen presentation characteristics. *Folia Biol (Praha)*. 2002; 48(6): 242-5. PMID: 12512800
98. Radhakrishnan AK, Sim GC, Cheong SK. Comparing the ability of freshly generated and cryopreserved dendritic cell vaccines to inhibit growth of breast cancer in a mouse model. *Biores Open Access*. 2012; 1(5) : 239-46. DOI: [10.1089/biores.2012.0229](https://doi.org/10.1089/biores.2012.0229)
99. Meijerink M, Ulluwishewa D, Anderson RC, Wells JM. Cryopreservation of monocytes or differentiated immature DCs leads to an altered cytokine response

- to TLR agonists and microbial stimulation. *J Immunol Methods*. 2011; 373(1-2): 136- 42.DOI: [10.1016/j.jim.2011.08.010](https://doi.org/10.1016/j.jim.2011.08.010)
100. Buhl T, Legler TJ, Rosenberger A, Schardt A, Schön MP, Haenssle HA. Controlled-rate freezer cryopreservation of highly concentrated peripheral blood mononuclear cells results in higher cell yields and superior autologous T-cell stimulation for dendritic cell-based immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2012; 61 (11): 2021-31.DOI: [10.1007/s00262-012-1262-0](https://doi.org/10.1007/s00262-012-1262-0)
 101. Hori S, Heike Y, Takei M, Maruyama M, Yoshiko Inoue, Je-Jung Lee et al. Freeze-thawing procedures have no influence on the phenotypic and functional development of dendritic cells generated from peripheral blood CD14+ monocytes. *J Immunother*. 2004 ; 27(1): 27-35.DOI: [10.1097/00002371-200401000-00003](https://doi.org/10.1097/00002371-200401000-00003). PMID: 14676631
 102. Makino M, Baba MA cryopreservation method of human peripheral blood mononuclear cells for efficient production of dendritic cells. *Scand J Immunol*. 1997; 45(6): 618-22.DOI: [10.1046/j.1365-3083.1997.d01-441](https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.1997.d01-441)
 103. Westermann J, Körner IJ, Kopp J, Kurz S, Zenke M, Dörken B, Pezzutto A. Cryopreservation of mature monocyte-derived human dendritic cells for vaccination: influence on phenotype and functional properties. *Cancer Immunol Immunother*. 2003; 52(3): 194-8.DOI: [10.1007/s00262-002-0355-6](https://doi.org/10.1007/s00262-002-0355-6)
 104. Ghanekar SA, Bhatia S, Ruitenberg JJ, et al. Phenotype and in vitro function of mature MDDC generated from cryopreserved PBMC of cancer patients are equivalent to those from healthy donors. *J Immune Based Ther Vaccines*. 2007; 5:7 DOI:[10.1186/1476-8518-5-7](https://doi.org/10.1186/1476-8518-5-7)
 105. Messmer D, Hatsukari I, Hitosugi N, et al. Morphine reciprocally regulates IL-10 and IL-12 production by monocyte-derived human dendritic cells and enhances T cell activation. *Mol Med*. 2006; 12(11-12): 284-90. DOI: [10.2119/2006-00043](https://doi.org/10.2119/2006-00043)
 106. Goltsev AN, Babenko NN, Dubrava TG, et al. Modification of the state of bone marrow hemopoietic cells after cryopreservation. *International Journal of*

- Refregeneration*. 2006; 29 (3): 358-67.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0140700705002409>
107. Vaure C, Liu Y. A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species. *Front Immunol*. 2014 Jul 10;5:316.
 DOI: [10.3389/fimmu.2014.00316](https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00316)
 108. Wang L, Huckelhoven A, Hong J, et al. Standardization of Cryopreserved Peripheral Blood Mononuclear Cells Through a Resting Process for Clinical Immunomonitoring— Development of an Algorithm. *Cytometry*. 2016; 89(3):246-58 DOI: [10.1002/cyto.a.22813](https://doi.org/10.1002/cyto.a.22813)
 109. Shaik S, Hayes D, Gimble J, Devireddy R. Inducing Heat Shock Proteins Enhances the Stemness of Frozen-Thawed Adipose Tissue-Derived Stem Cells. *Stem Cells Dev*. 2017 ; 26(8): 608-616.DOI: [10.1089/scd.2016.0289](https://doi.org/10.1089/scd.2016.0289)
 110. Tukaj S., Kaminski M. Heat shock proteins in the therapy of autoimmune diseases: Too simple to be true? *Cell Stress Chaperones*. 2019;24(3):475–479.
 DOI: [10.1007/s12192-019-01000-3](https://doi.org/10.1007/s12192-019-01000-3)
 111. Jansen MAA, Spiering R, Broere F, et all. Targeting of tolerogenic dendritic cells towards heat-shock proteins: a novel therapeutic strategy for autoimmune diseases? *Immunology*. 2018; 153(1): 51-59. DOI:[10.1111/imm.12811](https://doi.org/10.1111/imm.12811)
 112. Dimitrov A, Bondarovich N, Chelombitko O, Borisov P. Analysis of ido gene expression in mouse fetal liver mesenchymal stem cells after cryopreservation using different programs. *Refrigeration science and technology*. 2014; 1: 318-22
 113. Fuller BJ. Gene expression in response to low temperatures in mammalian cells: a review of current ideas. *CryoLetters*. 2003; 24 (2): 95–102. PMID: 12819830.
 114. Desai K, Spikings E, Zhang T. Use of methanol as cryoprotectant and its effect on sox genes and proteins in chilled zebrafish embryos. *Cryobiology*. 2015; 71(1): 1-11.DOI: [10.1016/j.cryobiol.2015.06.009](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.06.009)
 115. Wolach O, Shpilberg O, Lahav M. Neutropenia after rituximab treatment: new insights on a late complication. *Curr Opin Hematol*. 2012; 19(1): 32–8.
 DOI: [10.1097/MOH.0b013e32834da987](https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e32834da987)

116. Ma L., Liu B., Jiang Z., Jiang Y. Reduced numbers of regulatory B cells are negatively correlated with disease activity in patients with new-onset rheumatoid arthritis. *Clin. Rheumatol.* 2014;33():187–195.DOI: [10.1007/s10067-013-2359-3](https://doi.org/10.1007/s10067-013-2359-3)
117. Li Y, Giang L, Zhang S, et al. Methotrexate attenuates the Th/IL-17 levels in peripheral blood mononuclear cells from healthy individuals and RA patients. *Rheumatol Int.* 2012; 32: 2415–22. DOI:[10.1007/s00296-0111867-1](https://doi.org/10.1007/s00296-0111867-1)
118. Isaacs JD. Therapeutic agents for patients with rheumatoid arthritis and an inadequate response to tumour necrosis factor-alpha antagonists. *Expert Opin Biol Ther.* 2009; 9(): 1463–75. DOI: [10.1517/14712590903379494](https://doi.org/10.1517/14712590903379494)
119. Singh JA, Hossain A, Kotb A, Wells G. Risk of serious infections with immunosuppressive drugs and glucocorticoids for lupus nephritis: a systematic review and network meta-analysis. *BMC Med.* 2016; 14(1): 137. DOI: [10.1186/s12916-016-0673-8](https://doi.org/10.1186/s12916-016-0673-8)
120. Salliot C, Gossec L, Ruysen-Witrand A, Luc M, Duclos M, Guignard S, Dougados M. Infections during tumour necrosis factor-alpha blocker therapy for rheumatic diseases in daily practice: a systematic retrospective study of 709 patients. *Rheumatology* (Oxford). 2007; 46: 327–34. DOI: [10.1093/rheumatology/kel236](https://doi.org/10.1093/rheumatology/kel236)
121. Gómez-Reino JJ, Carmona L, Angel Descalzo M. Risk of tuberculosis in patients treated with tumor necrosis factor antagonists due to incomplete prevention of reactivation of latent infection. *Arthritis Rheum.* 2007;57:756 – 761. DOI: [10.1002/art.22768](https://doi.org/10.1002/art.22768)
122. Carson KR, Evens AM, Richey EA, Habermann TM, Focosi D, Seymour JF, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy after rituximab therapy in HIV-negative patients: a report of 57 cases from the Research on Adverse Drug Events and Reports project. *Blood.* 2009;113:4834 – 40. DOI: [10.1182/blood-2008-10-186999](https://doi.org/10.1182/blood-2008-10-186999)
123. Norris P.AA, Kaur G, Lazarus AH. New insights into IVIg mechanisms and alternatives in autoimmune and inflammatory diseases. *Current Opinion in*

- Hematology*. 2020;27(Issue 6):392-398. DOI: [10.1097/MOH.0000000000000609](https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000609)
124. Shevach E.M. CD4+ CD25+ suppressor T-cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol*. 2002;2 (6):389-400. DOI: [10.1038/nri821](https://doi.org/10.1038/nri821)
 125. Grischenko VI, Goltsev AN. Transplantation of the products of embryofetoplacental complex. From understanding of mechanism of the effect to increasing the efficiency of application. *Problems of Cryobiology*. 2002; (1): 54–84
 126. Ng Sue-Ann., Sullivan K.M. Application of stem cell transplantation in autoimmune diseases *Current Opinion in Hematology*. 2019. 26(6):392-398. DOI: [10.1097/MOH.0000000000000531](https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000531)
 127. Jiang Q, Yang G, Liu Q, Wang S, Cui D. Function and Role of Regulatory T Cells in Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol*. 2021;12:626193. DOI: [10.3389/fimmu.2021.626193](https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.626193). PMID: 33868244; PMCID: PMC8047316
 128. Park MJ, Moon SJ, Lee EJ, Kim EK, Baek JA, Kim SY, et al. Daurinol Attenuates Autoimmune Arthritis via Stabilization of Nrp1-PTEN-Foxp3 Signaling in Regulatory T Cells. *Front Immunol*. 2019;10:1526. DOI: [10.3389/fimmu.2019.01526](https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01526)
 129. . Safari F, Farajnia S, Arya M, Zarredar H, Nasrolahi A. CRISPR and personalized Treg therapy: new insights into the treatment of rheumatoid arthritis. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2018. 40(3): 201–11. DOI: [10.1080/08923973.2018.1437625](https://doi.org/10.1080/08923973.2018.1437625)
 130. Cortez JT, Montauti E, Shifrut E, Gatchalian J, Zhang Y, Shaked O, et al. CRISPR screen in regulatory T cells reveals modulators of Foxp3. *Nature*. 2020. 582 (7812): 416–20. DOI: [10.1038/s41586-020-2246-4](https://doi.org/10.1038/s41586-020-2246-4).
 131. Gołąb K, Grose R, Placencia V, Wickrema A, Solomina J, Tibudan M, Konsur E, et al. Cell banking for regulatory T cell-based therapy: strategies to overcome the impact of cryopreservation on the Treg viability and phenotype. *Oncotarget*. 2018;9(11): 9728–9740. DOI: [10.18632/oncotarget.23887](https://doi.org/10.18632/oncotarget.23887)

132. Consonni FM, Porta C, Marino A, Pandolfo C, Mola S, Bleve A, Sica A. Myeloid-derived suppressor cells: ductile targets in disease. *Front Immunol.* 2019;10:949.DOI: [10.3389/fimmu.2019.00949](https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00949)
133. Ten Brinke A, Hilkens CM, Cools N, Geissler EK, Hutchinson JA, Lombardi G, et al. Clinical use of tolerogenic dendritic cells-harmonization approach in european collaborative effort. *Mediators Inflamm.* 2015;471719. DOI: [10.1155/2015/471719](https://doi.org/10.1155/2015/471719)
134. Stoop JN, Robinson JH, Hilkens CMU. Developing tolerogenic dendritic cell therapy for rheumatoid arthritis: what can we learn from mouse models? *Ann Rheum Dis.* 2011;70:1526–33.DOI:[10.1136/ard.2011.151654](https://doi.org/10.1136/ard.2011.151654)
135. de Aragao-Franca LS, Rocha VCJ, Cronemberger-Andrade A, Costa FHB, Vasconcelos JF, Vasconcelos JF et al. Tolerogenic dendritic cells reduce airway inflammation in a model of dust mite triggered allergic inflammation. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2018;10:406–19.DOI: [10.4168/aair.2018.10.4.406](https://doi.org/10.4168/aair.2018.10.4.406).
136. Obregon C, Kumar R, Pascual MA, et al. Update on dendritic cell-induced immunological and clinical tolerance. *Front Immunol.* 2017;8:1514. DOI: [10.3389/fimmu.2017.01514](https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01514)
137. Zubizarreta I, Benitez D, Sara V, Arnaiz JA. et. al. A Phase 1b Clinical Trial with Tolerogenic Dendritic Cells for Multiple Sclerosis and Neuromyelitis Óptica. *Neurology.* 2016;86(16):Supplement P2.159. DOI: [10.1136/bmjopen-2019-030309](https://doi.org/10.1136/bmjopen-2019-030309)
138. Giannoukakis N., Phillips B., Finegold D. Phase I (safety) study of autologous tolerogenic dendritic cells in type 1 diabetic patients. *Diabetes Care.* 2011;34(9): 2026–2032.DOI: [10.2337/dc11-0472](https://doi.org/10.2337/dc11-0472)
139. Goltsev AN, Dubrava TG, Yampolskaya EE, Gayevskaya YuA, Babenko NA Bondarovich NA, Kovalenko IG. The optimization method of isolation of immature dendritic cells. *Fiziol. Zh,* 2018;64(6): 32–9. DOI:[10.15407/fz64.06.032](https://doi.org/10.15407/fz64.06.032)
140. Gurina T.M., Vysekantsev I.P., Polyakova A.L. Effect of Cooling Rate in the Vicinity of eutectic temperature characteristic for cryoprotectant aqueous

- solution on post-thaw viability of *saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* cells. *Probl Cryobiol Cryomed* 2013;23(1):15–25
141. Han B., Bischof J.C. Direct cell injury associated with eutectic crystallization during freezing. *Cryobiology*. 2004;48:8–21.
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2003.11.002>
 142. Гордиенко ЕА, Пушкарь НС. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. -Киев: *Наук. думка*, 1994. 143 с
 143. Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1):55-63
 144. Міщенко О.Я. Котвіцька А.А. Фармакологічна ефективність емульсії анальбену на моделі ад'ювантного артриту у щурів. *Вісник фармації*. 2001;(3):124–125
 145. Справочник по клинко-биохимической лабораторной диагностике. / Камышников ВС. - 3-е изд. – М.: МЕДпресс-информ, 2009. – 896 с. ISBN 5-98322-303-8.
 146. Oxenkrug GF, McIntyre IM, Stanley M, Gershon S. Dexamethasone suppression test: experimental model in rats, and effect of age. *Biol Psychiatry*. 1984;19: 413-416
 147. Савилова А.М., Трофимов Д.Ю., Бурменская О.В., Алексеев Л.П., Хаитов Р.М. Метод оценки результатов с помощью количественной полимеразной цепной реакции. *Иммунология*. 2008;29(3):178-182
 148. Boyum A. A one-stage procedure for isolation of granulocytes and lymphocytes from human blood. General sedimentation properties of white blood cells in a 1g gravity. *Scand J Clin Lab Investig*. 1968;97:51—76
 149. Suwandi J.S., Nikolic T., Roep B.O. Translating mechanism of regulatory action of tolerogenic dendritic cells to monitoring endpoints in clinical trials. *Front Immunol*. 2017;8:1598. DOI: [10.3389/fimmu.2017.01598](https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01598)

150. Prado C, Gómez J, López P, de Paz B, Gutiérrez C, Suárez A. Dexamethasone upregulates FOXP3 expression without increasing regulatory activity. *Immunobiology*. 2011;216:386-392. DOI: [10.1016/j.imbio.2010.06.013](https://doi.org/10.1016/j.imbio.2010.06.013)
151. Giles AJ, Hutchinson MND, Sonnemann HM, et al. Dexamethasone-induced immunosuppression: mechanisms and implications for immunotherapy. *J Immunother Cancer*. 2018;6(1):51. DOI: [10.1186/s40425-018-0371-5](https://doi.org/10.1186/s40425-018-0371-5)
152. Bendele A.M. Animal models of rheumatoid arthritis. *J Musc Neuron Interact*. 2001;1(4):377–85. PMID: 15758488
153. Zhou J., An H., Xu H., Liu S., Cao X. Heat shock up-regulates expression of Toll-like receptor-2 and Toll-like receptor-4 in human monocytes via p38 kinase signal pathway. *Immunology*. 2005; 114(4):522–30. PMC1782119.
154. McInnes IB, Schett G. Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2017;389:2328-37. DOI: [10.1016/S0140-6736\(17\)31472-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31472-1)
155. Abbasi M, Mousavi MJ, Jamalzehi S, Alimohammadi R, Bezvan MH, Mohammadi H, Aslani S. Strategies toward rheumatoid arthritis therapy; the old and the new. *J Cell Physiol*. 2019;234(7):10018-31. DOI: [10.1002/jcp.27860](https://doi.org/10.1002/jcp.27860)
156. Yokoyama Y, Iwasaki T, Kitano S, Satake A, Nomura S, Furukawa T, Matsui K, Sano H. IL-2-Anti-IL-2 Mono-clonal antibody immune complexes inhibit collagen induced arthritis by augmenting regulatory T cell functions. *J Immunol*. 2018; 201:1899–1906. DOI: [10.4049/jimmunol.1701502](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701502)
157. Xia C-Q, Peng R, Beato F, Clare-Salzler MJ. Dexamethasone induces IL-10-producing monocyte-derived dendritic cells with durable immaturity. *Scand J Immunol*. 2005;62:5–54. DOI: [10.1111/j.1365-3083.2005.01640.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2005.01640.x)
158. Hontelez S, Karthaus N, Looman MW, Ansems M, Adema GJ. DC-SCRIPT regulates glucocorticoid receptor function and expression of its target GILZ in dendritic cells. *J Immunol*. 2013 Apr 1;190(7):3172-9. DOI: [10.4049/jimmunol.1201776](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201776)

159. Donaldson LF, Seckl JR, McQuenn DS. A discrete adjuvant-induced monoarthritis in the rat: effects of adjuvant dose. *J Neurosci Methods*. 1993;49(1-2):5-10. DOI: [10.1016/0165-0270\(93\)90103-x](https://doi.org/10.1016/0165-0270(93)90103-x)
160. Schurgers E, Billiau A, Matthys P. Collagen-induced arthritis as an animal model for rheumatoid arthritis: focus on interferon-gamma. *J Interferon Cytokine Res*. 2011;(12):917-26. DOI: [10.1089/jir.2011.0056](https://doi.org/10.1089/jir.2011.0056)
161. Goltsev AM, Lutsenko OD, Yampolska KYe, Gaevska YuO, Bondarovych MO, Ostankova LV et al. Correction of Cytokine Profile in Autoimmune Diseases with Cryopreserved Embryofetoplacental Complex Products. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2022;32(2):121-33. DOI: [10.15407/cryo32.02.121](https://doi.org/10.15407/cryo32.02.121)
162. Markovics A, Rosenthal KS, Mikecz K, Carambula RE, Ciemielewski JC, Zimmerman DH. Restoring the Balance between Pro-Inflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines in the Treatment of Rheumatoid Arthritis: New Insights from Animal Models. *Biomedicines*. 2021;10(1):44. DOI: [10.3390/biomedicines10010044](https://doi.org/10.3390/biomedicines10010044)
163. Alunno A, Carubbi F, Giacomelli R, Gerli R. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: new players and therapeutic targets BMC. *Rheumatol*. 2017;1:3. DOI: [10.1186/s41927-017-0001-8](https://doi.org/10.1186/s41927-017-0001-8)
164. Yoshida Yu, Tanaka T. Interleukin 6 and Rheumatoid Arthritis. *Biomed Res Int*. 2014;2014:698313. DOI: [10.1155/2014/698313](https://doi.org/10.1155/2014/698313)
165. Somaiya M, Shagufta M, Sumayya S, Qayyum K.A. Level of inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis patients: Correlation with 25-hydroxy vitamin D and reactive oxygen species. *PLoS One*. 2017;12(6):e0178879. DOI: [10.1371/journal.pone.0178879](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178879)
166. Lee SH, Kwon JY, Kim S-Y, Jung KA, Cho M-L. Interferon-gamma regulates inflammatory cell death by targeting necroptosis in experimental autoimmune arthritis. *Sci Rep*. 2017;7(1):10133. DOI: [10.1038/s41598-017-09767-0](https://doi.org/10.1038/s41598-017-09767-0)

167. Yang Yi, He Xiao, Zhao R, Guo W, Zhu M, Xing W et al. Serum IFN- γ levels predict the therapeutic effect of mesenchymal stem cell transplantation in active rheumatoid arthritis. *J Transl Med*. 2018;16:165.
DOI: [10.1186/s12967-018-1541-4](https://doi.org/10.1186/s12967-018-1541-4)
- .
- .

ДОДАТОК А

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації

Статті у фахових журналах, внесених у міжнародну базу Scopus i WOS

1. Goltsev AM, Yampolska KYe, **Kisielova HG**, Ostankov MV, Dubrava TG, Babenko NM, et al. Cryopreservation as Biotechnological Application of Dendritic Cells in Clinical Practice. Probl Cryobiol Cryomed. 2021;31(4):289–303. DOI:[10.15407/cryo31.04.289](https://doi.org/10.15407/cryo31.04.289).
2. **Kysielova H**, Yampolska K, Dubrava T, Lutsenko O, Bondarovich M, Babenko N, et al. Improvement of bone marrow mononuclear cells cryopreservation methods to increase the efficiency of dendritic cell production. Cryobiology. 2022;106:122-30. DOI: [10.1016/j.cryobiol.2022.02.004](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2022.02.004).
3. A.M. Goltsev, **Н.Н. Kisielova**. Justification of therapeutic efficacy of dendritic cells derived from cryopreserved precursors in an adjuvant arthritis model. World of Medicine and Biology. 2023; 2(84):197–202. DOI: [10.26724/2079-8334-2023-2-84-197-202](https://doi.org/10.26724/2079-8334-2023-2-84-197-202).
4. Kisielova HG, Dubrava TG, Goltsev AM, Heat Shock Proteins as Key Triggers to Form Cryopreserved Progenitors-Derived Tolerogenic Dendritic Cells. Probl Cryobiol Cryomed. 2023; 33(2):144–149. DOI: [10.15407/cryo33.02.0](https://doi.org/10.15407/cryo33.02.0).
5. **Г.Г. Кісєльова**, Т.Г Дубрава, А.М. Гольцев. Порушений цитокіновий профіль при ад'ювантному артриті – терапевтична мішень для дендритних клітин, що отримані з кріоконсервованих попередників. Innov Biosyst Bioeng. 2023;7(3):32–43. DOI: [10.20535/ibb.2023.7.3.285432](https://doi.org/10.20535/ibb.2023.7.3.285432).

Глава в монографії за матеріалами дисертації

6. Гольцев А.М., Дубрава Т.Г., Останков М.В., Ямпольська К.Є., **Кісєльова Г.Г.**, Бабенко Н.М., Гаєвська Ю.О., Бондарович М.О., Луценко О.Д. Умови кріоконсервування визначають толерогенні властивості дендритних клітин для

застосування їх в імунотерапії. В: Петренко О.Ю., редактор. Холод в біології та медицині: сучасний стан і перспективи. Київ: Наукова думка, 2023. С.204-212.

Корисна модель за матеріалами дисертації

7. Гольцев АМ, Останков МВ, Ямпольська КЄ, Дубрава ТГ, **Кісєльова ГГ**. Спосіб кріоконсервування моноклеарів кісткового мозку. Пат. України на корисну модель UA 149361, МПК A01N 1/02 (2006.01), G01N 1/42 (2006.01). Заявл. 08.06.2021 № и 202103139;. Заявник та патентовласник ІПКіК НАН України. опубл. 10.11.2021, Бюл. № 45.
<https://base.uipv.org/searchINV/search.php?action=viewdetails&IdClaim=278973>

Наукові праці які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

8. Гольцев АМ, Дубрава ТГ, Ямпольська КЄ, Останков МВ, Бабенко НМ, Гаєвська ЮО, Бондарович МО, **Кісєльова ГГ**. Кріоконсервування моноклеарів кісткового мозку з метою одержання *ex vivo* дендритних клітин для терапії аутоімунних захворювань. / Тези VIII Національного конгреса з патофізіології. Одеса, Україна, 13-15 травня 2020 р. – С.57.

9. Гольцев АМ, **Кісєльова ГГ**, Дубрава ТГ, Ямпольська КЄ. Особливості впливу кріоконсервування на структурні й функціональні характеристики моноклеарів кісткового мозку з метою одержання з них *ex vivo* дендритних клітин. / Тези Конф. мол. вчених. Харків, Україна, 19 травня 2020 р. Problems of Cryobiology and Cryomedicine 30 (3), 289.

10. Goltsev AM, Yampolska KYe, Dubrava TG, Ostankov MV, Babenko NM, Gaevska YuO, Bondarovich MO, **Kyselyova GG**. Implementation of tolerogenic potential of dendritic cells *ex vivo* obtained from cryopreserved bone marrow mononuclear cells. CRYO 2020 the 57th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, Chicago, USA P.10. 21-23 July 2020, Cryobiology. – 2020. December 2020, Vol. 97. – P.288.

11. Гольцев АМ, **Кісєльова ГГ**, Ямпольська КЄ, Дубрава ТГ, Луценко ОД. Дослідження клініко-діагностичних показників тварин з ад'ювантним артритом. Матеріали науково-практичної міжнародної дистанційної конференції «Сучасні досягнення та перспективи клінічної лабораторної

медицини у діагностиці хвороб людини та тварин», Харків, 17 березня 2021 р., Т.2. – С.57-59.

12. **Кісєльова ГГ**, Гольцев АМ, Дубрава ТГ, Ямпольська КЄ, Бабенко НМ, Гаєвська ЮО, Бондарович МО. Толерогенні дендритні клітини в імунотерапії ревматоїдного артриту. Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції Перші читання, присвячені Д.О.Альперну: «Актуальні питання патологічної фізіології» (до 150-річчя кафедри загальної та клінічної патофізіології імені Д.О.Альперна), 26 березня 2021, Харків, Україна С. 63.

13. Гольцев АМ, **Кісєльова ГГ**, Дубрава ТГ, Ямпольська КЄ, Останков МВ, Луценко ОД, Бабенко НМ, Гаєвська ЮО, Бондарович МО. Відновлення цитокінового профілю у тварин з ад'ювантним артритом після застосування дендритних клітин. Збірник матеріалів VIII Національного конгресу патофізіологів України з міжнародною участю «Патологічна фізіологія – охороні здоров'я України» присвяченого 120-річчю Одеської патологічної школи, 6-8 жовтня 2021, Одеса, Україна. С.23.

14. Goltsev A, **Kysielova H**, Dubrava T, Lutsenko O, Ostankov M. The role of cryopreservation in the activation of tolerogenic activity of dendritic cells. Abstracts in person and virtual meeting of the Society for Cryobiology and the Society for Low Temperature Biology, July 19-22, 2022, Dublin, Ireland. // Cryobiology, 2022, Volume 109, P.64. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2022.11.206>.

15. **Кісєльова ГГ**, Дубрава ТГ, Ямпольська КЄ, Бабенко НМ, Гаєвська ЮО, Бондарович МО, Останков МВ, Гольцев АМ. Роль білків теплового шоку у реалізації толерогенної активності дендритних клітин після кріоконсервування / Збірник тез Міжнародної наукової конф. студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» м.Львів, 6-7 жовтня 2022 р., С.123-124.

16. Гольцев АМ, Дубрава ТГ, Луценко ОД, Ямпольська КЄ, **Кісєльова ГГ**, Бабенко НМ, Гаєвська ЮО, Бондарович МО, Останков МВ. Імунотерапія аутоімунних захворювань толерогенними дендритними клітинами, отриманими з кріоконсервованих попередників кісткового мозку / Збірник тез V науково-практичної internet-конференції з міжнародною участю «Механізми розвитку

патологічних процесів і хвороб та їх фармакологічна корекція». 2022, 17 листопада, м. Харків. С.111-113.

17. Goltsev AM, Dubrava TG, **Kysielova HH**, Lutsenko OD, Ostankov MV, Bondarovich MO, Gaevska YO, Babenko NM. The role of hsp70 in the regulation of the tolerogenic potential of dendritic cells derived from cryopreserved progenitors of bone marrow origin. Abstract book of the 60th Annual Meeting of the Society for Cryobiology «CRYO2023». July 25-27th, 2023, Minneapolis USA. P.112.

18. Гольцев АМ, Дубрава ТГ, **Кісельова ГГ**, Луценко ОД, Останков МВ, Бабенко НМ, Гаєвська ЮО, Бондарович МО. Можливі механізми активації толерогенного потенціалу дендритних клітин під впливом кріоконсервування / Збірник тез III Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології», 2023, 24 березня, м. Харків. С.143-144.

ДОДАТОК Б

Відомості про апробацію результатів дисертації

Результати роботи були представлені на наступних наукових конференціях:

- VIII Національному конгресі з патофізіології. (Одеса, 2020);
- Конференції молодих вчених «Холод в біології і медицині» (Харків, 2020);
- «CRYO 2020» the 57th Annual Meeting of the Society for Cryobiology (Chicago, USA, 2020);
- Науково-практичної міжнародної дистанційної конференції «Сучасні досягнення та перспективи клінічної лабораторної медицини у діагностиці хвороб людини та тварин» (Харків, 2021);
- Всеукраїнської науково-практичної конференції Перші читання, присвячені Д.О.Альперну: «Актуальні питання патологічної фізіології» (до 150-річчя кафедри загальної та клінічної патофізіології імені Д.О.Альперна) (Харків, 2021);
- VIII Національному конгресі патофізіологів України з міжнародною участю «Патологічна фізіологія – охороні здоров'я України» присвяченого 120-річчю Одеської патологічної школи (Одеса, 2021);
- Virtual meeting of the Society for Cryobiology and the Society for Low Temperature Biology (Dublin, Ireland, 2022);
- Міжнародної наукової конференції. студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2022);
- V науково-практичної internet-конференції з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їх фармакологічна корекція» (Харків, 2022);
- «CRYO2023» the 60th Annual Meeting of the Society for Cryobiology (Minneapolis, USA, 2023);

– III Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології» (Харків, 2023).