

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Атретханы Камар-Сулу Нияз кызы

**Иммунорегуляторные функции TNF в поддержании
супрессорного микроокружения при аутоиммунных и раковых
заболеваниях**

03.03.03 – Иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2019

Работа выполнена в лаборатории молекулярных механизмов иммунитета ФГБУН Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук.

**Научные
руководители**

Недоспасов Сергей Артурович

доктор биологических наук, профессор, академик РАН

Друцкая Марина Сергеевна

кандидат биологических наук

**Официальные
оппоненты**

Лядова Ирина Владимировна

доктор медицинских наук, заведующий лабораторией клеточных и молекулярных основ гистогенеза ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

Бигильдеев Алексей Евгеньевич

доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории физиологии кроветворения ФГБУ

«Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения России

Пичугин Алексей Васильевич

кандидат физико-математических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории активации иммунитета ФГБУ «Государственный научный центр Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства России

Защита диссертации состоится «28» октября 2019 г. в 15:40 часов на заседании диссертационного совета МГУ.03.12 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, биологический факультет, ауд. ББА.

E-mail: dkiselevs@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/234531029>

Автореферат разослан 26 сентября 2019 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Д.Б. Киселевский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Иммунотерапия, направленная на изменение и модулирование иммунного ответа, является перспективным направлением в создании лекарственных препаратов против раковых и аутоиммунных заболеваний. В последнее время большое внимание уделяется изучению молекулярных механизмов действия провоспалительных цитокинов. Поскольку детальное понимание регуляции цитокиновой системы и иммунного ответа необходимо для создания более специфичных реагентов и снижения побочных эффектов существующей терапии.

Для многих цитокинов характерно плеiotропное влияние на организм. На фактор некроза опухоли (TNF) - цитокин, открытый благодаря своей противоопухолевой активности (Carswell et al., 1975), изначально возлагались большие надежды в качестве противоопухолевого препарата. Однако его действие оказалось токсичным для организма, и использование такой терапии возможно только в специальной системе (Grünhagen et al., 2006). Оказалось, что TNF обладает рядом важных функций для организма, в том числе участвует в развитии лимфоидных органов, иммунном ответе против инфекций и регуляции воспаления (Endres et al., 1999, Tumanov et al., 2010, Winsauer et al., 2014). При этом его повышенная продукция может приводить к развитию раковых и аутоиммунных заболеваний (Winsauer et al., 2014).

В настоящее время активно изучается роль микроокружения опухоли, состоящего из клеток иммунной системы, фибробластов и эндотелиальных клеток, в развитии самой опухоли и опухолевой ниши (Nagarsheth et al, 2017). Оказалось, что важной популяцией опухолевого микроокружения являются миелоидные супрессорные клетки (MDSC), незрелые миелоидные клетки, участвующие в подавлении противоопухолевого иммунного ответа (Gabrilovich 2017). В последнее время появляются данные о том, что хроническое воспаление, в частности, повышенная продукция TNF, может способствовать развитию и накоплению MDSC (Sander, et al., 2010, Zhao, et al., 2012). Поэтому в первой части нашей работы исследуется действие фармакологической нейтрализации TNF с помощью клинически применяемых блокаторов TNF человека на развитие MDSC в модели перевиваемой солидной опухоли у мышей с гуманизацией гена *TNF*.

В то же время TNF является мишенью для терапевтической блокировки при аутоиммунных заболеваниях, таких как ревматоидный артрит, болезнь Крона и псориаз (Steeland et al, 2018). Однако системная анти-TNF терапия оказалась не только неэффективной в лечении рассеянного склероза (РС), а наоборот, приводила к усилению симптомов заболевания (TLS group, 1999). Вдобавок, у пациентов, использующих на постоянной основе блокаторы TNF, со временем могут развиваться побочные эффекты, в том числе и

демиелинизация. Поэтому было сделано предположение, что TNF может играть протективную роль при нейровоспалении.

Широкий спектр действия TNF отчасти объясняется наличием двух рецепторов с широким профилем экспрессии на разных типах клеток и различиями в опосредуемых этими рецепторами сигнальными каскадами. Так, было показано, что за основные провоспалительные функции TNF ответственен сигнальный путь через TNFR1, тогда как роль TNFR2 все еще активно изучается (Wajant et al., 2003). В ранних исследованиях было показано, что TNFR2 может играть защитную роль при нейровоспалении (Alexoroulou et al., 2006, Ruuls et al., 2001, Tsakiri et al., 2012). Например, он участвует в процессах ремиелинизации за счет стимулирования пролиферации предшественников олигодендроцитов (Madsen et al., 2016). Кроме того, показана защитная роль TNFR2 на клетках микроглии (Gao et al., 2017). Интересно, что экспрессия TNFR2 характерна для ряда супрессорных популяций, в том числе и для Т-регуляторных (Treg) клеток (Chen et al., 2010, Chen et al., 2008). Treg клетки - важная популяция Т-клеток, необходимая для осуществления гомеостаза в организме, подавления иммунного ответа и для контроля воспаления (Lu et al., 2017). Несмотря на то, что TNFR2 экспрессирован на Treg клетках, его роль в контексте нейровоспаления не до конца изучена.

Изучение роли TNF и его рецепторов при различных заболеваниях необходимо для создания новых подходов к терапии аутоиммунных заболеваний. К примеру, основанных на блокировке только тех TNF-сигнальных путей, которые ответственны за патологическое состояние, но не затрагивающих при этом защитные свойства TNF.

Целью нашего исследования было изучение роли TNF в поддержании супрессорного микроокружения при раковых и аутоиммунных заболеваниях.

В рамках этой работы были поставлены следующие задачи:

1. Изучить влияние блокировки TNF на рост перевиваемой опухоли фибросаркомы MCA205, а также на накопление и функциональность MDSC у мышей с гуманизацией гена *TNF*.
2. Изучить роль TNFR2 сигнального пути в Treg клетках в поддержании их супрессорного фенотипа и функциональной активности в нормальном состоянии.
3. Изучить роль TNF-TNFR2 сигнального пути в Treg клетках в развитии нейровоспаления в мышинной модели рассеянного склероза.

Научная новизна работы

Работу проводили на уникальной линии мышей, гуманизированных по гену *TNF*, в которых было изучено действие клинически применяемых блокаторов TNF в модели перевиваемой солидной опухоли MCA205 фибросаркомы. Впервые было исследовано, как нейтрализация TNF *in vivo* с помощью Инфликсимаба, химерного антитела, состоящего из Fab фрагмента мыши и Fc части IgG1 человека, и Этанерцепта, слитного белка, состоящего из двух молекул TNFR2 и Fc части IgG1 человека, влияет на накопление

MDSC и их функциональную активность при росте перевиваемой солидной опухоли МСА 205 фибросаркомы. Было показано, что нейтрализация TNF обоими типами блокаторов приводит к замедлению роста опухоли и подавляет накопление MDSC в крови и в лимфоидных органах. При этом блокировка TNF не только способствует снижению количества MDSC, но также влияет на их супрессорные функции.

Кроме того, в этой работе впервые были охарактеризованы мыши с двойной гуманизацией системы лиганд-рецептор TNF-TNFR2 с возможностью генетической инактивации TNFR2 в определенном типе клеток, в частности в Т-регуляторных клетках. Было установлено, что TNFR2 участвует в поддержании супрессорного фенотипа Т-регуляторных клеток. Удаление TNFR2 приводит к снижению экспрессии ключевых молекул Treg клеток, участвующих в подавлении аутоиммунных реакций. Кроме того, была установлена протективная роль TNFR2 на Treg клетках в контроле нейровоспаления в мышинной модели рассеянного склероза.

Теоретическая и практическая значимость работы

Представленные результаты работы имеют важное значение как для фундаментальной иммунологии, так и для клинических приложений. Прежде всего, иммунотерапия, в том числе и антицитокиновая терапия, представляет собой новую эру в разработке лекарств против аутоиммунных и раковых заболеваний. Однако для создания безопасных и эффективных прототипов антицитокиновых препаратов необходимо понимание молекулярных механизмов регуляции иммунного ответа, а также изучение роли ключевых цитокинов и их рецепторов в поддержании гомеостаза организма.

В нашей работе были использованы гуманизированные по гену *TNF* мыши, которые позволили продемонстрировать эффективность действия клинически применяемых блокаторов TNF в мышинной модели фибросаркомы. Кроме того, была подтверждена важность TNF в поддержании супрессорных свойств MDSC, популяции иммунных клеток, участвующих в развитии рака, и впервые показана эффективность нейтрализации hTNF в подавлении MDSC *in vivo*. Таким образом, наши данные свидетельствуют о том, что TNF и MDSC могут рассматриваться как потенциальные мишени для иммунотерапии рака.

Используя мышей с кондиционным удалением TNFR2 с Treg клеток, была установлена важная иммунорегуляторная роль TNFR2 в поддержании их супрессорного фенотипа. Кроме того, полученные данные о протективной роли TNF/TNFR2 на Treg клетках при нейровоспалении указывают на перспективность создания более специфических реагентов, которые будут ингибировать действие цитокина только из патогенного источника, при этом сохраняя его иммунорегуляторные свойства.

Методология и методы исследования

Для изучения последствий фармакологической нейтрализации TNF в *in vivo* модели перевиваемой опухоли эксперименты проводили на мышах, гуманизированных по гену *TNF* (hTNFKI). В качестве модели перевиваемой опухоли была использована клеточная линия МСА205 фибросаркомы мыши.

Для фармакологической блокировки TNF *in vivo* применяли препараты Этанерцепт или Инфликсимаб. Мыши получали инъекцию Этанерцепта и Инфликсимаба из расчета 10 мкг/г каждые три дня, контрольной группе вводили фосфатный буфер (PBS). На седьмой день эксперимента мышам вводили 1×10^6 опухолевых клеток MCA205 фибросаркомы в 200 мкл PBS. Эффект фармакологической блокировки TNF на накопление MDSC и их супрессорную активность оценивали методом проточной цитометрии, в том числе и по способности MDSC ингибировать пролиферацию активированных Т-клеток *in vitro*.

Для изучения иммунорегуляторной роли TNF при нейровоспалении эксперименты проводили на мышах с двойной гуманизацией системы лиганд-рецептор TNF-TNFR2 с возможностью кондиционного удаления TNFR2 в FoxP3⁺ клетках. В качестве модели нейровоспаления применяли широко распространенную мышиную модель рассеянного склероза – экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (EAE). В этой модели индукцию заболевания осуществляли введением 100 мкг миелинового пептида MOG₃₅₋₅₅ в смеси с полным адъювантом Фрейнда и последующим двукратным введением 200 нг коклюшного токсина для повышения проницаемости гематоэнцефалического барьера. Клинические симптомы EAE оценивали по стандартному протоколу, начиная с девятого дня после индукции заболевания. Последствия генетической инактивации TNFR2 в Т-регуляторных клетках на их супрессорную активность оценивали методом проточной цитометрии, в частности по способности подавлять пролиферацию активированных Т-клеток *in vitro*.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Фармакологическая нейтрализация TNF клинически применяемыми блокаторами, Инфликсимабом или Этанерцептом, замедляет рост MCA205 фибросаркомы, подавляет накопление MDSC в организме и их супрессорную активность.
2. TNFR2 на Т-регуляторных клетках необходим для поддержания их супрессорного фенотипа и функциональной активности в нормальном состоянии.
3. TNFR2 на Т-регуляторных клетках играет защитную роль в модели рассеянного склероза, экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите.

Личный вклад автора

В настоящей работе автором были выполнены эксперименты, связанные с изучением роли TNF в поддержании супрессорного микроокружения при развитии фибросаркомы и экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита. Личный вклад автора состоит в непосредственном участии в планировании и выполнении экспериментов, обработке и анализе результатов, написании публикаций и текста диссертации.

Достоверность результатов

Результаты работы были воспроизведены в двух и более независимых экспериментах. При формировании экспериментальных групп подбирали мышей соответствующего возраста и пола, а эксперименты с генетическим удалением TNFR2 проводили с мышами из того же помета (литтермейт-контроли), не несущими Cre-рекомбиназу. Методы исследования, мышинные модели заболеваний, а также статистическая обработка данных, приведенные в работе, соответствуют общепризнанным международным стандартам и являются корректными.

Апробация результатов и публикации

Результаты диссертационной работы были представлены и обсуждены на международных и отечественных конференциях и научных школах: 3rd Belgrade EFIS symposium on immunoregulation, Белград, Сербия, 24-28 мая 2015, Всероссийском форуме имени В.И. Иоффе “Дни иммунологии в Санкт-Петербурге”, Санкт-Петербург, Россия, 1-4 июня 2015, 81st Cold Spring Harbor Symposium: Targeting Cancer, Колд Спринг Харбор, США, 1-6 июня 2016, 13th Spring School on Immunology, Этталь, Германия, 8-13 марта 2017, Second interdisciplinary congress on IL17, Мюнхен, Германия, 24-25 ноября 2017 года, III Всероссийском конгрессе “Аутоиммунные и иммунодефицитные заболевания”, 16-17 ноября 2018 года, конференции молодых ученых Института молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта РАН, 24 апреля 2019 года, III Международной конференции “Наука будущего” и форуме “Наука будущего – наука молодых”, Сочи, Россия, 14-17 мая 2019 года и коллоквиуме в Институте молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта РАН, 9 сентября 2019 года. По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ: 4 статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 03.03.03 – иммунология, а также 7 тезисов.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, который включает 139 источников. Работа изложена на 99 страницах, содержит 31 рисунок, 2 таблицы, 1 приложение из 7 рисунков.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Работа по исследованию иммунорегуляторных функций TNF в поддержании супрессорного микроокружения состояла из двух частей.

Первая часть работы посвящена исследованию эффекта фармакологической нейтрализации TNF клинически применяемыми блокаторами на рост перевиваемой опухоли MCA205 фибросаркомы и развитие супрессорного микроокружения. Для этого работу проводили на уникальной линии мышей с гуманизацией гена *TNF* (hTNFKI) (Efimov et al., 2016, Olleros et al., 2015). Была изучена динамика роста опухоли на фоне фармакологической блокировки TNF Инфликсимабом или Этанерцептом. Было изучено влияние нейтрализации TNF на накопление MDSC *in vivo* и их супрессорные свойства *ex vivo*. Было обнаружено, что фармакологическая нейтрализация TNF снижает рост опухоли MCA205 фибросаркомы, приводит к замедлению накопления MDSC и снижению их супрессорных свойств.

Во второй части работы была исследована роль TNF/TNFR2 сигнального пути в мышинной модели рассеянного склероза. Для этого работу проводили на hTNFKI и дважды гуманизированных по TNF и TNFR2 мышах (hTNFKI x hTNFR2KI), а также дважды гуманизированных hTNFKI x hTNFR2KI мышах с возможностью кондиционного удаления TNFR2 в T-регуляторных клетках (hTNFKI x hTNFR2KI^{ΔTregs}). В качестве мышинной модели рассеянного склероза в работе использовали MOG₃₅₋₅₅ – индуцированный экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (ЕАЕ). Была подробно изучена динамика ЕАЕ у hTNFKI и hTNFKI x hTNFR2KI мышей с последующим анализом основных популяций иммунных клеток на периферии и в центральной нервной системе. Далее была изучена динамика заболевания ЕАЕ у мышей с делецией TNFR2 в T-регуляторных клетках, было изучено влияние генетического удаления TNFR2 на экспрессию супрессорных молекул Treg клеток. Кроме того, была изучена супрессорная активность Treg клеток *in vitro*. Было обнаружено, что TNFR2 на Treg клетках необходим для поддержания их супрессорного фенотипа и контроля Th17-зависимого иммунного ответа при нейровоспалении.

1. Влияние фармакологической нейтрализации TNF клинически применяемыми блокаторами на рост перевиваемой опухоли MCA205 фибросаркомы и накопление MDSC.

1.1. Фармакологическая нейтрализация TNF с помощью Инфликсимаба или Этанерцепта приводит к замедлению роста MCA205 фибросаркомы и снижению накопления MDSC во вторичных лимфоидных органах hTNFKI мышей

В настоящей работе было выдвинуто предположение, что фармакологическая нейтрализация TNF может подавлять супрессорные свойства MDSC и тем самым влиять на развитие опухоли. Для изучения последствий нейтрализации TNF клинически применяемыми блокаторами

использовали мышей, гуманизированных по гену *TNF*. Основная сложность, связанная с изучением этих мышей, заключается в возможном нарушении передачи сигнала человеческим TNF через мышинный рецептор TNFR2 (Bossen, et al., 2006). Ранее было показано, что эффективный TNFR2 сигнальный путь необходим для роста опухолей, в том числе и для фибросаркомы, а также для накопления MDSC (Zhao, et al., 2012). Тем не менее, нами было установлено, что генетическая замена мышинного гена *Tnf* на человеческий не влияет на рост MCA205 фибросаркомы и накопление MDSC *in vivo* (данные представлены в диссертации). Поэтому такая система может быть использована для дальнейшего изучения эффектов клинически применяемых блокаторов TNF Этанерцепта и Инфликсимаба на рост перививаемой опухоли и накопление MDSC.

Было обнаружено, что нейтрализация TNF блокаторами Этанерцептом или Инфликсимабом подавляет рост MCA205 фибросаркомы. Так, через 2-3 недели объем опухоли достигал 500-600 мм³ при подкожном введении опухолевых клеток (Рис.1А).

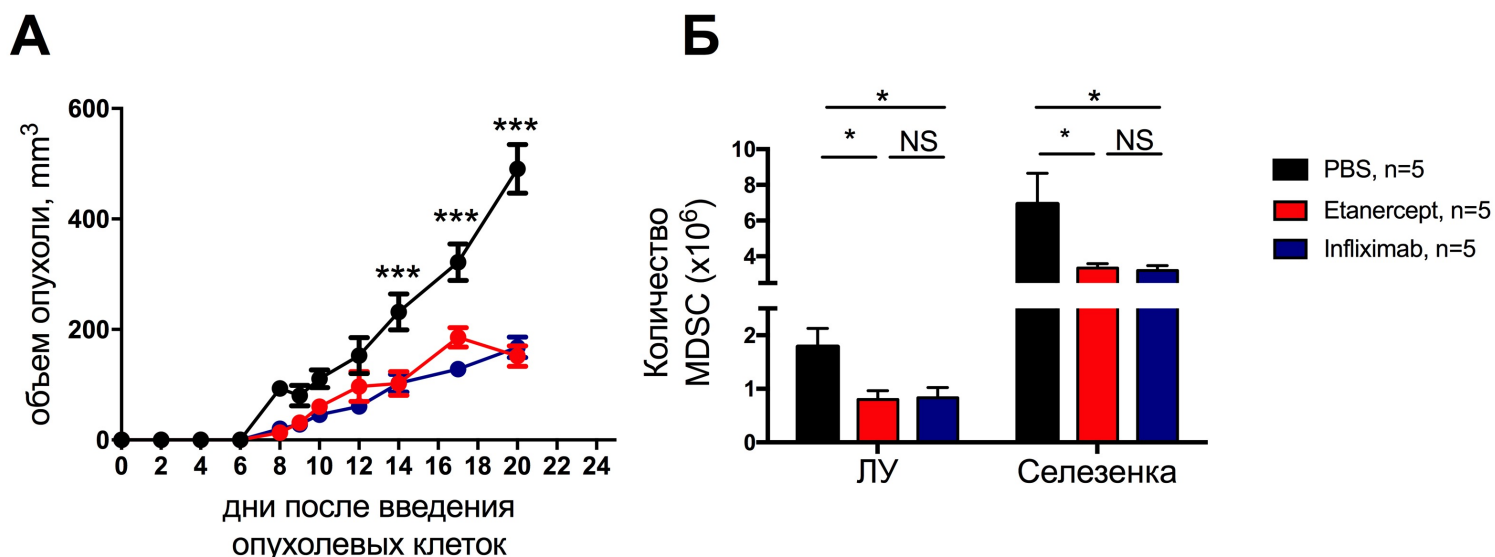


Рисунок 1. Нейтрализация TNF приводит к снижению роста опухоли MCA205 фибросаркомы и количества MDSC во вторичных лимфоидных органах. А) Динамика роста опухоли у hTNFKI мышей на фоне нейтрализации TNF блокаторами Этанерцептом (красная линия) или Инфликсимабом (синяя линия) и без нейтрализации TNF с введением PBS в качестве контроля (черная линия). Каждая точка представляет собой среднее значение объема опухоли со стандартной ошибкой среднего в группе из 9-10 мышей Б) Количество MDSC в лимфатических узлах (ЛУ) и селезенке. MDSC определяли как $Ly6C^{+}Ly6G^{+}CD11b^{+}F4/80^{+}B220^{-}CD45^{+}VD^{-}$. Результаты представлены как среднее значение $\pm$ SEM и подтверждены в 3 независимых экспериментах. Статистический анализ был проведен с помощью 1-way ANOVA (Б) и 2-way ANOVA тестов (А). Различия считали достоверными при $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$; $****p < 0.0001$; NS, non-significant (недостоверная разница).

Введение блокаторов Этанерцепта или Инфликсимаба значительно замедляло динамику роста опухолей. Объем опухолей на фоне нейтрализации TNF не превышал 200 мм³ через 2-3 недели после введения опухолевых клеток (Рис.1А). Кроме того, фармакологическая нейтрализация hTNF приводит к снижению количества MDSC во вторичных лимфоидных органах (Рис.1Б).

Таким образом, фармакологическая блокировка TNF приводит к замедлению роста фибросаркомы MCA205, а также препятствует накоплению MDSC в лимфоидных органах *in vivo*.

1.2. Фармакологическая нейтрализация TNF Инфликсимабом или Этанерцептом приводит к снижению супрессорной активности MDSC

Ранее было отмечено, что MDSC способствуют опухолевому росту за счет подавления пролиферации и функций Т-клеток. Выделение активных форм азота является одним из способов подавления иммунного ответа MDSC. Детекцию NO осуществляли по флуоресценции реагента DAF-FM методом проточной цитометрии в моноцитарной популяции MDSC (CD11b⁺Ly6C⁺) в крови мышей с опухолями на фоне нейтрализации TNF. Было обнаружено, что фармакологическая нейтрализация TNF подавляет продукцию активных форм азота моноцитарной популяцией MDSC (Рис.2).

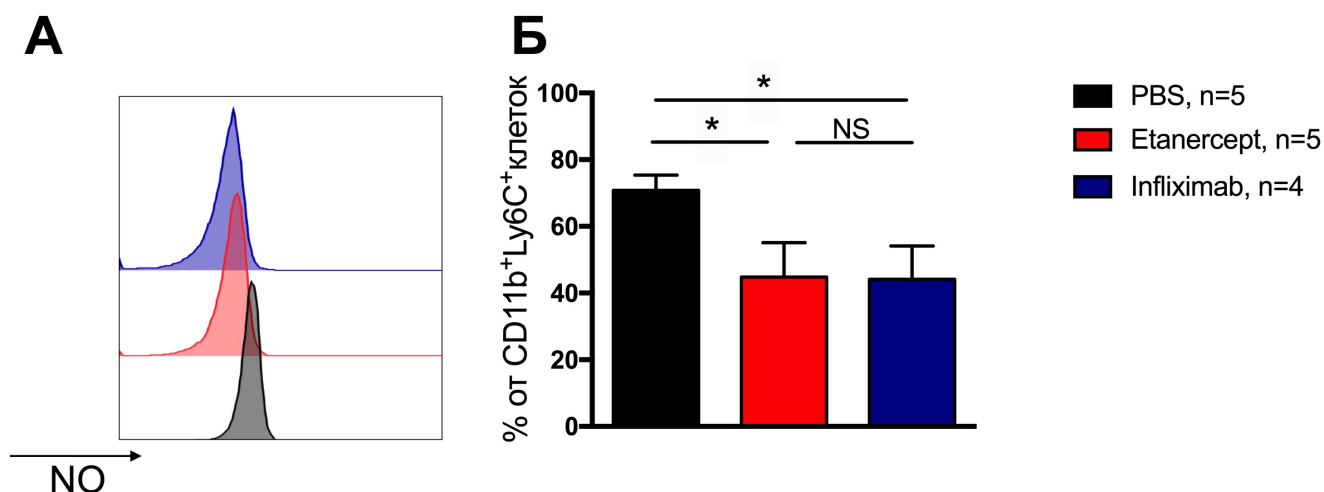


Рисунок 2. Нейтрализация TNF снижает уровни NO в MDSC крови hTNFКI мышей с MCA205 фибросаркомой

А) Репрезентативные гистограммы и (Б) процентное содержание NO⁺ популяции MDSC от CD11b⁺Ly6C⁺CD45⁺VD⁻ клеток в крови мышей с MCA205 фибросаркомой без нейтрализации TNF (черный), и на фоне введения блокаторов Этанерцепт (красный) или Инфликсимаб (синий). Результаты представлены как среднее значение ± SEM и подтверждены в 2 независимых экспериментах. Статистический анализ был проведен с помощью 1-way ANOVA теста. Различия считали достоверными при *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; ****p < 0.0001; NS, nonsignificant (недостоверная разница).

Далее мы оценили влияние фармакологической блокировки TNF на способность MDSC подавлять Т-клеточную пролиферацию. Для этого была получена суспензия MDSC клеток методом магнитной сепарации из селезенки мышей с опухолями на фоне блокировки TNF и без нейтрализации TNF. После этого MDSC культивировали совместно с Т-клетками в присутствии активирующих сигналов и оценивали пролиферацию Т-клеток по степени разбавления метки CFSE. Оказалось, что MDSC, выделенные из селезенки мышей с MCA205 фибросаркомой без нейтрализации TNF, эффективно ингибируют пролиферацию Т-клеток (Рис.3 А). В то же время MDSC, выделенные из мышей с опухолями, подверженных блокировке TNF, не ингибировали Т-клеточную пролиферацию (Рис.3 В, Г). В качестве контролей использовали Т-клетки без добавления MDSC, которые активно пролиферировали в ответ на активирующий стимул, и Т-клетки без активации (Рис.3 Б).

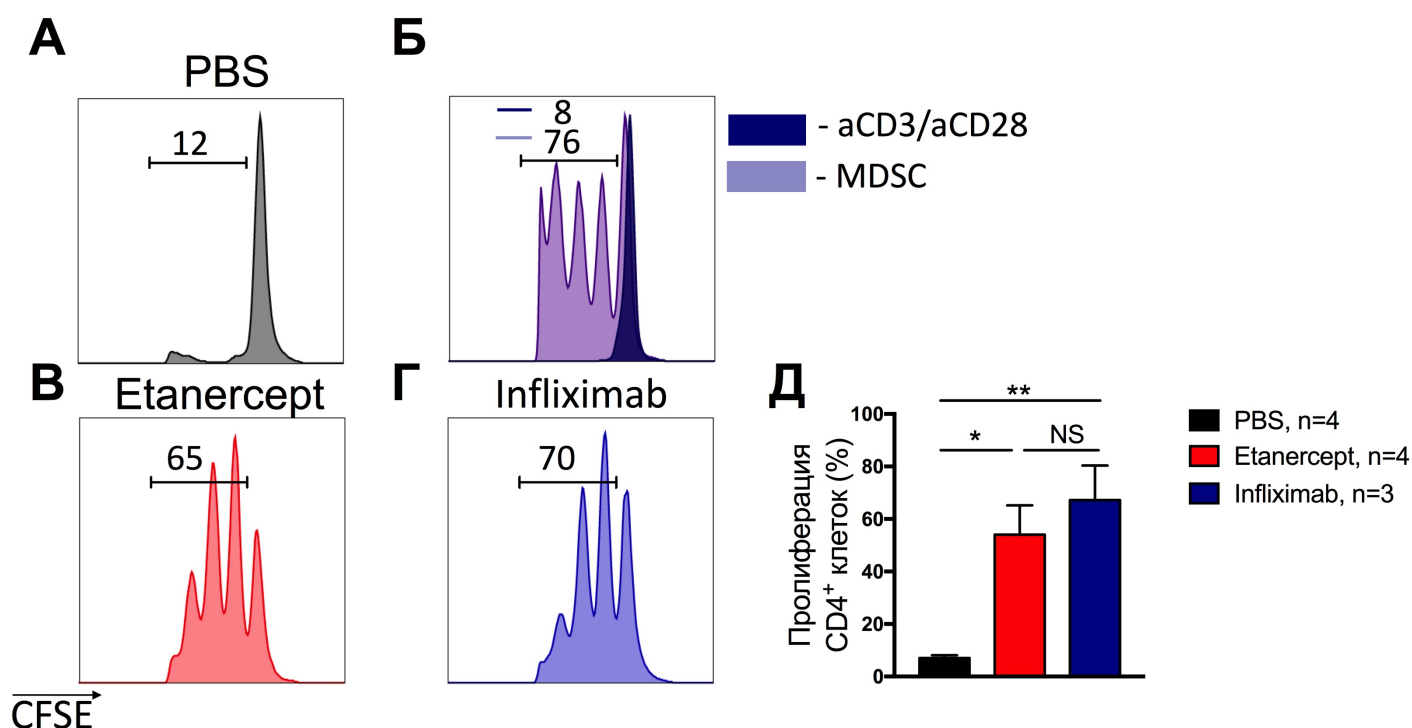


Рисунок 3. Фармакологическая нейтрализация TNF подавляет супрессорные функции MDSC

Репрезентативные гистограммы пролиферации Т-клеток в присутствии MDSC, выделенных из опухолевых мышей без нейтрализации TNF (А), на фоне блокировки TNF с помощью Этанерцепт (В) или Инфликсимаб (Г). Б) Репрезентативные гистограммы пролиферации Т-клеток без активации (темно-синий) или без добавления MDSC (фиолетовый) Д) Процентное содержание пролиферации CD4⁺ клеток от VD⁻ клеток, инкубированных с MDSC, выделенных из опухолевых мышей без нейтрализации TNF (черный), на фоне блокировки TNF с помощью Этанерцепт (красный) или Инфликсимаб (синий). Результаты представлены как среднее значение $\pm$ SEM и подтверждены в 3 независимых экспериментах. Статистический анализ был проведен с помощью 1-way ANOVA теста. Различия считались достоверными при * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001 **** p < 0.0001; NS, nonsignificant (недостоверная разница).

В результате мы установили, что MDSC не способны ингибировать Т-клеточную пролиферацию на фоне блокировки TNF, что свидетельствует о нарушении их супрессорных свойств (Рис.3 Д).

Таким образом, введение блокаторов TNF приводит к снижению роста опухоли, ассоциированному с меньшим накоплением MDSC и нарушением их супрессорных свойств. Тем самым мы показали, что TNF действительно важен для накопления MDSC и поддержания их супрессорных функций при росте перевиваемой опухоли MCA205 фибросаркомы.

2. Иммунорегуляторная функция TNF/TNFR2 в мышинной модели рассеянного склероза

2.1. Изучение динамики развития ЕАЕ у мышей дикого типа (C57BL/6), гуманизированных по гену *TNF* (hTNFKI) и дважды гуманизированных по TNF и TNFR2 (hTNFKI x hTNFR2KI)

Блокаторы TNF широко применяются в терапии аутоиммунных заболеваний, но имеют ряд побочных эффектов. Кроме того, анти-TNF терапия оказалась неэффективной в лечении рассеянного склероза, что свидетельствует о возможной защитной роли TNF в развитии нейровоспаления.

В предыдущих экспериментах было обнаружено, что гуманизация гена *TNF* не влияет на развитие опухоли и накопление MDSC. Однако нельзя было исключить, что ослабленное взаимодействие hTNF с mTNFR2 по сравнению с hTNFR2 может влиять на развитие ЕАЕ (Bossen, et al., 2006). Кроме того, на сегодняшний день известно, что возможная протективная роль TNF при нейровоспалении опосредуется через TNFR2 (Tsakiri, et al., 2012).

Для выяснения возможной протективной функции TNF-TNFR2 сигнального пути при нейровоспалении мышам дикого типа (C57BL/6), гуманизированным по гену *TNF* (hTNFKI) и дважды гуманизированным по TNF и TNFR2 (hTNFKI x hTNFR2KI) вводили MOG-пептид в полном адьюванте Фрейнда с последующим введением коклюшного токсина в день индукции и на второй день после индукции заболевания. Было установлено, что гуманизация гена *TNF* приводит к усилению клинических симптомов ЕАЕ (Рис. 4 А), инфильтрации ЦНС (Рис. 4 Б), тогда как дополнительная гуманизация рецептора TNFR2 в hTNFKI мышах снижает симптомы ЕАЕ до уровня заболевания у мышей дикого типа (Рис. 4 А).

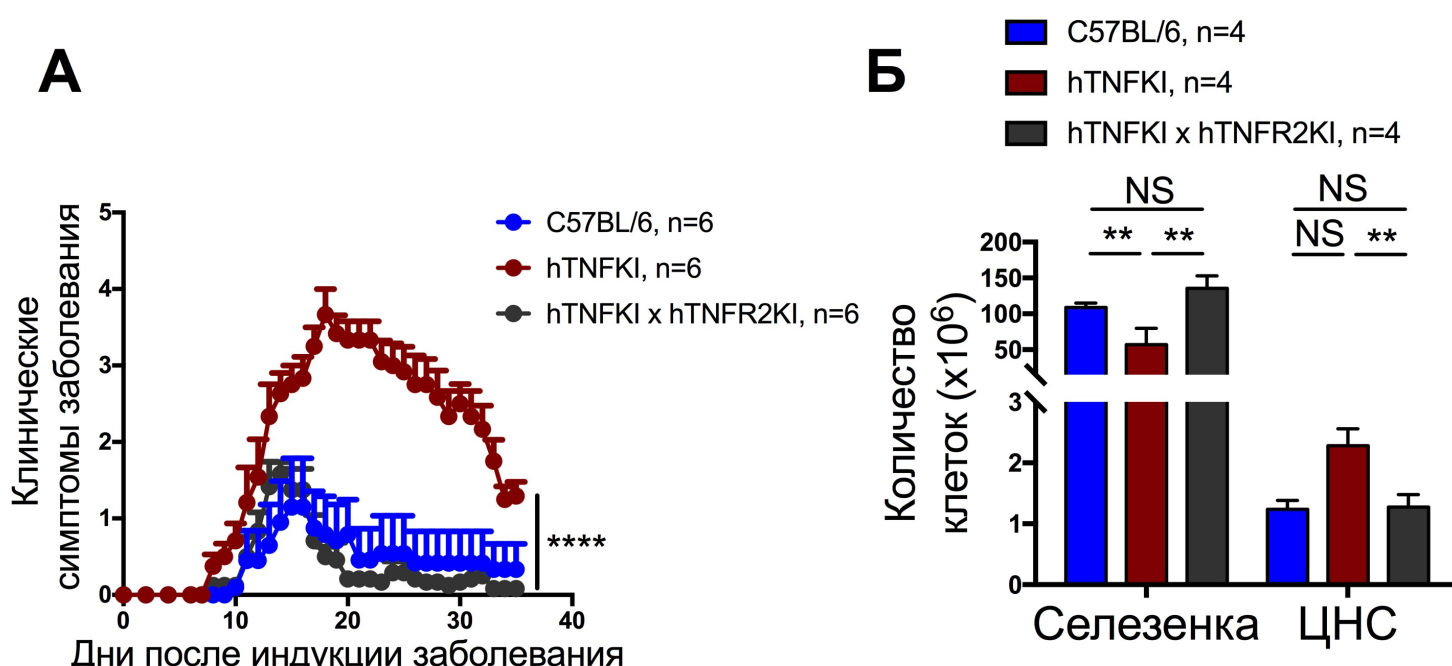


Рисунок 4. Гуманизация TNF приводит к усилению клинических симптомов ЕАЕ и инфильтрации ЦНС.

А) Динамика клинических симптомов ЕАЕ у мышей дикого типа C57BL/6 (голубой), hTNFKI (бордовый) и hTNFKI x hTNFR2KI (серый) Б) Количество клеток в селезенке и инфильтрация ЦНС у мышей дикого типа C57BL/6 (голубой), hTNFKI (бордовый) и hTNFKI x hTNFR2KI (серый). Результаты представлены как среднее значение $\pm$ SEM и подтверждены в 5 независимых экспериментах. Статистический анализ был проведен с помощью 1-way ANOVA (Б) и 2-way ANOVA тестов (А). Различия считались достоверными при $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$ $****p < 0.0001$; NS, nonsignificant (недостоверная разница).

Кроме того, у hTNFKI мышей наблюдалось снижение процентного содержания Treg клеток и повышение Th17 клеток в ЦНС (Рис.5 А, Б), пониженная экспрессия сигнатурных молекул Treg клеток, таких как FoxP3, CD25, CTLA-4, что может свидетельствовать о нарушении супрессорных свойств Treg клеток (данные представлены в диссертации).

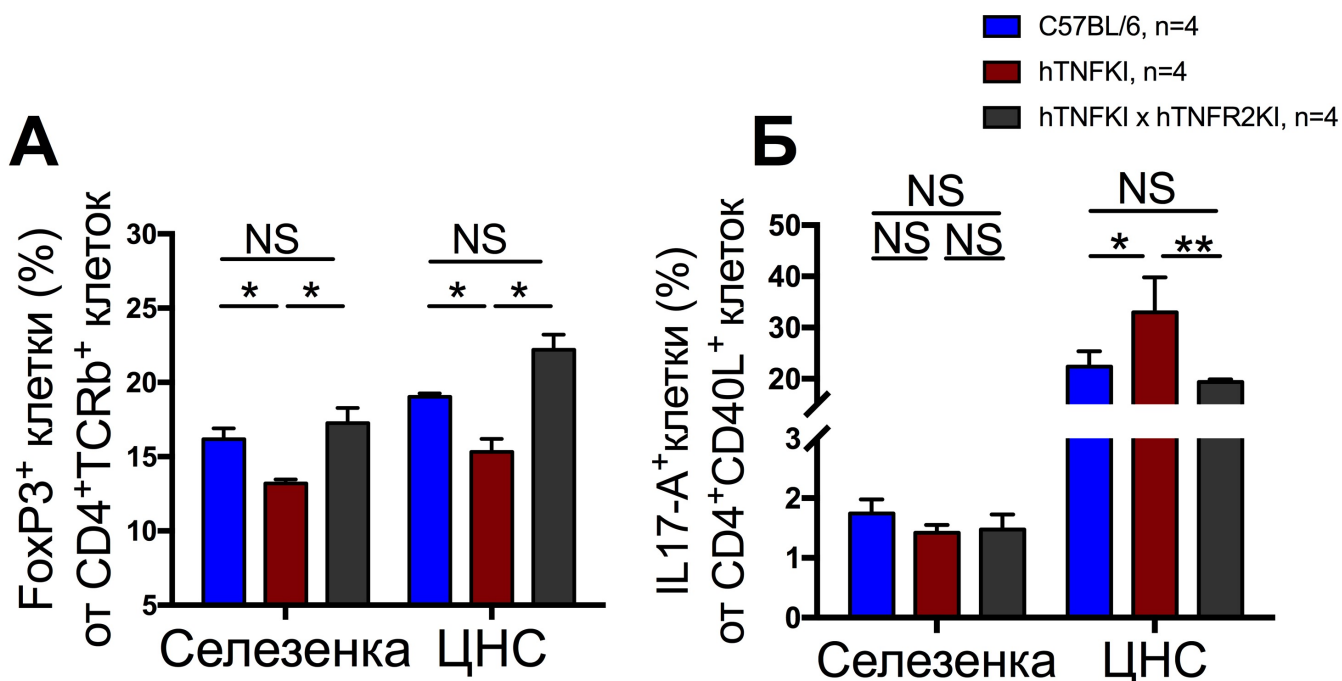


Рисунок 5. Анализ процентного содержания Treg (А) и Th17 клеток (Б) у мышей дикого типа (голубой), hTNFKI (бордовый) и hTNFKI x hTNFR2KI (серый) на эффекторной фазе ЕАЕ.

А) Процентное содержание FoxP3⁺ Т-клеток в селезенке и ЦНС от CD4⁺ TCRb⁺ VD⁻ клеток
 Б) Процентное содержание IL-17A⁺ Т-клеток от CD4⁺CD40L⁺ клеток, рестимулированных MOG-пептидом в присутствии брефельдина. Результаты представлены как среднее значение $\pm$ SEM и подтверждены в 3 независимых экспериментах. В каждой группе представлено по 4 мыши. Статистический анализ был проведен с помощью теста 1-way ANOVA. Различия считали достоверными при * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ **** $p < 0.0001$; NS, non-significant (недостоверная разница).

Таким образом, результаты нашей работы подтвердили протективную функцию TNFR2 в развитии нейровоспаления, которая, возможно, частично опосредована за счет поддержания супрессорных свойств Treg клеток.

2.2. TNFR2 на Т-регуляторных клетках необходим для поддержания их супрессорного фенотипа и функциональной активности в нормальном состоянии

Для детального изучения роли TNFR2 на Treg клетках при нейровоспалении, были созданы гуманизированные мыши по TNF и TNFR2 с возможностью кондиционного удаления hTNFR2 в FoxP3⁺ Т-регуляторных клетках (hTNFKI x hTNFR2KI^{ΔTregs}). Было показано, что удаление TNFR2 на Т-регуляторных клетках приводит к накоплению эффекторных CD44^{hi}CD62L^{lo} Т-клеток (Рис.6 А), а также Т-регуляторных клеток на периферии (Рис.6 Б) в нормальном состоянии. Накопление эффекторных Т-клеток и Treg клеток может свидетельствовать о наличии воспалительного процесса и нарушения поддержания гомеостаза в организме hTNFKI x hTNFR2KI^{ΔTregs} мышей. Кроме

того, у мышей с удалением TNFR2 на Treg клетках наблюдается снижение доли $CD25^+$ Treg клеток (Рис.6 В), а также $CCR6^+$ Treg клеток (Рис.6 Г), но не $GITR^+$ и $CTLA-4^+$ Treg клеток (данные представлены в диссертации).

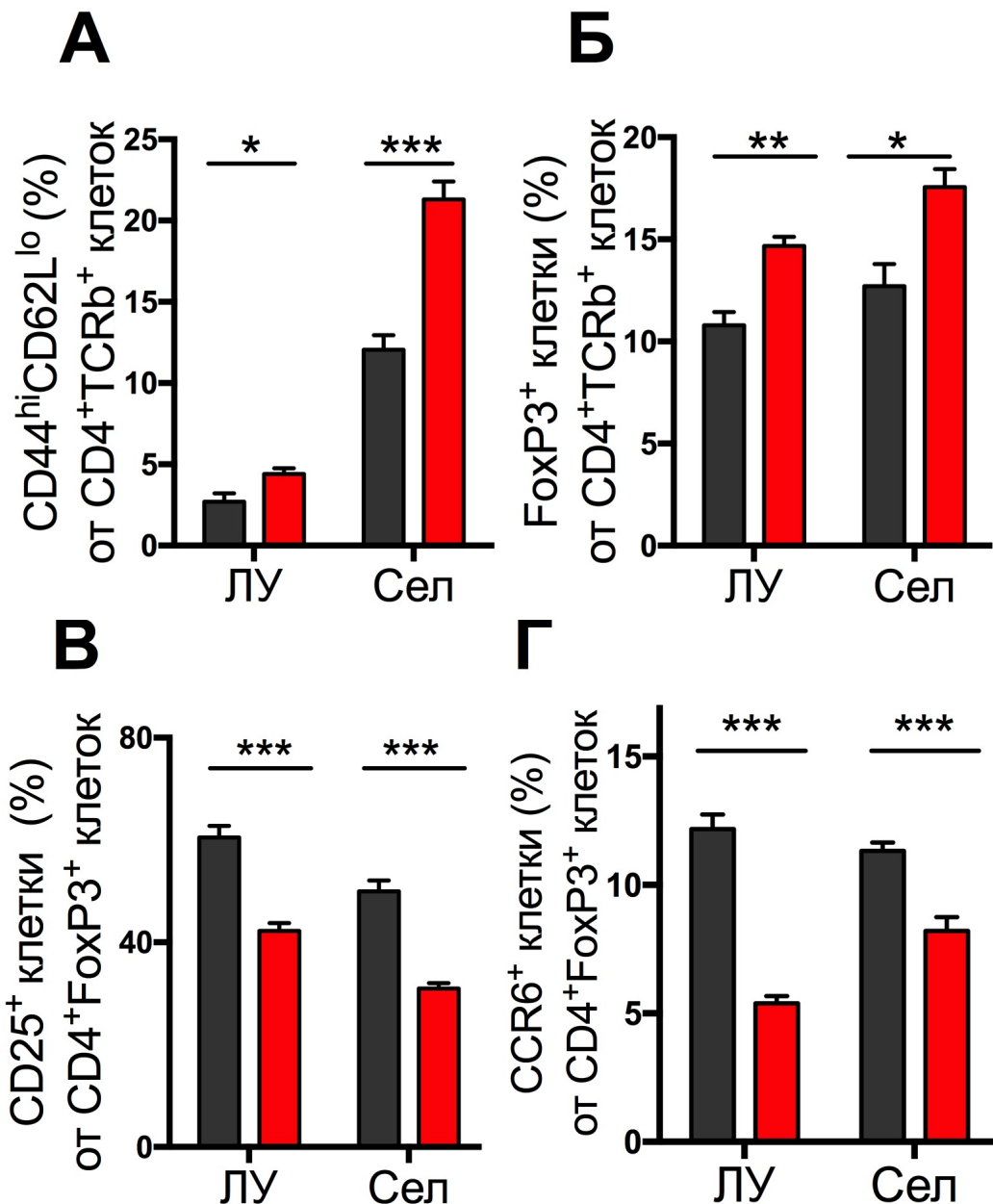


Рисунок 6. Анализ процентного содержания популяций Т-клеток в hTNFKI x hTNFR2KI (серый) и hTNFKI x hTNFR2KI Δ Tregs (красный) мышях в норме.

Процентное содержание $CD44^{hi}CD62L^{lo}$ Т-клеток (А) и $FoxP3^+$ клеток (Б) от $CD4^+TCRb^+VD^-$ клеток в лимфатических узлах (ЛУ) и селезенке (Сел). Процентное содержание $CD25^+$ (В), $CCR6^+$ (Г) клеток от $VD^-TCRb^+CD4^+FoxP3^+$ клеток. Результаты представлены как среднее значение $\pm$ SEM и подтверждены в 3 независимых экспериментах. В каждой группе представлено по 4 мыши. Статистический анализ был проведен с помощью t-критерия Стьюдента. Различия считались достоверными при $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$ $****p < 0.0001$; NS, non-significant (недостоверная разница).

При этом известно, что для Treg клеток характерен высокий уровень экспрессии молекулы CD25, одной из субъединиц рецептора IL-2R, с помощью которого эти клетки конкурентно связывают IL-2, фактор пролиферации и выживания эффекторных Т-клеток. CCR6, в свою очередь, необходим для миграции Treg клеток в ЦНС, и снижение его экспрессии может свидетельствовать о возможных нарушениях регуляции иммунного ответа при нейровоспалении. Далее, была оценена экспрессия различных маркеров Т-регуляторных клеток, необходимых для подавления иммунного ответа с помощью цитофлуориметрического метода по интенсивности флуоресценции. Оказалось, что удаление TNFR2 приводит к снижению экспрессии важных молекул Treg клеток, таких как FoxP3, CD25, CTLA-4 и GITR (Рис. 7).

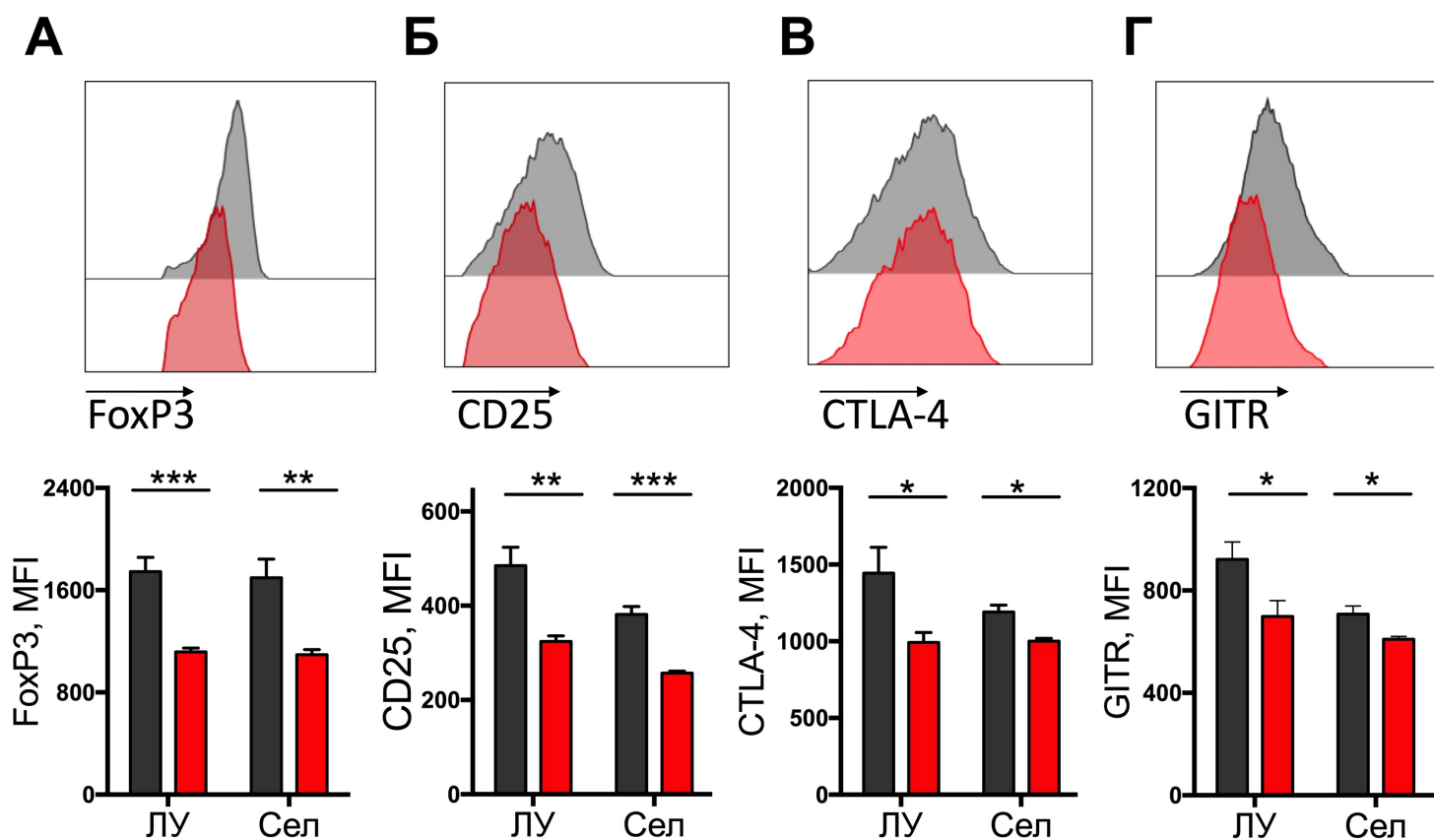


Рисунок 7. Удаление TNFR2 на Treg клетках приводит к снижению экспрессии супрессорных молекул в норме.

А) Репрезентативные гистограммы и средние интенсивности флуоресценции (MFI) молекул FoxP3 (А), CD25 (Б), CTLA-4 (В), GITR (Г) от $VD\text{-}TCRb^+CD4^+FoxP3^+$ клеток. Результаты представлены как среднее значение $\pm$ SEM и подтверждены в 3 независимых экспериментах. В каждой группе представлено по 4 мыши. Статистический анализ был проведен с помощью t-критерия Стьюдента. Различия считались достоверными при $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$ $****p < 0.0001$; NS, non-significant (недостоверная разница)

Снижение экспрессии супрессорных молекул на Treg клетках может приводить к нарушению их функций. Для подтверждения этого предположения была исследована способность Treg клеток, выделенных из дважды гуманизированных мышей и мышей hTNFKI x hTNFR2KI^{ΔTregs} ингибировать пролиферацию Т-клеток в функциональном тесте *in vitro*.

Для этого были выделены Treg клетки из вторичных лимфоидных органов дважды гуманизированных и hTNFKI x hTNFR2KI^{ΔTregs} мышей методом магнитной сепарации. После этого Treg клетки культивировали совместно с наивными Т-клетками, окрашенными флуоресцентной меткой, в присутствии активирующих сигналов. По степени разбавления флуоресцентной метки CTV оценивали пролиферацию Т-клеток в присутствии Treg клеток. Было обнаружено, что Treg клетки, выделенные из вторичных лимфоидных органов дважды гуманизированных мышей, эффективно ингибируют пролиферацию Т-клеток (Рис.8 А, Г).

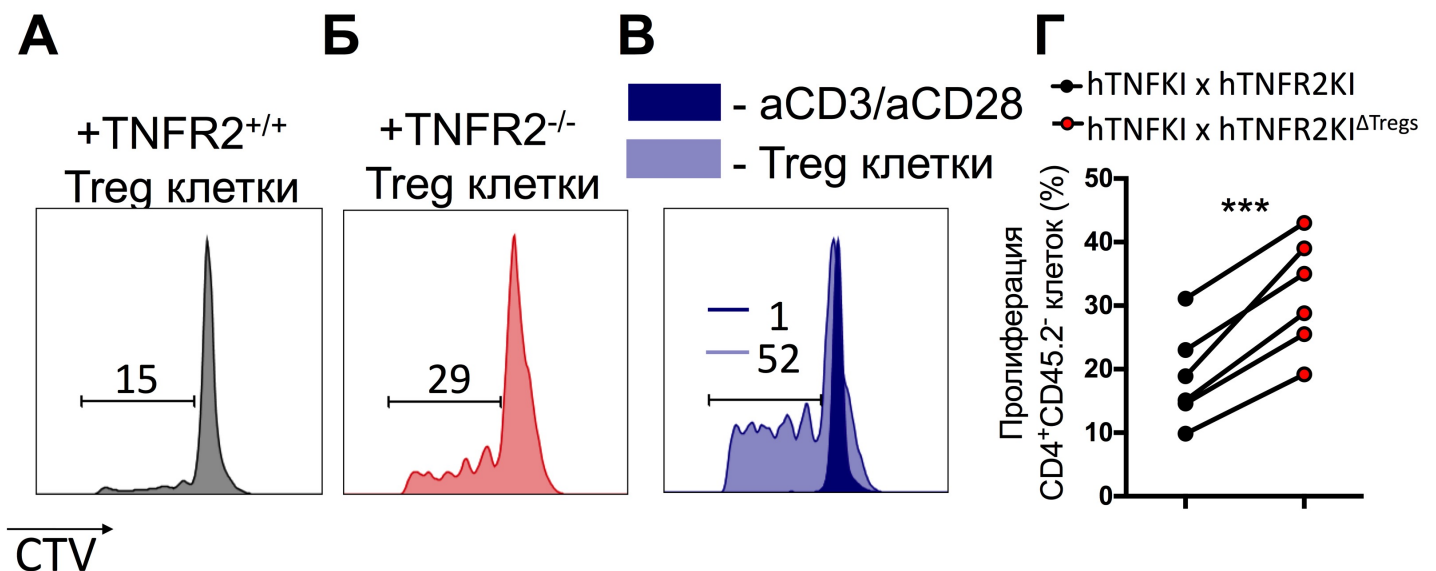


Рисунок 8. TNFR2 на Treg клетках необходим для подавления пролиферации Т-клеток

А) Репрезентативные гистограммы пролиферации Т-клеток в присутствии Treg клеток, выделенных из hTNFKI x hTNFR2KI (А) и hTNFKI x hTNFR2KI^{ΔTregs} мышей (Б). В) Репрезентативные гистограммы пролиферации Т-клеток без активации (темно-синий) или без добавления Treg клеток (фиолетовый). Г) Процентное содержание пролиферации CD4⁺CD45.2⁻ клеток от VD⁻ клеток, инкубированных с Treg клетками, выделенными из hTNFKI x hTNFR2KI и hTNFKI x hTNFR2KI^{ΔTregs} мышей. Представлены данные 6 независимых экспериментов по изучению пролиферации Т-клеток в присутствии Treg клеток из hTNFKI x hTNFR2KI (черный) и hTNFKI x hTNFR2KI^{ΔTregs} (красный) мышей. Статистический анализ был проведен с помощью t-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001 *****p* < 0.0001; NS, non-significant (недостоверная разница).

Однако у Treg клеток, выделенных из hTNFKI x hTNFR2KI^{ΔTregs} мышей, способность к подавлению пролиферации снижена в несколько раз по

сравнению с контрольной группой (Рис.8 Б, Г). В качестве технических контролей использовали Т-клетки без добавления Treg клеток, которые активно пролиферировали в ответ на активирующий стимул и Т-клетки без активации (Рис.8 В).

Таким образом, было показано, что TNFR2 участвует в поддержании фенотипа Т-регуляторных клеток и необходим для осуществления их супрессорных функций в нормальном состоянии.

2.3. Генетическая инактивация TNFR2 на Т-регуляторных клетках приводит к усилению клинических симптомов ЕАЕ и нарушению контроля Th17 клеток.

На предыдущем этапе было установлено, что TNFR2 необходим для поддержания супрессорных свойств Treg клеток в нормальном состоянии. Далее была исследована роль TNFR2 на Т-регуляторных клетках в контроле нейровоспаления в модели ЕАЕ. Для этого индуцировали заболевание у дважды гуманизированных мышей и hTNFKI x hTNFR2KI^{ΔTregs} и анализировали клинические симптомы ЕАЕ и иммунный ответ на периферии и ЦНС. Было обнаружено, что кондиционное удаление TNFR2 на Т-регуляторных клетках приводит к усилению клинических симптомов ЕАЕ (Рис.9 А). Анализ ЦНС на пике заболевания выявил повышение общего количества инфильтрирующих клеток (Рис.9 Б).

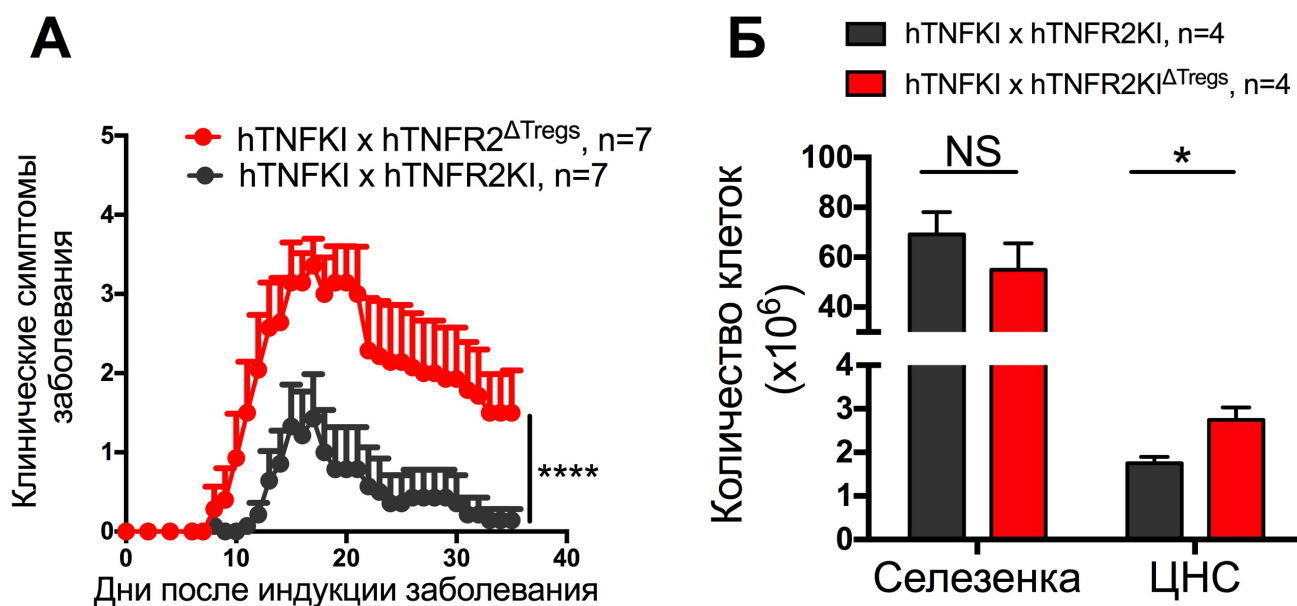


Рисунок 9. Удаление TNFR2 на Treg клетках приводит к усилению клинических симптомов ЕАЕ и инфильтрации ЦНС.

А) Динамика клинических симптомов ЕАЕ у hTNFKI x hTNFR2KI (серый) hTNFKI x hTNFR2KI^{ΔTregs} (красный) мышей. Б) Количество клеток в селезенке и инфильтрация ЦНС у hTNFKI x hTNFR2KI (серый) и hTNFKI x hTNFR2KI^{ΔTregs} мышей. Результаты представлены как среднее значение ± SEM и подтверждены в 3 независимых экспериментах. Статистический анализ был проведен с помощью t-критерия Стьюдента (Б) и 2-way ANOVA тестов (А). Различия считали достоверными при * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ **** $p < 0.0001$; NS, nonsignificant (недостоверная разница).

При этом процентное содержание Treg клеток у hTNFКI х hTNFR2KI^{ΔTregs} мышей не изменялось по сравнению с дважды гуманизированными мышами на эффекторной фазе ЕАЕ (Рис.10 А). Однако, доля CD25⁺ и CCR6⁺ Treg клеток как на периферии, так и в ЦНС, была снижена у hTNFКI х hTNFR2KI^{ΔTregs} мышей по сравнению с контрольными мышами (Рис.10 Б, В).

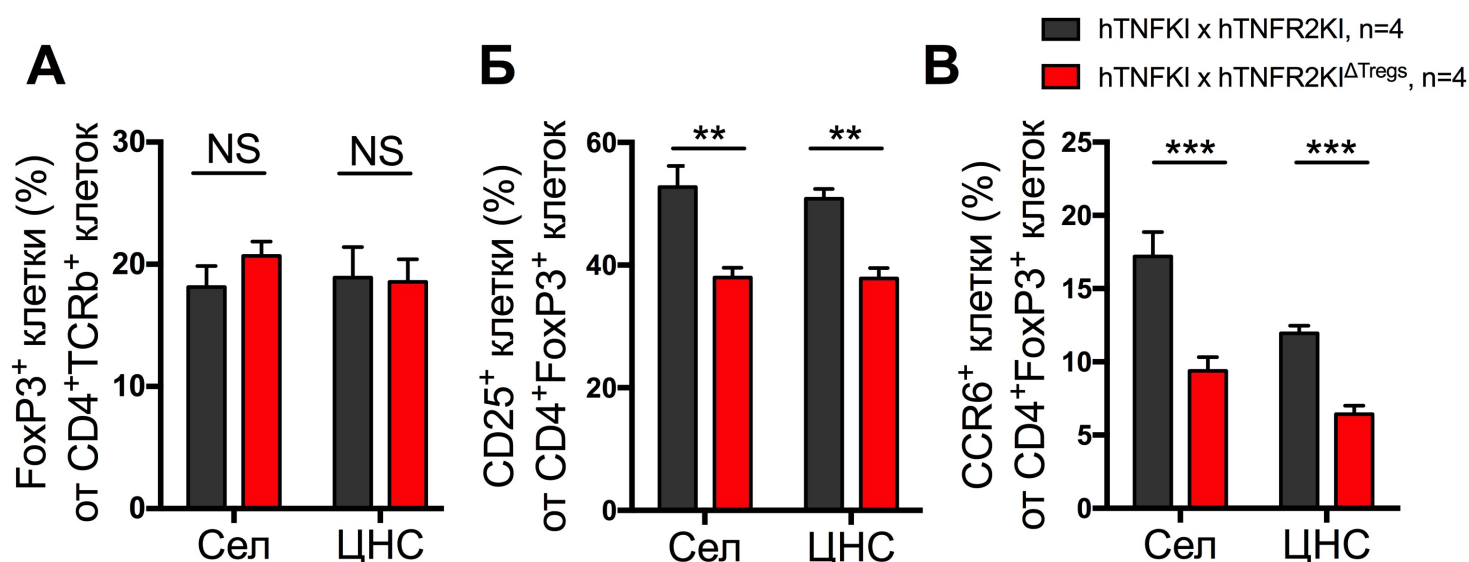


Рисунок 10. Анализ процентного содержания популяций Treg клеток в hTNFКI х hTNFR2KI (серый) и hTNFКI х hTNFR2KI^{ΔTregs} (красный) мышах на эффекторной фазе ЕАЕ.

Процентное содержание FoxP3⁺ клеток (А) от CD4⁺TCRb⁺VD⁻ клеток в селезенке и ЦНС. Процентное содержание CD25⁺ (Б), CCR6⁺ (В) клеток от VD⁻TCRb⁺CD4⁺FoxP3⁺ клеток. Результаты представлены как среднее значение ± SEM и подтверждены в 3 независимых экспериментах. В каждой группе представлено по 4 мыши. Статистический анализ был проведен с помощью t-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001 *****p* < 0.0001; NS, nonsignificant (недостоверная разница).

Помимо этого, удаление TNFR2 приводило к снижению экспрессии FoxP3, CD25, CTLA-4 и GITR на Т-регуляторных клетках как на периферии, так и в ЦНС на эффекторной фазе ЕАЕ, что свидетельствует о нарушении супрессорных свойств Treg клеток (Рис. 11).

Известно, что CCR6 необходим для миграции Treg клеток в ЦНС (Yamazaki et al., 2008), поэтому сниженное содержание CCR6⁺Treg клеток может свидетельствовать о нарушении миграции Treg клеток в сайт воспаления, что в дальнейшем может приводить к усилению воспаления в ЦНС. Действительно, у мышей с делецией TNFR2 на Treg клетках

наблюдается повышение инфильтрации ЦНС (Рис. 9 Б), а также процентного содержания MOG-специфических Th17 клеток, но не Th1 и T_{GM-CSF} клеток, в селезенке и ЦНС на эффекторной фазе ЕАЕ (Рис.12).

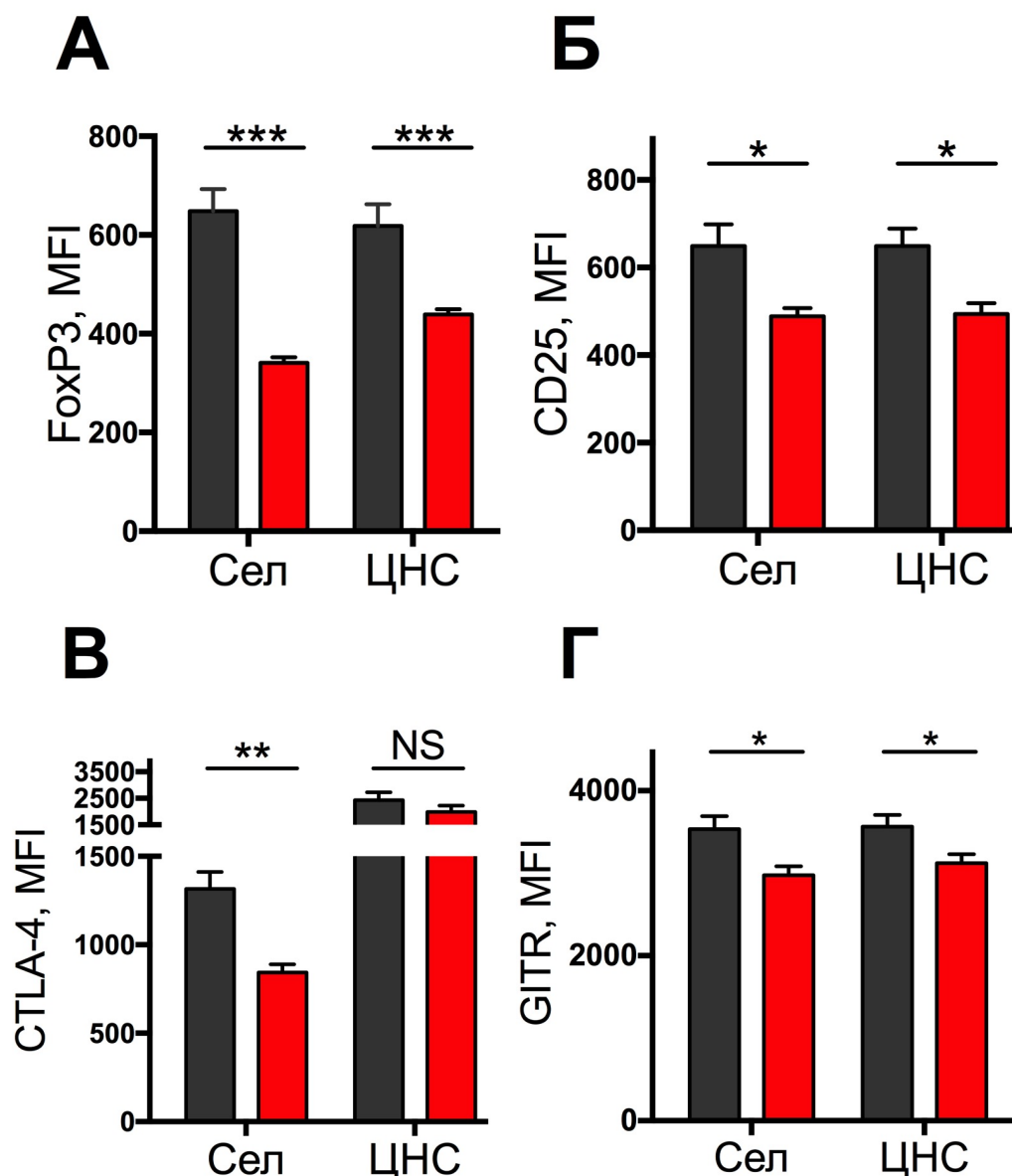


Рисунок 11. Анализ экспрессии супрессорных молекул Treg клеток у hTNFKI x hTNFR2KI (серый) и hTNFKI x hTNFR2KI^{ΔTregs} (красный) мышей на эффекторной фазе ЕАЕ.

А) Средние интенсивности флуоресценции (MFI) молекул FoxP3 (А), CD25 (Б), CTLA-4 (В), GITR (Г) от VD-TCRb⁺CD4⁺FoxP3⁺ клеток. Результаты представлены как среднее значение ± SEM и подтверждены в 3 независимых экспериментах. В каждой группе представлено по 4 мыши. Статистический анализ был проведен с помощью t-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ **** $p < 0.0001$; NS, non-significant (недостоверная разница).

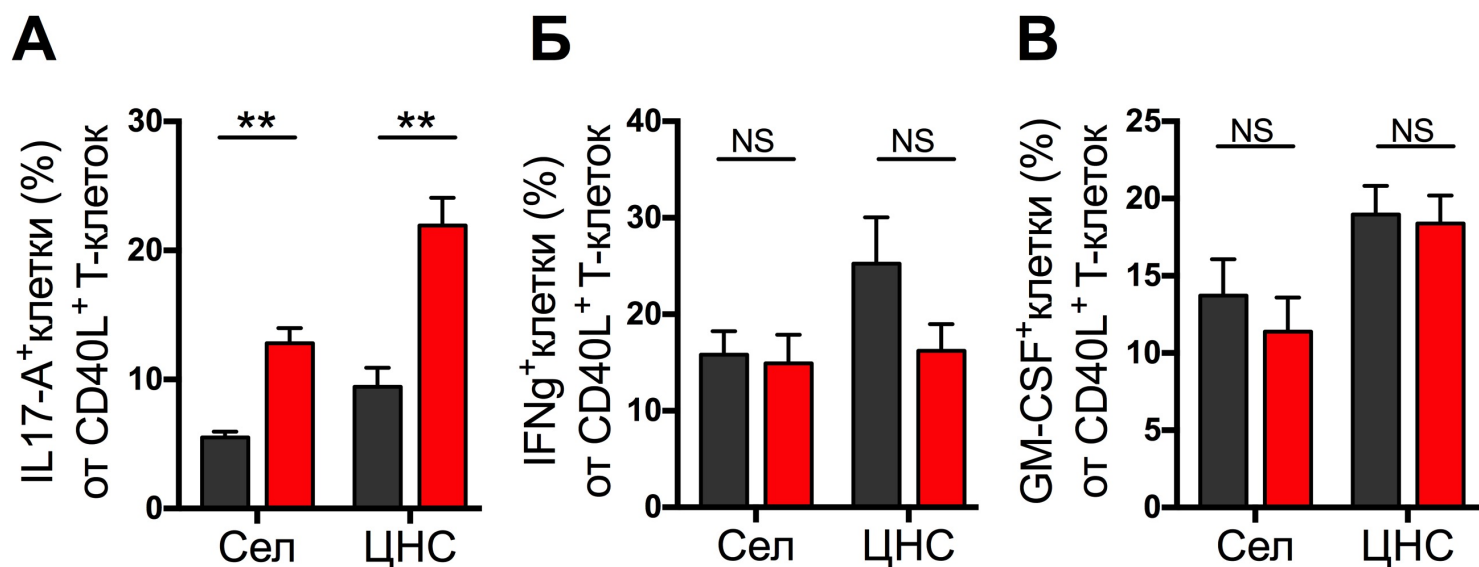


Рисунок 12. Удаление TNFR2 на Treg клетках приводит к повышению процентного содержания Th17 клеток в селезенке и ЦНС на эффекторной фазе ЕАЕ.

А) Процентное содержание IL-17A⁺ (А), IFN-γ⁺ (Б) и GM-CSF⁺ (В) Т-клеток от CD4⁺CD40L⁺ клеток, рестимулированных MOG-пептидом в присутствии брефельдина. Результаты представлены как среднее значение ± SEM и подтверждены в 3 независимых экспериментах. В каждой группе представлено по 4 мыши. Статистический анализ был проведен с помощью t-критерия Стьюдента. Различия считались достоверными при * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ **** $p < 0.0001$; NS, nonsignificant (недостоверная разница).

Таким образом, нами обнаружено, что TNFR2 на Treg клетках играет протективную роль при нейровоспалении. Было показано, что TNFR2 участвует в поддержании фенотипа Т-регуляторных клеток, может способствовать их миграции в сайт воспаления за счет поддержания CCR6⁺Treg клеток и обеспечивать контроль патогенных Th17 клеток в модели ЕАЕ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе настоящей работы была экспериментально продемонстрирована эффективность фармакологической нейтрализации TNF клинически применяемыми блокаторами TNF человека в снижении опухолевого роста. Для изучения влияния блокаторов TNF человека использовали уникальных мышей, гуманизированных по гену *TNF*. Гуманизированные мыши представляют собой удобную модель для предклинических исследований как существующих блокаторов, так и разрабатываемых антагонистов. В работе были изучены последствия фармакологической нейтрализации TNF блокаторами Инфликсимабом или Этанерцептом на опухолевое микроокружение. Так, введение блокаторов TNF приводило к пониженному накоплению MDSC в организме мыши и снижению их супрессорных функций. Результаты данной работы подтверждают важность TNF-опосредованного сигнального пути в регуляции MDSC в контексте опухолевого роста, что позволяет потенциально рассматривать TNF и MDSC как мишени для иммунотерапии рака. Дальнейшие исследования с использованием более специфических блокаторов, к примеру, с возможностью инактивации TNF только в миелоидных клетках или в MDSC, могут показать эффективность такой терапии в раковых моделях. Поиск новых мишеней для терапии аутоиммунных и опухолевых заболеваний необходим, поскольку системная анти-TNF терапия сопряжена с различными побочными эффектами, в том числе реактивацией туберкулеза и демиелинизацией.

Во второй части работы было показано, что TNFR2-опосредованный сигнальный каскад играет важную роль в поддержании супрессорного фенотипа Treg клеток в норме и при нейровоспалении. Было экспериментально продемонстрировано, что мыши с гуманизацией гена *TNF* могут иметь нарушенный TNF/TNFR2 сигнальный путь, критичный для контроля нейровоспаления, но не опухолевого роста. При этом дополнительная гуманизация TNFR2 приводила к нормализации иммунного ответа при нейровоспалении, что свидетельствует о важной иммунорегуляторной роли TNFR2 в этом процессе. Далее, используя мышей с возможностью кондиционного удаления TNFR2, было показано, что TNFR2 на Treg клетках необходим для поддержания их супрессорного фенотипа. При этом генетическая инактивация TNFR2 на Treg клетках приводила к снижению экспрессии ключевых супрессорных молекул, что было сопряжено с подавлением их супрессорных функций. Более того, установлено, что TNFR2 на Treg клетках играет протективную роль при нейровоспалении. Так, TNFR2 на Treg клетках необходим для поддержания их супрессорного фенотипа, доли CCR6⁺ популяции Treg клеток, мигрирующих в ЦНС, а также для контроля Th17-зависимого иммунного ответа при ЕАЕ, мышинной модели рассеянного склероза.

Суммируя все вышесказанное, роль TNF в развитии аутоиммунных и раковых заболеваний неоднозначна. С одной стороны, TNF может рассматриваться, как потенциальная мишень для иммунотерапии солидных опухолей за счет снижения воспаления и последующего накопления MDSC. С другой стороны, TNF обладает иммунорегуляторными функциями, в частности, через TNFR2 на Treg клетках, он участвует в контроле нейровоспаления. Результаты работы свидетельствуют о необходимости разработки новых подходов терапии аутоиммунных и раковых заболеваний с нейтрализацией TNF в определенном типе клеток, которые являются источником патогенного цитокина и вносят ключевой вклад в развитие заболевания, при этом сохраняя защитные функции этого цитокина из других клеточных источников.

Выводы

1. Фармакологическая нейтрализация TNF клинически применяемыми блокаторами, Инфликсимабом или Этанерцептом, замедляет рост MCA205 фибросаркомы.
2. Системная блокировка TNF Инфликсимабом или Этанерцептом подавляет накопление и супрессорную активность MDSC у мышей с MCA205 фибросаркомой.
3. TNFR2 на T-регуляторных клетках необходим для поддержания их супрессорного фенотипа и функциональной активности в нормальном состоянии.
4. В экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите, мышинной модели рассеянного склероза, TNFR2 на T-регуляторных клетках играет защитную роль.
5. Передача сигнала через TNFR2 на T-регуляторных клетках необходима для контроля Th17-зависимого иммунного ответа при нейровоспалении.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Web of Science:

1. **Atretkhany K-S. N.**, Mufazalov I. A., Dunst J., Kuchmiy A., Gogoleva V. S., Andruszewski D., Drutskaya M. S., Faustman D. L., Schwabenland M., Prinz M., Kruglov A. A., Waisman A., Nedospasov S. A. Intrinsic TNFR2 signaling in T regulatory cells provides protection in CNS autoimmunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2018 Dec 18;115(51):13051-13056. Импакт-фактор (WoS) – 9,58
2. **Atretkhany, K-S. N.**, Drutskaya M. S., Nedospasov S. A., Grivennikov S. I., Kuprash D. V. Chemokines, cytokines and exosomes help tumors to shape inflammatory microenvironment. *Pharmacology and Therapeutics*. 2016; 168: 98-112. Импакт-фактор (WoS) – 9,396
3. **Атретханы К.-С. Н.**, Друцкая М. С. Миелоидные супрессорные клетки и провоспалительные цитокины как мишени терапии рака. *Биохимия*. 2016; 81(11): 1274-1283. Импакт-фактор (WoS) – 1,886
4. **Atretkhany K.-S. N.**, Nosenko M. A., Gogoleva V. S., Zvartsev R. V., Qin Z., Nedospasov S. A., Drutskaya M. S. TNF Neutralization Results in the Delay of Transplantable Tumor Growth and Reduced MDSC Accumulation. *Frontiers in Immunology*. 2016;19(7):147. Импакт-фактор (WoS) – 4,716

Тезисы конференций:

- 1) **Atretkhany K-S**, Nosenko M.A., Zvartsev R.V., Kruglov A.A., Efimov G.A., Qin Z., Nedospasov S.A., Drutskaya M.S. (2015) Systemic TNF ablation results in delayed tumor growth and reduced MDSC accumulation in transplantable tumor model. 3rd Belgrade EFIS Symposium on immunoregulation, May 24-28, Belgrade, Serbia. Сборник тезисов.
- 2) **Атретханы К.-С.Н.**, Носенко М.А. Зварцев Р.В., Хозер Д., Вильямский Г., Бланкештейн Т., Недоспасов С.А., Друцкая М.С. Изучение экспрессии генов IL-6, TNF и LTA в модели спонтанной В-клеточной лимфомы (2015). Медицинская Иммунология, 17:156
- 3) **Kamar-Sulu Atretkhany**, Maxim Nosenko, Violetta Gogoleva, Ruslan Zvartsev, Zhihai Qin, Marina Drutskaya, Sergei Nedospasov. (2016) TNF neutralization in transplantable tumor model results in the delay of tumor growth and reduces MDSC accumulation. 81st Cold Spring Harbor Symposium: Targeting Cancer, June 1-6, Cold Spring Harbor, USA. Сборник тезисов.
- 4) **Kamar-Sulu Atretkhany**, Violetta Gogoleva, Maxim Nosenko, Ruslan Zvartsev, Zhihai Qin, Marina Drutskaya, Sergei Nedospasov (2017). Anti-TNF treatment affects MDSC function and prevents metastasis in transplantable tumor model. 13th Spring School on Immunology, March 5 - 10, Ettal, Germany. Сборник тезисов.
- 5) **Atretkhany K-S.N**, Gogoleva V.S, Nosenko M.A, Gorshkova E.A, Efimov G.A, Drutskaya M.S, Nedospasov S. A (2017). Myeloid cell-restricted anti-TNF

treatment ameliorates EAE and inhibits Th17 development. Second interdisciplinary congress on IL17, November 24-25, Munich, Germany. Сборник тезисов.

6) **Атретханы К-С.Н.**, Муфазалов И.А., Кучмий А., Гоголева В.С., Андрюшевский Д., Друцкая М.С., Круглов А.А., Вайсман А., Недоспасов С.А. (2018). TNFR2 и Т-регуляторные клетки как мишени при терапии рассеянного склероза. III Всероссийский конгресс “Аутоиммунные и иммунодефицитные заболевания”, 16-17 ноября 2018 год, Москва, Россия. Научно-практическая ревматология. 2018; 56 (3, прил. 3), с 7.

7) **Атретханы К-С.Н.**, Гоголева В.С., Друцкая М.С., Недоспасов С.А. (2019) Иммунорегуляторные функции TNF в поддержании супрессорного микроокружения при аутоиммунных и раковых заболеваниях. III Международная конференция “Наука будущего” и форум “Наука будущего – наука молодых”, 14-17 мая, Сочи, Россия. Сборник тезисов.