

На правах рукописи



Фишер Марина Сергеевна

**ИНДУКЦИЯ АНТИГЕН-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ С ПОМОЩЬЮ
ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК, ТРАНСФИЦИРОВАННЫХ ДНК-КОНСТРУКЦИЯМИ, ПРИ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АРТРИТЕ**

3.2.7. Иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени кандидата

медицинских наук

Новосибирск 2025

**Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении
«Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»
(НИИФКИ)**

Научный руководитель:

доктор медицинских наук,
профессор

Сенников Сергей Витальевич

Официальные оппоненты:

Королев Максим Александрович, доктор медицинских наук, руководитель филиала, заведующий лабораторией патологии соединительной ткани, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии - филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (НИИКЭЛ – филиал ФИЦ ИЦиГ СО РАН), г. Новосибирск.

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

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

Защита состоится «19» июня 2025 г. в 14.00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.184.01 (Д 001.001.ХХ) в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» по адресу: 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, д. 14.

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

Автореферат разослан «__» ____ 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

кандидат биологических наук

Облеухова И.А

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Одними из ключевых особенностей аутоиммунных заболеваний (АИЗ) являются утрата толерантности и запуск иммунного ответа против собственных антигенов, что приводит к повреждению клеток и тканей организма [Weyand et al., 2021]. В связи с этим восстановление иммунологической толерантности остается одним из приоритетных направлений клеточной иммунотерапии, направленных на устранение причин заболеваний. На сегодняшний день одобренные методы лечения АИЗ включают в себя постоянный прием иммунодепрессивных препаратов, биологических средств с таргетным действием и синтетических ингибиторов сигнальных путей. Однако использование этих препаратов может вызвать иммуносупрессию, что, в свою очередь, может привести к развитию хронических инфекций или онкологических заболеваний [Lortholary et al., 2020; Huss et al., 2022; Scottà et al., 2016]. Современные методы лечения АИЗ редко приводят к полному излечению или безмедикаментозной ремиссии [Greenberg et al., 2010; Durcan et al., 2019]. В связи с этим разработка новых подходов к терапии АИЗ, которые могут обеспечить стойкую ремиссию и минимизировать побочные эффекты, остается актуальной научной задачей.

Одним из перспективных подходов к восстановлению иммунологической толерантности является применение толерогенных дендритных клеток (толДК). Известно, что толДК способны инициировать и поддерживать как центральную, так и периферическую толерантность [Fucikova et al., 2019]. Применение толДК в ряде клинических исследований оказалось успешным [Machen et al., 2004; Benham et al., 2015; Bell et al., 2017], однако существуют некоторые недостатки, которые необходимо учитывать для улучшения разработки эффективной терапии с помощью толДК. Неспецифические толДК обладают потенциалом подавлять функциональную активность не только аутореактивных Т-клеток, но и Т-клеток с другой специфичностью Т-клеточного рецептора. Это вновь ведет к риску возникновения побочных эффектов: инфекционным и онкологическим заболеваниям, нефро- и гепатотоксичности. При получении антиген-специфических ДК встает проблема выбора антигенов, так как в патогенезе многих АИЗ участвует несколько аутоантигенов, и толерантность только к одному из них, может не привести к ожидаемому клиническому эффекту. Возможно, решением проблемы выбора антигенов для терапии будет одновременное использование в качестве мишени нескольких аутоантигенов, пептидов или трансфекция экзогенной ДНК, кодирующей несколько иммуногенных пептидов. Эффективность использования подхода с применением ДНК-конструкций была приведена в нескольких исследованиях по терапии онкологических заболеваний и трансплантационных реакций [Kurilin et al., 2022; Kulikova et al., 2015; Хантакова, 2016].

Важным аспектом является миграция и накопление толДК в пораженных болезнью органах и/или лимфатических узлах. В целях усиления терапевтического эффекта используются различные пути введения или изменение характеристик толДК через сверхэкспрессию хемокиновых рецепторов [Mansilla et al., 2023]. Также важным фактором является стабильность толерогенных дендритных клеток в области развития аутоиммунного процесса. Поэтому, следует рассмотреть возможности совершенствования протоколов для стабилизации фенотипа и функциональности. Одним из хемокинов, который может одновременно влиять на миграцию и сохранение толерогенного фенотипа ДК, является CCR9. Рецептор хемокина CCR9 представляет собой G-белок-связанный рецептор, который можно обнаружить на различных типах иммунных клеток, включая CD4⁺Т-клетки, дендритные клетки (ДК) и В-клетки [Kulkarni et al., 2017]. CCR9 стимулирует перемещение иммунных клеток по градиенту концентрации своего лиганда CCL25, который экспрессируется эпителиальными клетками кишечника и тимуса [Wurbel et al., 2000]. Известно, что CCR9⁺ДК участвуют в регуляции воспаления, пищевой аллергии, аутоиммунных и трансплантационных реакциях [Uehara et al., 2002]. Взаимодействие CCR9⁺-ДК с лимфоидными и миелоидными клетками в тимусе, во вторичных лимфоидных тканях и участках слизистой оболочки играет важную роль в иммунной регуляции [Pathak et al., 2020]. Существуют данные о том, что повышенная экспрессия CCR9 на ДК приводит к снижению экспрессии МНС

II и CD86 дендритными клетками, что может привести к устойчивому толерогенному фенотипу ДК [Pathak et al., 2020].

В рамках этой научной работы были изучены методы создания новых типов дендритных клеток с использованием ДНК-конструкций, которые кодируют IL-10, CCR9 и эпитопы коллагена II типа. Также была оценена эффективность трансфицированных ДК в индукции толерантности к коллагену при экспериментальном артрите. Использование ДНК-конструкции, которая кодирует CCR9, способствует миграции дендритных клеток в тимус. Это может влиять на формирование центральной толерантности. Также известно, что миелоидные ДК экспрессируют CCR7, который способствует миграции к лимфатическим узлам, где формируются процессы периферической иммунной толерантности. Таким образом, актуальность данной работы подтверждается изучением механизмов формирования иммунной толерантности. Предполагается, что в данном протоколе задействованы механизмы как центральной, так и периферической иммунной толерантности.

Степень разработанности темы исследования

Восстановление иммунологической толерантности посредством использования толДК широко изучалось как в отечественных, так и в зарубежных исследованиях. Значительная часть работ была сосредоточена на неспецифических толДК, которые широко модулируют иммунные ответы, демонстрируя свой потенциал как в доклинических, так и клинических исследованиях.

Кроме того, разработка и применение антиген-специфических толДК тоже исследовались. Этот подход является многообещающим. Несмотря на значительный прогресс в этой области, многие вопросы остаются открытыми. В частности, недостаточно изучены способы нагрузки антигенами ДК и стабильность толерогенного фенотипа ДК в условиях воспаления. Представленная работа была посвящена решению указанных вопросов.

Цель и задачи исследования

Целью данной работы является изучение индукции антиген-специфической толерантности с помощью дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими IL-10, CCR9 и эпитопы коллагена II типа в модели антиген-коллаген индуцированного артрита у мышей.

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

1. Разработать протокол получения дендритных клеток с толерогенным фенотипом, при помощи трансфекции ДНК-конструкциями, кодирующими IL-10, CCR9 и эпитопы коллагена II типа.
2. Изучить влияние толерогенных дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими IL-10, CCR9 и эпитопы коллагена II типа, на содержание регуляторных Т-клеток в совместной культуре со спленоцитами, содержание в кондиционной среде IL-10, и потенциал подавления пролиферативной активности CD4⁺ спленоцитов в условиях *in vitro*.
3. Оценить миграционный потенциал дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкцией, кодирующей CCR9, к клеткам тимуса *in vitro*.
4. Проанализировать влияние толерогенных дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими IL-10, CCR9 и эпитопы коллагена II типа, на течение экспериментального коллаген-индуцированного артрита у мышей *in vivo*.

Научная новизна

Разработан новый протокол получения толДК, с помощью трансфекции ДНК-конструкциями, кодирующими IL-10, CCR9 и эпитопы коллагена II типа. Полученные ДК имеют сниженный уровень экспрессии маркеров зрелости CD80, CD86 и H-2Db (MHC I), а также способны к продукции IL-10, что указывает на их толерогенный фенотип.

Показано, что со-культивирование полученных ДК и спленоцитов, приводит к достоверному увеличению содержания FoxP3⁺Т-регуляторных клеток, стимуляции продукции IL-10 и TGF-β CD4⁺спленоцитами.

Установлено, что совместное культивирование антиген-специфических Т-регуляторных клеток и CD4⁺спленоцитов (полученных от мышей с антиген-коллаген индуцированным

артритом), приводит к достоверному снижению пролиферативной активности в ответ на антиген (коллаген II типа).

Получены новые данные о том, что трансфекция миелоидных ДК генетической конструкцией, кодирующей ген CCR9, приводит к повышению его экспрессии и увеличению миграционной активности миелоидных ДК к клеткам тимуса *in vitro*. Данный феномен является нетипичным для миелоидных ДК.

Впервые показана способность толДК, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими IL-10, CCR9 и эпитопы коллагена II типа, к подавлению активности антиген-коллаген индуцированного артрита (АКИА) у мышей.

Теоретическая и практическая значимость работы

В работе была продемонстрирована потенциальная возможность применения ДК, модифицированных с помощью ДНК-конструкций, для целенаправленного подавления активности аутоиммунных реакций. Этот метод представляет собой новый подход к созданию иммунологической толерантности при АИЗ. Представлены данные о получении антиген-специфических ДК, с использованием ДНК-конструкций, кодирующих IL-10, CCR9 и эпитопы коллагена II типа.

Ценность данной работы заключается в том, что она позволяет сравнить толерогенные свойства антиген-специфических и неспецифических ДК. Результаты показывают, что антиген-специфические ДК эффективно подавляют АКИА у мышей. Полученные антиген-специфические ДК могут стать основой для создания клеточных вакцин для лечения АИЗ.

Материалы, полученные в результате исследования, могут иметь практическую значимость для восстановления иммунологической толерантности к аутоантигенам при аутоиммунных заболеваниях. Активация миграции в тимус ДК, нагруженных антигеном, представляет важный вклад в формирование платформы технологий по индукции иммунологической толерантности при клеточной терапии аутоиммунных заболеваний.

Методология и методы исследования

Исследование выполнено на базе лаборатории молекулярной иммунологии НИИФКИ. В работе применялись методы культивирования клеточных культур, метод трансфекции клеток ДНК-конструкциями, проточная цитофлуориметрия, иммуноферментный анализ, функциональные пролиферативные тесты, витальное окрашивание и оценка миграции клеток, гистологический и серологический методы, визуальную оценку припухлостей лап с помощью штангенциркуля, статистическую обработку данных.

Объектом исследования были выбраны ДК, полученные из клеток костного мозга лабораторных мышей линии BALB/с. Предмет исследования - изучение влияния ДК, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими CCR9, IL-10 и эпитопы коллагена II типа, на индукцию иммунологической толерантности.

ДК трансфицированы ДНК-плазмидами, кодирующими IL-10, CCR9 и эпитопы коллагена II типа посредством метода электропорации. ДК также охарактеризованы по экспрессии маркеров созревания и дифференцировки, посредством проточной цитофлуориметрии. Полученные трансфицированные ДК сокультивированы со спленоцитами для оценки их влияния на пролиферативную активность эффекторных клеток, содержание регуляторных Т-клеток и иммунорегуляторных цитокинов (IL-10, TGF- β) с помощью методов проточной цитофлуориметрии и иммуноферментного анализа. Для оценки антиген-специфичности используемых трансфицированных ДК, проводился пролиферативный тест в совместной культуре со спленоцитами в ответ на коллаген II типа, с последующим анализом с использованием проточной цитофлуориметрии.

Оценка миграции ДК проводилась посредством витальной окраски (CFSE) целевых клеток с последующим со-культивированием с клетками тимуса и лимфоузлов и исследованием миграционного потенциала с помощью прибора In cell. Оценка эффективности влияния полученных антиген-специфических толДК на течение экспериментального артрита у мышей осуществлялась по измерению припухлостей суставов, гистологической оценке суставов и содержанию антител к коллагену II типа в сыворотке лабораторных животных посредством иммуноферментного анализа.

Положения, выносимые на защиту:

1. Дендритные клетки, трансфицированные ДНК-конструкциями, кодирующими IL-10, CCR9 и эпитопы коллагена II типа, обладают толерогенным фенотипом и потенциалом к индукции антиген-специфической толерантности *in vitro*, посредством генерации Т-регуляторных клеток и IL-10, TGF- β CD4⁺ клетками.
2. Дендритные клетки, трансфицированные ДНК-конструкциями, кодирующими IL-10, CCR9 и эпитопы коллагена II типа способны к антиген-специфическому подавлению активности антиген-коллаген индуцированного артрита, снижая припухлость лап экспериментальных животных, уровень антител к коллагену II типа и вызывают регресс патологических гистологических изменений.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Достоверность результатов, полученных в ходе диссертационного исследования, обеспечивается комплексным подходом, включающим использование современных, научно обоснованных методов, полностью соответствующих поставленным целям и задачам работы. Применение сертифицированного и калиброванного оборудования, а также достаточный объем экспериментальной выборки с участием лабораторных животных гарантируют точность и воспроизводимость данных. Все научные положения и выводы подтверждены фактическим материалом, наглядно представленного в виде графиков и рисунков, что позволяет объективно оценить полученные результаты.

Статистическая обработка данных выполнена с применением корректных методов анализа. Проведен детальный анализ экспериментальных данных, включая их сопоставление с актуальными научными публикациями, что подтверждает соответствие результатов современным исследованиям в данной области.

Основные научные положения и выводы диссертационной работы были доложены и обсуждены на: OpenBio-2024 (г. Новосибирск, 2024), XVII Всероссийском научном форуме с международным участием имени академика В.И. Иоффе «ДНИ ИММУНОЛОГИИ В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ» (г. Санкт-Петербург, 2023), OpenBio-2023 (г. Новосибирск, 2023), EULAR 2022 (г. Копенгаген, Дания, 2022), отчетных научно-практических конференциях аспирантов НИИФКИ (г. Новосибирск, 2020-2023).

Публикации по теме исследования

По теме диссертационного исследования опубликовано 7 научных работ, из них 3 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования Российской Федерации для публикаций основных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.2.7. Иммунология, из них 3 статьи в журналах, индексируемых в международных базах данных (Scopus и/или Web of Science).

Личный вклад автора

Автор участвовал в разработке дизайна всех экспериментов. Результаты, представленные в работе, получены автором лично. Выделение и культивирование клеток, оценка пролиферативного ответа, оценка экспрессии маркеров зрелости, продукции цитокинов, миграционной активности клеток, постановка модели экспериментального артрита, все манипуляции с лабораторными животными, проводились лично соискателем на базе лаборатории молекулярной иммунологии НИИФКИ. Автором лично заполнялись все протоколы исследования, выполнена статистическая обработка полученных результатов и интерпретация экспериментальных данных. Подготовка всех публикаций по выполненной работе проведена лично автором.

Объем и структура диссертации

Диссертация написана в традиционном стиле и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения и выводов. Материал изложен на 111 страницах машинописного текста, включающего 3 таблицы и 21 рисунок. Прилагаемая библиография содержит ссылки на 176 литературных источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования

Объектом исследования были дендритные клетки, полученные из костного мозга лабораторных мышей линии BALB/c. Предметом исследования, выступила способность дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими CCR9, IL-10 и антигенные детерминанты коллагена II типа, индуцировать иммунологическую толерантность.

Этическое заключение

Все манипуляции с экспериментальными животными проводились под изофлурановым наркозом согласно принципам гуманного обращения с животными. Исследование проводилось в соответствии с принципами, изложенными в Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментах и в иных научных целях (№ 123, Страсбург, 18.03.1986) и ГОСТ 33216-2014 Государственный стандарт Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Все протоколы и методы исследования были утверждены этическим комитетом НИИФКИ, Новосибирск, Россия (Протокол № 146/31-05-2024).

Лабораторные животные

В исследовании использовали 100 самцов мышей линии BALB/c в возрасте 2-6 мес. Мышей содержали в виварии НИИФКИ в условиях естественного освещения и неограниченного доступа к еде и воде. Выведение мышей из эксперимента осуществляли с помощью цервикальной дислокации.

Получение миелоидных дендритных клеток у мышей

Для создания ДК использовали лабораторных мышей линий BALB/c (самцы). Клетки костного мозга (ККМ) получали путем промывания костномозгового канала бедренных костей фосфатно-солевым буфером (ФСБ). Затем клетки дважды отмывали: центрифугировали 10 минут при 1500 об/мин в присутствии фосфатно-солевого буфера (ФСБ), с удалением надосадка. ККМ рассаживали в культуральные флаконы площадью 75 см² в концентрации 1млн/1-2мл полной среды RPMI-1640 с добавлением 10% FCS (Biowest, Франция), 2 mM L-глутамин (Биолот, Россия), 10 mM HEPES (Биолот, Россия), 5×10⁻⁴M 2-меркаптоэтанол (Sigma-Aldrich, США), 80 мкг/мл гентамицина (KRKA, Словения), 100 мкг/мл бензилпенициллина (Биолот, Россия). В качестве ростовых факторов использовали GM-CSF и IL-4 в концентрации 20 мкг/мл. Половину питательной среды меняли каждые 2-3 суток с добавлением ½ объема факторов роста. Клетки собирали на 7 сутки для электропорации и цитометрического анализа.

Схема эксперимента

Схема полного эксперимента представлена на рисунке 1.

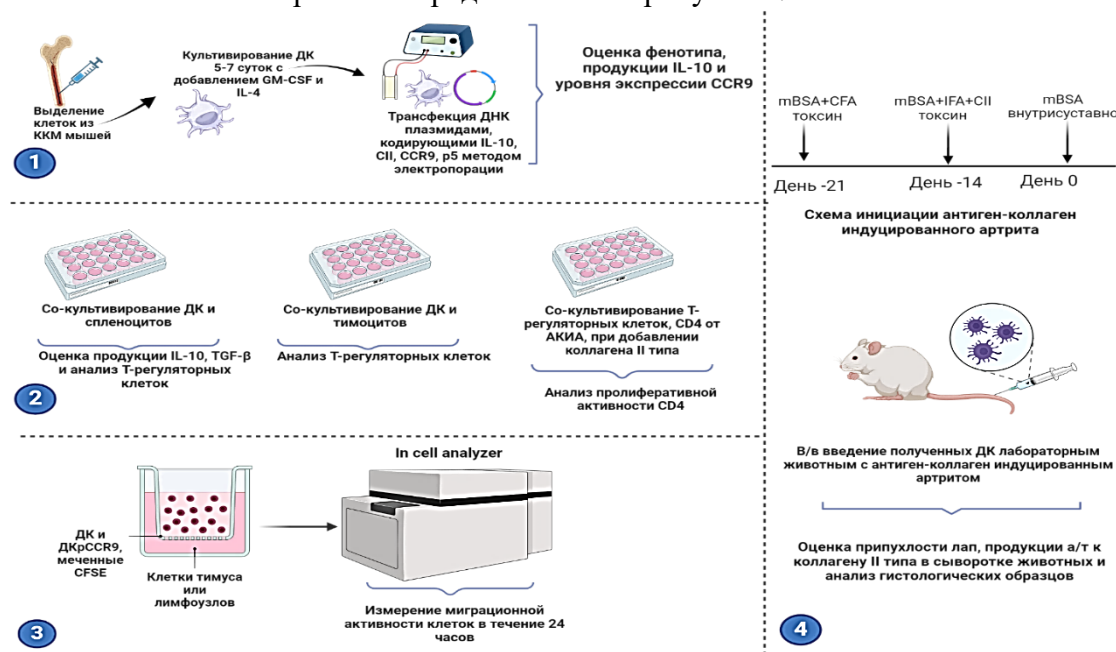


Рисунок 1 - Схема эксперимента по оценке влияния ДК, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими IL-10, CCR9 и эпитопы коллагена II типа, на подавление активности экспериментального артрита [Разработан автором].

Получение ДНК-конструкций, кодирующих IL-10, CCR9 и эпитопы коллагена II типа

Для разработки искусственных генов была использована программа Gene Designer 2.0 (DNA2.0, INC.). В нуклеотидной последовательности генов были исключены сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции AgeI, BamHI и SacI, чтобы упростить процесс клонирования в вектор pmax-Ub. Клонирование искусственных генов в вектор pmax-Ub и получение рабочих генетических конструкций, кодирующих целевые белковые продукты, проводили согласно следующим стадиям: гидролиз ДНК эндонуклеазами рестрикции, элюция фрагментов ДНК из агарозного геля, лигирование ДНК, трансформация компетентных клеток E.coli, выделение плазмидной ДНК, секвенирование ДНК. Для дальнейшей работы были отобраны два независимых клона с подтвержденной нуклеотидной последовательностью встроенных искусственных генов. Каждая плазмидная генетическая конструкция с подтвержденной нуклеотидной последовательностью была наработана в препаративном количестве и очищена от эндотоксинов с помощью набора EndoFreePlasmidMaxiKit ("Qiagen", Германия) в соответствии с рекомендациями производителя. Концентрацию плазмидной ДНК измеряли спектрофотометрически на приборе Ultrospec 3000 pro ("GE HealthCareLifeSciences", США). Чтобы подтвердить правильность структуры очищенных ДНК-конструкций, проводили рестрикционный анализ относительно исходных клонов и секвенирование по обеим цепям. В качестве контрольной выступала некодирующая плаزمид (p5) на основе вектора pmax-Ub. ДНК-конструкция pIL-10 кодировала мышинный IL-10, последовательность которого была взята из базы данных UniProtKB P18893.

Для получения плазмидной ДНК, кодирующей эпитопы коллагена II типа (pCII), на первом этапе работы была проведена оптимизация первичных нуклеотидных последовательности гена anti-C02A1_human с учетом частоты встречаемости различных кодонов для повышения уровня экспрессии гена в эукариотической системе экспрессии. Нуклеотидная последовательность была синтезирована ЗАО «Евроген Ру» (Российская Федерация) в составе векторной плазмиды. Далее полученную фирменную векторную плазмиду, содержащую ген anti-C02A1_human, гидролизировали эндонуклеазами рестрикции BamHI и SacI и встраивали в рекомбинантную плазмиду pmax_Ub_C57BI6 (получена ранее, содержит последовательность, кодирующую убиквитин), предварительно гидролизованную данными эндонуклеазами рестрикции (взамен гена C57BI6). Последовательность, встраиваемая в вектор:

```
GGATCCGGCAGTGTGTTGCTGACACTTCTCGTGGCAGCCTACTTGGAcGAGGCTGCTGGCA
ACCTGAGACTTGGCGCTCCACAGACTCTGGTGAATCTGGCCCCCAACACAGCCAACGTCG
CTGACTGTGTCTACCCCAATCCTGCCAACGTTGCCGACAGCTTGAACAACCAGATCGAGTC
AATCGCAGACGTGCAAATGACATTCTTGAGACTGCTTGCCGAcCTGCTGATCCAAGGGAGC
AACGACGTGGTATTGCTGACACTGCTGGTGGCAGCAGTGTATCTGGACGAGGCCGACAGGC
AACTTGAAGAAAGCATTGCTGATCCAAGGCTCCAACGAiGTGGCAGACAGTCTGAACAAT
CAGATCGAGTCCATCAACCTTGCTCCTAACACTGCCAACGTGCAGATGACSTTTCTACGCT
TGCTGAGGCTGAGAGCCAGACTTGGTGCACCTCAGACACTGGTGTACTGACATTGCTAGT
TGCAGCCGTTGCCGACGGGAGCTC
```

GGATCC – BamHI GAGCTC - SacI

Структуру полученной рекомбинантной плазмиды подтверждали при помощи электрофоретического анализа, рестрикционного анализа и секвенирования концевых участков гена. В результате был отобран клоновый вариант плазмиды pCII, проведена наработка плазмиды и очистка от эндотоксинов при помощи «EndoFree Plasmid Maxi Kit» («Qiagen», Германия). Далее проводили проверку подлинности выделенной плазмидной ДНК при помощи электрофоретического, рестрикционного анализов и секвенирования концевых фрагментов встроенных генов.

Трансфекция

После 7 дней культивирования клеточные культуры собирали и подвергали электропорации ДНК-конструкциями, кодирующими CCR9 (pCCR9), IL-10 (pIL-10) и плазмидой

кодирующей эпитопы коллагена II типа (pCII). Для электропорации $1-6 \times 10^6$ клеток ресуспендировали в OptiMEM (Thermo Fisher Scientific, США), в концентрации 1 млн/100 мкл с добавлением ДНК плазмид 10 мкг/1 млн или без них, и переносили в 1-мм кювету (VTX, США). Электропорацию проводили с помощью электропоратора VTX 830 (VTX, США) одиночным импульсом (сила 260 В, длительность импульса 200 мкс). После электропорации следовала 10-минутная фаза покоя. После фазы покоя клетки переносили для последующего культивирования в полной среде в 12-луночной (или 6-ти луночной) планшете в концентрации 1-2 млн/мл с добавлением GM-CSF и IL-4. Были созданы следующие группы трансфицированных клеток: НеЭП ДК - ДК без воздействия электропорации, ДКp5 - культура ДК, которой проводили электропорацию контрольной некодирующей плазмидой p5, ДКpIL10 - культура ДК, которой проводили электропорацию экспериментальной плазмидой pIL10, ДКpCII - культура ДК, которой проводили электропорацию экспериментальной плазмидой pCII, ДКpCCR9 - культура ДК, которой проводили электропорацию экспериментальной плазмидой pCCR9, ДКpIL10+pCII - культура ДК, которой проводили электропорацию экспериментальными плазмидами pIL10 и pCII, ДКpCII+pCCR9+pIL10 - культура ДК, которой проводили электропорацию экспериментальными плазмидами pCII, pCCR9 и pIL10, ДКpCCR9+pCII - культура ДК, которой проводили электропорацию экспериментальными плазмидами pCCR9 и pCII.

Оценка продукции IL-10 трансфицированными дендритными клетками

При помощи ИФА проводился анализ содержания IL-10 в кондиционной среде исследуемых ДК через 24 часа после трансфекции. ИФА проводили с помощью коммерческого набора на определение концентрации IL-10, согласно инструкции производителя (Biolegend, США), анализ данных производился на мультимодальном планшетном ридере Varioskan LUX (США).

Со-культивирование лимфоцитов и дендритных клеток

Спленоциты извлекали из селезенок мышей линии Balb/c путем измельчения гомогенизатором. Полученную клеточную суспензию фильтровали через 45 мкм в присутствии ФСБ, центрифугировали и удаляли супернатант. Эритроциты удаляли методом осмотического шока. ДК собирали, и со-культивировали со спленоцитами в соотношении 1:10 ($2 \times 10^4/2 \times 10^5$). По истечении 5 суток клетки собирались, подвергались центрифугированию и оценивались по количеству Т-регуляторных клеток, IL-10 и TGF- β методом проточной цитометрии.

Для анализа содержания клеток, продуцирующих IL-10 и TGF- β , сначала проводилась стимуляция при помощи Cell Activation Cocktail (BioLegend, США), согласно протоколу производителя. Затем клетки собирали, отмывали в ФСБ и проводили поверхностное окрашивание клеток против CD3 – BV421, CD4-PerCP (BioLegend, США) согласно протоколу производителя. После инкубации с поверхностными антителами клетки промывали в 500 мкл ФСБ. Для внутриклеточного анализа после окрашивания поверхностными антителами клетки фиксировали в растворе ФСБ, содержащем 1% параформальдегида, по 500 мкл на пробу в течение 20 минут, пермеабилizировали 0,1% раствором Tween-20 (Biolegend, США) и окрашивали моноклональными антителами против IL-10-PE и TGF- β -APC (Biolegend, США).

С помощью проточной цитометрии, изучали относительное количество CD3+CD4+CD25+FoxP3+Т-рег в совместной культуре in vitro. Для проточной цитометрии использовали поверхностное мечение CD3 – BV421, CD4 – PerCP, CD25 – FITC антителами (Biolegend, США), согласно протоколам производителей. Для внутриклеточного окрашивания использовались анти-FoxP3-PE (Biolegend, США), и для фиксации и пермеабилзации использовался True-Nuclear Transcription Factor Buffer Set (Biolegend, США) согласно инструкциям производителя.

По истечении 5 суток в сочетанной культуре ДК и спленоцитов собирали супернатанты и оценивали концентрацию IL-10 методом ИФА (ИФА набор ELISA MAX Deluxe Set Mouse IL-10).

Пролиферативная активность CD4⁺лимфоцитов при со-культивировании с Т-рег

На 5 сутки культивирования полученных ДК и спленоцитов, выполнялась магнитная сортировка Т-рег из групп ДКpIL-10 (неспецифические Т-рег, далее - НеАгТ-рег) и ДКpIL-10+CII+CCR9 (антиген-специфические Т-рег, далее - АгТ-рег). Магнитную сортировку CD4+CD25+ лимфоцитов осуществляли в соответствии с протоколом производителя (Mojosort,

США). Процедура включала два этапа: негативную и позитивную селекцию. Точность сортировки достигала 98-99%. CD4⁺-лимфоциты были получены от мышей с АКИА и выделялись с помощью негативной магнитной сортировки согласно инструкции производителя (Mojosort, США). Затем CD4⁺ -лимфоциты метили CFSE (Biolegend, США) (5 мМоль/мл) в течение 20 мин по стандартному протоколу и со-культивировали с HeAgT-рег или AgT-рег в соотношении 10:1 (200 тыс. CD4⁺/20 тыс. T-рег) Через 48 часов добавляли бычий коллаген II типа (Collagen Type II, Bovine, Lyophilized, Sigma-Aldrich, Германия), в концентрации 2 мг/мл по 25 мкл на 200 тысяч CD4⁺, и еще через 3 суток проводился анализ пролиферативной активности CD4⁺лимфоцитов. В качестве контроля использовали популяцию CD4⁺ -Т-лимфоцитов, культивированных при добавлении коллагена II типа, и без его добавления.

Для анализа пролиферативной активности CD4⁺лимфоцитов в совместной культуре T-рег и CD4⁺ -лимфоцитов в присутствии коллагена II типа клетки собирали, отмывали в ФСБ и подвергались поверхностному мечению анти-CD4-PerCP (BioLegend, США) в течение 20 минут в темном месте при комнатной температуре.

Анализ миграционной активности дендритных клеток *in vitro*

Для оценки миграционной активности полученных ДК в условиях *in vitro* использовали transwell-системы с размером пор 5 мкм (Corning, США). Клетки тимуса и лимфатических узлов (подмышечные и паховые) выделяли и измельчали при помощи ножниц на небольшие кусочки. Фрагменты тимуса и лимфоузлов инкубировались в течение 30 минут на магнитной мешалке в ФСБ без Ca²⁺ и Mg²⁺. Клеточные суспензии собирались и затем фрагменты тимуса смешивали магнитной мешалкой в RPMI-1640 с 2 мг/мл коллагеназы («Биолот», Россия) в течение 30 мин. Полученную клеточную суспензию промывали в среде, содержащей ФКС, фильтровали через 45 мкм.

В нижний отсек лунок планшета transwell-системы добавляли 500 мкл культуральной среды и различные аттрактанты: 5×10^5 клеток тимуса мышей Balb/c, 5×10^5 клеток лимфатических узлов мышей Balb/c, и в качестве контроля – культуральная среда без добавления аттрактантов. В верхний отсек добавляли по 1×10^5 незлектропорированных ДК (группа ДК0), и электропорированных с pmaxCCR9 (группа ДКpCCR9) жизнеспособных ДК мышей, предварительно меченных CFSE (Biolegend, США) по стандартному протоколу. Миграцию *in vitro* оценивали с помощью флуоресцентной микроскопии нижних отделов с использованием In Cell Analyzer 6000 с модулем жизнеобеспечения клеточных культур (GE Healthcare, США). Микроскопические изображения были получены в каналах светлого поля и FITC (CFSE) каждые 4 часа на протяжении 24 часов после посева клеток. Для каждой лунки было проанализировано 25 полей зрения в проекции transwell-мембраны. Подсчёт мигрировавших клеток осуществлялся с помощью программы In Cell Developer Toolbox 1.9.3, разработанной в США компанией GE Healthcare. Индекс миграции для каждой группы рассчитывали, как [количество клеток, мигрировавших к хемоаттрактантам] / [количество клеток, мигрировавших в культуральную среду].

Анализ содержания Т-рег в сочетанной культуре дендритных клеток и клеток тимуса

Клетки тимуса выделяли из тимусов мышей линии Balb/c и измельчали при помощи ножниц на небольшие кусочки. Фрагменты тимуса и лимфоузлов инкубировались в течение 30 минут на магнитной мешалке в ФСБ без Ca²⁺ и Mg²⁺. Клеточные суспензии собирались и затем фрагменты тимуса смешивали магнитной мешалкой в RPMI-1640 с 2 мг/мл коллагеназы («Биолот», Россия) в течение 30 мин. Полученную клеточную суспензию промывали в среде, содержащей ФКС, фильтровали через 45 мкм. Полученные клетки тимуса ссаживали с всеми группами трансфицированных ДК в соотношении 5×10^4 ДК/ 5×10^5 клеток тимуса. По истечении 5 суток оценивали количество Т-регуляторных клеток методом проточной цитометрии.

Для изучения способности трансфицированных ДК индуцировать Трег, использовали проточную цитометрию. Для этого применяли анти-FoxP3-PE, CD3 – BV421, CD4 – PerCP, CD25 – PE-Cy7 антитела (Biolegend, США). Для внутриклеточного окрашивания FoxP3, и для фиксации и пермеабиллизации использовался True-Nuclear Transcription Factor Buffer Set (Biolegend, США) согласно инструкциям производителя.

Проточная цитометрия

На 7-е сутки культивирования ДК, с помощью метода проточной цитометрии, выполнялся анализ частоты встречаемости полученных миелодных клеток. Через 24 часа после трансфекции оценивался фенотип полученных клеток методом проточной цитометрии. Для проведения проточной цитометрии собирали 2×10^5 полученных трансфицированных клеток и инкубировали 20 минут в темноте при комнатной температуре при добавлении флуоресцентных моноклональных антител: анти-CD11c-PE-Cy7 и анти-SIRP α -PE-Cy5.5 для анализа субпопуляций ДК. Для анализа фенотипа полученных ДК использовали анти-CD11c-PE-Cy7, анти-CCR9-PE, анти-H-2Db-FITC, анти-CD80-PerCP и анти-CD86-APC (Biolegend, США). Все анализы выполнялись на проточном цитометре Attune NxT (Life Technologies, США).

Протокол антиген-коллаген индуцированного артрита

За основу протокола индукции АКИА взята модель из работы U. Baddack [Baddack et al., 2013]. Для индукции АКИА использовались мыши линии BALB/c в возрасте 2-6 месяцев.

Протокол №1. Первую иммунизацию проводили (день 0), вводя подкожно 100 мкг альбумина метилированного из бычьей сыворотки (mBSA, Sigma-Aldrich, Германия), разведенного в 50 мкл ФСБ и эмульгированного с 50 мкл полного адьюванта Фрейнда (CFA, Sigma-Aldrich, Германия). Через неделю (день 7) мышей повторно подкожно иммунизировали раствором, содержащим 100 мкг бычьего коллагена типа II (Collagen Type II, Bovine, Lyophilized, Sigma-Aldrich, Германия), 50 мкг mBSA, эмульгированного с 50 мкл неполного адьюванта Фрейнда (IFA, Sigma-Aldrich, Германия). Параллельно с каждой иммунизацией внутрибрюшинно вводили 200 нг токсина Bordetella p. (Pertussis toxin from Bordetella pertussis, PTX, lyophilized powder, Sigma-Aldrich, Германия). Через 14 дней после последней иммунизации (день 21) в полость левого коленного сустава вводили 50 мкг mBSA, разведенного в 20 мкл ФСБ, в экспериментальной группе, в группе контроля – 20 мкл ФСБ внутрисуставно.

Протокол №2 и №3. В день первой иммунизации доза mBSA для подкожного введения была увеличена до 200 мкг mBSA. При повторной иммунизации вводилось подкожно 200 мкг бычьего коллагена типа II (Collagen Type II, Bovine, Lyophilized, Sigma-Aldrich, Германия), 200 мкг mBSA эмульгированного с 50 мкл неполного адьюванта Фрейнда (IFA, Sigma-Aldrich). Для внутрибрюшинного введения дозировка токсина Bordetella p. была увеличена до 300 нг (Pertussis toxin from Bordetella pertussis, PTX, lyophilized powder, Sigma-Aldrich, Германия). При индукции локального артрита в полость левого коленного сустава вводилось: в 2-ом протоколе 100 мкг mBSA разведенного в 20 мкл ФСБ, в 3-м протоколе 250 мкг в 20 мкл ФСБ, в группу контроля - 20 мкл ФСБ внутрисуставно.

***In vivo* исследование**

Согласно протоколу, проводился запуск модели антиген-коллаген индуцированного артрита. Миелодные ДК были получены, указанным выше способом. На 7-е сутки выполнялась электропорация экзогенной ДНК, с использованием ДНК-конструкций, кодирующими рецептор хемотаксиса мыши CCR9 (pCCR9), плазмидой кодирующей продукцию IL-10 (pIL-10) и плазмидой кодирующей эпитопы коллагена II типа (pCII). ДК, трансфицированные плазмидой p5, использовались в качестве контроля. Полученные ДК собирались через 24 часа после проведения электропорации, дважды отмывались средой RPMI-1640, и разводились в 0,9% растворе натрия хлорида, в концентрации 5×10^5 /150 мкл. Полученный раствор ДК вводился в хвостовую вену экспериментальных животных, на 6-7 сутки после индукции локального артрита (индукция локального артрита – день 21, введение ДК проводилось на 28 сутки от запуска модели артрита), при появлении первых клинических признаков. В таблице 1 приведены группы лечения:

Таблица 1 - Группы ДК для введения лабораторным животным с АКИА [Разработана автором]

| Номер группы | Группы, вводимых ДК |
|--------------|---|
| 1 | ДКpIL10 |
| 2 | ДКpIL10+pCII |
| 3 | ДКpCCR9+pCII+pIL10 |
| 4 | ДКpCCR9+pCII |
| 5 | Контроль, введен раствор натрия хлорида |
| 6 | Контроль, введены ДКp5 |

На 7 и на 14 сутки после введения ДК, проводилось измерение толщины (поперечный размер) пораженных лап, с помощью штангенциркуля, оценка содержания антител к коллагену II типа в сыворотке лабораторных животных методом ИФА, забор суставов для гистологического исследования.

Оценка влияния трансфицированных ДК на течение экспериментального артрита

Припухлость лап оценивали, измеряя среднюю толщину обеих задних лап с помощью штангенциркуля 0–10 мм на 0, 3, 6, 7–23 сутки после индукции локального артрита.

Содержание антител, специфичных к мышинному коллагену II типа, измеряли в сыворотке крови лабораторных животных методом иммуноферментного анализа (ИФА; IgG против мышинного коллагена типа II, Cayman chemical, США).

На 10 и 23 сутки после индукции артрита мышей выводили из эксперимента при помощи цервикальной дислокации. Выделялись коленные суставы. Полученные материалы фиксировали в забуференном 10 % растворе формалина и пропитывались парафином для гистологического исследования. Срезы тканей подготавливали при помощи микротомы и собирали на предметные стекла, которые затем депарафинизировали и окрашивали гематоксилином и эозином. Воспаление оценивали, как гиперплазию слоя синовиальной оболочки и инфильтрацию лейкоцитов в синовиальную мембрану/пространство сустава, разрушение тканей – по образованию паннуса и наличию эрозии хряща.

Статистический анализ данных

Статистическая обработка данных была выполнена с помощью программы Prism 8.0 (GraphPad Software, США). Статистические выборки проверялись на нормальность с помощью критериев Шапиро-Уилка и Колмогорова-Смирнова. Значимость различий между выборками оценивали с помощью однофакторного или двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA с множественными сравнениями Тьюки, или с помощью критерия Манна-Уитни. Данные были представлены в виде медианы и межквартильного интервала (25–75%). Различия сравниваемых параметров считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Значимые отличия проиллюстрированы на рисунках символами и скобками.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение толерогенных дендритных клеток

Дендритные клетки были получены при помощи GM-CSF и IL-4. На 7 сутки культивирования выполнялся анализ субпопуляций ДК. Было показано, что описанный протокол позволяет генерировать ДК с преимущественным миелоидным фенотипом (рисунок 2).

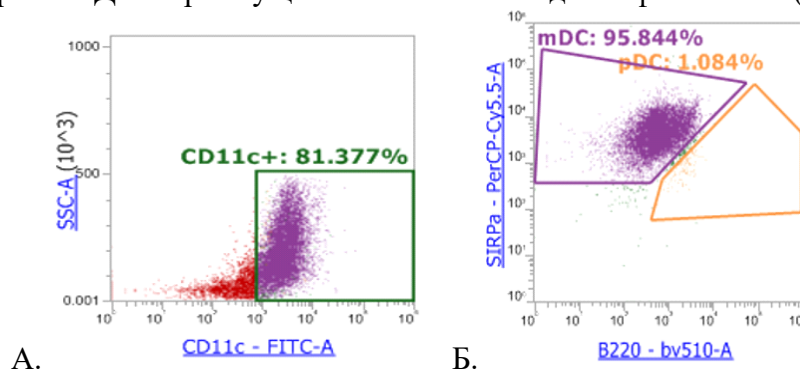


Рисунок 2 - Данные полученные при помощи проточной цитометрии. А. стратегия гейтирования и количество клеток CD11c⁺ из популяции лимфоцитов; Б. относительное содержание миелоидных ДК (mDC) и плазмацитоидных ДК (pDC).

На 7 сутки культивирования выполнялась трансфекция ДНК плазмидами p5, pIL-10, pCCR9, pCII. Через 24 часа после трансфекции выполнялся анализ фенотипа трансфицированных ДК. Было обнаружено достоверное снижение клеток с экспрессией CD80, CD86, H-2Db в культуре клеток, по сравнению с культурой ДК, не подвергшимся трансфекции (рисунок 3). Это обстоятельство может свидетельствовать о толерогенном фенотипе трансфицированных ДК.

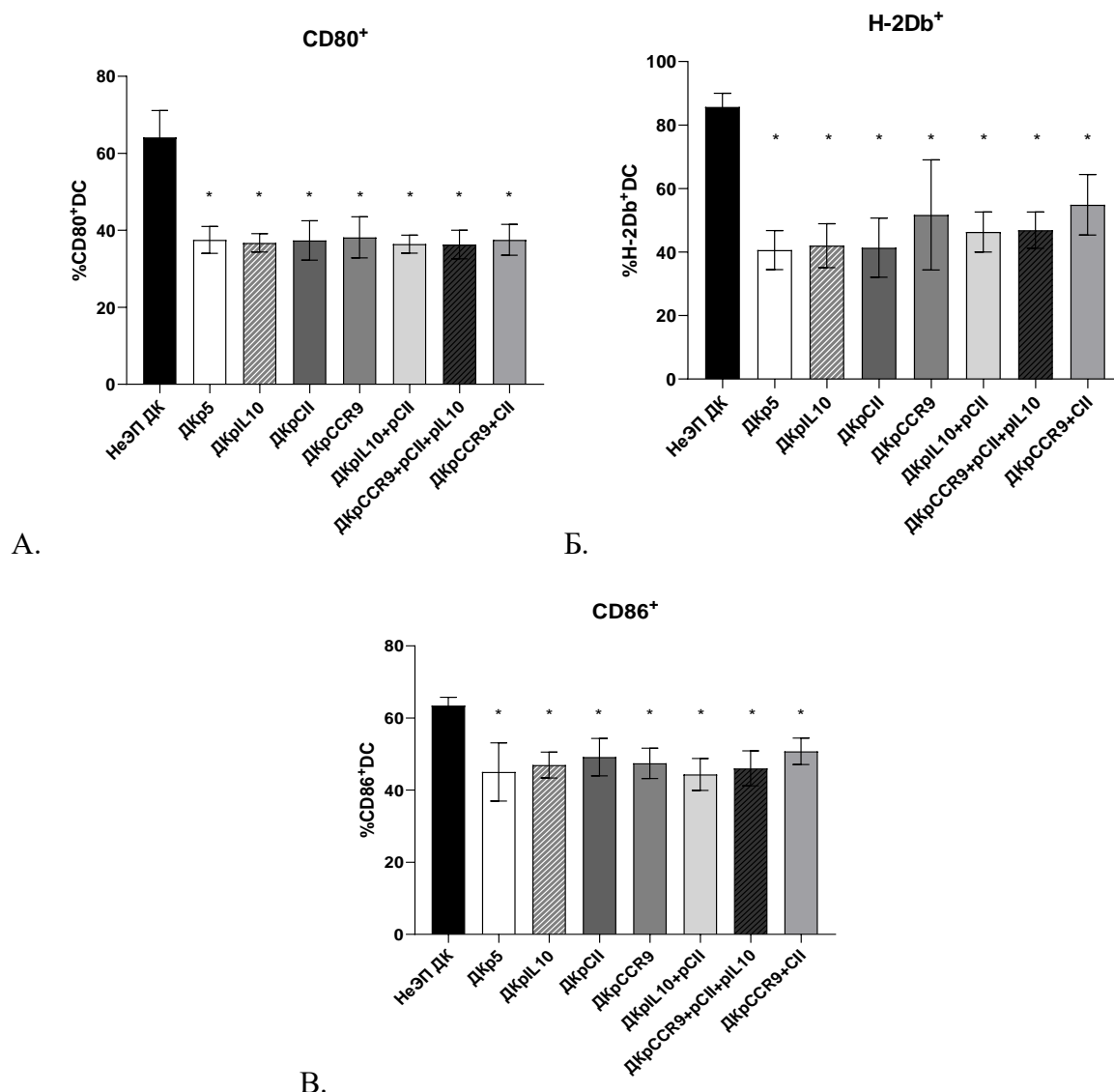
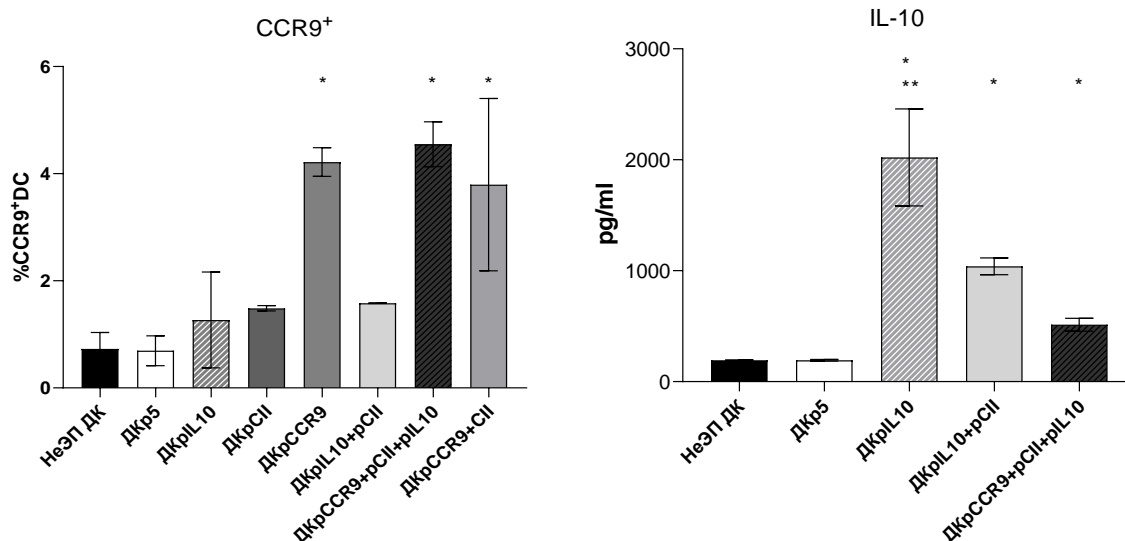


Рисунок 3 - Анализ экспрессии маркеров созревания дендритных клеток, трансфицированных различными плазмидами: А. относительное содержание ДК, экспрессирующих CD80; Б. относительное содержание ДК, экспрессирующих H-2Db; В. относительное содержание ДК, экспрессирующих CD86, (n=8). * - статистически значимые различия всех экспериментальных групп от группы неЭП ДК ($p \leq 0.01$).

При оценке экспрессии CCR9 исследуемыми ДК (рисунок 4А), было получено, что в группах ДК, где для трансфекции использовались pCCR9, наблюдается повышенная экспрессия рецептора хемотаксиса, по сравнению с другими группами.

При оценке продукции IL-10 было показано достоверное увеличение содержания цитокина в кондиционных средах всех групп ДК, которые были трансфицированы плазмидой pIL-10 (рисунок 4Б).

В результате, можно сделать вывод, что полученные ДК обладают незрелым фенотипом, а группы трансфицированные плазмидой pCCR9, характеризуются еще и повышенной экспрессией CCR9. В связи с этим, исследуемые ДК обладают толерогенными фенотипом и могут быть использованы для индукции иммунологической толерантности.



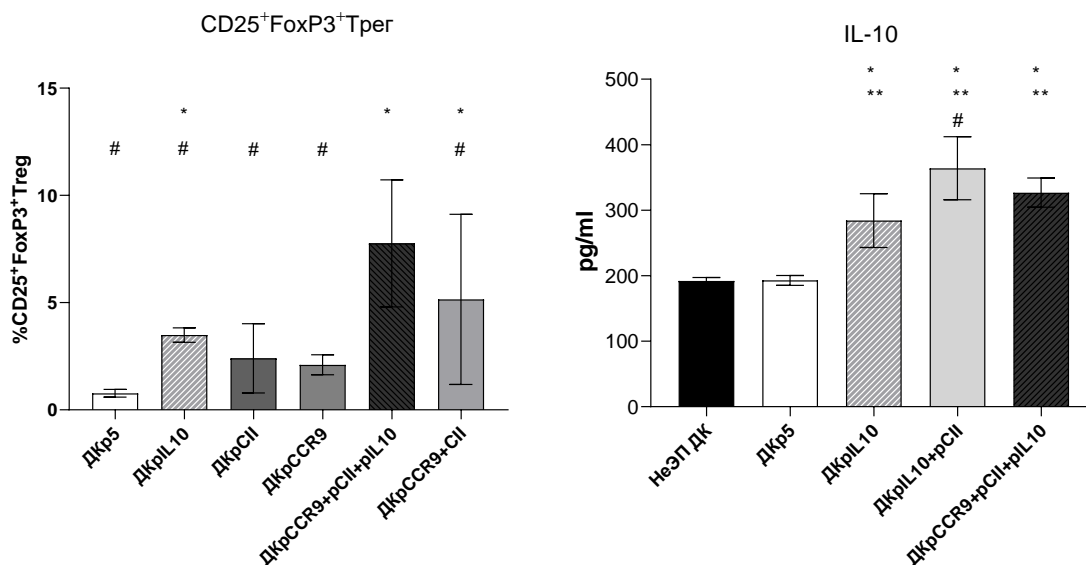
А.

Б.

Рисунок 4А - Анализ экспрессии CCR9 культивированными ДК после трансфекции различными плазмидами (n=8). * - статистически значимые различия от групп неЭПДК, ДКp5, ДКpIL-10, ДКCII и ДКpIL10+pCII ($p \leq 0.001$). Рисунок 4Б - Анализ содержания IL-10 в кондиционной среде культуры ДК после трансфекции различными плазмидами. * - статистически значимые различия от группы неЭП ДК, ** - группы ДКpIL10 от остальных групп ($p \leq 0.001$).

Толерогенный потенциал трансфицированных ДК, оценивали по количеству Т-регуляторных клеток и продукции IL-10 в совместной культуре ДК и спленоцитов (рисунок 5А). Было получено достоверное увеличение содержание Т-рег в группах ДКpIL-10, ДКpCCR9+pCII+pIL-10 и ДКpCCR9+pCII, по сравнению с другими группами.

При оценке содержания IL-10 в кондиционной среде совместной культуры исследуемых ДК и спленоцитов было показано повышение содержания данного цитокина в следующих экспериментальных группах ДК: ДКpIL-10, ДКpCCR9+pCII+pIL-10 и ДКpIL-10+pCII (рисунок 5Б).



А.

Б.

Рисунок 5А - Анализ относительного содержания Т-регуляторных клеток (CD25⁺FoxP3⁺) в совместной культуре исследуемых ДК и спленоцитов (n=8). * - статистически значимые различия от группы ДКp5, # - статистически значимые различия от группы ДКpCCR9+pCII+pIL-10 (one-way ANOVA, $p \leq 0.0001$). Рисунок 5Б - Анализ содержания IL-10 в кондиционной среде совместной культуры исследуемых ДК и спленоцитов (n=8). * - статистически значимые различия от группы неЭП ДК, ** - от группы ДКp5 ($p \leq 0.0001$), # - группы ДКpIL-10 от остальных групп ($p \leq 0.001$).

Полученный результат (увеличение относительного содержания Т-рег и повышение продукции IL-10) в совместной культуре в трансфицированных ДК со спленоцитами, может говорить об успешной индукции иммунологической толерантности полученными ДК, что позволит использовать их в дальнейших экспериментах, связанных с иммунологической толерантностью.

Оценка содержания IL-10⁺ и TGF-β⁺ CD4⁺лимфоцитов в совместной культуре ДК и CD4⁺лимфоцитов

При анализе относительного содержания IL-10⁺ и TGF-β⁺ CD4⁺лимфоцитов в совместной культуре ДК и CD4⁺лимфоцитов (рисунок 6), было зарегистрировано достоверное увеличение клеток, продуцирующих IL-10 в ДКpIL-10, ДКpIL-10+pCII и ДКpIL-10+pCII+pCCR9, и достоверное увеличение количества TGF-β в группах ДКpIL-10 и ДКpCCR9+pCII+pIL-10.

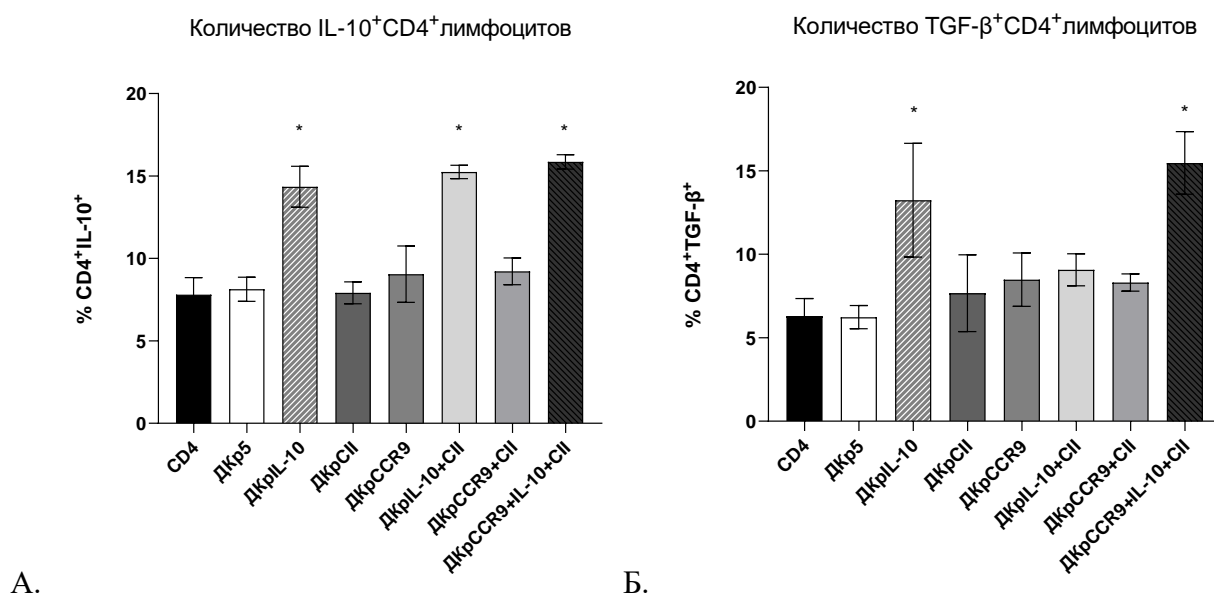


Рисунок 6 - Анализ относительного содержания IL-10⁺ (А) и TGF-β⁺ (Б) CD4⁺лимфоцитов в совместной культуре ДК и CD4⁺лимфоцитов (n=8). CD4 - CD4⁺лимфоциты. * - статистически значимые отличия групп ДКpIL-10, ДКpIL-10+pCII и ДКpCCR9+pCII+pIL-10 от контрольных групп ДКp5 и CD4-лимфоцитов (one-way ANOVA, p≤0.0001).

Пролиферация CD4⁺спленоцитов в совместной культуре Т-рег, CD4⁺лимфоцитов и коллагена II типа

Анализ пролиферативной активности CD4⁺спленоцитов (полученных от мышей больных АКИА) в сочетанной культуре с антиген-специфическими (полученными от группы ДКpCCR9+pCII+pIL-10) или неспецифическими Т-рег (полученными от группы ДКpIL-10) при добавлении коллагена II типа, показал достоверное увеличение пролиферации CD4⁺спленоцитов при добавлении коллагена II типа, кроме групп с AgT-рег и HeAgT-рег (рисунок 7). Группа с антиген-специфическими Т-рег, напротив, показала наименьший уровень пролиферативной активности CD4⁺спленоцитов, равный группе контроля CD4⁺спленоцитов без добавления коллагена II типа. Группа HeAgT-рег показала тенденцию к снижению пролиферативной активности, но не полное ее подавление. Полученные данные могут свидетельствовать о подавлении пролиферативной активности CD4⁺спленоцитов антиген-специфическими Т-рег в присутствии стимулирующего фактора коллагена II типа, т.е. развитие иммунной толерантности.

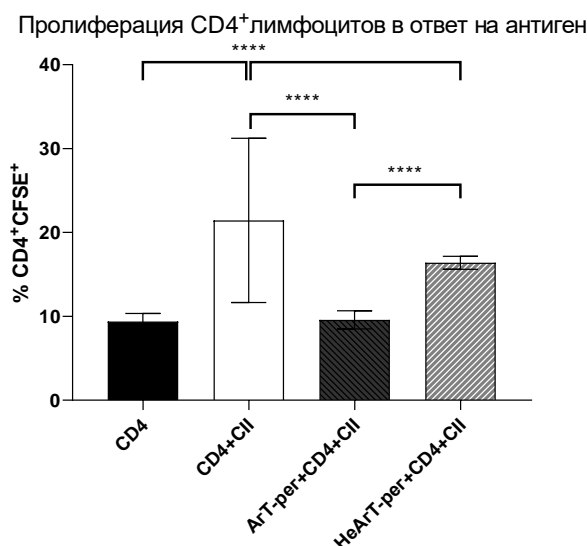


Рисунок 7 - Оценка пролиферативной активности CD4⁺ лимфоцитов в совместной культуре с Т-рег при добавлении коллагена II типа (n=6). Только CD4 - CD4⁺ спленоциты без добавления Т-рег и коллагена II типа, CD4+CII - CD4⁺ спленоциты при добавлении коллагена II типа, AgT-reg+CD4+CII - антиген-специфические Т-рег, CD4⁺ спленоциты и коллаген II типа, HeAgT-reg+CD4+CII - неспецифические Т-рег, CD4⁺ спленоциты и коллаген II типа. Медианы и межквартильный интервал. Скобками указаны статистически значимые отличия (one-way ANOVA, **** - P < 0.0001).

Анализ *in vitro* миграционных возможностей ДК, трансфицированных ДНК-конструкциями CCR9

Следующим этапом была изучена миграционная активность ДК, трансфицированных ДНК-конструкцией, кодирующей CCR9, к клеткам тимуса и клеткам лимфатических узлов *in vitro* с помощью transwell-систем (рисунок 8). Индекс миграции высчитывали как отношение количества клеток, мигрировавших к клеткам тимуса, или к клеткам лимфатических узлов, к количеству клеток, мигрировавших в культуральную среду без хемоаттрактантов.

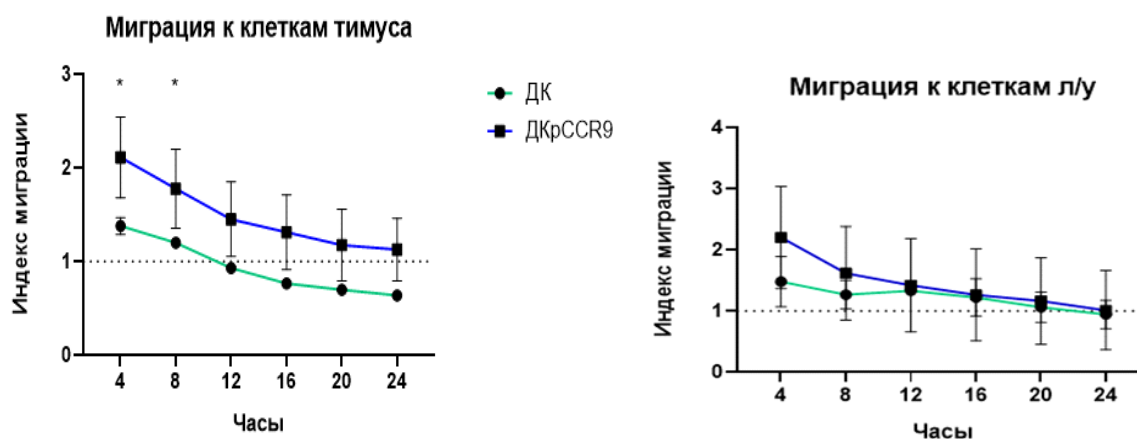


Рисунок 8 - Оценка миграционной способности ДК к клеткам тимуса (слева), к клеткам лимфоузлов (справа) (n=6). ДК – дендритные клетки без воздействия электропорации, ДКpCCR9 – дендритные клетки, трансфицированные плазмидой CCR9. Л/у – лимфатические узлы. Медианы и межквартильный интервал. * - указаны статистически значимые отличия от группы ДК (2way ANOVA, P < 0,0001).

Было выявлено, что через 4 и 8 часов после посадки дендритные клетки, трансфицированные pCCR9, в 1,5 раза более активно мигрируют к клеткам тимуса по сравнению с неэлектропорированными ДК. Анализ миграции ДК к клеткам лимфатических узлов не выявил какой-либо достоверности.

Анализ количества Т-рег в совместной культуре ДК и клеток тимуса

На 5 сутки совместного культивирования полученных ДК и клеток тимуса, был проведен анализ количества Т-регуляторных клеток (рисунок 9). Эксперимент показал, что в группах, где использовалась плазида CCCR9, обнаруживается достоверное увеличение содержания Т-регуляторных клеток, по сравнению с остальными группами.

Количество Т-рег в совместной культуре ДК и клеток тимуса

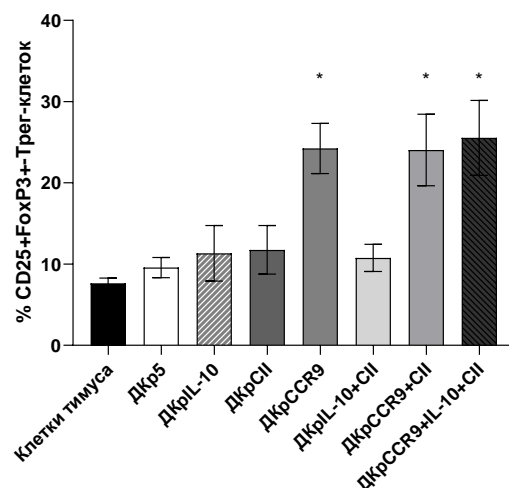


Рисунок 9 - Анализ количества Т-рег в совместной культуре ДК и клеток тимуса (n=6).

* - статистически значимые отличия групп ДКpCCR9, ДКpCCR9+pCII и ДКpCCR9+pIL-10+pCII от контрольных групп ДКp5 и клеток тимуса ($p \leq 0.0001$).

Отработка модели антиген-коллаген индуцированного артрита

Отработка модели экспериментального артрита была проведена по трём различным протоколам: первый – классическая модель АКИА, второй и третий - модель АКИА с измененными дозировками препаратов. Изменения в первый протокол были внесены с целью достижения более выраженных клинических симптомов у испытуемых животных. Было также проведено сравнение результатов для определения наиболее оптимального протокола для последующих исследований.

После запуска моделей проводилась оценка клинических, лабораторных и гистологических параметров.

При оценке припухлости лап у мышей, задействованных в протоколе 1 (далее пр.1), было выявлено достоверное увеличение этого параметра в экспериментальной группе на 10-е сутки, по сравнению с контрольной группой. К 23-м суткам интенсивность припухлостей лап спадала, и достоверных различий обнаружено не было (рисунок 10).

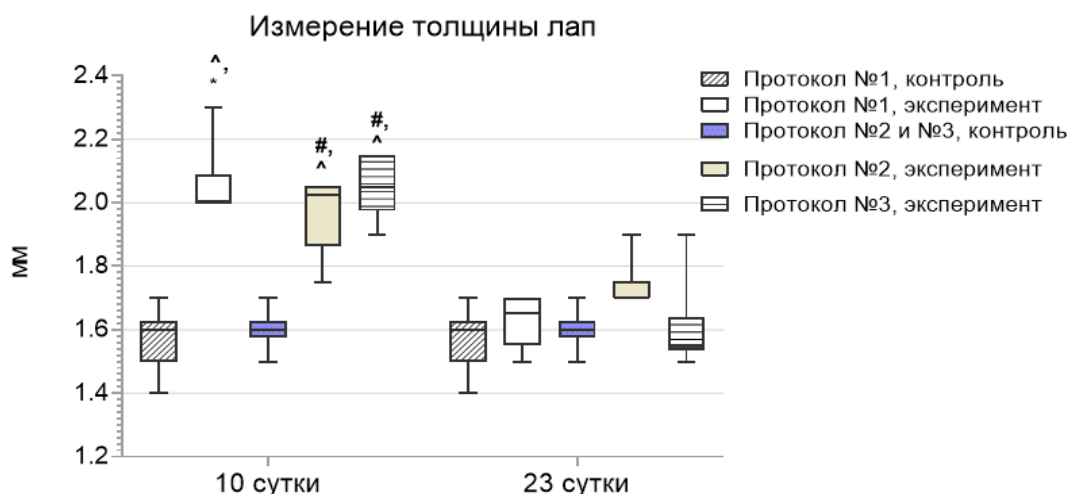


Рисунок 10 - Сравнение толщины задних лап мышей линии BALB/c индуцированных по протоколам №1, №2 и №3 на 10 сутки и 23 сутки (n=6-10). Контроль – введение ФСБ. Данные представлены в виде медианы межквартильного интервала, минимума и максимума значений.

* - указаны статистически значимые отличия от группы контроля в протоколе №1 на 10-е сутки, # - указаны статистически значимые отличия от группы контроля в протоколе № 2 на 10-е сутки, ^ - указаны статистически значимые отличия данных 10 суток от 23 суток у мышей из всех протоколов (two-way ANOVA, $p \leq 0.0001$).

Анализ изменения толщины лап в эксперименте, проведенному на мышах по протоколу №2 (далее пр. 2), и в эксперименте, проведенному на мышах по протоколу №3 (далее пр. 3), показал достоверное увеличение размеров толщины лап во всех экспериментальных группах по сравнению с контрольными группами. На 23-е сутки анализ толщины лап, также, не выявил статистически значимых отличий. Увеличение толщины лап на 10-е сутки, по сравнению с 23-ми сутками, оказалось достоверным во всех экспериментальных группах.

Анализ содержания антител к коллагену II типа в сыворотке лабораторных животных (рисунок 11) пр. 1 на 10, 23 сутки показал достоверное увеличение уровня антител в экспериментальных группах по сравнению с контрольными. Также, увеличение антител к коллагену II типа на 10-е сутки в экспериментальной группе пр.1 достоверно выше, чем в экспериментальных группах пр. 2 и пр. 3. На 23-е сутки достоверным оказалось увеличение антител к коллагену II типа в экспериментальной группе пр. 2, по сравнению с показателями мышей из других протоколов.

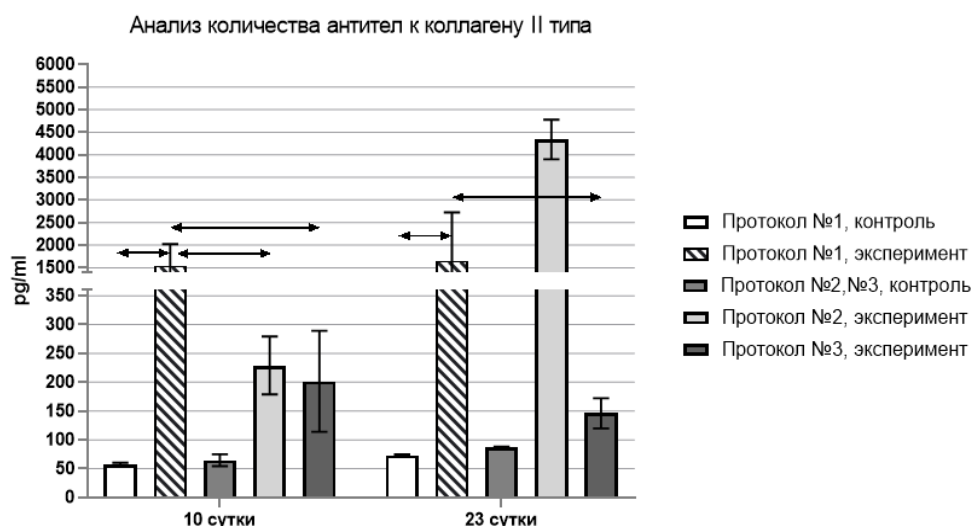


Рисунок 11 - Анализ содержания антител к коллагену II типа в сыворотке лабораторных животных, индуцированных по протоколам №1, №2 и №3 на 10 и 23 сутки (n = 6-10). Средние значения и стандартные ошибки средних, медианы и межквартильный интервал. Стрелкой указаны статистически значимые различия (Mann-Whitney test, $p \leq 0.0001$).

Далее проводился анализ гистологических изменений в образцах суставов экспериментальных животных (рисунок 12). В экспериментальной группе лабораторных животных из пр.1 на 10-е сутки во всех опытных образцах были обнаружены гипертрофия синовиальной оболочки, инфильтрация лейкоцитами; в 3-х образцах (из 10) – паннус. На 23-е сутки вышеуказанные изменения проявлялись менее выражено, но в 2-х образцах наблюдался паннус. У образцов из пр. 2 и пр. 3 наблюдалось сходство в выявленных изменениях, присутствовало реактивное разрастание синовиальной оболочки при слабой воспалительно-клеточной инфильтрации и сохранении хрящевого слоя, кроме 2-х образцов от мышей пр. 2 и 1-го образца пр. 3. Также, у нескольких мышей пр. 2 было обнаружено образование паннусов на 10 суток.

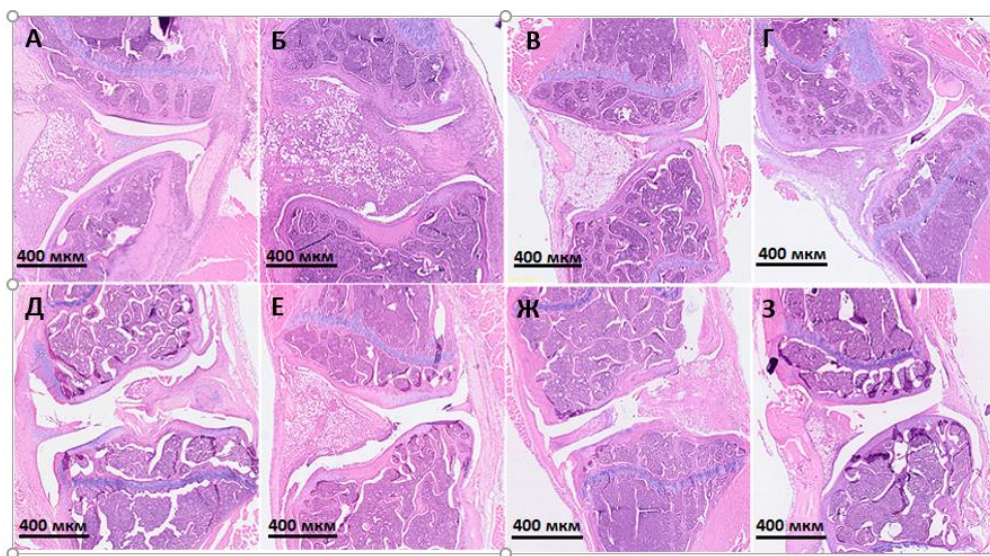


Рисунок 12 - Гистологическое исследование. А, Б, В, Г, Д, Е, Ж, З - микрофотографии тканей суставов мышей после окраски гематоксилином и эозином при увеличении в 400 раз (n=4-6). Протокол №1, 11 сутки: (А) Контроль: патологических изменений нет. (Б) Опыт: увеличенная толщина синовиальной оболочки с многоочаговой лейкоцитарной инфильтрацией, большая площадь покрытия суставной поверхности - «паннус». Синовиальная оболочка имеет утолщенные немногочисленные ворсины. Протокол №1, 25 сутки. (В) Контроль: норма. (Г) Опыт: выраженные разрастания синовиальной оболочки, значительная инфильтрация лейкоцитами, присутствует нарастание синовиальной оболочки на суставной хрящ (паннус). Протокол №2, 10 сутки. (Д) Контроль: патологических изменений нет. (Е) Опыт: дефект суставного хряща в виде узур, удлиненные разрастания синовиальной оболочки по типу ворсин, но довольно тонкие. Присутствуют нейтрофилы группами в полости сустава. Протокол №2, 23 сутки. (Ж) Контроль: норма. (З) Опыт: гипертрофия синовиальной оболочки, мелкая группа нейтрофилов в синовиальной полости, мелкие очаги инфильтрации лейкоцитами синовиальной оболочки.

Все протоколы индукции, применяемые в данном исследовании, показали изменения, сходные с изменениями при ревматоидном артрите (РА), и, следовательно, эта модель может быть выбрана для дальнейшего изучения эффективности новых терапевтических подходов и методов. Подобно РА у человека, в представленной модели обнаруживали такие клинические изменения, как припухлость суставов, эритема. Также в представленной модели регистрировали типичные для РА гистологические изменения синовиальной оболочки, деструкцию хрящей, паннусы.

Делая вывод необходимо отметить, что у мышей, индуцированных по протоколу №1 наблюдалось более стабильное увеличение уровней антител к коллагену 2 типа, а гистологические изменения обнаруживались наиболее выраженные. Таким образом, для дальнейшего исследования была выбрана классическая модель индукции АКИА.

Оценка влияния полученных дендритных клеток на течение экспериментального артрита у мышей

ДК собирались через 24 часа после проведения электропорации, дважды отмывались средой RPMI-1640, и разводились в 0,9% растворе натрия хлорида, в концентрации 500 тыс/150 мкл. Полученный раствор ДК вводился в хвостовую вену экспериментальных животных, на 7 сутки после индукции локального артрита, при появлении первых клинических признаков, в соответствии с созданными группами лечения.

После введения полученных ДК мышам с АКИА, было проведено сравнение припухлостей лап, уровней антител к коллагену II типа на 7 и 14 сутки лечения (рисунок 13). Показано, что припухлость лап во всех экспериментальных группах была достоверно меньше, чем в контрольных группах как на 7, так и на 14 сутки. Также, припухлость лап группы ДКpCCR9+pCII+pIL10 была достоверно менее выражена, чем во всех группах на 7 сутки.

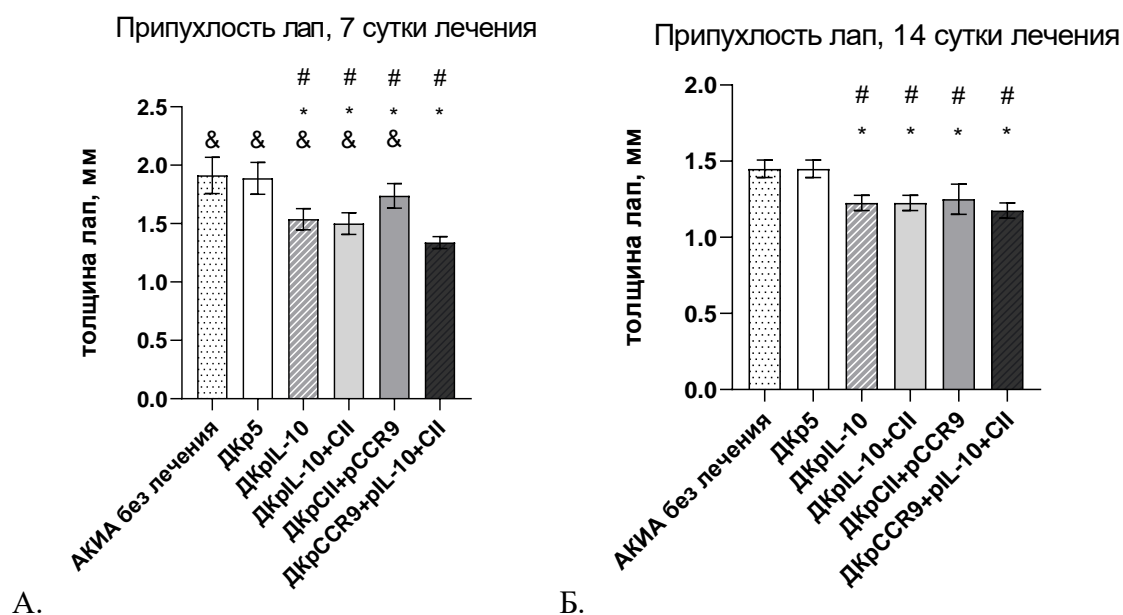


Рисунок 13 - Сравнение припухлостей лап лабораторных животных на 7 сутки (А) и на 14 сутки (Б) после начала терапии (n=8-12). АКИА без лечения, ДКр5 – группы контроля. Медианы и межквартильный интервал. # — статистически значимые отличия от контрольной группы АКИА без лечения, * — статистически значимые отличия от контрольной группы ДКр5, & — статистически значимые отличия от группы ДКрCCR9+pCCII+pIL10 (one-way ANOVA, $P < 0,0001$).

Однако, при анализе уровней антител к коллагену II типа было выявлено достоверное снижение содержание антител только в группах ДКрIL10+pCCII и ДКрCCR9+pCCII+pIL10, по сравнению с контрольными группами на 7 сутки лечения (рисунок 14). На 14 сутки после начала лечения во всех экспериментальных группах, кроме ДКр5, было обнаружено снижение титра антител к коллагену II типа. Причем, группа ДКрCCR9+pCCII+pIL10 показала наиболее низкий уровень антител к коллагену II типа по сравнению с остальными группами, как на 7 сутки, так и на 14 сутки.

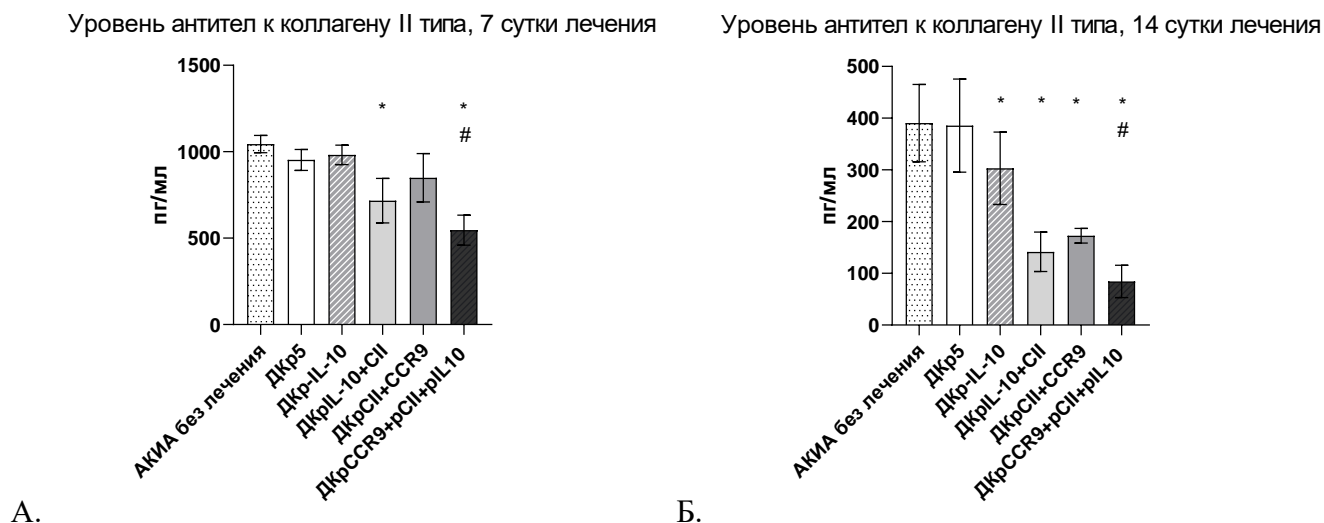


Рисунок 14 - Сравнение уровней антител к коллагену II типа лабораторных животных на 7 сутки (А) и 14 сутки (Б) после лечения (n=8-12). АКИА без лечения, ДКр5 – группы контроля. Медианы и межквартильный интервал. * - указаны статистически значимые отличия от групп контроля, # -

статистически значимые отличия группы ДКpCCR9+pCII+pIL10 от остальных групп (one-way ANOVA, $P < 0,001$).

Таким образом, в/в введение исследуемых ДК привело к снижению уровней припухлостей лап и антител к коллагену II типа в экспериментальных группах. Причем, группа ДКpCCR9+pCII+pIL10 показала наиболее низкие уровни сравниваемых параметров.

При анализе гистологических образцов (рисунок 15), полученных через неделю после начала лечения (7 суток) достоверной разницы с контрольными группами, не было обнаружено: у всех животных отмечались воспалительная инфильтрация синовиальной оболочки, у некоторых – формирование паннуса и пенетрация синовии в суставной хрящ, утолщение синовиальной оболочки. Через 14 суток после введения ДК, наиболее выраженные изменения обнаруживались в контрольных группах (5 и 6) – утолщение и инфильтрация синовиальной оболочки лимфоцитами, у одного животного с формированием ворсин и мелкими группами лейкоцитов в полости сустава (рисунок 15). В 3 группе у всех животных патологические изменения отсутствовали. В 1 группе у двух животных формирование ворсин синовиальной оболочки, слабая лимфоцитарная инфильтрация. Во 2 и 4 группах схожие патоморфологические явления – умеренная лимфоцитарная инфильтрация.

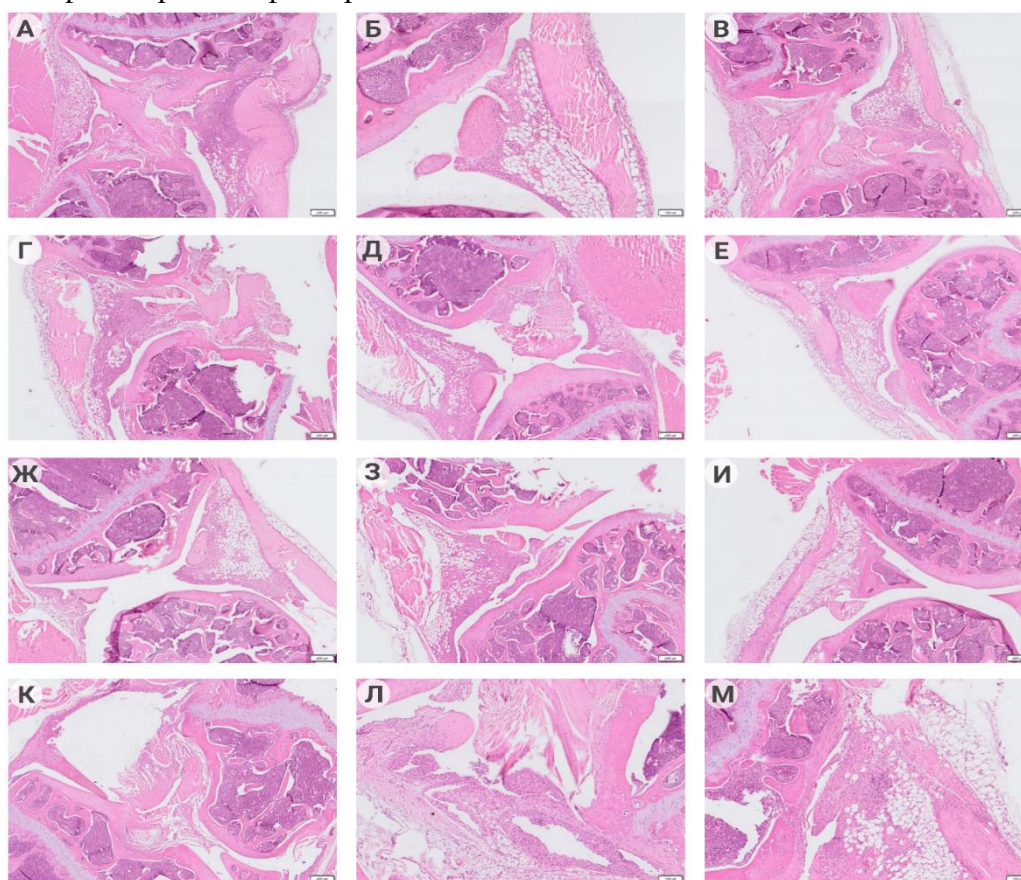


Рисунок 15 - Данные гистологического анализа тканей суставов мышей. А, Б, В, Г, Д, Е, Ж, З, И, К, Л, М - микрофотографии тканей суставов мышей после окраски гематоксилином и эозином при увеличении в 400 раз ($n=4-6$).

На 7-й день после лечения: 1-я группа – выраженная лимфоцитарная инфильтрация синовиальной стромы, образование субхондральной кисты (А); 2-я группа - образование паннуса, слабая воспалительная инфильтрация синовиальной оболочки (Б); 3-я группа - утолщение синовиальной оболочки со слабой лимфоцитарной инфильтрацией, образование синовиальных ворсинок (В); группа 4 – умеренная инфильтрация синовиальной оболочки, проникновение синовиальной оболочки в суставной хрящ (Г); группа 5 – врастание синовиальной оболочки в костную ткань вблизи суставного хряща, умеренная лимфоцитарная инфильтрация синовиальной оболочки с ее утолщением и образованием ворсинок (Д); 6-я группа - слабая воспалительная инфильтрация синовиальной оболочки, визуализируется паннус (Е). На 14-й день после лечения: группа 1 – инфильтрация синовиальной оболочки лимфоцитами (Ж); группа 2 – умеренная инфильтрация синовиальной оболочки сустава, пролиферация фибробластов (З); группа 3 –

видимых патологических изменений обнаружено не было (И); группа 4 - умеренная лимфоцитарная инфильтрация сустава, субсиновиальная строма (к); 5-я группа - утолщение и многочисленные наросты (ворсинки) синовиальной оболочки, небольшие скопления лейкоцитов в полости сустава (Л); 6-я группа - разрастание синовиальной оболочки с образованием паннуса, лимфоцитарная инфильтрация субсиновиальной стромы (М).

Таким образом, минимальные изменения обнаружены в 1 группе (ДКpIL-10) на 7 сутки лечения, и отсутствие патологии у животных 3 группы (ДКpCCR9+pCII+pIL-10) на 14 сутки лечения, наиболее выраженные в группах контроля.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной работе был разработан оригинальный протокол получения ДК, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими IL-10, CCR9 и эпитопы коллагена II типа, обладающих толерогенным потенциалом, что подтверждается пониженным содержанием клеток с экспрессией маркеров зрелости CD80, CD86 и H-2Db, повышенной экспрессией CCR9, а также способностью к повышенной продукции IL-10.

Потенциал к подавлению аутоиммунных реакций полученными ДК клетками проявлялся в их способности к генерации Т-рег, продукции IL-10 и TGF- β CD4⁺ лимфоцитами, и угнетении пролиферативной активности при их совместном культивировании. Причем был продемонстрирован разный характер подавления иммунных реакций. Группа ДКpIL-10 показала неспецифический иммуносупрессивный эффект, а группа ДКpIL-10+pCII+pCCR9, в свою очередь, антиген-специфическое подавление пролиферативной активности CD4⁺лимфоцитов в ответ на антиген. Уровень антиген-специфического подавления оказался более высоким, так как наблюдалось снижение пролиферативной активности до уровня группы контроля без добавления коллагена.

Как показало данное исследование, трансфекция ДНК-конструкцией, кодирующей CCR9, приводит к тому, что ДК приобретают более высокий миграционный потенциал по отношению к тимическим клеткам, чем нетрансфицированные ДК. А также CCR9+ДК способствуют индукции Т-рег клеток при совместном культивировании с тимоцитами.

Введение лабораторным животным с антиген-коллаген индуцированным артритом модифицированных толДК привело к снижению выраженности припухлости лап, уменьшению уровня антител к коллагену II типа и патологических изменений тканей суставов. Наиболее выраженный эффект наблюдался в группе ДКpCCR9+pCII+pIL10, где к 14 суткам после введения уже не обнаруживалось патологических изменений, а также снижался уровень антител к коллагену II типа. Группа ДКpIL-10 показала снижение выраженности припухлостей лап, что повлияло на припухлость лап лабораторных животных. При исследовании уровня антител к коллагену II типа в сыворотке, группа ДКpIL-10 не вызвала его снижение. Таким образом, группа ДКpIL-10 может оказывать ранний положительный эффект, но не способна сохранить его для купирования патологической реакции.

В заключение следует отметить, что ДК, трансфицированные ДНК-конструкциями, кодирующими эпитопы коллагена II типа, IL-10 и CCR9, способствуют развитию антиген-специфической толерантности, контролируют воспаление и уменьшают тяжесть экспериментального артрита за счет исследованных механизмов: индукции Т-регуляторных клеток, IL-10, TGF- β .

В исследовании представлен подход, позволяющий модулировать иммунные реакции и воздействовать на аутоиммунные заболевания при помощи ДК, трансфицированных ДНК-конструкциями.

ВЫВОДЫ

1. Трансфекция дендритных клеток, ДНК-конструкциями, кодирующими IL-10, CCR9 и коллаген II типа, способствует снижению уровней экспрессии маркеров зрелости CD80, CD86 и H-2Db, повышению экспрессии CCR9, а также продукции IL-10, что говорит об толерогенном фенотипе полученных дендритных клеток.

2. Трансфекция дендритных клеток, ДНК конструкцией, кодирующей рецептор хемокина CCR9, приводит к повышению миграционной способности к клеткам тимуса *in vitro*, а также к индукции Т-регуляторных при со-культивировании с клетками тимуса, что указывает на миграционный и толерогенный потенциал полученных дендритных клеток.
3. Дендритные клетки, трансфицированные ДНК-конструкциями, кодирующими IL-10, CCR9 и эпитопы коллагена II типа, способны к генерации Т-рег, CD4⁺Т-клеток, продуцирующих IL-10 и TGF- β в совместной культуре ДК и спленоцитов, а также к подавлению пролиферативной активности CD4⁺Т-клеток в ответ на антиген, что свидетельствует об антиген-специфическом толерогенном действии.
4. Введение толерогенных дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими IL-10, CCR9 и эпитопы коллагена II типа, лабораторным животным с антиген-коллаген индуцированным артритом, позволяет снизить выраженность припухлости лап экспериментальных животных, уменьшить уровень антител к коллагену II типа и вызвать регресс гистологических изменений, что может говорить об антиген-специфическом подавлении данной патологической реакции.
5. Дендритные клетки, трансфицированные ДНК-конструкциями, кодирующими IL-10, CCR9 и эпитопы коллагена II типа, способны к индукции антиген-специфической толерантности в модели антиген-коллаген индуцированного артрита, посредством генерации Т-регуляторных клеток, продукции IL-10 и TGF- β CD4⁺Т-клетками, и подавлению коллаген-индуцированной пролиферативной активности CD4⁺Т-клеток, и вызывают уменьшение припухлости лап мышей, снижают уровень антител к коллагену II типа и восстанавливают нормальную гистологическую картину суставов.

Список основных работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи

1. **Фишер М.С.**, Курилин В.В., Терещенко В.П., Булыгин А.С., Кузнецова М.С., Ивлева Е.К., Сенников С.В. Экспериментальная модель антиген- и коллаген-индуцированного артрита у мышей. Иммунология. 2022; 43 (2): 157-165. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2022-43-2-157-165>
2. **Фишер М.С.**, Сенников С.В. Клеточные технологии в иммунотерапии аутоиммунных заболеваний. Иммунология. 2023; 44 (6): 813–824. DOI: <https://doi.org/10.33029/1816-2134-2023-44-6-813-824>
3. **Fisher MS**, Kurilin VV, Bulygin AS, Shevchenko JA, Philippova JG, Taranov OS, Ivleva EK, Maksyutov AZ and Sennikov SV (2024). Dendritic cells transfected with DNA constructs encoding CCR9, IL-10, and type II collagen demonstrate induction of immunological tolerance in an arthritis model. Front. Immunol. 15:1447897. doi: 10.3389/fimmu.2024.1447897

Тезисы материалов конференций

1. **Fisher M**, Kurilin V, Sennikov S. AB0093 MODELING OF ANTIGEN-COLLAGEN-INDUCED ARTHRITIS IN BALB/c MICE. Annals of the Rheumatic Diseases 2022; 81:1178. DOI: 10.1136/annrheumdis-2022-eular.4575. <http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2022-eular.4575>
2. **Фишер М.С.**, Булыгин А.С., Курилин В.В., Хантакова Ю.Н., Сенников С.В. «Индукция Т-рег при экспериментальном коллаген-индуцированном артрите и при трансплантации», XVII Всероссийский научный форум с международным участием имени академика В.И. Иоффе «ДНИ ИММУНОЛОГИИ В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ», 5-8 июня 2023, г. Санкт-Петербург. <http://immundays.spbraaci.ru/docs/ImmDays2023.pdf>
3. **Фишер М.С.**, Булыгин А.С., Курилин В.В., Хантакова Ю.Н., Сенников С.В. Индукция антиген-специфической иммунологической толерантности с помощью Т-регуляторных клеток при коллаген-индуцированном артрите и при трансплантации *in vitro*. DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-383

4. **Фишер М.С.,** Курилин В.В., Сенников С.В. Индукция иммунологической толерантности с помощью толерогенных дендритных клеток при экспериментальном артрите. DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-358.

Список сокращений и условных обозначений

ДК - дендритные клетки
ТолДК – толерогенные дендритные клетки
ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота
IL - интерлейкин
TGF- β - трансформирующий фактор роста бета
CCR9 - рецептор хемокина 9
ЭП - электропорация
СII - коллаген II типа
ККМ - клетки костного мозга
GM-CSF - гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
T-рег - Т-регуляторные клетки
CD - кластер дифференцировки
АКИА - антиген-коллаген индуцированный артрит
МНС - главный комплекс гистосовместимости
pIL10 – плазида (ДНК-конструкция), кодирующая IL10
P5 - ДНК-конструкция, не кодирующая
pCII – ДНК-конструкция, кодирующая коллаген II типа
pCCR9 - ДНК-конструкция, кодирующая CCR9