

УДК 576.3:612.017.1]:616.72-002.77-085

Обґрунтування адоптивного застосування толерогенних дендритних клітин в терапії ревматоїдного артриту у мишей



Гольцев А. М., Дубрава Т. Г., Ямпольська К. Є., Луценко О. Д., Гаєвська Ю. О., Бабенко Н. М., Бондарович М. О.

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України, Харків, Україна

e-mail: yampi@ukr.net

РЕЗЮМЕ

Толерогенні властивості дендритних клітин становлять особливий інтерес у світлі пошуку нових підходів до корекції Т-регуляторної ланки імунітету при лікуванні аутоімунних захворювань.

МЕТА ДОСЛІДЖЕННЯ. Встановити вплив толерогенних дендритних клітин на стан Т-регуляторної ланки імунітету у мишей з ад'ювантним артритом на різних етапах його розвитку.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ. Ад'ювантний артрит (АА) індукували у мишей СВА/Н субплантарним введенням повного ад'юванта Фрейнда. Дендритні клітини отримували *ex vivo* з моноклеарів кісткового мозку. На 7-у, 14-у або 21-у добу розвитку ад'ювантного артриту тваринам вводили толерогенні дендритні клітини та оцінювали індекс артриту і стан Т-регуляторної ланки імунітету ($CD4^+CD25^+$ та $FOXP3^+$ клітини).

РЕЗУЛЬТАТИ. Продемонстровано дисфункцію Т-регуляторної ланки імунітету й клініко-діагностичних показників у тварин на різних етапах розвитку ад'ювантного артриту. Показано, що на 14-у і 21-у добу розвитку ад'ювантного артриту імунотерапія у вигляді отриманих *ex vivo* дендритних клітин сприяла підвищенню вмісту $CD4^+CD25^+$ та $FOXP3^+$ клітин в селезінці і нормалізації клініко-діагностичних показників у тварин. У гострому періоді розвитку артриту (7-а доба) адоптивна терапія толерогенними дендритними клітинами виявилася неефективною.

ВИСНОВКИ. Адоптивне застосування толерогенних дендритних клітин сприяло зниженню клінічної маніфестації змодельованого артриту. Найбільшу терапевтичну ефективність проявляли дендритні клітини введені на 14-у добу розвитку патології, що сприяло нормалізації клінічного статусу реципієнтів з ад'ювантним артритом.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: ад'ювантний артрит; адоптивна імунотерапія; толерогенні дендритні клітини; Т-регуляторні клітини

Важливою складовою патогенезу ревматоїдного артриту (РА) є дисрегуляція функції імунної системи, що індукує порушення толерантності до власних антигенів і розвиток аутоімунних реакцій. Відомо, що значима роль у пригніченні аутоімунної відповіді належить регуляторним Т клітинам (Трег), рівень супресорної активності яких у значній мірі визначається експресією гена транскрипційного фактора forkhead box protein 3 (Foxp3), необхідного для нормального функціонування й розвитку Трег [1]. Foxp3 діє як репресор транскрипції прозапальних цитокінів, виступаючи антагоністом функції NFAT (nuclear factor of activated T-cells), який є центральною ланкою у формуванні імунної відповіді при запаленні [2]. У хворих на РА спостерігається зниження кількості супресорних клітин і експресії гена Foxp3 в них [3, 4]. Одним з механізмів цього процесу може бути порушення балансу про-

і протизапальних цитокінів. Так, наприклад, відомо, що при РА спостерігається підвищення вмісту в плазмі крові прозапальних: TNF α , IL-6, IL-1 β , IL17 і зниження протизапальних цитокінів: IL10, IL4 [5, 6]. На цій підставі є думка, що зниження рівня прозапальних цитокінів може сприяти відновленню супресорної функції Трег.

На сьогоднішній день найпоширенішим методом лікування РА є імуносупресивна терапія, яка дозволяє суттєво зменшити ступінь прояву симптомів хвороби, однак має тяжкі побічні ефекти, зокрема загальне зниження резистентності до інфекцій, пригнічення протипухлинного імунітету, мутагенний і цитотоксичний вплив на клітини. До важливих факторів, що лімітують можливості імуносупресивної терапії РА, відносять розвиток резистентності до раніше ефективних препаратів, що нерідко виникає в процесі їх тривалого застосування

[7, 8]. Таким чином, існує необхідність пошуку альтернативних методів лікування РА. Одним з перспективних терапевтичних підходів є застосування аутологічних толерогенних дендритних клітин (толДК) [9, 10, 11, 12]. Дендритні клітини представляють унікальну популяцію антигенпрезентуючих клітин, які здатні як стимулювати, так і інгібувати імунну відповідь. Толерогенні ДК, на відміну від імуногенних, характеризуються низьким рівнем експресії ко-стимуляторних молекул, високим – імунорегуляторних цитокінів і здатністю викликати Т клітинну анергію й апоптоз [11, 12]. Новий підхід до лікування РА, насамперед, спрямований на формування толерантності до артритних аутоантигенів. Однак залишається невирішеним питання щодо впливу толДК на природні антиген-специфічні Трег клітини, які відіграють ключову роль у контролі толерантності до власних антигенів через пригнічення аутореактивних Т лімфоцитів. Також немає даних щодо ефективності терапії толДК в залежності від строку їх введення при розвитку патології.

МЕТА ДОСЛІДЖЕННЯ. Вивчити вплив толДК на стан Т-регуляторної ланки імунітету у мишей з ад'ювантним артритом (АА) на різних етапах його розвитку.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Експерименти виконували на самках мишей лінії СВА/Н віком 2,5-3 місяці. Дослідження проводили відповідно до «Загальних принципів експериментів на тваринах», схвалених V Національним конгресом по біоетиці (Київ, 2013) і погоджених з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовують для експериментальних і інших наукових цілей» (Страсбург, 1986). Тварин виводили з експерименту під ефірним наркозом шляхом цервікальної дислокації.

Виділення клітин кісткового мозку у мишей. Кістковий мозок вимивали зі стегнових кісток мишей ($n = 10$) робочим середовищем RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Великобританія) з додаванням 3 % ембріональної телячої сироватки (БиоЛот, Росія) і 2 % цитрату натрію (Sigma-Aldrich, США). Суспензію клітин кісткового мозку пропускали через нейлоновий фільтр з діаметром пор 100 мкм (Falcon, США), центрифугували при 300 хг протягом 10 хв і ресуспендували у робочому середовищі.

Виділення мононуклеарів кісткового мозку. Мононуклеарні клітини (МНК) виділяли за допомогою центрифугування суспензії кісткового мозку в градієнті щільності Тразографа 1,077 г/см³ (Юнік Фармасьютікал Лабораторіз, Індія) [12].

Отримання толерогенних дендритних клітин. МНК культивували в пластикових чашках Петрі з діаметром 35 мм у середовищі RPMI-1640 з додаванням 10 % ембріональної телячої сироватки і 1 %-го розчину антибіотиків (100 од/мл пеніциліну, 0,1 мг/мл стрептоміцину), у концентрації $3\text{--}5 \cdot 10^6$ клітин/мл або $9 \cdot 10^6$ /чашку. Клітини культивували при 37 °C у атмосфері з 5 % CO₂. На 0 добу у культуральне середовище додавали мишачий рекомбінантний гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор – ГМ-КСФ (Sigma-Aldrich, Великобританія) 20 нг/мл, IL-4 (Sigma-Aldrich, Великобританія) 5 нг/мл [13] та дексаметозон (Dex) 0,4 мкг/мл (Sigma-Aldrich, Великобританія) [14]. Через 3 доби додавали свіжу порцію культурального середовища з факторами і Dex. На 6-7-у добу збирали неадгезовані й слабо адгезовані клітини для подальшого цитофлуориметричного аналізу та введення тваринам з ад'ювантним артритом (АА). На 6-7-у добу культивування відносний вміст толДК становив 90 % від посаджених на чашку клітин або $8 \cdot 10^6$ клітин/чашку.

Індукція ад'ювантного артриту. Ад'ювантний артрит (АА) індукували у мишей СВА/Н ($n = 15$) субплантарним введенням повного ад'юванта Фрейнда (Santa Cruz, США) у дозі 0, 2 мл/мишу. Розвиток АА оцінювали за допомогою індексу артриту (ІА), який є відношенням окружності дослідного суглоба до окружності контрольного. У здорових тварин ($n = 5$), яким вводили фізіологічний розчин у тій

же дозі, що й повний ад'ювант Фрейнда, ІА було прийнято за одиницю. Введення фізіологічного розчину не викликало місцевої запальної реакції.

Визначення запальних медіаторів при АА. Вміст серомукоїдів в сироватці крові тварин з АА визначали турбодиметричним методом за допомогою набору реактивів (Філісіт-Діагностика, Україна) відповідно до інструкції виробника й оцінювали в одиницях помутніння (S-H) по Shank i Hoagland. Вміст сілових кислот визначали за методом Гессе [15].

Введення толерогенних ДК тваринам з АА. Сингенні, вирощені *ex vivo* ДК у дозі $5 \cdot 10^5$ кл/мишу [Yang J., 2013] в 0,2 мл робочого середовища вводили внутрішньовенно на 7-у ($n = 5$), 14-у ($n = 5$) або 21-у ($n = 5$) добу розвитку АА. У кожному випадку через 7 діб після введення ДК, відповідно на 14-у, 21-у і 28-у добу, визначали вміст Трег у селезінках і ІА тварин усіх дослідних груп. Було проведено п'ять експериментів, у кожній групі кількість тварин дорівнювала п'яти. Контролем слугували тварини ($n = 5$), яким вводили мононуклеарні клітини кісткового мозку у такій же концентрації, що і толДК ($5 \cdot 10^5$ кл/мишу). Групою порівняння були тварини ($n = 5$), яким внутрішньовенно вводили дексаметазон – Декс (КРКА, Словенія) 0,022 мг/мишу в 0,2 мл 0,9 % розчину NaCl [16].

Цитофлуориметричний аналіз клітин. Для оцінки на проточному цитофлуориметрі FACS Calibur (Becton Dickinson, США) приналежності ДК, що були вирощені *ex vivo*, до толерогенних були використані моноклональні антимишачі антитіла: CD14-FITC, CD11b-FITC, CD83-FITC, CD80-FITC і CD86-FITC (BD Biosciences, США), згідно з інструкцією виробника. Вміст Трег в селезінці тварин на різних етапах розвитку АА та після введення толДК оцінювали за допомогою моноклональних антимишачих антитіл: CD4-FITC, CD25-PE, FOXP3-PE (BD Biosciences, США), згідно з інструкцією виробника. Ізотип-відповідні антитіла (BD Biosciences, США) були використані як негативний контроль. Статистичний аналіз даних, отриманих при цитофлуориметрії, здійснювали за допомогою програми WinMDi 2.8 (Scripps Institute, США).

Статистична обробка даних проводилася з використанням пакету програм SPSS Statistics 17.0 (IBM, 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 $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Як відомо, найбільш маніфестною ознакою початку розвитку АА у гризунів є набряк ураженого, тобто регіонального до місця введення повного ад'юванта Фрейнда суглоба, що визначалось у мишей дослідної групи (рис. 1).

Згідно з літературними джерелами [17, 18, 19], набряк суглобів у період з 4-ї по 9-у добу після індукції АА є наслідком інтраартикулярних змін синовіальної оболонки з наступним розвитком грануляційної тканини, що характеризується як гостра стадія патології. Максимального значення у тварин ІА набував на 14-у добу розвитку АА ($1,802 \pm 0,058$)

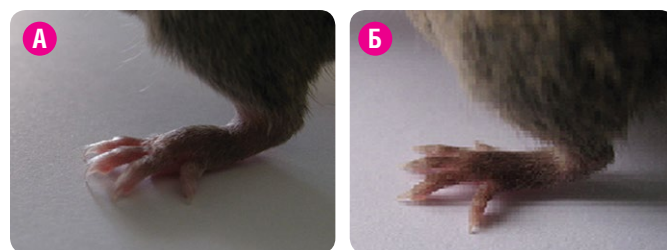
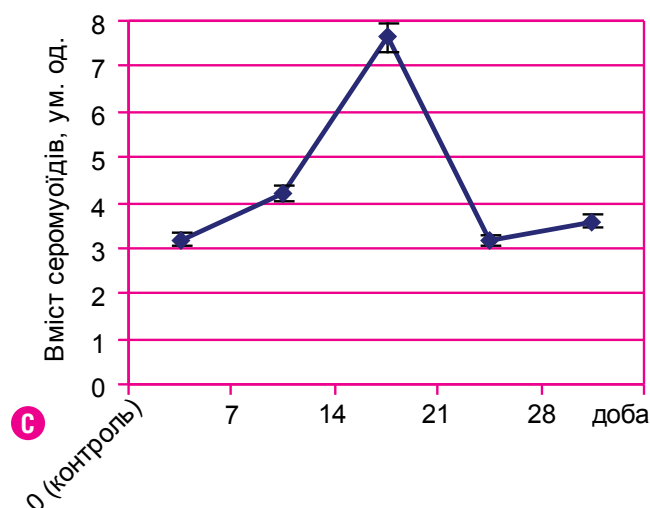
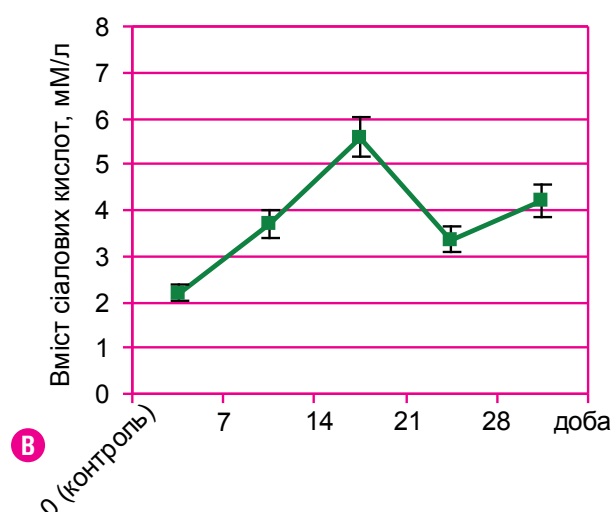
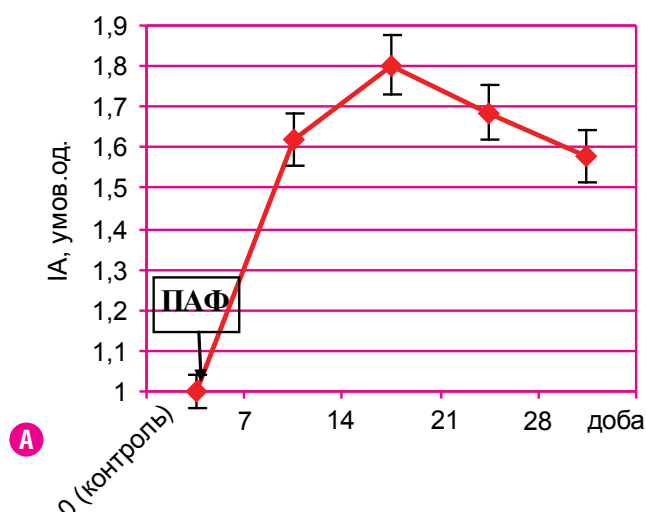


Рис. 1. Зображення місцевої запальної реакції у вигляді набряку дистального відділу плесна задньої лапи миші з ад'ювантним артритом (А) в порівнянні з контролем (Б).



(рис. 2 А). Період з 10-ї по 20-у добу розвитку АА відповідає найбільш інтенсивному розростанню сполучної тканини, що може обумовлювати більш виражений набряк суглобів й характеризується як фаза клінічної маніфестації захворювання. Далі спостерігається хронізація запального процесу при збереженні високого рівня ІА протягом усього строку спостереження (до 28-ї доби).

Відомо, що РА супроводжується деструкцією сполучної тканини, до складу основної речовини якої входять глікопротеїни, рівень яких визначають за вмістом сіалових кислот й серомукоїдів. У зв'язку із цим не викликає сумніву доцільність визначення маркерів запального процесу сіалових кислот й серомукоїдів при оцінці тяжкості патологічного процесу, моніторингу його перебігу, контролю над ефективністю лікування [20, 21].

Так, після індукції АА у тварин спостерігалось збільшення вмісту серомукоїдів і сіалових кислот у сироватці крові, показники яких досягали піка до 14-ї доби розвитку патології, що узгоджується з максимальним показником ІА (рис. 2 А, В, С). У період хронізації запального процесу ці показники знижувалися, однак і до 28-ї доби залишалися вище рівня контрольних значень.

Однією з причин порушення толерантності при РА може бути зниження вмісту Трег або їх функціональні дефекти. Більшість дослідників спостерігали зменшення відносної кількості циркулюючих Трег [22, 23, 24], в деяких роботах виявлено їх збільшення [25] або відсутність відмінностей в порівнянні зі здоровими пацієнтами [26]. У наших дослідженнях було продемонстровано зниження кількості Трег у різний термін розвитку АА (рис. 3).

В експериментальних моделях на мишах показано, що дефіцит Трег, а саме $CD4^+CD25^+$ клітин, хоча й не є головним фактором патогенезу розвитку артриту, але грає важливу роль в підтримці аутоімунного процесу [27]. Знижена активність Трег при аутоімунних захворюваннях може бути наслідком неадекватної експресії клітинних поверхневих молекул, залучених в механізм контактзалежної супресії, таких як $CTLA-4$, $CD39$, $CD223$, FAS -ліганд ($CD95$), гранзім А, а також втрата здатності секретувати розчинні фактори TGF , $IL-10$, $IL-35$. Вплив на механізми імуносупресії визначають, насамперед, генетичні чинники. Має значення також локальне розташування імункомпетентних клітин, участь антигенпрезентуючих клітин і цитокінів (таких як $TNF-\alpha$), які можуть впливати на функцію Трег [5]. Частіше з популяцією Трег клітин пов'язують експресію найбільш специфічного маркера – транскрипційного фактора $FOXP3$, який забезпечує диференціювання та супресорну функцію $FOXP3^+$ Трег.

Зважаючи на це, було доцільно у клітинах селезінки тварин з АА поряд з кількістю $CD4^+CD25^+$ клітин визначати також вміст $FOXP3^+$ клітин по наявності внутрішньоклітинного білка скурфіну, що визначає їх супресорну функцію. Відомо, що до $FOXP3^+$ Трег разом з $CD4^+CD25^+$ можна віднести інші клітини з регуляторною активніс-



Рис. 2. Динаміка зміни клінічних показників при АА:

А – індекс артриту (ІА), В – вміст сіалових кислот і С – серомукоїдів в сироватці крові тварин; $n = 5$.

Примітка: FCA – повний ад'ювант Фрейнда (Freund's Complete Adjuvant).

тю, наприклад, $Th3$ та $Tr1$, що продукують протизапальні медіатори $TGF-\beta$, $IL-10$ [28].

Так, нами було встановлено, що показники відносного вмісту $CD4^+CD25^+$ і $FOXP3^+$ клітин не мали достовірних відмінностей у інтактних мишей (контроль). При розвитку АА на 7-у добу вміст $CD4^+CD25^+$ і $FOXP3^+$ клітин знижувався в 1,6 і 1,4 разу щодо контролю (рис. 3), що може сприяти зриву толерантності при розвитку патології. Це узгоджується з даними Fontenot J. і співавт., які відкрили спеціальний генетичний механізм домінантної толерантності, опосередкований білком $FOXP3$, що захищає організм від аутоімунних захворювань і хронічних інфекцій [29]. В нашому випадку саме на цьому фоні імунних порушень найбільш вражаючим було зростання ІА.

На 14-у добу кількість $CD4^+CD25^+$ клітин незначно збільшувалася в порівнянні з 7-ю (залишаючись нижче контрольного показника на 25 %), вміст $FOXP3^+$ клітин при цьому зростав в 1,6 разу. Це може свідчити про наявність $FOXP3$ білка в інших клітинах з регуляторною активністю. Відомо, що гіперекспресія $FOXP3$ -білка може обумовлювати порушення функції Трег і, зокрема, $CD4^+CD25^+$ клітин, що призводить до зниження їх проліферації й продукції протизапальних цитокінів і в деяких випадках – до розвитку важкого імунodefіциту [28].

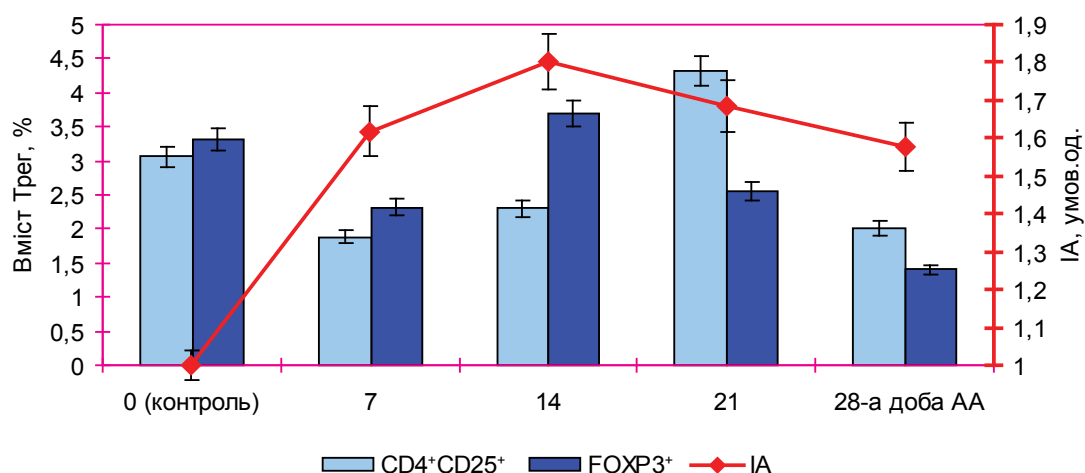


Рис. 3. Вміст Трег в селезінці тварин та індекс артриту в динаміці розвитку AA.

На 21-у добу розвитку патології, навпаки, спостерігалася активна проліферація CD4⁺CD25⁺ клітин при низькому рівні FOXP3⁺ клітин у загальній популяції клітин селезінки, що свідчить про їхню знижену функціональну активність. Така експансія Трег у селезінках тварин з AA в цей період відзначалася й іншими авторами [28, 30], що може бути результатом посилення експресії CD25 у відповідь на збільшення прозапальних цитокінів IL-2, простагландин E2, IFN-γ, які є медіаторами запалення. Є всі підстави припускати, що на стадії активної проліферації CD4⁺CD25⁺ клітин їх функціональна (супресорна) активність знижена, про що свідчить низький рівень вмісту FOXP3-білка високий показник IA – $1,686 \pm 0,073$ (рис. 3).

На 28-у добу AA знижувався вміст як CD4⁺CD25⁺, так і FOXP3⁺ клітин у порівнянні з 21-ю добою розвитку патології. І в цей строк функціональна активність CD4⁺CD25⁺ клітин перебувала на низькому рівні, наслідком чого є високий показник IA ($1,578 \pm 0,099$). Таким чином, на всіх етапах розвитку AA відмічено дисфункцію Т-регуляторної ланки імунітету та порушення клініко-діагностичних показників тварин, що потребує імунокорекції.

Враховуючи здатність толДК перетворювати наївні Т клітини в Трег, що секретують супресивні толерогенні чинники, такі як IL-10, TGF-β, ретиноева кислота і ліганди програмованої смерті [5], нами було досліджено можливість використання незрілих сингенних ДК для індукції Трег в організмі реципієнтів з AA. З цієї метою нами були отримані *in vitro* ДК і підтверджена їх приналежність до толерогенних за відповідними фенотипічними характеристиками.

Аналіз літератури дозволив вибрати низку моноклональних анти-тіл: CD14, CD83, CD11b, CD80, CD86, що є негативними або позитивними маркерами, які характеризують приналежність отриманих ДК до толерогенних [12, 13, 14] (табл. 1).

Диференціація моноцитів в незрілі ДК супроводжувалася втра-тою CD14 антигену, низьким рівнем експресії CD83 маркера і ко-стимуляторних молекул CD80/86, а також високим рівнем маркерної для цих клітин молекули CD11b. Отримані незрілі толДК мали фенотип CD14⁺CD11b⁺ CD83^{low}CD80/86^{low}. Їх відносний вміст на 7-у добу культивування становив 90 % від посаджених на початку культивування.

Оскільки стійкість до дозрівання *in vivo* при аутоімунних захворюваннях, імовірно, є найважливішою особливістю серед усіх інших характерних ознак толДК [31, 32, 33], наступним етапом дослідження була апробація толДК, отриманих у культурі, на моделі AA.

Аналіз стану Т-регуляторної ланки імунітету тварин після проведення адаптивної терапії толДК в залежності від терміну розвитку AA (7, 14 і 21 доба) представлений на рис. 4. При введенні толДК тваринам на 7-у добу розвитку AA (AA-7) (рис. 4 А) спостерігалася збільшення в 1,6 разу вмісту CD4⁺CD25⁺ клітин і в 1,5 разу зниження FOXP3⁺ клітин в порівнянні з нелікованими тваринами (AA-14). Це може свідчити про здатність толДК в цей строк стимулювати проліферацію CD4⁺CD25⁺ клітин при зниженій продукції FOXP3-білка в Трег, що відповідає за їх супресорну функцію. В свою чергу, Декс і МНК, що були використані як групи порівняння, в меншій мірі сприяли нормалізації цих показників. До того ж, судячи з IA, введення толДК в цей строк було неефективним, оскільки показник IA через тиждень (14 доба оцінки ефекту) не відрізнявся від такого у нелікованих тварин. Наші дані співпадають з даними van Duivenvoorde та ін., який також не отримав позитивного ефекту при введенні толДК під час гострої стадії розвитку артриту [34]. Слід зазначити, що введення Декс або МНК тваринам з AA-7 також не викликало зниження IA ($1,736 \pm 0,165$ і $1,730 \pm 0,093$ ум. од. відповідно).

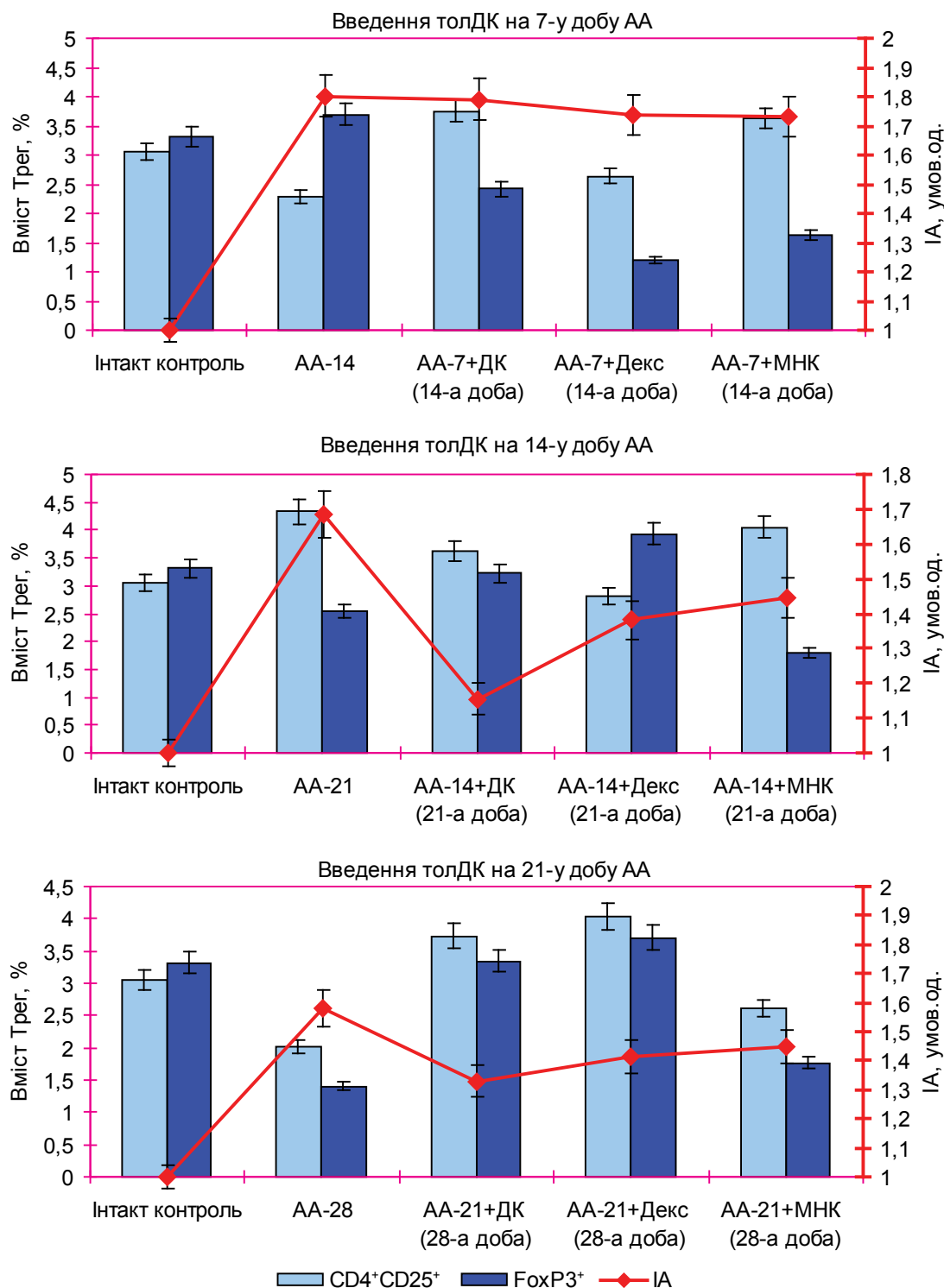
Введення толДК на 14-у добу розвитку артриту (AA-14) вже через тиждень викликало суттєві зміни показників вмісту CD4⁺CD25⁺ та FOXP3⁺ клітин, які суттєво не відрізнялися від показників інтактного контролю (рис. 4 В). Це може свідчити про стимулювання функціональної активності Трег після введення толДК у цей строк. Більше того, тільки у цій групі, у порівнянні з іншими групами, суттєво знижувався показник IA, максимально наближаючись до контрольного ($1,154 \pm 0,109$ і $1,0 \pm 0,01$ ум. од. відповідно).

Введення толДК на 21-у добу розвитку AA (AA-21) в найбільшій мірі, ніж Декс та МНК корегувало показники IA та обох субпопуляцій Трег. В той же час, в меншій мірі, ніж при введенні толДК на 14-у добу, спостерігалось зменшення набряку суглоба (рис. 4 С).

Використання толДК в період клінічної маніфестації патології (14-а, 21-а доба) проявляли більшу коригуючу активність щодо

Таблиця 1. Фенотипічні маркери толерогенних ДК

CD14	глікопротеїновий рецептор, що експресується на моноцитах, макрофагах, клітинах Купфера, лейкоцитах
CD83	молекула суперродини імуноглобулінів, найбільш характерний маркер повністю диференційованих дендритних клітин; відсутній або слабо експресується на толерогенних ДК
CD80/86	мембранні білки суперродини імуноглобулінів, що експресуються на антиген-презентуючих клітинах, а також зрілих ДК і служать ко-стимулюючим сигналом для активації і виживання Т-лімфоцитів
CD11B	інтегрин Mac-1, молекула, що експресується на незрілих толерогенних і відсутня на зрілих імуногенних ДК



А

В

С

Рис. 4. Вміст Трег клітин та ІА до та після введення толДК, Декс, МНК кісткового мозку тваринам з АА. Введення: А – на 7-у добу АА, оцінка на 14-у добу; В – на 14-у добу, оцінка на 21-у добу; С – на 21-у добу, оцінка на 28-у добу; n=5.

Т-регуляторної ланки імунітету, викликаючи зниження ІА, у порівнянні з Декс і МНК.

При використанні Декс ми також спостерігали збільшення вмісту FOXP3⁺ клітин, але вони проявляли меншу супресорну активність, ніж індуковані толерогенними ДК, судячи з показника ІА. Більше того, як зазначено Prado C. і співавт. [35], здатність дексаметазону підсилювати експресію FOXP3-білка в Трег *in vitro* не корелювала з їх регуляторною активністю. Проте в ході проведених нами досліджень була відзначена позитивна динаміка клінічного статусу тварин, а саме ІА, при введенні Декс на 14-у й 21-у добу розвитку АА. Річ в тому, що механізм дії Декс має свої особливості.

По-перше, кортикостероїди є потужними імунодепресантами [36]. Вирішальне значення в імуносупресії приділяється транскрипційному фактору GILZ, який активується під дією глюкокортикоїдів, викликаючи інгібіцію ядерного фактора каппа-В (NFκB), що, в свою чергу, сприяє зменшенню продукції прозапальних цитокінів. Крім того, епігенетична регуляція генів, в першу чергу метилювання ДНК, грає істотну роль в контролі їх функції і бере участь в експресії транскрипційного регулятора Трег – FoxP3 [37]. Механізм, що лежить в основі цього унікального епігенетичного ефекту глюкокортикоїдів, пов'язаний зі зниженням експресії гена ДНК-метилтрансферази, що призводить до суттєвого пригнічення метилювання ДНК [38].

Це викликає порушення транскрипційної активності гену і, як наслідок, може призводити до збільшення продукції FoxP3.

Після введення МНК на 14-у та 21-у добу розвитку АА також знижується ІА, але в меншій мірі, порівняно з Декс і, тим більше, толДК. Відомо, що в складі МНК присутні мезенхімальні стовбурові клітини, які продукують протизапальні медіатори. За рахунок секреції IDO, TGFβ вони здатні індукувати Трег, та за рахунок секреції PGE2 – інгі-

бувати дозрівання ДК [39]. Саме цей факт був відзначений в нашому дослідженні. Введення МНК викликало стимулювання проліферації CD4⁺CD25⁺, але не впливало на вміст FOXP3⁺ Трег, що характерно для толДК. Це підтверджує той факт, що індукція FOXP3⁺ Трег є одним з основних механізмів, за допомогою яких ДК підтримують імунну толерантність [11, 28].

ВИСНОВКИ

Узагальнюючи наведені данні, можна зробити висновок про роль строків введення клітинних препаратів в прояві їх терапевтичного ефекту. Найбільшу терапевтичну ефективність проявляли толДК, введені на 14-у добу розвитку патології – саме в цей термін вони коригували вміст Трег у реципієнтів з АА, що сприяло нормалізації їх клінічного статусу.

Вочевидь, що толДК реалізують свій імунокорегуючий ефект значно раніше, ніж глюкокортикоїди, що характеризується більш пізнім, ніж при введенні толДК, проявом коригуючого ефекту саме дексаметазону.

Робота проведена в рамках цільової програми «Молекулярно-генетичні і біохімічні механізми регуляції клітинних та системних взаємодій за фізіологічних та патологічних станів» за темою «Вивчення молекулярних механізмів толерогенної активності кріоконсервованих дендритних клітин за їх адаптивного застосування».

СПИСОК ЦИТОВАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Chae W. J., Bothwell A. L. M. Therapeutic Potential of Gene Modified Regulatory T Cells: From Bench to Bedside. Front Immunol. 2018. **9**. P. 303. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00303. eCollection 2018.
2. Dastrange M., Oukka M., Bettelli E. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-κB to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. PNAS. 2005. **102**, № 14. P. 5138-5143.
3. Han G. M., O'Neil-Anderson N. J., Zurier R. B., et al. CD4⁺CD25⁺ high T cell numbers are enriched in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. Cell Immunol. 2018. **253**. P. 92-101.
4. Endharti A., Okuno Y., Shi Z., et al. CD8⁺CD122⁺ regulatory T cells (Tregs) and CD4⁺ Tregs cooperatively prevent and cure CD4⁺ cell-induced colitis. J Immunol. 2011. **186**, № 1. P. 41-52.
5. Быковская С. Н., Карасев А. В., Лохонина А. В., и др. Анализ Т-регуляторных клеток CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ при аутоиммунных заболеваниях. Молекулярная медицина. 2013. № 3. С. 20-28.
6. Малышева И. Е., Топчиева Л. В., Курбатова И. В. и др. Экспрессия гена FOXP3 и профиль цитокинов у больных ревматоидным артритом при лечении метотрексатом. Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2015. № 2. С. 6-10.
7. Насонов Е. Л. Фармакотерапия ревматоидного артрита: российские и международные рекомендации. Клиническая фармакология и терапия. 2016. **1**, № 25. С. 67-76.
8. Corsiero E., Marrelli A. An update on research advances in rheumatoid arthritis: from clinic to basic science. J Lab Precis Med. 2018. **54**, № 3. P. 1-9.
9. Hilkens C. M. U., Isaacs J. D., Thomson A. W. Development of dendritic cell-based immunotherapy for autoimmunity. Int Rev Immunol. 2010. **29**. P. 156-183.
10. Yang J., Yang Y., Ren Y., et al. A Mouse model of adoptive immunotherapeutic targeting of autoimmune arthritis using allo-tolerogenic dendritic cells. PLoS ONE. 2013. **8**, № 10. P. 77729.
11. Сенников С. В., Куликова Е. В., Кнауэр Н. Ю., и др. Молекулярно-клеточные механизмы, опосредуемые дендритными клетками, участвующие в индукции толерантности. Медицинская иммунология. 2017. **19**, № 4. С. 359-374.
12. Гольцев А. М., Дубрава Т. Г., Ямпольська К. Є., и др. Оптимізація методу одержання незрілих дендритних клітин для терапевтичного застосування. Фізіологічний журнал. 2018. **64**, № 5. С. 33-40.
13. Нехаева Т. Л. Оптимизация технологии и стандартизация получения противоопухолевых вакцин на основе аутологических дендритных клеток: дис. ...канд. мед. наук / ФГБУ «НИИ онкологии им. Н. Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург, 2014.
14. Цатуров М. Э., Талаев В. Ю., Матвейчев А. В., и др. Толерогенные дендритные клетки – созревание и функции в экспериментах *in vitro*. Медицинский альманах. 2010. **2**, № 11. С. 263-266.
15. Камышников С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике 2000. **2**. С. 64-66.
16. Oxenkrug G. F., McIntyre I. M., Stanley M., et al. Dexamethasone suppression test: experimental model in rats, and effect of age. Biol Psychiatry. 1984. **19**. P. 413-416.
17. Саратиков А. С., Венгеровский А. И., Прищеп Т. П. Адьювантная болезнь (морфология, патогенез, экспериментальная терапия). Томск: Изд-во Томск. ун-та, 1983. 101 с.
18. Donaldson L. F., Seckl J. R., McQuenn D. S. A discrete adjuvant-induced monoarthritis in the rat: effects of adjuvant dose. Journal of Neuroscience Methods. 1993. **49**. P. 5-10.
19. Chillingworth N. L., Donaldson L. F. Characterization of Freund's complete adjuvant-induced model of chronic arthritis in mice. J Neurosci Methods. 2003. **128**. P. 45-52.
20. Ямпольская Е. Е., Кравченко М. А., Дубрава Т. Г., и др. Регуляция иммунновоспалительного процесса у животных с адьювантным артритом кріоконсервованими клітками фетальної печені. Вестник ХНУ. 2012. **15**, № 1008. С. 177-186.
21. Cui Z., Liu R., Wang A., et al. Correlation between sialic acid levels in the synovial fluid and radiographic severity of knee osteoarthritis. Exp Ther Med. 2014. **8**. P. 255-259.

22. Sakaguchi S. Regulatory T cells: history and perspective. *Methods Mol Biol.* 2011. **707**. P. 3-17.
23. Faye A. H., Cooles, John D., Anderson A. E. Treg Cells in Rheumatoid Arthritis: An Update. *Curr Rheumatol Rep.* 2013. **15**, № 352. P. 2-9.
24. Papagoras C., Markatseli T. E., Petsiou A., et al. Co-stimulation modulation improves Rheumatoid Arthritis despite reducing the proportion of CD4⁺CD25^{high} T regulatory cells. *Mediterr J Rheumatol.* 2016. **27**, № 1. P. 15-19.
25. Monte K., Wilson C., Fei Shih F. Increased Number and Function of FoxP3 Regulatory T Cells During Experimental Arthritis. *Arthritis and Rheumatism.* 2008. **58**, № 12. P. 3730-3741.
26. Liu M. F., Wang C. R., Fung L. L., et al. The presence of cytokine-suppressive CD4⁺CD25⁺ T cells in the peripheral blood and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol.* 2005. **62**. P. 312-317.
27. McGeachy M. J., Stephens L. A., Anderton S. M. Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: Contribution of CD4⁺CD25⁺ regulatory cells within the central nervous system. *J Immunol.* 2005. **175**, № 5. P. 3025-3032.
28. Ярилин А. А., Донецкова А. Д. Естественные регуляторные Т-клетки и фактор FOXP3 Иммунология. 2006. № 3. С. 176-188.
29. Fontenot J., Rudensky A. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nature Immunol.* 2005. **6**. P. 331-337.
30. Луценко Е. Д., Гольцев А. Н. Мониторинг состояния пула Т-регуляторных клеток при адьювантном артрите после применения криоконсервированных клеток плаценты. Ліки – людині. сучасні проблеми створення, вивчення і апробації лікарських засобів: Матеріали XXVII науковопрактичної конференції з міжнародною участю. Харків: Вид-во НфаУ, 2010. С. 325-333.
31. Adler H. S., Steinbrink K. Tolerogenic dendritic cells in health and disease: friend and foe! *Eur J Dermatol.* 2007. **17**. P. 476-491.
32. Morelli A. E., Thomson A.W. Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nat Rev Immunol.* 2007. **7**. P. 610-621.
33. 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**. P. 1598.
34. van Duivenvoorde L. M., Han W. G., Bakker A. M., et al. Immunomodulatory dendritic cells inhibit Th1 responses and arthritis via different mechanisms. *J Immunol.* 2007. **179**, № 3. P. 1506-1516.
35. Prado C., Gómez J., López P., et al. Dexamethasone upregulates FOXP3 expression without increasing regulatory activity. *Immunobiology.* 2011. **216**. P. 386-392.
36. Giles A. J., Hutchinson M. N. D., Sonnemann H. M., et al. Dexamethasone-induced immunosuppression: mechanisms and implications for immunotherapy. *J Immunother Cancer.* 2018. **6**, № 1. P. 51.
37. Hoppstädter J., Hachenthal N., Valbuena-Perez J. V., et al. Induction of Glucocorticoid-induced Leucine Zipper (GILZ) Contributes to Anti-inflammatory Effects of the Natural Product Curcumin in Macrophages. *J Biol Chem.* 2016. **291**, № 44. P. 22949-22960.
38. Kennedy A., Schmiudt E. M., Cribbs A. P., et al. A novel upstream enhancer of FOXP3, sensitive to methylation-induced silencing, exhibit dysregulated methylation in rheumatoid arthritis T reg cells. *Eur J Immunol.* 2014. **44**. P. 2668-2678.
39. Cribbs A. P., Kennedy A., Penn H., et al. Methotrexate restores regulatory T cell function through demethylation of the FoxP3 upstream enhancer in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2015. **67**. P. 1182-1192.
40. Figueroa F. E., Carrión F., Villanueva S., et al. Mesenchymal Stem Cell treatment for autoimmune diseases: a critical review. *Biol Res.* 2012. **45**. P. 269-277.



СТАТТЯ НА САЙТІ
TRANSPLANTOLOGY.ORG

Автори заявили про відсутність потенційного конфлікту інтересів щодо дослідження, авторства та/або публікації даної статті.

Надійшла до редакції 26.06.2019 р.

Прийнята до друку 30.09.2019 р.