

ПОРУШЕНИЙ ЦИТОКІНОВИЙ ПРОФІЛЬ ПРИ АД'ЮВАНТНОМУ АРТРИТІ – ТЕРАПЕВТИЧНА МІШЕНЬ ДЛЯ ДЕНДРИТНИХ КЛІТИН, ЩО ОТРИМАНІ З КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ПОПЕРЕДНИКІВ

Г.Г. Кісельова, Т.Г. Дубрава*, А.М. Гольцев

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, Україна

*Corresponding author: tg.dubrava@gmail.com

Received 1 August 2023; Accepted 18 September 2023

Проблематика. Однією з головних причин розвитку ревматоїдного артриту вважається порушення природної толерантності імунної системи до власних антигенів, що супроводжується розбалансуванням цитокінового профілю організму. Перспективним методом корекції такого стану є реабілітація антиген-специфічної толерантності, у формуванні якої беруть участь толерогенні дендритні клітини (толДК).

Мета. Експериментальне обґрунтування можливості коригування цитокінового профілю тварин з ад'ювантним артритом (АА) шляхом застосування толДК із кріоконсервованих попередників кісткового мозку.

Методика реалізації. Дослідження проводили на мишах лінії СВА/Н. Розвиток АА оцінювали за клінічним показником – індексом артриту. Визначали вміст про- (ФНО- α , ІЛ-6, ІФН- γ) і протизапальних (ІЛ-10, ІЛ-4) цитокінів у сироватці крові тварин з АА до та після введення толДК, отриманих із нативних (НатДК) або кріоконсервованих (КріодК) за різними режимами мононуклеарів (МНК) кісткового мозку. На 14-ту добу після індукції АА тваринам внутрішньовенно вводили толДК (5×10^5 клітин на мишу). Через тиждень оцінювали вміст цитокінів у сироватці крові тварин та індекс артриту.

Результати. За розвитку АА спостерігалось односпрямоване підвищення рівня ФНП- α і ІЛ-6 і зниження вмісту протизапальних цитокінів, що супроводжувалося набряком суглобів тварин. КріодК мали більший коригувальний ефект відносно про- і протизапальних цитокінів порівняно з НатДК, що підтверджено зниженням індексу артриту як клінічного прояву патології.

Висновки. Доведено можливість корекції порушеного цитокінового профілю та клінічного стану тварин при розвитку АА шляхом застосування толДК, що отримані з кріоконсервованих МНК кісткового мозку. Відпрацьовано певні умови кріоконсервування МНК, що забезпечують формування з них толДК із більш потужною здатністю порівняно з похідними нативних МНК до коригування цитокінового профілю та клінічного статусу тварин з АА.

Ключові слова: ад'ювантний артрит; цитокіни; мононуклеари кісткового мозку; кріоконсервування; толерогенні дендритні клітини.

Вступ

Ревматоїдний артрит (РА) до теперішнього часу залишається одним із поширених аутоімунних захворювань (АІЗ) [1, 2]. Загальноприйнятою гіпотезою патогенезу АІЗ є порушення природної толерантності імунної системи (ІС) організму до власних антигенів [3, 4]. Вказується на певний перелік тригерів порушення природної толерантності, до якого включено і психоемоційне навантаження на організм [5, 6]. Роль цього фактора як індуктора і “бустера” АІЗ, включаючи РА, істотно зросла останнім часом з огляду на перебування як військових, так і цивільного населення України в умовах воєнного стану [5, 6]. У цілому РА характеризується хронічним системним запаленням, яке супро-

воджується синовітом, руйнуванням хряща, ерозією кістки та її періартикулярною декальцифікацією, що врешті-решт обумовлює порушення функції суглоба та призводить до довічної інвалідизації [3]. Незважаючи на багатовекторність досліджень із визначення причин, механізмів розвитку і лікування РА, багато питань залишаються не до кінця з'ясованими.

Важливою складовою патогенезу РА є дисрегуляція функції ІС на тлі розбалансування цитокінового профілю з підвищенням вмісту прозапальних цитокінів [3]. Вказується на залучення до індукції та підтримки розвитку РА фактора некрозу пухлини (ФНП)- α та інтерлейкіну (ІЛ)-6 [7]. Проте відзначається, що і такі цитокіни, як ІЛ-7, ІЛ-17, ІЛ-21, ІЛ-23, ІЛ-1 β , ІЛ-18, ІЛ-33, ІЛ-2, також відіграють певну роль

на всіх етапах розвитку РА від гострої до хронічної стадії [8].

Традиційними в лікуванні РА залишаються глюкокортикоїди та нестероїдні протизапальні препарати, що переважно контролюють запалення та обумовлюють зменшення больового ефекту [1]. Вони хоча й запобігають прогресуванню запальних реакцій, однак мають небажані побічні ефекти. В переліку препаратів терапії РА згадуються також гідроксихлорохін, метотрексат, лефлуномід, сульфасалазин і препарати інших фармакологічних груп [1, 9]. Наприклад, застосування метотрексату пригнічує продукцію ФНП- α , ІЛ-6, ІЛ-1 β , ІЛ-17 та інших прозапальних цитокінів, однак не завжди приводить до стійкого покращення стану пацієнтів з АІЗ і може викликати низку серйозних, навіть непередбачуваних побічних ефектів. На жаль, не всі пацієнти демонструють позитивну реакцію на протиревматичні препарати, що висуває нові вимоги до спеціальних мішеней і нових методів лікування [9]. На теперішній час розробляється широкий спектр інноваційних лікарських препаратів, включаючи моноклональні антитіла (МАТ) і рекомбінантні білки, що блокують активність прозапальних цитокінів. До них можна віднести інгібітори ФНП- α , а саме етанерцепт, інфліксимаб, адалімумаб тощо [1]. Інфліксимаб і етанерцепт пригнічують зв'язування ФНП- α з ацептуєчими їх рецепторами на клітинах та інгібують цитотоксичну реакцію. Однак застосування вказаних анти-ФНП-МАТ покращує перебіг захворювання тільки на ранній стадії. Селективне блокування медіаторів запалення з використанням цих препаратів нерідко асоціюється з “первинною” неефективністю, “вторинною” резистентністю, розвитком генералізованої імуносупресії, парадоксальною активацією аутоімунного процесу та обтяженням перебігу супутніх захворювань [2]. У роботі G. George та співавт. [2] вказується також на можливість лікування РА із застосуванням інгібіторів янус-кінази JAK (Janus family tyrosine kinase), МАТ до рецептора ІЛ-6, рекомбінантного інгібітора ІЛ-1 – анакінра та блокатора костимуляції – абатацепта. Особливий інтерес становить вивчення клінічної ефективності селективного блокування трансигналізації ІЛ-6 за допомогою розчинного gp130 рекомбінантного білка (оламкицепта) або МАТ, що пригнічують зв'язування gp130 із комплексом ІЛ-6/ІЛ-6Р [10].

На жаль, перелічені підходи до лікування РА супроводжуються небажаними побічними ефектами, а іноді пацієнти з РА не демонстру-

ють клінічної відповіді на застосування зазначених препаратів [2].

Експериментальні й клінічні нароби надають додаткову інформацію відносно “імунного фону” при розвитку РА [2, 11]. Особливе місце в його формуванні займає дисфункція Т-регуляторної ланки імунітету. Відомо, що Т-регуляторні клітини (Трег) є одним із найголовніших складових елементів супресорної ланки ІС ссавців [12]. Ці клітини продукують протизапальні медіатори та цитокіни (ІЛ-10, ІЛ-35, ТРФ- β , galectin-1 тощо) або чинять пряму цитотоксичну дію відносно ефекторних клітин шляхом продукції гранзиму В і перфоринів [13]. Відомо, що розвиток таких АІЗ, як РА, розсіяний склероз, хвороби кишківника, системний червоний вовчак та інші, супроводжує гіперпродукція запального ІЛ-17 Тh17-клітинами [14]. Важливо, що як ініціації, так і підтримці розвитку АІЗ сприяє саме дисбаланс про- та протизапальних цитокінів, обумовлений зміною кількості або функції антиподних субпопуляцій Тh17 і Трег [15].

Розроблені протягом останніх років стратегії лікування РА, які покращили перебіг захворювання в пацієнтів, нині удосконалюються. Більшість із них досягають ремісії клінічних проявів. Мова йде про можливість корекції цитокінового профілю організму за допомогою таких клітинно-тканинних терапевтичних препаратів, як мезенхімальні стромальні клітини, Трег, а також толерогенні дендритні клітини (толДК) [1, 16, 17]. Так, толДК здатні стимулювати й відновлювати функцію Трег опосередковано через ІЛ-10, індоламін-2-3-діоксигеназу (ІДО), трансформуючий ростовий фактор – бета (ТРФ- β). Це приводить до інгібіції активованих Т-лімфоцитів, пригнічення їх проліферації та перепрофілювання наївних Т-клітин на Трег із супресорною функцією, що сприяє зниженню рівня прозапальних цитокінів і клінічного стану хворих у цілому [18, 19]. На жаль, дослідження щодо застосування толДК у клінічній практиці при лікуванні хворих з РА є поодинокими, а механізми реалізації їх імуноригувальної дії достеменно не з'ясовані.

Суттєвою складовою використання толДК у клінічній практиці, а саме в терапії РА, є розробка ефективних технологій їх кріоконсервування і зберігання з метою використання за необхідності. Оскільки толДК є дуже вразливими до дії факторів кріоконсервування [20], очевидно є необхідність пошуку більш кріостійких клітин-попередників, з яких можливо

in vitro отримувати ДК. Потенційним джерелом є мононуклеарні клітини (МНК), а також моноцити периферичної, кордової крові або кісткового мозку [21]. З огляду на це актуальною є розробка адекватних способів кріоконсервування МНК для отримання з них ДК із толерогенним потенціалом з метою подальшого клінічного використання при лікуванні АІЗ. При цьому на значну увагу заслуговує вивчення особливостей впливу ультранизьких температур на механізми формування та реалізації толерогенної активності ДК за цих захворювань.

Метою роботи було експериментальне обґрунтування можливості коригування цитокінового профілю тварин з АА шляхом застосування толерогенних ДК, що отримані з кріоконсервованих попередників кісткового мозку.

Матеріали і методи

Експерименти виконували на мишах лінії СВА/Н 20-тижневого віку, які були отримані з підприємства “Біомодельсервіс”, м. Київ, із подальшим розведенням у стандартних умовах віварію Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. Дослідження проводили відповідно до “Загальних принципів експериментів на тваринах”, схвалених V Національним конгресом з біоетики (м. Київ, 2013 р.) і погоджених із положеннями “Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей” (Страсбург, 1986 р.), а також відповідно до Висновку комісії Комітету з біоетики при Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (протокол № 3 від 1 червня 2023 р.).

Кістковий мозок вимивали зі стегових кісток мишей середовищем RPMI-1640 (Biowest, Франція) з додаванням 3 % ембріональної телячої сироватки – ETC (Biowest, Франція) і 2 % цитрату натрію (Sigma-Aldrich, США) (далі в тексті – робоче середовище). Після цього суспензію клітин кісткового мозку пропускали через нейлоновий фільтр із діаметром пор 100 мкм (Falcon, США), центрифугували за 300g протягом 10 хв і ресуспендували в робочому середовищі. Мононуклеарні клітини (МНК) виділяли за допомогою центрифугування суспензії КМ у градієнті щільності (1,077 г/мл) Тразографа (Юнік Фармасьютикал Лабораторіз, Індія) [22].

Кріоконсервування МНК здійснювали в кріопробірках Nunc об'ємом 1,8 мл (Thermo scientific, Данія) під захистом 10 %-вого диметилсульфоксиду (ДМСО) зі швидкістю 1 град/хв

за двома режимами: P1 (загальноприйнятий) – до $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$; P2 (теоретично обґрунтований авторами статті) – до $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, із подальшим зануренням в обох випадках у рідкий азот $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (відповідно: КріоP1МНК і КріоP2МНК) [17]. Зразки відігрівали на водяній бані за температури $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ до зникнення твердої фази. Клітини одноразово відмивали від ДМСО шляхом повільного додавання подвійного об'єму робочого середовища та подальшого 10-хвилинного центрифугування (300g). Після видалення надосаду осад ресуспендували в робочому середовищі.

Одразу після розморожування КріоP1- та КріоP2МНК культивували протягом 7-ми діб у середовищі RPMI-1640 із додаванням 10 % ембріональної телячої сироватки, мишачих рекомбінантних GM-CSF (Sigma-Aldrich, Англія) і ІЛ-4 та дексаметазону (Sigma-Aldrich, Англія) [17]. Із кріоконсервованих за різними режимами МНК було отримано *in vitro* КріоP1ДК і КріоP2ДК відповідно. Як контроль використовували ДК, що отримані з нативних МНК (НатДК). Приналежність ДК, що отримані *in vitro*, до незрілих толерогенних була підтверджена за експресією характерних фенотипових маркерів на проточному цитофлуориметрі FACS Calibur (Becton Dickinson, США) із використанням моноклональних антимишачих антитіл: CD11b (FITC), CD14 (FITC), CD83 (FITC), CD80 (FITC) і CD86 (FITC) (BD Biosciences, США) [22].

Ад'ювантний артрит (АА) індукували в мишей лінії СВА/Н субплантарним введенням повного ад'юванта Фрейнда (ПАФ) в об'ємі 0,1 мл на мишу (Santa Cruz, USA). Тяжкість клінічного перебігу АА у тварин оцінювали за допомогою індексу артриту (ІА) [11], який є відношенням довжини окружності дослідного суглоба до окружності контрольного – контрлатерального. У здорових тварин ІА покладався за “1,0”.

Вміст запальних медіаторів визначали в сироватці крові тварин з АА: серомукоїда – турбодиметричним методом за допомогою набору реактивів (ТОВ “НПП Філісит-Діагностика”, Україна) відповідно до інструкції виробника й оцінювали в одиницях помутніння (S-N) за Shank і Hoagland; сіалових кислот – за методом Гессе й оцінювали в умовних одиницях [23].

Дендритні клітини, які були вирощені *in vitro* з нативних або кріоконсервованих МНК, вводили внутрішньовенно тваринам з АА у дозі 5×10^5 клітин на мишу в 0,2 мл робочого середовища на 14-ту добу розвитку АА [17]. Через 7 діб після введення ДК визначали ІА і вміст цитокінів у сироватці крові тварин з АА.

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

З метою більш показової оцінки цитокінового профілю було введено коефіцієнт (ум. од.) зміни продукції цитокінів, що є співвідношенням їх вмісту (пікограм на мілілітр) на різних етапах розвитку АА, а також після введення різних видів ДК тваринам із патологією, до відповідного показника в інтактному контролі, який покладался за "1".

Статистична обробка даних проводилася з використанням пакета програм SPSS (Statistics 17.0, США). У кожній групі кількість тварин становила $n = 7$. 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

Найбільш суттєвою ознакою клінічного прояву АА у гризунів є набряк регіонального до місця введення ПАФ суглоба, який характеризується як ІА (рис. 1а). Максимального значення ІА набував на 7-му добу після індукції патології ($1,70 \pm 0,058$), після чого відзначалося його повільне зниження, хоча протягом усього

строку спостереження він залишався значно вищим за контрольний показник.

Відомо, що РА супроводжується деструкцією сполучної тканини суглобів, до складу якої входять глікопротеїни, рівень яких визначають за вмістом сіалових кислот і серомукоїдів. Дійсно, вже на 7-му добу після індукції АА в сироватці крові тварин максимально збільшувався вміст серомукоїдів і сіалових кислот (рис. 1б), що збіглося з максимальним показником ІА. У подальший період ці показники знижувалися, однак до 28-ї доби залишалися вище рівня контрольних значень.

Дані на рис. 2 свідчать про суттєвий дисбаланс про- і протизапальних цитокінів, що супроводжує перебіг запальної реакції у тварин з АА.

Так, з 7 до 21-ї доби розвитку патології концентрація прозапальних цитокінів ФНП- α , ІЛ-6 достовірно перевищувала показники тварин контрольної групи (рис. 2а). Несподівано, але рівень ІФН- γ ні в один із термінів спостереження не перевищував контрольні показники. Максимальні значення вмісту ФНП- α , ІЛ-6, що були вищими за контрольні та визначалися коефіцієнтом зміни продукції цих цитокінів, який становив 3,65 і 2,82 ум. од. відповідно, визначалися на 21-шу добу розвитку патології (рис. 2а, табл. 1). У цей же термін відзначався і максимальний сумарний коефіцієнт зміни продукції прозапальних цитокінів (7,26 ум. од.) порівняно з контрольним (3 ум. од.).

На 28-му добу рівень кожного з прозапальних цитокінів знижувався, але з різним ступенем. Для ІФН- γ ці зміни були неістотними, тоді як зниження вмісту ФНП- α і ІЛ-6 було більш вираженим, причому концентрація ІЛ-6 і

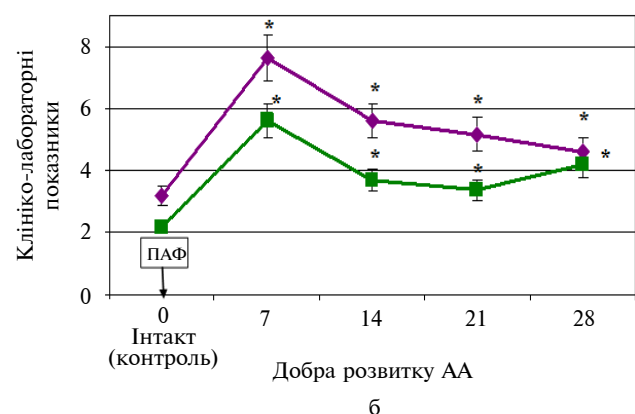
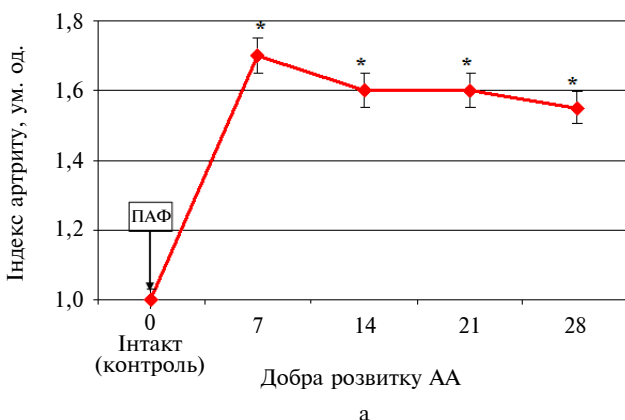


Рисунок 1: Динаміка зміни клініко-лабораторних показників при ад'ювантному артриті (АА): (а) індекс артриту (ІА); (б) вміст серомукоїдів і сіалових кислот у сироватці крові тварин (—◆— серомукоїди, ум. од., —■— сіалові кислоти, ммоль/л). ПАФ – повний ад'ювант Фрейнда; ІА в інтактних тварин покладался за "1"; * – показники мають статистично значущі відмінності від групи інтактних тварин (контроль) ($p < 0,05$)

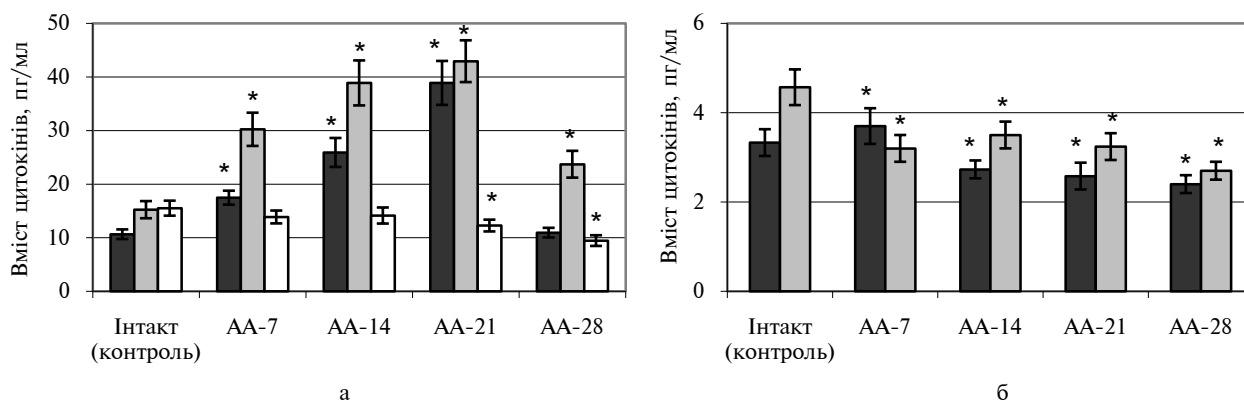


Рисунок 2: Вміст (а) прозапальних (■ – ФНП-α, □ – ІЛ-6, □ – ІФН-γ) і (б) протизапальних (■ – ІЛ-4, □ – ІЛ-10) цитокінів у сироватці крові тварин на різних етапах розвитку ад'ювантного артриту; * – показники мають статистично значущі відмінності від групи інтактних тварин (контроль) ($p < 0,05$)

Таблиця 1: Коефіцієнти зміни продукції цитокінів у сироватці крові тварин у динаміці розвитку ад'ювантного артриту

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

Примітка. Коефіцієнт (ум. од.), що характеризує зміну продукції цитокінів у сироватці крові тварин, є співвідношенням вмісту цитокінів у пікограмах на мілілітр на різних етапах розвитку ад'ювантного артриту до відповідного показника в інтактному контролі, покладался за "1".

в цей термін залишалася на майже в півтора разу вищому рівні, ніж у контролі (рис. 2а, табл. 1). З урахуванням збереження в цей термін ознак розвитку АА (ІА – $1,55 \pm 0,01$) і підвищеного рівня в сироватці крові серомукоїдів (рис. 1 а, б) очевидно є роль ІЛ-6 як ключового гравця підтримки запальних процесів при розвитку АА.

Як вказувалося вище та видно з рис. 2б і табл. 1, на фоні підвищення рівня прозапальних ІЛ-6 і ФНП-α розвиток АА супроводжувався достовірним зниженням рівня протизапальних цитокінів – ІЛ-4 та ІЛ-10 на всіх етапах спостереження (за винятком ІЛ-4 на 7-му добу). При цьому на 28-му добу коефіцієнт зміни продукції ІЛ-4 та ІЛ-10 порівняно з контролем становив 0,72 і 0,59 ум. од. відповідно (табл. 1). Порівняльний аналіз свідчить про те, що і наприкінці терміну спостереження розвитку АА

(28-ма доба) концентрація прозапальних цитокінів майже в 2,5 разу перевищувала концентрацію протизапальних.

Застосування імунотерапії у вигляді різних видів ДК продемонструвало насамперед здатність ДК мінімізувати прояви розвитку АА (рис. 3). Так, через тиждень після введення ДК (21-ша доба розвитку патології), що отримані як з нативних, так і з кріоконсервованих за різними режимами МНК, ІА як основний клініко-діагностичний показник АА знижувався. При цьому лікувальний ефект ДК, що отримані з кріоконсервованих попередників, переважав ефект ДК, отриманих із нативних МНК. Максимальне зниження ІА відбувалося після введення КріоР2ДК ($1,16 \pm 0,02$ ум. од.).

Вміст сіалових кислот і серомукоїдів у сироватці крові тварин з АА через тиждень після

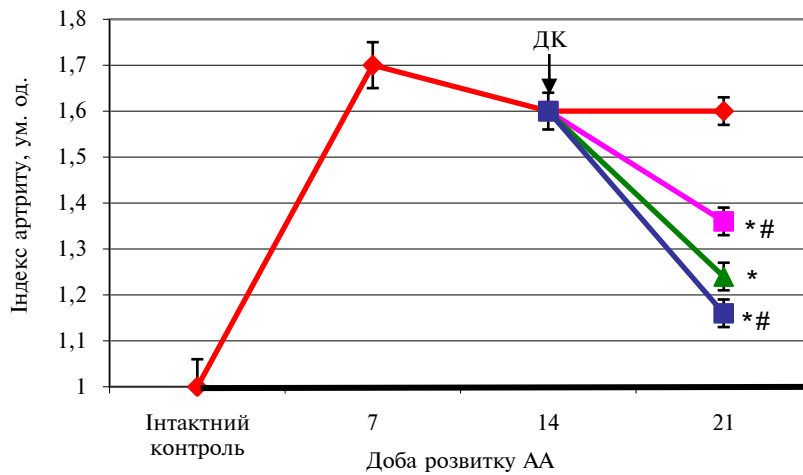


Рисунок 3: Індекс артриту (ІА) у тварин з ад’ювантним артритом (АА) до та після введення дендритних клітин (ДК), що отримані *in vitro* з нативних або кріоконсервованих за різними режимами мононуклеарів. ДК вводили на 14-ту добу розвитку АА. ІА оцінювали через 7 діб (21-ша доба розвитку патології) після введення ДК; * – показники мають статистично значущі відмінності від групи тварин з АА; # – від групи тварин з АА + КріоР1ДК ($p < 0,05$); ІА у інтактних тварин (інтактний контроль) покладался за “1”

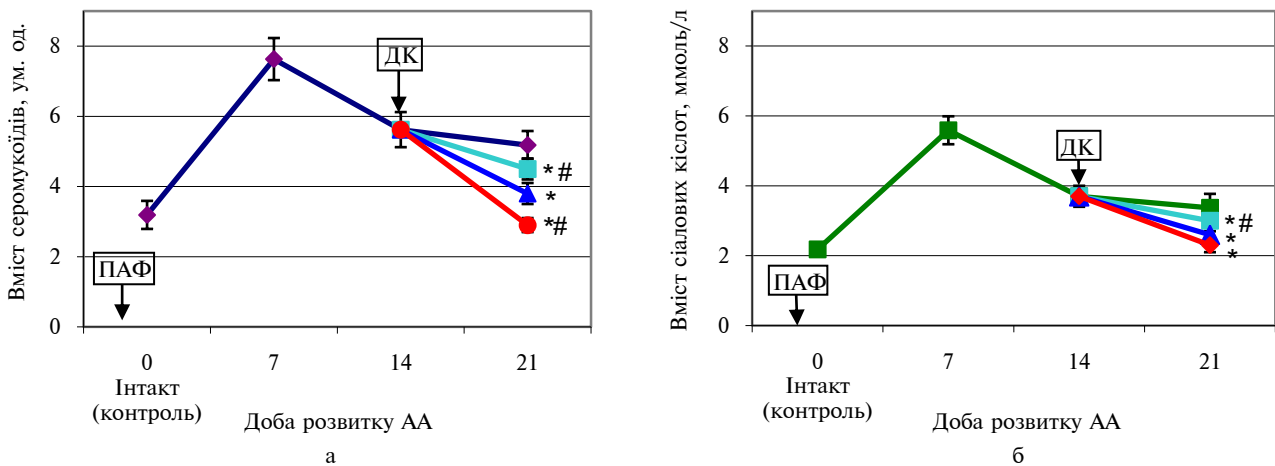


Рисунок 4: Динаміка зміни клініко-лабораторних показників у тварин з ад’ювантним артритом (АА) після ДК-терапії: (а) вміст серомукоїдів (—♦— АА, —■— +НатДК, —▲— +КріоР1ДК, —●— +КріоР2ДК) і (б) сіалових кіслот у сироватці крові тварин (—■— АА, —■— +НатДК, —▲— +КріоР1ДК, —●— +КріоР2ДК). ПАФ – повний ад’ювант Фрейнда; ДК – дендритні клітини; * – показники мають статистично значущі відмінності від групи тварин з АА; # – від гр. тварин + КріоР1ДК ($p < 0,05$)

ДК-терапії також максимально знижувався після введення КріоР2ДК (рис. 4 а, б), що збіглося і з максимальним зниженням ІА в цій групі тварин (див. рис. 3).

Зіставлення показників цитокінового профілю з ІА та клініко-лабораторними показниками як тест-система оцінки ефективності лікування АА свідчить, що найкращий терапевтичний ефект спостерігався за максимального зниження запальних ІЛ-6 і ФНП- α та максимального зростання протизапальних ІЛ-4 й ІЛ-10. Саме такого рівня корекція відбувалася після застосування ДК, отриманих із МНК,

кріоконсервованих за режимом Р2. При цьому слід відзначити перевагу коригувального ефекту цитокінового профілю обох видів КріоДК над НатДК. Насамперед це стосується зниження рівня ІЛ-6 (рис. 5а і табл. 2). Крім того, порівняння між собою коригувального ефекту КріоДК свідчить про перевагу КріоР2ДК не тільки в корекції, але і в співвідношенні гармонізації складу ключових прозапальних цитокінів. Привертає до себе увагу підвищення концентрації ІФН- γ після введення ДК порівняно з показниками нелікованих тварин. Із точки зору лікувального ефекту вкрай важливим був

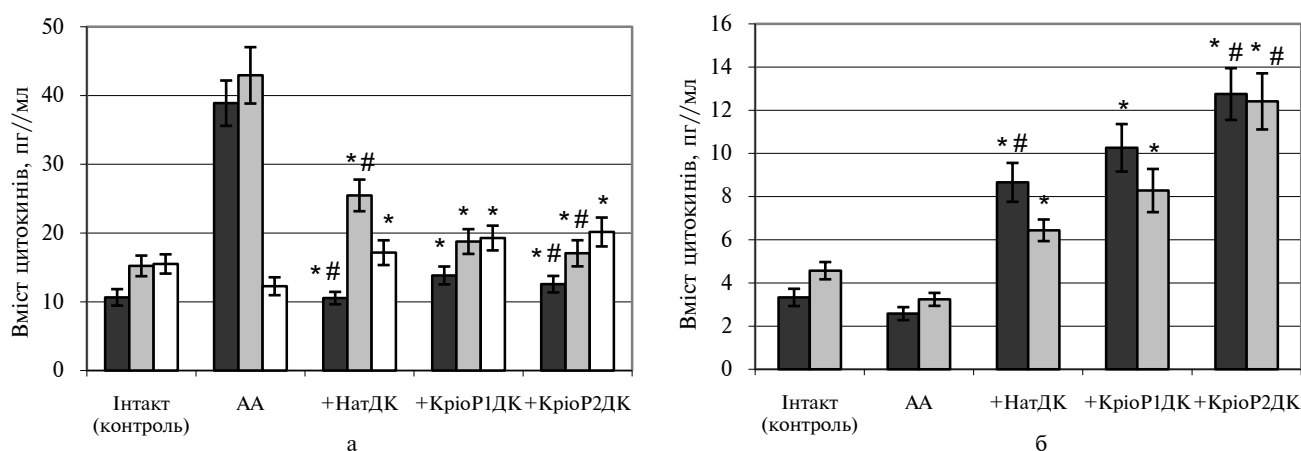


Рисунок 5: Вміст (а) прозапальних (■ – ФНП- α □ – ІЛ-6, □ – ІФН- γ) і (б) протизапальних (■ – ІЛ-4 □ – ІЛ-10) цитокінів у сироватці крові тварин з ад'ювантним артритом (АА) до та після введення НатДК або КріоДК. Дендритні клітини (ДК) вводили на 14-ту добу розвитку АА. Вміст цитокінів оцінювали через 7 діб (21-ша доба розвитку патології) після введення ДК; * – показники мають статистично значущі відмінності від групи тварин з АА; # – від гр. тварин з АА + КріоР1ДК ($p < 0,05$)

Таблиця 2: Коефіцієнти зміни продукції цитокінів в сироватці крові тварин до та після різних видів дендритноклітинної терапії

Показник, ум. од.	Інтактний контроль	Ад'ювантний артрит	НатДК	КріоР1ДК	КріоР2ДК
ФНП- α	1	3,65	0,99	1,3	1,18
ІЛ-6	1	2,82	1,67	1,21	1,12
ІФН- γ	1	0,79	1,11	1,24	1,30
Сумарний коефіцієнт зміни продукції прозапальних цитокінів	3	7,26	3,77	3,75	3,6
ІЛ-4	1	0,77	2,60	3,08	3,83
ІЛ-10	1	0,71	1,41	1,81	2,71
Сумарний коефіцієнт зміни продукції протизапальних цитокінів	2	1,48	4,01	4,89	6,54

Примітка. Коефіцієнт (ум. од.), що характеризує зміну продукції цитокінів у сироватці крові тварин до та після введення нативних (НатДК) або кріоконсервованих дендритних клітин (КріоР1ДК, КріоР2ДК), є співвідношенням вмісту цитокінів у пікограмах на мілілітр у кожній групі до відповідного показника в інтактному контролі, який покладалася за "1".

стимулювальний вплив ДК на протизапальні цитокіни (рис. 5б). Україй важливо, що всі три види ДК (Нат-, КріоР1- і КріоР2ДК) більшою мірою стимулювали продукцію протизапальних цитокінів, ніж інгібували продукцію прозапальних цитокінів, про що свідчать сумарні коефіцієнти зміни продукції цитокінів (табл. 2). І в цьому випадку КріоР2ДК мали перевагу над КріоР1ДК. Так, КріоР2ДК втричі порівняно з інтактним контролем підвищували вміст ІЛ-4 і ІЛ-10 у сироватці тварин з АА (рис. 4б, табл. 2), що супроводжувалося, як зазначалося вище, максимальним зниженням ІА (див. рис. 3).

Обговорення

До теперішнього часу АІЗ залишаються серйозною медичною і соціальною проблемою багатьох держав світу. Агравация ситуації обумовлюється також неоднозначністю етіологічних факторів розвитку АІЗ і неординарністю їх клінічної маніфестації [1, 4, 24]. Враховуючи відсутність достатньо ефективних методів лікування АІЗ, очевидно є необхідність удосконалення методології та методів їх діагностики, а також пошуку і впровадження передових технологій терапії. Серед широкого спектра біоло-

гічних сполук, що мають патогенетичне значення в ініціації та підтримці розвитку АІЗ, а також є свідками їх агресивності, особливе місце посідають цитокини [11, 24]. Цитокинам відводиться ключова роль в аранжуванні як “гармонічного” стану, так і зрушень функції ІС. Плюріпотентність взаємодії цитокинів з ІКК обумовлена безліччю факторів, а саме їх кількісним рівнем, репертуаром і ступенем експресії рецепторів на клітинах, а також здатністю активувати або пригнічувати синтез інших цитокинів [24, 25]. Наприклад, при РА діагностично значущим є ступінь зміни концентрацій цитокинів у сироватці крові пацієнтів на тлі розвитку імунної реакції у вогнищі запалення [3].

Використання АА як експериментальної моделі РА [26] дає можливість вирішити питання відносно особливостей розвитку цієї патології та методів її лікування ДК, що отримані *in vitro* з кріоконсервованих попередників кісткового мозку.

Результати наших досліджень показали збіг динаміки зміни лабораторно-діагностичних показників зі змінами клінічної маніфестації АА за ІА, що узгоджується з даними інших авторів [27, 28]. Так, розвиток запального процесу після 7-ї доби супроводжувався деяким зниженням показників ІА, серомукоїдів і сіалових кислот, які, однак, залишалися вище рівня контрольних значень, що свідчить про хронічний розвиток запального процесу при цій патології. Це узгоджується з даними [2], які вказують на факт хронізації запалення за РА, обумовленого зростанням кількості активованих у процесі хрящової та кісткової деструкції тканинних фібробластів, хондроцитів і остеобластів. Доречно додати, що як активація запального процесу, так і реалізація ефекторних функцій ІКК при РА неможливі без участі широкого спектра цитокинів [3, 29, 30]. Виходячи з цього, оцінка цитокінового профілю організму при розвитку РА і подібних захворювань є вкрай актуальною з точки зору як кращого розуміння патогенезу цих захворювань, так і удосконалення стратегії їх лікування [3, 25, 30].

На експериментальній моделі АА доведено кореляцію між ступенем тяжкості перебігу запальної реакції в суглобах тварин і системним дисбалансом про- та протизапальних цитокинів [11, 30]. Клінічні спостереження свідчать, що основними патогенетично значущими прозапальними цитокинами-індукторами розвитку та підтримки РА є ФНП- α і ІЛ-6 [30], тоді

як протизапальні цитокини ІЛ-10 і ІЛ-4 сповільнюють запалення та деструкцію суглобів [31].

Результати нашого дослідження свідчать про позитивну кореляцію зростання концентрації ФНП- α і ІЛ-6 з клінічними ознаками розвитку АА, що узгоджується з характером їх змін при розвитку РА та подібних АІЗ [32]. У роботі Yu. Yoshida і T. Tanaka [32] підкреслюється, що головна роль синтезу більшості гострофазових білків у печінці відводиться ІЛ-6, тоді як ФНП- α меншою мірою причетний до стимуляції синтезу окремих білків, хоча і в цьому випадку він діє опосередковано через ІЛ-6. Наші дані також свідчать про превалюючу концентрацію ІЛ-6 порівняно з ФНП- α у сироватці крові тварин з АА у всі терміни визначення, що підкреслює ключову роль ІЛ-6 у підтримці запальних процесів при розвитку АА. Це узгоджується з результатами клінічних досліджень, у яких визначено високий рівень ІЛ-6 і ФНП- α у синовіальній рідині та сироватці крові пацієнтів з РА [33]. Несподівано, але рівень прозапального ІФН- γ у всі терміни спостереження не перевищував показники інтактного контролю. При цьому відомо, що ІФН- γ здатен активувати апоптотичні процеси, обумовлюючи опосередковано, через механізми стимуляції ІДО, формування Трег, які інгібують Th17-клітини [28]. До того ж в експериментальних моделях АІЗ показано, що за низьких рівнів ІФН- γ або рецепторів до нього на клітинах збільшується сприйнятливість до запальних процесів і їх тяжкість [34]. Відомо також, що рівень мРНК ІФН- γ був знижений у тканинах суглобів мишей із колаген-індукованим артритом [34]. Складається враження, що залежно від умов навколишнього середовища та концентрації ІФН- γ може реалізувати неоднотипні ефекти. Тобто встановлене нами зниження порівняно з контролем рівня ІФН- γ у сироватці крові тварин на всіх етапах розвитку АА може бути цілком не парадоксальним і повинно враховуватися в клінічній практиці. Не викликає сумніву, що вивчення ролі все більшої кількості цитокинів, залучених у розвиток запального процесу аутоімунного генезу, сприяє кращому розумінню механізмів розвитку АІЗ і вдосконаленню заходів їх лікування.

Перспективним методом корекції стану ІС при АІЗ є формування антиген-специфічної толерантності, одним зі складових компонентів формування якої є ДК із толерогенною активністю [35]. На сьогодні в клінічній практиці трендовими є пілотні проекти щодо застосу-

вання толДК при лікуванні РА [21, 36, 37]. Уже проведені випробування толерогенної ДК-терапії у пацієнтів I фази з аутоімунними захворюваннями. У багатьох випадках продемонстровані безпека й добра переносимість без відповідних побічних ефектів [35–37]. Проте залишається обов'язковим з'ясування питань їх отримання, оцінки здатності функціонування в умовах організму з різним цитокиновим профілем і реалізації механізму імунокоригувальної дії [22, 36, 37].

Наявні знання щодо ролі цитокинового профілю організму й цитокинів, що його складають і залучені до розвитку РА, будуть сприяти підвищенню ефективності лікування цієї патології в майбутньому.

Результати представленної роботи свідчать про можливість коригування цитокинового профілю тварин з індукованим АА за допомогою ДК, що отримані з кріоконсервованих попередників. Доведена перевага таких ДК у реалізації лікувального ефекту порівняно з похідними нативних попередників. Так, обидва види КріюДК більшою мірою, ніж НатДК, коригували рівень про- і протизапальних цитокинів, а також показників клінічного стану тварин з АА. Застосування таких ДК супроводжувалося синхронізацією позитивних змін лабораторно-діагностичних показників: сермукоїдів, сіалових кислот й ІА – клінічного показника маніфестації АА.

Важливим є факт інгібіції під впливом ДК-терапії продукції прозапальних ФНП- α і ІЛ-6, а саме формування більш “гармонізованого” їхнього профілю, наближеного до контрольних показників (див. рис. 5а, табл. 2). Привертає до себе увагу сильніший прояв цього ефекту при введенні КріюДК порівняно з НатДК. Більше того, певні умови кріоконсервування (Режим 2) попередників кісткового мозку сприяли формуванню ДК із максимальним коригувальним ефектом серед усіх ДК.

Особливу увагу привертає до себе потенціал толДК підвищувати у тварин з АА рівень протизапальних цитокинів ІЛ-4 і ІЛ-10. При цьому зіставлення показників інгібіції прозапальних і стимуляції протизапальних цитокинів після толДК-терапії свідчить про їхню здатність не тільки реалізувати різноспрямовану активність відносно цих цитокинів, але і визначати ступінь цієї активності. Отримані результати свідчать, що сумарний коефіцієнт зміни продукції прозапальних цитокинів після ДК-терапії знижувався від 3,77 (НатДК) до

3,6 ум. од. (КріюР2ДК), тоді як для протизапальних цитокинів цей показник підвищувався від 4,01 (НатДК) до 6,54 ум. од. (КріюР2ДК). Тобто лікувальний процес у тварин з АА при застосуванні толДК реалізується двоспрямовано, а саме інгібіцією продукції прозапальних цитокинів і стимуляцією протизапальних. Раніше ми довели, що така ситуація супроводжується підвищенням в організмі тварин з АА як вмісту, так і функціонального потенціалу Трег-клітин, що обумовлює стимуляцію продукції ІЛ-10 [38]. Наші результати узгоджуються з даними J.E. Park і співавт. [39], які отримані в експериментальній моделі колаген-індукованого артриту при введенні нативних толДК. Автори показали пригнічення прогресування артриту на фоні активації формування Трег і зниження антиген-специфічної активації Th1- та Th17-клітин.

У світлі встановленого “несподіваного” зниження вмісту ІФН- γ при розвитку АА важливим є підвищення концентрації цього цитокіна після застосування ДК на фоні покращення клінічних показників у тварин. Наші дані збігаються з результатами досліджень Y. Yang і співавт. [40], у яких продемонстровано зниження ступеня тяжкості РА на фоні підвищення рівня ендогенного ІФН- γ .

Таким чином, виконана робота доводить ефективність застосування толДК, отриманих із кріоконсервованих попередників, у лікуванні АА. Підкреслені переваги застосування кріоконсервованих толДК порівняно з нативними в корекції вмісту в тварин з АА як запальних, так і протизапальних цитокинів, а також показників їх клінічного стану. Отримані в роботі результати доцільно взяти до уваги за розробки та впровадження методів клітинно-тканинної терапії в клінічну практику для лікування АІЗ, зокрема РА. Представлений матеріал демонструє можливість використання ультранизьких температур як “інструмента”, що здатний спрямовано керувати толерогенним потенціалом ДК, отриманих із клітин-попередників.

Висновки

На моделі АА, індукованого введенням повного ад'юванта Фрейнда мишам, доведено здатність толДК, що отримані з кріоконсервованих попередників кісткового мозку, коригувати порушений цитокиновий профіль і, як наслідок, клінічний стан тварин. Встановлено переваги КріюДК у прояві визначених якостей порівняно з НатДК.

Відпрацьовано певні умови кріоконсервування МНК кісткового мозку, що забезпечують формування з них толДК із більшою здатністю, порівняно з похідними нативних МНК, до коригування цитокінетичного профілю та клінічного статусу тварин з АА.

Фінансування

Робота виконана у відділі кріопатофізіології і імунології Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України в рамках науково-дослідної роботи “Вивчення механізмів активації толерогенної активності дендритних клітин під впливом кріоконсервування і компо-

нентів кордової крові” за кошти державного бюджету України, № ДР 0117U000852.

Подяки

Автори висловлюють подяку Павлу Михайловичу Зубову (відділ кріоцитології і кількісної морфології ІПКіК НАН України) за допомогу при виконанні роботи на проточному цитофлуориметрі.

Розкриття інтересів

Автори не заявляють про наявність конфлікту інтересів до розкриття.

References

- [1] Abbasi M, Mousavi MJ, Jamalzei S, Alimohammadi R, Bezvan MH, Mohammadi H, Aslani S. Strategies toward rheumatoid arthritis therapy; the old and the new. *J Cell Physiol.* 2019;234(7):10018-31. DOI: 10.1002/jcp.27860
- [2] George G, Shyni GL, Raghu KG. Current and novel therapeutic targets in the treatment of rheumatoid arthritis. *Infammopharmacology.* 2020;28:1457-76. DOI: 10.1007/s10787-020-00757-9
- [3] Kondo N, Kuroda T, Kobayashi D. Cytokine networks in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Int J Mol Sci.* 2021;22(20):10922. DOI: 10.3390/ijms222010922
- [4] McInnes IB, Schett G. Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet.* 2017; 389(10086):2328-37. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)31472-1
- [5] Song H, Fang F, Tomasson G, Arnberg FK, Mataix-Cols D, Fernández de la Cruz L, et al. Association of stress-related disorders with subsequent autoimmune disease. *JAMA.* 2018;319(23):2388-400. DOI: 10.1001/jama.2018.7028
- [6] Kessler RC, Aguilar-Gaxiola S, Alonso J, Benjet C, Bromet EJ, Cardoso G, et al. Trauma and PTSD in the WHO world mental health surveys. *Eur J Psychotraumatol.* 2017;8(sup5):1353383. DOI: 10.1080/20008198.2017.1353383
- [7] Clavel C, Nogueira L, Laurent L, Iobagiu C, Vincent C, Sebbag M, Serre G. Induction of macrophage secretion of tumor necrosis factor through Fc receptor IIa engagement by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated proteins complexed with fibrinogen. *Arthritis Rheum.* 2018;58:678-88. DOI: 10.1002/art.23284
- [8] Yokoyama Y, Iwasaki T, Kitano S, Satake A, Nomura S, Furukawa T, et al. IL-2-Anti-IL-2 Mono-clonal antibody immune complexes inhibit collagen induced arthritis by augmenting regulatory T cell functions. *J Immunol.* 2018;201(7):1899-906. DOI: 10.4049/jimmunol.1701502
- [9] Huang J, Fu X, Chen X, Li Zh, Huang Yu, Liang Ch. Promising therapeutic targets for treatment of rheumatoid arthritis. *Front Immunol.* 2021;12:686155. DOI: 10.3389/fimmu.2021.686155
- [10] Liu X, Jones GW, Choy EH, Jones SA. The biology behind interleukin-6 targeted interventions. *Curr Opin Rheumatol.* 2016;28(2):152-60. DOI: 10.1097/BOR.0000000000000255
- [11] Goltsev AM, Lutsenko OD, Yampolska KY, Gaevska YO, Bondarovich MO, Ostankova LV, et al. Correction of cytokine profile in autoimmune diseases with cryopreserved embryofetoplacental complex products. *Probl Cryobiol Cryomed* 2022;32(2):121-33. DOI: 10.15407/cryo32.02.121
- [12] Dominguez-Villar M, Hafler DA. Regulatory T cells in autoimmune disease. *Nat Immunol.* 2018;19(7):665-73. DOI: 10.1038/s41590-018-0120-4
- [13] Wang YA, Li XL, Mo YZ, Fan CM, Tang L, Xiong F, et al. Effects of tumor metabolic microenvironment on regulatory T cells. *Mol Cancer.* 2018 Nov 26;17(1):168. DOI: 10.1186/s12943-018-0913-y
- [14] Shmerling RH. Autoimmune disease and stress: Is there a link? [Internet] Harvard Health Publishing; 2020 [cited 2023 Jul 25]. Available from: <https://www.health.harvard.edu/blog/autoimmune-disease-and-stress-is-there-a-link-2018071114230>
- [15] Paradowska-Gorycka A, Wajda A, Romanowska-Prochnicka K, Walczuk E, Kuca-Warnawin E, Kmiolek T, et al. Th17/Treg-related transcriptional factor expression and cytokine profile in patients with rheumatoid arthritis. *Front Immunol.* 2020;11:572858. DOI: 10.3389/fimmu.2020.572858

- [16] Vvedenskiy D, Volkova N, Babenko N, Gaevska Y, Yukhta M, Goltsev AM. Role of cryopreserved multipotent mesenchymal stromal cells in modulation of some indices of cell immunity in adjuvant arthritis. *Reumatology*. 2022;60(3):213-19. DOI: 10.5114/reum.2022.117842
- [17] Kysielova H, Yampolska K, Dubrava T, Lutsenko O, Bondarovich M, Babenko N, et al. Improvement of bone marrow mononuclear cells cryopreservation methods to increase the efficiency of dendritic cell production. *Cryobiology*. 2022;106:122-30. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2022.02.004
- [18] Consonni FM, Porta C, Marino A, Pandolfo C, Mola S, Bleve A, et al. Myeloid-derived suppressor cells: ductile targets in disease. *Front Immunol*. 2019 May 3;10:949. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00949
- [19] Cauwels A, Tavernier J. Tolerizing strategies for the treatment of autoimmune diseases: from ex vivo to in vivo strategies. *Front Immunol*. 2020;11:674. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00674
- [20] Goltsev AM, Yampolska KY, Kysielova HG, Ostankov MV, Dubrava TG, Babenko NM, et al. Cryopreservation as biotechnological application of dendritic cells in clinical practice. *Problems Cryobiol Cryomed*. 2021;31(4):289-303. DOI: 10.15407/cryo31.04.289
- [21] Usero L, Miralles L, Esteban I, Pastor-Quiñones C, Maleno MJ, Leal L, et al. Feasibility of using monocyte-derived dendritic cells obtained from cryopreserved cells for DC-based vaccines. *J Immunol Methods*. 2021;498:113133. DOI: 10.1016/j.jim.2021.113133
- [22] Goltsev AN, Dubrava TG, Yampolskaya EE, Gayevskaya YA, Babenko NN, Bondarovich NA, et al. Optimization of the method of obtaining immature dendritic cells for therapeutic use. *Physiol J*. 2018;64(5):33-40. DOI: 10.22494/cot.v7i2.99
- [23] Kamyshnikov VS. Reference book on clinical and biochemical research and laboratory diagnostics. MEDpress-inform; 2000. p. 64-6.
- [24] Novikov AA, Aleksandrova EN, Diatroptova MA, Nasonov EL. Role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatol Sci Pract*. 2010;48(2):71-82. DOI: 10.14412/1995-4484-2010-1420
- [25] Brennan FM, McInnes IB. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*. 2008;118(11):3537-45. DOI: 10.1172/JCI36389
- [26] Wang S, Zhou Y, Huang J, Li H, Pang H, Niu D, et al. Advances in experimental models of rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol*. 2023 Jan;53(1):e2249962. DOI: 10.1002/eji.202249962
- [27] Donaldson LF, Seckl JR, McQuenn DS. A discrete adjuvant-induced monoarthritis in the rat: effects of adjuvant dose. *J Neurosci Methods*. 1993;49(1-2):5-10. DOI: 10.1016/0165-0270(93) 90103-x
- [28] Schurgers E, Billiau A, Matthys P. Collagen-induced arthritis as an animal model for rheumatoid arthritis: focus on interferon-gamma. *J Interferon Cytokine Res*. 2011;(12):917-26. DOI: 10.1089/jir.2011.0056
- [29] Izquierdo E, Cañete JD, Celis R, Del Rey MJ, Usategui A, Marsal S, et al. Synovial fibroblast hyperplasia in rheumatoid arthritis: clinicopathologic correlations and partial reversal by anti-tumor necrosis factor therapy. *Arthritis Rheum*. 2011;63(9):2575-83. DOI: 10.1002/art.30433
- [30] Markovics A, Rosenthal KS, Mikecz K, Carambula RE, Ciemielewski JC, Zimmerman DH. Restoring the balance between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the treatment of rheumatoid arthritis: new insights from animal models. *Biomedicines*. 2021;10(1):44. DOI: 10.3390/biomedicines10010044
- [31] Alunno A, Carubbi F, Giacomelli R, Gerli R. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: new players and therapeutic targets *BMC Rheumatol*. 2017;1:3. DOI: 10.1186/s41927-017-0001-8
- [32] Yoshida Y, Tanaka T. Interleukin 6 and rheumatoid arthritis. *Biomed Res Int*. 2014;2014:698313. DOI: 10.1155/2014/698313
- [33] Somaiya M, Shagufta M, Sumayya S, Qayyum KA. Level of inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis patients: Correlation with 25-hydroxy vitamin D and reactive oxygen species. *PLoS One*. 2017;12(6):e0178879. DOI: 10.1371/journal.pone.0178879
- [34] Lee SH, Kwon JY, Kim S-Y, Jung KA, Cho M-L. Interferon-gamma regulates inflammatory cell death by targeting necroptosis in experimental autoimmune arthritis. *Sci Rep*. 2017;7(1):10133. DOI: 10.1038/s41598-017-09767-0.
- [35] Cauwels A, Tavernier J. Tolerizing strategies for the treatment of autoimmune diseases: from ex vivo to in vivo strategies. *Front Immunol*. 2020;11:674. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00674/full
- [36] Benham H, Nel HJ, Law SC, Mehdi AM, Street S, Romnorulh N, et al. Citrullinated peptide dendritic cell immunotherapy in HLA risk genotype-positive rheumatoid arthritis patients. *Sci Transl Med*. 2015;7(290):290ra87. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaa9301
- [37] Bell GM, Anderson AE, Diboll J, et al. Autologous tolerogenic dendritic cells for rheumatoid and inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(1):227-34. DOI: 10.1136/annrheumdis-2015208456
- [38] Goltsev AM, Kysielova HH. Justification of therapeutic efficacy of dendritic cells derived from cryopreserved precursors in an adjuvant arthritis model. *World Med Biol*. 2023;2(84):197-202. DOI: 10.26724/2079-8334-2023-2-84-197-202

- [39] Park JE, Jang J, Choi JH, Kang MS, Woo YJ, Seong YR, et al. DC-based immunotherapy combined with low-dose methotrexate effective in the treatment of advanced CIA in mice. *J Immunol Res.* 2015;2015:834085. DOI: 10.1155/2015/834085
- [40] Yang Yi, He Xiao, Zhao R, Guo W, Zhu M, Xing W, et al. Serum IFN- γ levels predict the therapeutic effect of mesenchymal stem cell transplantation in active rheumatoid arthritis. *J Transl Med.* 2018;16:165. DOI: 10.1186/s12967-018-1541-4

H.H. Kisielova, T.G. Dubrava, A.M. Goltsev

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, NAS of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

DISTURBED CYTOKINE PROFILE IN ADJUVANT ARTHRITIS – A TARGET OF THE THERAPEUTIC POTENTIAL OF DENDRITIC CELLS DERIVED FROM CRYOPRESERVED PRECURSORS

Background. One of the primary causes of rheumatoid arthritis development is the disruption of the immune system's natural tolerance to its own antigens, leading to an imbalance in the body's cytokine profile. A promising method of correcting such a condition is restoring antigen-specific tolerance, in the formation of which tolerogenic dendritic cells (tolDCs) take part.

Objective. Experimental substantiation of the possibility of correcting the cytokine profile of animals with adjuvant arthritis (AA) by using tolDCs from cryopreserved bone marrow precursors.

Methods. The study was carried out on the CBA/H mice. The development of AA was assessed using a clinical indicator – the arthritis index. The levels of pro- (TNF- α , IL-6, IFN- γ) and anti-inflammatory (IL-10, IL-4) cytokines in the blood serum of AA-afflicted animals were measured before and after administration of tolDCs. These tolDCs were obtained from native (NatDCs) or cryopreserved (CryoDCs) using different methods bone marrow mononuclear cells (MNCs). On the 14th day after inducing AA, the animals received intravenous injections of tolDCs (5×10^5 /mouse). One week later, the cytokine levels in the animals' blood serum and the arthritis index were assessed.

Results. Throughout the development of AA, a unidirectional increase in TNF- α and IL-6 levels and a reduction in the content of anti-inflammatory cytokines were observed, which was accompanied by joint swelling in the animals. CryoDCs exhibited a more pronounced corrective effect on both pro- and anti-inflammatory cytokines compared to NatDCs, as evidenced by a decrease in the arthritis index, a clinical manifestation of the pathology.

Conclusions. The possibility of correcting the disturbed cytokine profile and the clinical state of animals during the development of AA through the use of tolDCs derived from cryopreserved MNCs has been proven. Specific cryopreservation conditions for MNCs have been developed, which facilitate the generation of tolDCs from them with a greater capacity, compared to derivatives of native MNCs, to correct the cytokine profile and clinical status of animals with AA.

Keywords: adjuvant arthritis; cytokines; bone marrow mononuclear cells; cryopreservation; tolerogenic dendritic cells.