

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

*На правах рукописи*

**Гоголева Виолетта Сергеевна**

**Нейроиммунные и гомеостатические функции  
лимфотоксина альфа**

3.2.7. — Иммунология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2024

Диссертация подготовлена в лаборатории молекулярных механизмов иммунитета Института молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта Российской академии наук.

**Научный руководитель**                    **Недоспасов Сергей Артурович**  
доктор биологических наук, профессор, академик РАН

**Официальные оппоненты**                    **Демидов Олег Николаевич**  
доктор медицинских наук,  
Институт цитологии РАН, ведущий научный сотрудник,  
Университет Бургундии и Институт здоровья и  
медицинских исследований INSERM, ведущий научный  
сотрудник

**Гривенников Игорь Анатольевич**  
доктор биологических наук, профессор,  
Национальный исследовательский центр  
«Курчатовский институт», Лаборатория молекулярной  
нейрогенетики и врожденного иммунитета, главный  
научный сотрудник

**Ломакин Яков Анатольевич**  
кандидат биологических наук,  
ФГБУ «Институт биоорганической химии им. академиков  
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской  
академии наук, лаборатория биокатализа, старший  
научный сотрудник

Защита диссертации состоится 1 марта 2024 г. в 16 часов на заседании диссертационного совета МГУ.015.1 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, биологический факультет, ауд. М1.

E-mail: [dkiselevs@mail.ru](mailto:dkiselevs@mail.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/015.1/2861>.

Автореферат разослан «    » \_\_\_\_\_ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат биологических наук



Д.Б. Киселевский

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность и степень разработанности темы исследования

Лимфотоксин (LT) – цитокин суперсемейства фактора некроза опухоли (TNF), открытый более 50 лет назад, причем гены для обоих цитокинов были клонированы одновременно 40 лет назад. Несмотря на то, что лимфотоксин и TNF обладают сходствами в биологической активности, годы исследований, в первую очередь на генно-модифицированных мышах, показали, что лимфотоксин имеет уникальные, не перекрывающиеся с TNF, функции в организме. Более того, лимфотоксин может существовать как в растворимой гомотримерной форме ( $LT\alpha_3$ , далее  $LT\alpha$ ), так и в мембраносвязанной гетеротримерной форме –  $LT\alpha_1\beta_2$  (далее *memLT*, или  $LT\beta$ ). Для исследования биологически значимых эффектов системы цитокинов TNF/ $LT\alpha$ / $LT\beta$  были сконструированы мыши с полной или клеточно-специфичной инактивацией соответствующих молекул. Анализ фенотипа этих мышей позволил охарактеризовать физиологическую роль лимфотоксинов  $\alpha$  и  $\beta$ , которая заключается в формировании и поддержании архитектуры лимфоидных органов, а также регуляции иммунного ответа. В дальнейших исследованиях было показано участие лимфотоксинов  $\alpha$  и  $\beta$  в патогенезе аутоиммунных заболеваний, в основном за счет индукции формирования третичных лимфоидных органов – эктопических лимфоидных структур, образующихся в очагах хронического воспаления  $LT\beta R$ -опосредованным путем. Эти результаты послужили толчком для создания терапевтических препаратов, блокирующих сигнальный путь, опосредованный лимфотоксинами  $\alpha$  и  $\beta$ , однако в клинических испытаниях ни один из исследованных препаратов не показал клиническую эффективность, что может указывать как на неоднозначную роль лимфотоксинов в патогенезе аутоиммунных заболеваний, так и на необходимость разработки новых вариантов фармакологических блокаторов.

Стоит отметить, что изучение функций лимфотоксинов  $\alpha$  и  $\beta$  как в норме, так и при патологии является непростой задачей. Во-первых, конструирование нокаутных мышей усложняется близким расположением генов, кодирующих TNF,  $LT\alpha$  и  $LT\beta$ , что затрудняет прицельное удаление соответствующих генов без затрагивания регуляторных участков соседних генов. Во-вторых, лимфотоксины характеризуются несколькими модальностями передачи сигнала – от растворимого гомотримера  $LT\alpha$  или мембранного гетеротримера  $LT\beta$ , с участием минимум трех рецепторов, а именно TNFR1, TNFR2 и  $LT\beta R$ . В-третьих, лимфотоксины продуцируются различными клетками лимфоидного происхождения – лимфоцитами врожденного иммунитета типа 3 (ILC3), T- и B-клетками. В-четвертых, при инактивации генов *Lta* или *Ltb* мыши не развивают

лимфатические узлы и Пейеровы бляшки, что затрудняет изучение функций лимфотоксинов в различных экспериментальных *in vivo* моделях аутоиммунных заболеваний.

В настоящей работе использовано несколько подходов к изучению иммунобиологии лимфотоксинов в норме и в модели экспериментально индуцированного аутоиммунного заболевания: 1) работу проводили, используя линию мышей с полной инактивацией гена *Lta* (т.е. гена, кодирующего субъединицу, присутствующую в  $LT\alpha$  и в  $memLT$ ; без разграничения индивидуальных вкладов растворимого гомотримера  $LT\alpha$  или мембранного гетеротримера  $LT\beta$ ) и интактной экспрессией TNF, 2) результаты, полученные на мышах с генетическим удалением лимфотоксинов, были подтверждены независимо в экспериментах с фармакологической блокировкой  $LT\alpha$ ), 3) был установлен невырожденный вклад различных клеточных источников лимфотоксинов в патогенез экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЕАЕ) – мышинной модели рассеянного склероза (РС), развитие которого напрямую не зависит от наличия лимфатических узлов.

**Целью** настоящей работы было определение нейроиммунных, а также некоторых гомеостатических функций молекулярных форм лимфотоксина  $\alpha$ .

Для достижения этой цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Определить роль лимфотоксина  $\alpha$  в поддержании гомеостаза кишечника и дифференцировке миелоидных клеток *in vitro*.
2. Изучить роль лимфотоксина  $\alpha$  в патогенезе экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита с применением полной генетической и фармакологической инактивации лимфотоксина  $\alpha$ .
3. Создать мышей с тканеспецифичным удалением *Lta* в  $CD19^+$  В-клетках
4. Изучить вклад молекулярных форм лимфотоксина  $\alpha$ , производимых ИЛСЗ, Т- и В-клетками, в развитие экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита.

### **Научная новизна работы**

Работу проводили на панели уникальных генетически модифицированных мышей с полным или тканеспецифичным удалением *Lta* (т.е. без разграничения индивидуальных вкладов растворимого гомотримера  $LT\alpha$  и мембранного гетеротримера  $LT\beta$ ), в результате чего были установлены некоторые новые аспекты иммунобиологии лимфотоксинов. Так, на *Lta*-дефицитных мышах с нормальной продукцией TNF миелоидными клетками показано, что полное удаление *Lta* влияет на поддержание гомеостаза ИЛСЗ в тонком кишечнике

взрослого организма и на дифференцировку миелоидных клеток в моноциты *in vitro*, что, по-видимому, опосредовано TNF-подобной функцией растворимого лимфотоксина. На этих же мышях было обнаружено, что вопреки имеющимся в литературе данным, генетическая инактивация лимфотоксина альфа не влияет на клинические симптомы ЕАЕ. Было установлено, что мыши с дефицитом *Lta* в ILC3 развивают сильные симптомы ЕАЕ, скорее всего, за счет увеличения инфильтрации IFN $\gamma$ -продуцирующих Т-клеток и моноцитов, дифференцирующихся в эффекторные дендритные клетки, в центральную нервную систему (ЦНС). Экспериментально доказано, что инактивация *Lta* в Т-клетках усугубляет динамику развития ЕАЕ путем контроля прайминга антиген-специфичных Т-клеток во вторичных лимфоидных органах. Впервые показано, что молекулярные формы лимфотоксина  $\alpha$ , продуцируемые В-клетками, играют ключевую роль в патогенезе модели ЕАЕ, опосредованной аутоантителами.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Представленные результаты комплексного исследования имеют важное значение как для фундаментальной иммунологии и понимания молекулярных механизмов регуляции цитокинов суперсемейства TNF, так и для возможного объяснения неэффективности блокаторов сигнальных путей, опосредованных лимфотоксином, в клинических испытаниях. Так, на фоне дефицита LT $\alpha$  выявлено значимое увеличение доли ILC3 в тонком кишечнике и уменьшение дифференцировки миелоидных клеток в моноциты *in vitro*, что важно для прогнозирования возможных побочных эффектов при применении этанерцепта, блокатора TNF/LT $\alpha$ , в терапии аутоиммунных заболеваний. В ходе работы были объяснены противоречия с ранее опубликованными результатами других авторов, касающихся функций лимфотоксинов в гомеостазе и в патогенезе рассеянного склероза, экспериментально индуцированного в мышях. Полученные данные о вкладе молекулярных форм лимфотоксина  $\alpha$ , продуцируемых разными типами иммунных клеток в патогенез ЕАЕ, в значительной степени расширяют наше понимание молекулярных механизмов патологии нейровоспаления в контексте РС, а также демонстрируют разделение функций лимфотоксина  $\alpha$  в трех модальностях: 1) в зависимости от клеточного источника, 2) во времени и 3) в локализации. Более того, результаты работы являются предпосылкой к переосмыслению возможности терапевтического применения блокаторов лимфотоксинов, в частности, рассмотрению фармакологической блокировки молекулярных форм лимфотоксина  $\alpha$ , производимых Т-клетками, в качестве подхода для избирательного таргетирования этого цитокина в контексте аутоиммунных заболеваний. Наконец, полученные данные дают основание предположить, что в случае

аутоантитело-ассоциированного подтипа рассеянного склероза, В-клетки, экспрессирующие молекулярные формы лимфотоксина  $\alpha$ , могут рассматриваться в качестве потенциальной иммунотерапевтической мишени. Однако еще предстоит выяснить индивидуальный вклад мембраносвязанной и растворимой форм лимфотоксинов.

**Объектом исследования** были мыши с полным удалением генов, кодирующих лимфотоксин  $\alpha$ , TNF или TNFR1, а также мыши с тканеспецифичным удалением гена, кодирующего лимфотоксин  $\alpha$ , в ILC3 (ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>), Т-клетках (CD4<sup>+</sup>) и В-клетках (CD19<sup>+</sup>) в возрасте 8-12 недель, полученные на генетической основе C57BL/6. Экспериментальные группы формировали с участием мышей обоих полов. В качестве контрольных мышей использовали мышей C57BL/6 в случае мышей с полным удалением LT $\alpha$ , TNF или TNFR1, или мышей, не несущих Cre-рекомбиназу из того же помета, что и мыши с генетическим удалением *Lta* в определенном типе клеток.

### **Методология и предмет исследования**

Изучение роли лимфотоксина  $\alpha$  в гомеостазе тонкого кишечника и дифференцировке миелоидных клеток проводили на мышах с полным удалением *Lta* или *Tnf*, полученных с помощью технологии Cre-loxP (*Lta* <sup>$\Delta\Delta$</sup>  и *Tnf* <sup>$\Delta\Delta$</sup> ). Исследование содержания ILC3 в собственной пластинке тонкого кишечника проводили с помощью цитофлуориметрического анализа. Дополнительно проводили анализ состояния иммунной системы *Lta* <sup>$\Delta\Delta$</sup>  мышей в норме с помощью мультиплексного анализа цитокинов и поляризации Т-клеток *in vitro*.

Изучение роли лимфотоксинов в патогенезе аутоиммунных заболеваний проводили на мышах с полным (*Lta* <sup>$\Delta\Delta$</sup> ) или тканеспецифичным удалением *Lta* в ILC3, Т- и В-клетках. Удаление *Lta* (т.е. гена, кодирующего субъединицу, присутствующую в LT $\alpha$  и в memLT) позволяет изучать эффекты от обеих форм лимфотоксинов, а именно LT $\alpha$  и memLT. В качестве модели аутоиммунного заболевания использовали широко распространенную модель рассеянного склероза на мышах – экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (ЕАЕ). Индукцию заболевания осуществляли иммунизацией MOG<sub>35-55</sub>-пептидом (для преимущественного развития Т-клеточнозависимого ответа) или полноразмерным белком rhMOG<sub>1-125</sub> (для преимущественного развития аутоантительного ответа) в полном адьюванте Фрейнда с последующим двукратным введением коклюшного токсина для повышения проницаемости гематоэнцефалического барьера. Клинические симптомы заболевания оценивали по стандартной шкале, вклад клеточных источников лимфотоксина в патогенез

ЕАЕ оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии, гистологического анализа, анализа экспрессии генов в ЦНС и иммуноферментного анализа.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. LT $\alpha$  важен для поддержания гомеостаза популяции лимфоцитов врожденного иммунитета типа 3 (ILC3) в тонком кишечнике и для дифференцировки миелоидных клеток в моноциты *in vitro*.
2. Полная генетическая и фармакологическая инактивация лимфотоксина  $\alpha$  не влияет на чувствительность мышей к экспериментальному аутоиммунному энцефаломиелиту.
3. Отдельные функции молекулярных форм лимфотоксина  $\alpha$  в модели нейровоспаления могут быть отнесены к конкретным клеткам-продуцентам и различаются по локализации, а также по стадии заболевания.

### **Степень достоверности результатов**

Результаты работы были воспроизведены в двух или более независимых экспериментах. Перед опытами мышей содержали совместно для выравнивания состава микробиоты. Методы исследования, экспериментальные модели заболеваний, а также статистическая обработка данных, приведенные в работе, соответствуют общепринятым международным стандартам.

### **Апробация результатов**

Результаты работы были представлены и обсуждены на международных и отечественных конференциях и научных школах: Конференция молодых ученых Института молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта РАН, 19-20 сентября 2023, Москва, Россия, Weizmann-Washington University Joint Meeting to Advance Neuroimmunology, 29-31 мая 2023, Реховот, Израиль, 18th International TNF Superfamily Conference, Ле Дьяблере, Швейцария, 10-14 октября 2021, Школа-конференция «Молекулярные медиаторы иммунитета», Сириус, Россия, 30 ноября-3 декабря 2019, 15th Spring School on Immunology, Этгаль, Германия, 10-15 марта 2019.

### **Личный вклад автора**

В настоящей работе автором были выполнены эксперименты, связанные с изучением роли LT $\alpha$  в гомеостазе иммунной системы и в патогенезе экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита. Личный вклад автора состоит в непосредственном участии в планировании и выполнении

экспериментов, обработке и анализе результатов, подготовке публикаций и текста диссертации.

### **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 239 источников. Работа изложена на 96 страницах, содержит 21 рисунок и 4 таблицы.

## **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

CCL – хемокиновый лиганд

EAE – экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит

GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

IFN $\gamma$  – интерферон  $\gamma$

IL – интерлейкин

ILC – лимфоциты врожденного иммунитета

LT $\alpha$ , лимфотоксин  $\alpha$  – растворимая гомотримерная форма лимфотоксина (LT $\alpha_3$ )

LT $\beta$ , memLT – мембраносвязанная гетеротримерная форма лимфотоксина (LT $\alpha_1\beta_2$ )

LT $\beta$ R – лимфотоксин- $\beta$  рецептор

MOG – миелин-олигодендроцитарный гликопротеин

T<sub>H</sub> – T-хелпер

TNF – фактор некроза опухоли

TNFR – рецептор фактора некроза опухоли

T<sub>reg</sub> – регуляторная T-клетка

мОДК – моноциты, дифференцирующиеся в эффекторные дендритные клетки

РС – рассеянный склероз

ЦНС – центральная нервная система

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

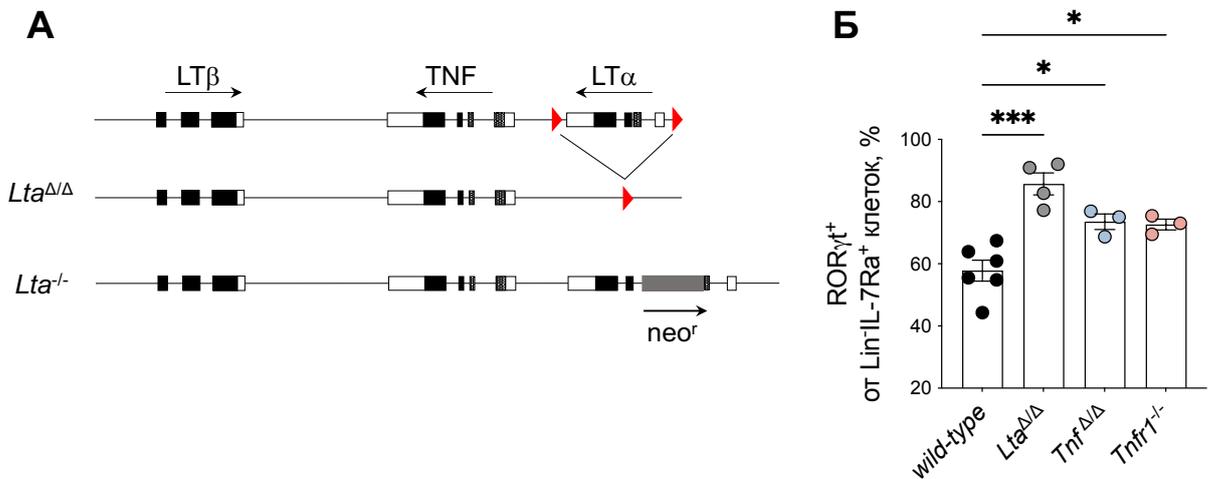
Настоящая работа посвящена изучению физиологических и нейроиммунных функций молекулярных форм лимфотоксина  $\alpha$ . На первом этапе была исследована роль лимфотоксина  $\alpha$  в гомеостазе кишечника и в дифференцировке миелоидных клеток – процессов, для которых относительно недавно была установлена роль сигнальных путей, опосредованных лимфотоксином. В описанных в работе результатах была предпринята попытка сравнения биологической активности лимфотоксина  $\alpha$ , TNF и TNFR1 в качестве альтернативного подхода по установлению TNF-подобной активности лимфотоксина  $\alpha$  (то есть растворимой формы LT $\alpha_3$ ). Второй важной проблемой, исследованию которой и посвящена основная часть работы, является роль молекулярных форм лимфотоксина  $\alpha$  в различных экспериментальных моделях аутоиммунных заболеваний. В качестве экспериментальной модели аутоиммунного заболевания, в контексте которой можно изучать функции лимфотоксинов, была выбрана модель MOG<sub>35-55</sub>-индуцированного ЕАЕ.

### 1. Роль лимфотоксина $\alpha$ в гомеостазе иммунной системы

В рамках настоящей работы была исследована роль лимфотоксина  $\alpha$  в гомеостазе кишечника и в дифференцировке миелоидных клеток – процессов, для которых относительно недавно была установлена роль сигнальных путей, опосредованных лимфотоксином.

Для четкого разграничения функций лимфотоксина  $\alpha$  и TNF использовали *Lta*-дефицитных мышей без кассеты, ответственной за резистентность к неомицину (*neo*-кассеты) (*Lta* <sup>$\Delta\Delta$</sup> ) (Liepinsh et al., 2006) (Рисунок 1А). У таких мышей отсутствуют как мембраносвязанная, так и растворимая формы лимфотоксинов. Предположительно, *neo*-кассета, присутствующая в таргетирующей конструкции мышей с конвенциональным удалением *Lta*, способна влиять на экспрессию соседних генов, в частности, *Tnf*. Так, для *Lta*-дефицитных мышей без *neo*-кассеты был описан нормальный уровень продукции TNF миелоидными клетками при *ex vivo* активации LPS по сравнению с мышами с конвенциональным удалением *Lta* (Liepinsh et al., 2006). Кроме этого, в инфекционной модели *Lta* <sup>$\Delta\Delta$</sup>  мыши без *neo*-кассеты были менее восприимчивы к заражению *Mycobacterium tuberculosis* по сравнению с мышами с конвенциональным удалением *Lta* и мышами с удалением *Tnf* (Allie et al., 2010). Дополнительным контролем для разграничения функций лимфотоксина  $\alpha$  и TNF служили мыши, дефицитные по *Tnf* (*Tnf* <sup>$\Delta\Delta$</sup> ) (Kuprash et al., 2005) и мыши с удалением TNFR1 (*Tnfrsf1a* <sup>$^{-/-}$</sup> , далее *Tnfr1* <sup>$^{-/-}$</sup> ) (Pfeffer et al., 1993).

Поскольку основным клеточным источником лимфотоксинов, участвующим как в образовании лимфоидных органов, так и в регуляции иммунитета слизистых, являются  $ROR\gamma^+$  ILC3, было проанализировано содержание ILC3 в собственной пластинке тонкого кишечника с помощью цитофлуориметрического анализа. Оказалось, что у  $Lta^{\Delta/\Delta}$  мышей повышено процентное содержание  $ROR\gamma^+$  ILC3 в тонком кишечнике (Рисунок 1Б). При этом такой же фенотип наблюдался у мышей с удалением TNF и TNFR1 (Рисунок 1Б), что позволяет заключить, что TNF и лимфотоксин  $\alpha$  необходимы и для поддержания гомеостаза ILC3 в тонком кишечнике взрослого организма.

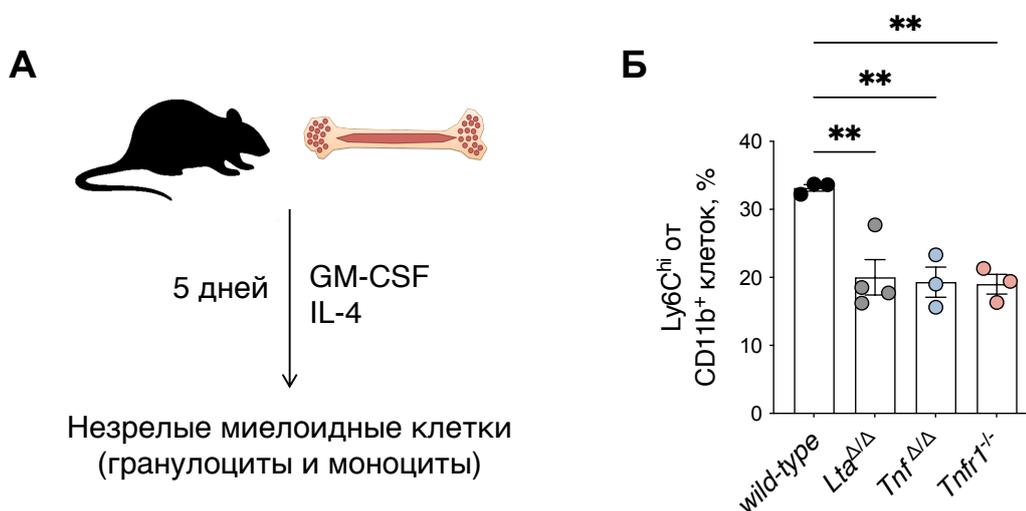


**Рисунок 1. Лимфотоксин  $\alpha$  важен для поддержания гомеостаза ILC3 в тонком кишечнике.** (А) Сравнение различных способов генетического таргетирования LT $\alpha$ . Сверху – схема локуса дикого типа, в центре – получение мышей без *neo*-кассеты ( $Lta^{\Delta/\Delta}$ ), снизу – получение мышей с конвенциональным удалением *Lta*, у которых сохраняется *neo*-кассета ( $Lta^{-/-}$ ). (Б) Процентное содержание  $ROR\gamma^+$  ILC3 клеток, выделенных как  $VD^- CD45^+ Lin^- IL-7R\alpha^+$  среди клеток собственной пластинки тонкого кишечника, выделенных из мышей дикого типа (wild-type) или с удалением *Lta*, *Tnf* или *Tnfr1*. Каждый символ соответствует индивидуальной мыши, результаты представлены как среднее значение  $\pm$  SEM и подтверждены в 3 независимых экспериментах. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ , one-way ANOVA.

Поскольку в последнее время появилось много данных о роли лимфотоксина (в основном memLT) в дифференцировке миелоидных клеток в различных иммунных компартаментах, было решено оценить развитие незрелых миелоидных клеток в культурах костного мозга *in vitro* (Рисунок 2А). Было выявлено, что генетическое удаление *Lta*, *Tnf* или *Tnfr1* приводит к уменьшению дифференцировки миелоидных клеток в  $LybC^{hi}$  моноциты (Рисунок 2Б). Эти результаты согласуются с ранее полученными данными об уменьшении количества миеломонобластов в культурах костного мозга, полученных из мышей с дефицитом *Tnf* или *Lta* (Drize et al., 2000). Предположительно, такой

фенотип может наблюдаться за счет ключевой роли сигнального пути, опосредованного TNFR1, в выживании моноцитов (Wolf et al., 2017).

Таким образом, лимфотоксин  $\alpha$ , предположительно, за счет своей TNF-подобной функции, необходим для поддержания гомеостаза ILC3 в тонком кишечнике, а также может участвовать в дифференцировке миелоидных клеток в моноциты *in vitro*.



**Рисунок 2. Удаление лимфотоксина  $\alpha$  и TNF влияет на дифференцировку незрелых миелоидных клеток *in vitro*.** (А) Схема эксперимента: клетки костного мозга, выделенные из мышей дикого типа (wild-type) или с удалением *Lta*, *Tnf* или *Tnfr1* культивировали в течение 5 дней в присутствии GM-CSF и IL-4. На 5-й день культивирования состав клеток анализировали методом проточной цитофлуориметрии с использованием антител к маркерам CD11b, Ly6G, Ly6C. (Б) Процентное содержание Ly6C<sup>hi</sup> клеток среди CD11b<sup>+</sup> клеток, полученных по схеме (А). Каждый символ соответствует индивидуальной мыши, результаты представлены как среднее значение  $\pm$  SEM и подтверждены в 2 независимых экспериментах. \*\* $P < 0.01$ , one-way ANOVA.

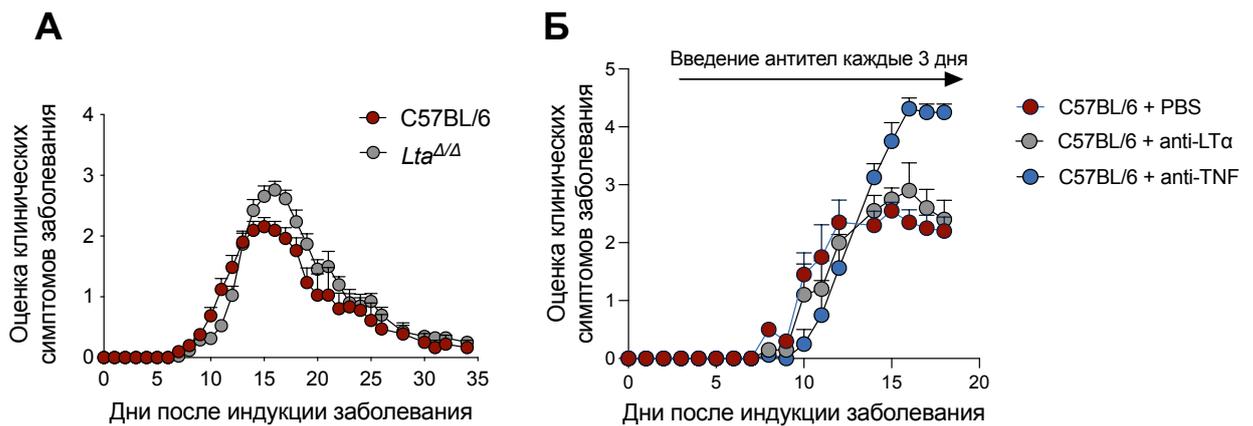
## 2. Роль молекулярных форм лимфотоксина $\alpha$ в патогенезе экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита

### 2.1. Генетическая и фармакологическая нейтрализация лимфотоксина $\alpha$ не приводит к усугублению симптомов ЕАЕ

На первом этапе для исследования функций молекулярных форм лимфотоксина  $\alpha$  были проведены эксперименты на мышах с полным удалением *Lta* (то есть с полным удалением LT $\alpha$ , входящим в состав как растворимого LT $\alpha$ , так и memLT) и интактной экспрессией TNF (*Lta* $\Delta\Delta$  мыши). Для этого мышей подвергали MOG<sub>35-55</sub>-индуцированному ЕАЕ. Было обнаружено, что *Lta* $\Delta\Delta$  мыши восприимчивы к ЕАЕ и развивали заболевание, схожее по динамике с заболеванием мышей дикого типа (Рисунок 3А), что прямо противоречило имеющимся в литературе данным об абсолютной резистентности мышей с

удалением *Lta* (Suen et al., 1997), но подтверждало результаты о нормальном развитии ЕАЕ у *Lta*-дефицитных мышей с нормальной продукцией TNF (Sean Riminton et al., 1998).

Иммунная система *Lta*-дефицитных мышей характеризуется отсутствием лимфатических узлов. В связи с этим для валидации полученных результатов динамику развития ЕАЕ, наблюдаемую у *Lta*-дефицитных мышей, сравнивали с таковой в экспериментах с фармакологической блокировкой LT $\alpha$ , которые блокируют как мембраносвязанную, так и растворимую формы лимфотоксина. Для этого мышам дикого типа (C57BL/6) вводили нейтрализующие антитела к LT $\alpha$  (Chiang et al., 2009) каждые 3 дня, начиная с 4-го дня после индукции ЕАЕ. Параллельно, для определения TNF-подобной активности лимфотоксина  $\alpha$ , другой экспериментальной группе вводили антитела к TNF, контрольные мыши получали инъекции PBS. Было обнаружено, что при фармакологической блокировке LT $\alpha$  мыши развивали заболевание, схожее по симптоматике с мышами дикого типа (Рисунок 3Б), что совпадало с результатами, полученными на мышках с генетическим удалением *Lta*. В то же время при фармакологической блокировке TNF мыши демонстрировали отложенное начало и более тяжелое течение заболевания (Рисунок 3Б), что согласуется с имеющимися в литературе данными (Batoulis et al., 2014; Kassiotis et al., 1999), однако говорит о том, что в контексте ЕАЕ, предположительно, не реализуется TNF-подобная функция LT $\alpha$ . Более того, эти результаты согласуются с данными об отсутствии ухудшения клинических симптомов при блокировке мембраносвязанной формы лимфотоксина в модели ЕАЕ (Gommerman et al. 2003).

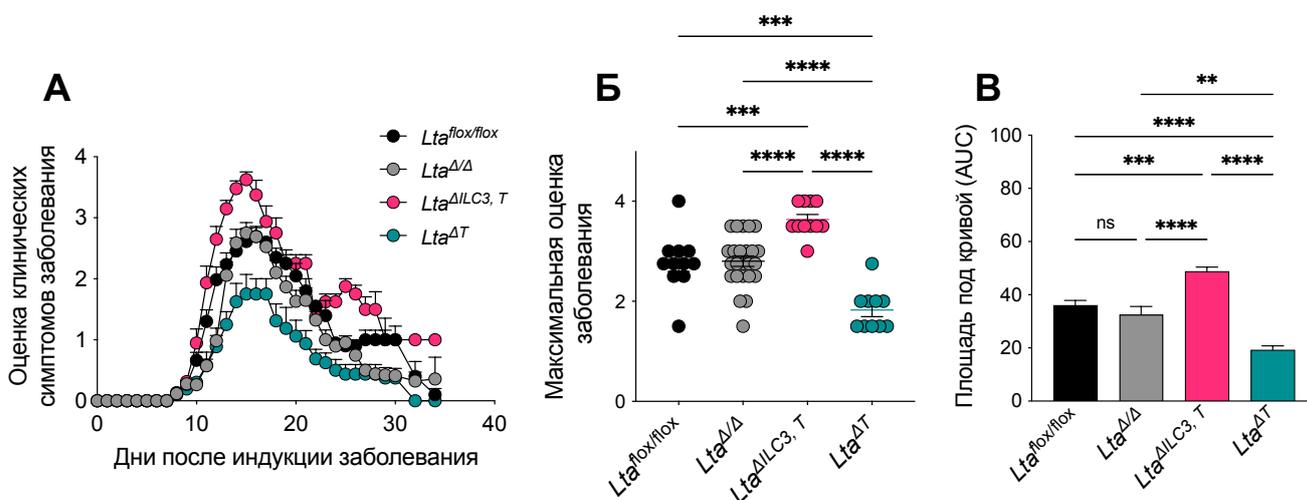


### Рисунок 3. Генетическая или фармакологическая нейтрализация лимфотоксинов не приводит к ухудшению симптомов ЕАЕ.

(А) Развитие клинических симптомов ЕАЕ у мышей дикого типа (C57BL/6) и мышей с удалением *Lta*. Результаты представлены как среднее значение  $\pm$  SEM и подтверждены в 7 независимых экспериментах. (Б) Динамика развития клинических симптомов ЕАЕ у мышей дикого типа на фоне нейтрализации LT $\alpha$  или TNF с введением PBS в качестве контроля. Антитела вводили каждые 3 дня, начиная с 4-го дня после иммунизации MOG<sub>35-55</sub>-пептидом. Результаты представлены как среднее значение  $\pm$  SEM и подтверждены в 2 независимых экспериментах.

## 2.2. Мыши с удалением *Lta* в ILC3 или в Т-клетках развивают различные по динамике симптомы ЕАЕ

На следующем этапе работы изучали роль основных клеточных источников лимфотоксинов, а именно ILC3 и Т-клеток, в патогенезе ЕАЕ, поскольку для ILC3 (Grigg et al., 2021) и Т-клеток (Chiang et al., 2009) показан высокий уровень экспрессии *Lta* в модели ЕАЕ. Для этого проводили иммунизацию MOG<sub>35-55</sub>-пептидом в полном адьюванте Фрейнда ранее полученных мышей с тканеспецифичной инактивацией *Lta* в RORγt<sup>+</sup> ILC3 и Т-клетках (*Lta*<sup>ΔILC3,T</sup>) или только Т-клетках (*Lta*<sup>ΔT</sup>), в качестве контрольных мышей использовали *Lta*<sup>flox/flox</sup> мышей (Kruglov et al., 2013). Кроме этого, в качестве дополнительного контроля использовали мышей с полным удалением лимфотоксина (*Lta*<sup>ΔΔ</sup>). Было обнаружено, что у *Lta*<sup>ΔILC3,T</sup> мышей происходит увеличение как максимальной оценки заболевания (Рисунок 9Б), так и общей тяжести заболевания по сравнению с *Lta*<sup>flox/flox</sup> и *Lta*<sup>ΔT</sup> мышами (Рисунок 4В). При этом мыши с инактивацией *Lta* только в Т-клетках демонстрировали умеренную тяжесть заболевания (Рисунок 4Б) и относительно легкое течение ЕАЕ (Рисунок 4В).



**Рисунок 4.** У *Lta*<sup>ΔILC3,T</sup> и *Lta*<sup>ΔT</sup> мышей наблюдается различное течение ЕАЕ.

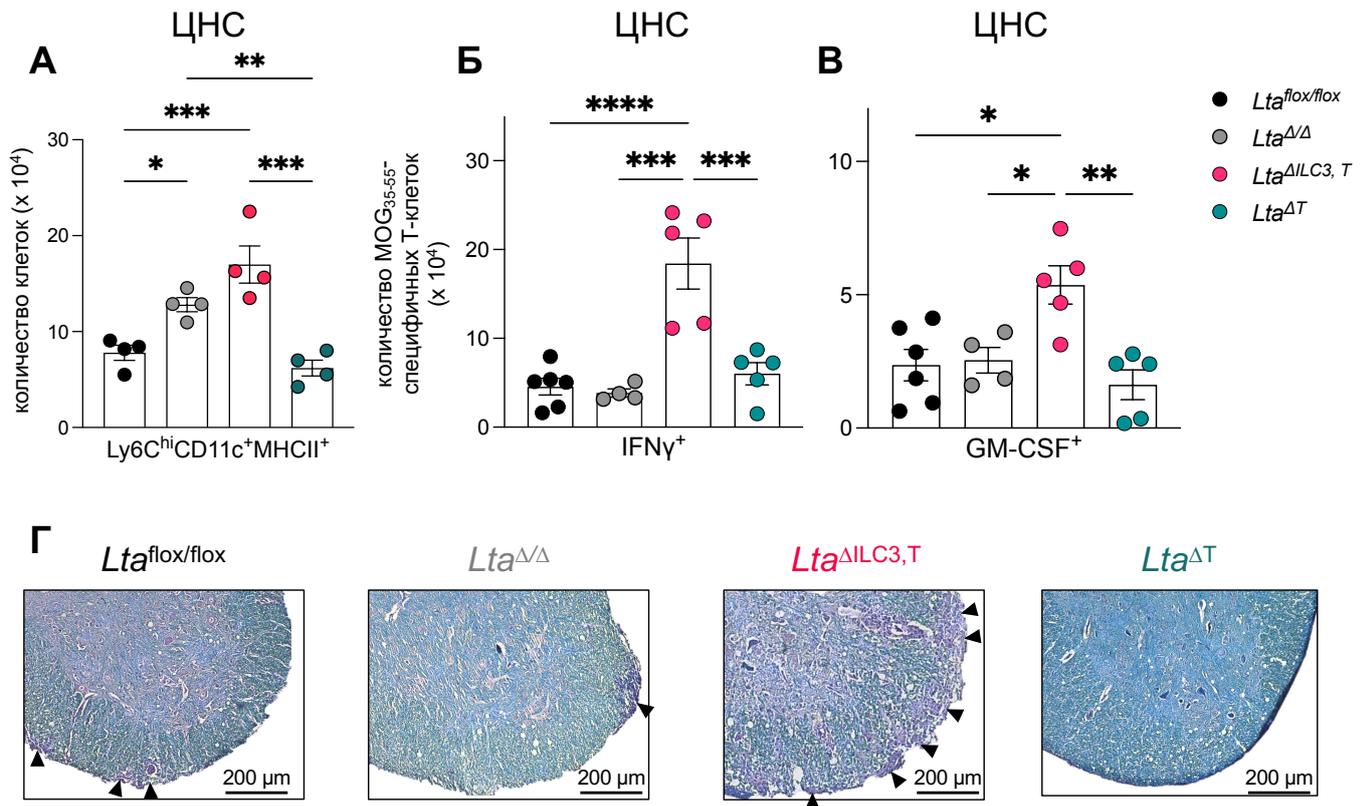
(А) Развитие клинических симптомов ЕАЕ у мышей дикого типа (*Lta*<sup>flox/flox</sup>) (n=15), мышей с полным удалением *Lta* (*Lta*<sup>ΔΔ</sup>) (n=17), мышей с удалением *Lta* в ILC3 и Т-клетках (*Lta*<sup>ΔILC3,T</sup>) (n=15) и с удалением *Lta* только в Т-клетках (*Lta*<sup>ΔT</sup>) (n=11). (Б) Максимальная оценка клинических симптомов ЕАЕ. (В) Площадь под кривой (area under the curve, AUC), рассчитанная для (А). Результаты представлены как среднее значение ± SEM и подтверждены в 4 независимых экспериментах. \*\*\**P* < 0.001, \*\*\*\**P* < 0.0001, one-way ANOVA.

### **2.3. У мышей с удалением *Lta* в ILC3 клетках происходит накопление моноцитов, дифференцирующихся в эффекторные дендритные клетки, опосредующие демиелинизацию**

На следующем этапе были изучены механизмы, за счет которых мыши с кондиционным удалением *Lta* в ILC3 развивают тяжелые симптомы ЕАЕ. Анализ миелоидных клеток в ЦНС на пике заболевания выявил, что как у мышей с полным, так и с ILC3-специфичным удалением *Lta* наблюдалось повышенное накопление в ЦНС  $Ly6C^{hi}CD11c^{+}MHCII^{+}$  моноцитов, дифференцирующихся в дендритные клетки (моДК), играющих патогенетическую роль в модели ЕАЕ (Croxford et al., 2015) (Рисунок 5А).

Известно, что для приобретения моноцитами зрелого воспалительного фенотипа моДК необходим  $IFN\gamma$ , тогда как GM-CSF необходим для выполнения ими эффекторных функций (Amorim et al., 2022). В соответствии с этим именно у  $Lta^{\Delta ILC3,T}$ , но не у  $Lta^{\Delta\Delta}$  мышей происходило накопление  $IFN\gamma$ - и GM-CSF-продуцирующих Т-клеток в ЦНС (Рисунок 5Б, В). Для проверки функциональной активности моДК (Yamasaki et al., 2014) был проведен гистологический анализ демиелинизации LFB/PAS образцов спинного мозга мышей. Обнаружено, что у мышей с удалением *Lta* в ILC3 сильнее выражена демиелинизация, что коррелирует с развитием тяжелых симптомов ЕАЕ (Рисунок 5Г). Интересно, что у мышей с полным удалением *Lta*, несмотря на повышенную инфильтрацию  $Ly6C^{hi}CD11c^{+}MHCII^{+}$  моноцитов, которая также наблюдалась в гомеостазе в крови таких мышей (Рисунок 5Б), не наблюдалось ни увеличения инфильтрации  $IFN\gamma^{+}$  и GM-CSF<sup>+</sup> Т<sub>H</sub>-клеток, ни очагов демиелинизации, что может говорить об отсутствии созревания моДК и объяснять симптоматику ЕАЕ (Рисунок 5).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что молекулярные формы лимфотоксина  $\alpha$  из ILC3 выполняют протективную роль в развитии ЕАЕ за счет подавления инфильтрации эффекторных моДК и  $IFN\gamma$ - и GM-CSF-продуцирующих  $CD4^{+}$  Т-клеток в ЦНС.

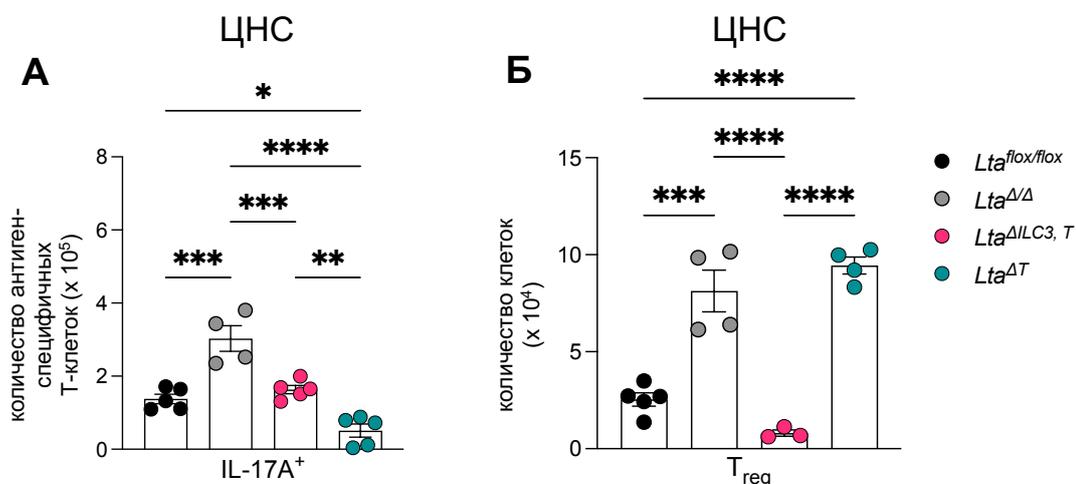


**Рисунок 5.** У мышей с удалением *Lta* в ILC3 происходит накопление моДК в ЦНС на пике ЕАЕ, предположительно, IFN $\gamma$ - и GM-CSF-опосредованным путем. (А) Количество моДК в ЦНС на пике клинических симптомов ЕАЕ. (Б) Количество IFN $\gamma$ <sup>+</sup> и (В) GM-CSF<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Т-клеток, рестимулированных MOG<sub>35-55</sub>, в ЦНС на 16 день после иммунизации. (Г) Репрезентативные фотографии гистологического окрашивания LFB/PAS срезов спинного мозга мышей дикого типа (*Lta*<sup>flx/flx</sup>), с полным удалением *Lta* (*Lta*<sup>ΔΔ</sup>), удалением *Lta* в ILC3 и Т-клетках (*Lta*<sup>ΔILC3,T</sup>) и удалением *Lta* только в Т-клетках (*Lta*<sup>ΔT</sup>), выделенных на пике ЕАЕ. Увеличение 10X, масштаб – 200 мкм, стрелки указывают на очаги демиелинизации (окрашены фиолетовым). Результаты представлены как среднее значение  $\pm$  SEM и подтверждены хотя бы в 2 независимых экспериментах. Каждый символ на (А), (Б) и (В) соответствует значению для индивидуальной мыши. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ , ns – недостоверные отличия, one-way ANOVA.

#### 2.4. Молекулярные формы лимфотоксина $\alpha$ , экспрессирующиеся Т-клетками, выполняют патогенетическую роль в ЕАЕ за счет контроля прайминга Т<sub>H</sub>-клеток на периферии

Ранее было обнаружено, что у *Lta*<sup>ΔT</sup> мышей симптомы ЕАЕ были выражены слабее, чем у *Lta*<sup>flx/flx</sup> мышей, *Lta*<sup>ΔΔ</sup> мышей и *Lta*<sup>ΔILC3,T</sup> мышей (Рисунок 4). В соответствии с этим у *Lta*<sup>ΔT</sup> мышей не было выявлено очагов демиелинизации в ЦНС (Рисунок 5Г). Кроме того, ЦНС *Lta*<sup>ΔT</sup> мышей характеризовалась уменьшением инфильтрации Т<sub>H</sub>17 на пике ЕАЕ (Рисунок 6А). В то же время в ЦНС *Lta*<sup>ΔΔ</sup> и *Lta*<sup>ΔT</sup> мышей было повышено абсолютное количество регуляторных Т-клеток (Рисунок 6Б), что может объяснять более слабые симптомы развития ЕАЕ у мышей с полным удалением *Lta* по сравнению

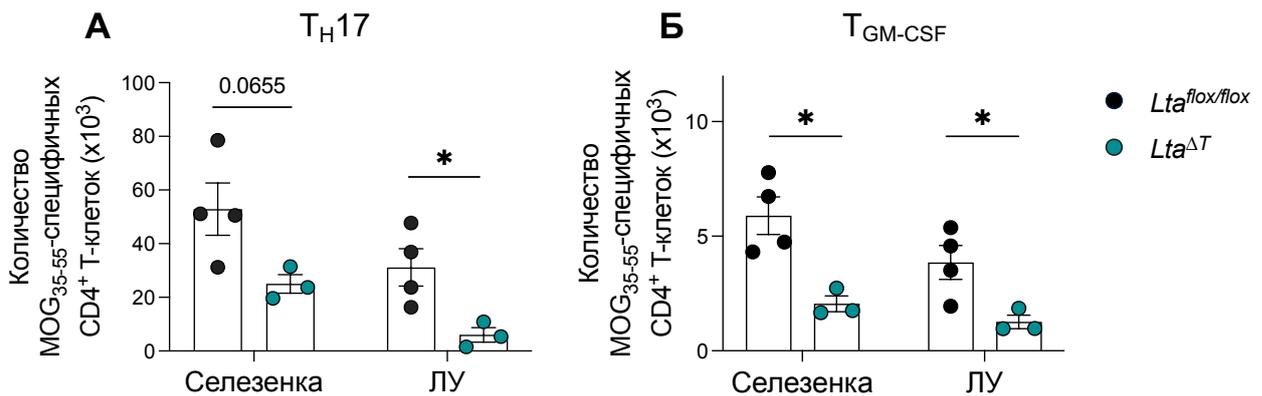
с мышами с ILC3-специфичным удалением, а также слабую восприимчивость к индукции ЕАЕ у мышей с удалением *Lta* в Т-клетках.



**Рисунок 6. В ЦНС *Lta*<sup>ΔT</sup> мышей на пике ЕАЕ снижена инфильтрация Т<sub>H</sub>17, но повышена инфильтрация Т<sub>reg</sub>.** (А) Количество IL-17A<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Т-клеток, рестимулированных MOG<sub>35-55</sub> и (Б) Количество регуляторных Т-клеток в ЦНС мышей дикого типа (*Lta*<sup>flox/flox</sup>), с полным удалением *Lta* (*Lta*<sup>ΔΔ</sup>), удалением *Lta* в ILC3 и Т-клетках (*Lta*<sup>ΔILC3, T</sup>) и удалением *Lta* только в Т-клетках (*Lta*<sup>ΔT</sup>) в ЦНС на 16 день после иммунизации. Каждый символ соответствует значению для индивидуальной мыши. Результаты представлены как среднее значение  $\pm$  SEM и подтверждены в 3 независимых экспериментах. \* $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ , one-way ANOVA.

Поскольку известно, что экспрессия мембраносвязанного лимфотоксина на антиген-специфичных Т-клетках необходима для их прайминга дендритными клетками (Summers-DeLuca et al., 2007), было выдвинуто предположение, что снижение тяжести ЕАЕ у *Lta*<sup>ΔT</sup> мышей связано с изменениями в антиген-специфичном прайминге Т-клеток на периферии. Для изучения прайминга CD4<sup>+</sup> Т-клеток в лимфатических узлах и селезенке *Lta*<sup>flox/flox</sup> и *Lta*<sup>ΔT</sup> мышей иммунизировали MOG<sub>35-55</sub>-пептидом в полном адьюванте Фрейнда с последующими двукратным введением коклюшного токсина и исследовали иммунный ответ в лимфоидных органах через 9 дней после иммунизации. Было выявлено, что у *Lta*<sup>ΔT</sup> мышей происходит снижение общего количества MOG<sub>35-55</sub>-специфичных CD4<sup>+</sup> Т-клеток, продуцирующих IL-17A (Рисунок 7А) и GM-CSF (Рисунок 7Б), в селезенке и лимфатических узлах на начальном этапе развития ЕАЕ.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о нарушении прайминга Т-клеток во вторичных лимфоидных органах на фоне генетической инактивации *Lta* и дают основание предположить, что это опосредовано дефицитом мембранного LT комплекса.

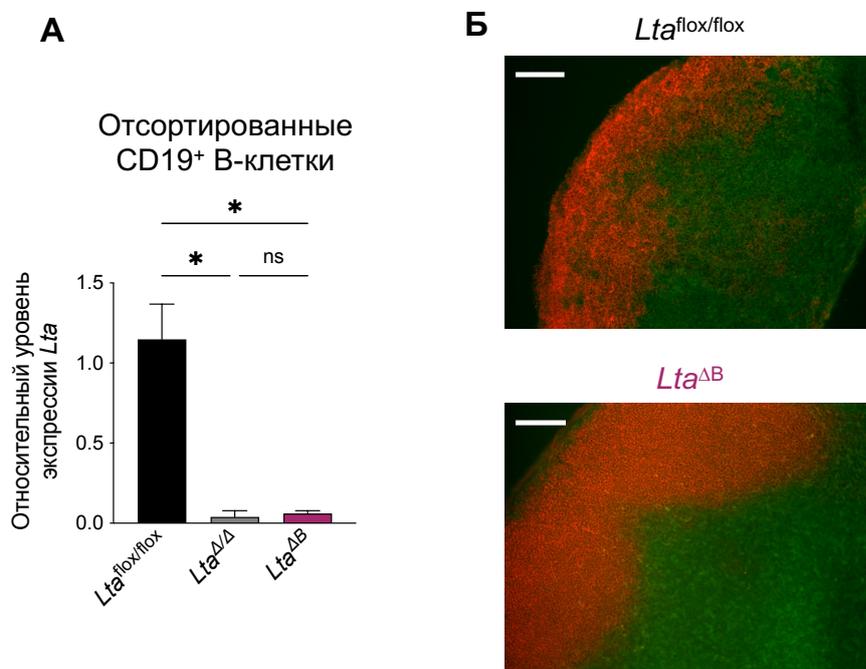


**Рисунок 7. В селезенке  $Lta^{\Delta T}$  мышей на начальной фазе ЕАЕ снижена продукция эффекторных цитокинов.**

(А) Количество  $T_{H17}$ -клеток, рестимулированных  $MOG_{35-55}$ , в селезенке и лимфатических узлах (ЛУ) на 9 день после иммунизации  $MOG_{35-55}$  в полном адьюванте Фрейнда. (Б) Количество  $T_{GM-CSF}$ -клеток, рестимулированных  $MOG_{35-55}$ , в селезенке и лимфатических узлах (ЛУ) на 9 день после иммунизации. Результаты представлены как среднее значение  $\pm$  SEM и подтверждены в 3 независимых экспериментах. Каждый символ соответствует значению для индивидуальной мыши.  $*P < 0.05$ , t-критерий Стьюдента

**2.5. Молекулярные формы лимфотоксина  $\alpha$ , экспрессирующиеся на В-клетках, выполняют патогенетическую роль в модели  $rhMOG_{1-125}$ -индуцированного ЕАЕ, но не в модели  $MOG_{35-55}$ -зависимого ЕАЕ**

Известно, что В-клетки пациентов с РС характеризуются повышенной продукцией  $LT\alpha$  (Bar-Or et al., 2010; McWilliam et al., 2018; Stein et al., 2018). В связи с этим была изучена динамика ЕАЕ у мышей с тканеспецифичным удалением  $Lta$  в В-клетках ( $Lta^{\Delta B}$ ). Для этого скрещивали  $Lta^{flox/flox}$  мышей с мышами, несущими специфичный для В-клеток Cre-делитер  $CD19^{Cre}$  (Rickert et al., 1997). Делецию подтверждали путем анализа экспрессии  $Lta$  в отсортированных  $CD19^+$  В-клетках, стимулированных анти- $CD40$ , с помощью количественной ПЦР в реальном времени (Рисунок 8А). Дополнительно оценивали разделение Т- и В-зон в лимфатических узлах  $Lta^{\Delta B}$  мышей и обнаружили, что, как и у  $Ltb^{\Delta B}$  мышей (Tumanov et al., 2002), в ЛУ  $Lta^{\Delta B}$  мышей сохранялись сегрегированные Т- и В-зоны (Рисунок 8Б).



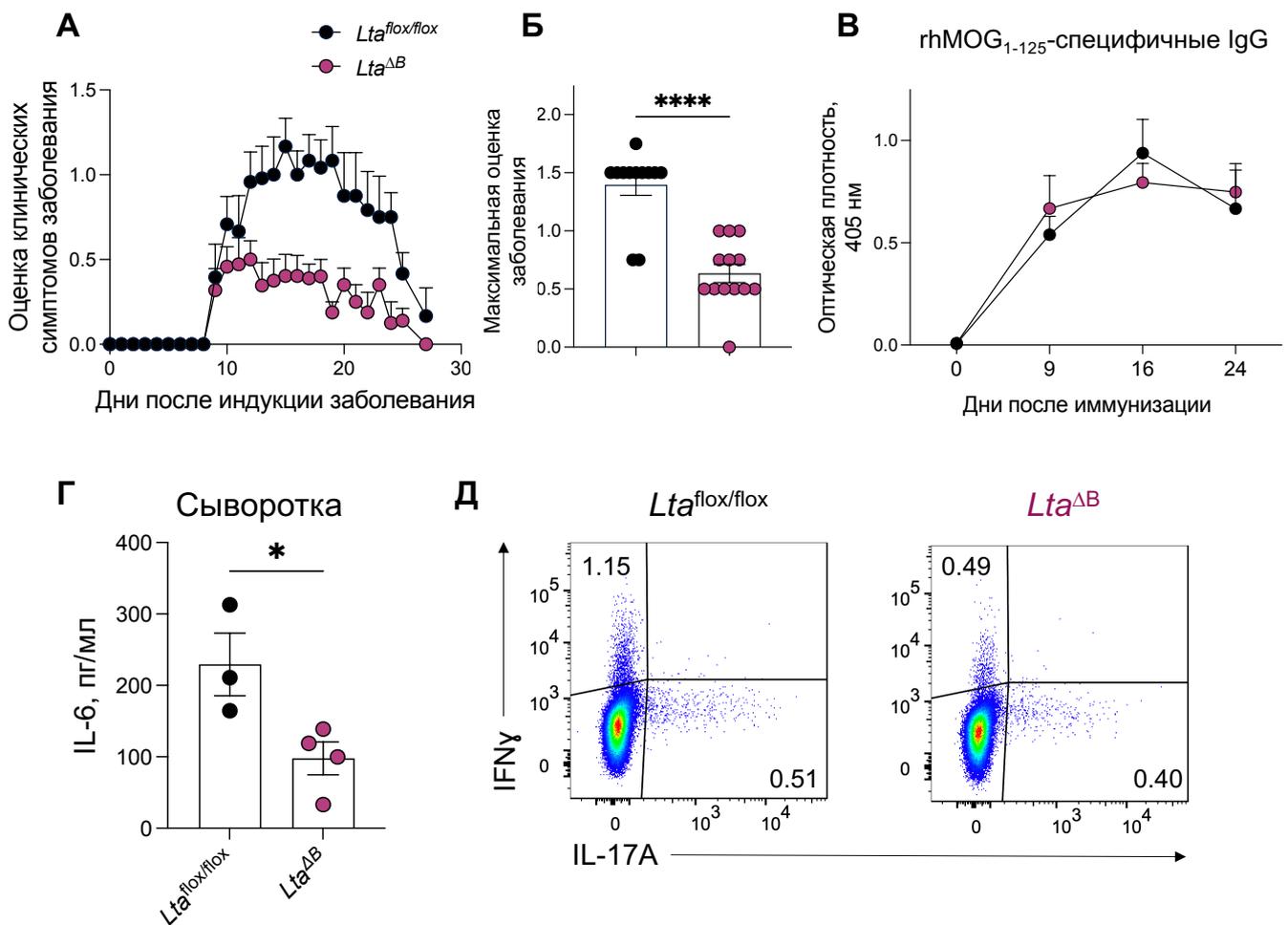
**Рисунок 8. Характеристика  $Lta^{\Delta B}$  мышей.** (А) Относительный уровень экспрессии  $Lta$  в отсортированных  $CD19^+$  В-клетках, выделенных из селезенок мышей дикого типа ( $Lta^{flox/flox}$ ), с полным удалением  $Lta$  ( $Lta^{\Delta/\Delta}$ ) и с удалением  $Lta$  только в  $CD19^+$  В-клетках ( $Lta^{\Delta B}$ ) и активированных с помощью anti-CD40 в течение 7 часов. В качестве референсного гена использовали  $\beta$ -актин. (Б) Репрезентативные фотографии иммунофлуоресцентного окрашивания CD3 (зеленый) и B220 (красный) в лимфатических узлах. Масштаб – 50 мкм. Результаты представлены как среднее значение  $\pm$  SEM и подтверждены в 2 независимых экспериментах.  $*P < 0.05$ , ns – недостоверные отличия, t-критерий Стьюдента.

Поскольку у  $Lta^{\Delta B}$  мышей в лимфатических узлах сохраняется сегрегация Т- и В-зон, что, согласно имеющимся в литературе данным, не влияет на созревание аффинности и переключение изотипов антител при подкожной иммунизации (Greter et al., 2009), на следующем этапе исследования мышей иммунизировали полноразмерным рекомбинантным человеческим белком MOG (rhMOG<sub>1-125</sub>). Этот белок индуцирует образование патогенетических анти-MOG аутоантител, способствующих индукции демиелинизации в ЦНС (Galicia et al., 2013).

Оказалось, что в модели rhMOG<sub>1-125</sub>-индуцированного ЕАЕ  $Lta^{\Delta B}$  мыши были менее восприимчивы к индукции заболевания, чем контрольные мыши дикого типа (Рисунок 9А, Б). Это могло быть связано с нарушением синтеза аутоантител, однако анализ содержания rhMOG<sub>1-125</sub>-специфичных IgG в сыворотке крови  $Lta^{flox/flox}$  и  $Lta^{\Delta B}$  мышей в динамике после иммунизации не выявил различий в выработке rhMOG<sub>1-125</sub>-специфичных аутоантител (Рисунок 9В). Анализ сыворотки крови мышей с удалением  $Lta$  в В-клетках выявил уменьшение концентрации IL-6 (Рисунок 9Г), для которого показана патогенетическая роль в модели ЕАЕ (Barr et al., 2012). Поскольку известно, что

T-клетки необходимы для индукции заболевания при иммунизации rhMOG<sub>1-125</sub> (Wang et al., 2021), была изучена продукция цитокинов CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>-клетками на пике ЕАЕ. В результате этого анализа снижение провоспалительного ответа на системном уровне было подтверждено уменьшение процентного содержания IFN $\gamma$ -продуцирующих T-клеток в лимфатических узлах (Рисунок 9Д).

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о том, что В-клетки являются критически важным источником молекулярных форм лимфотоксина  $\alpha$  только в модели rhMOG<sub>1-125</sub>-зависимого ЕАЕ.



**Рисунок 9. Молекулярные формы лимфотоксина  $\alpha$  из В-клеток выполняют патогенетическую роль в модели rhMOG<sub>1-125</sub>-индуцированного ЕАЕ.** (А) Развитие клинических симптомов ЕАЕ у мышей дикого типа (*Lta<sup>flox/flox</sup>*) (n=12) и мышей с удалением *Lta* в В-клетках (*Lta<sup>ΔB</sup>*) (n=13), иммунизированных белком rhMOG<sub>1-125</sub> в полном адьюванте Фрейнда. (Б) Максимальная оценка клинических симптомов ЕАЕ. (В) Значения оптической плотности rhMOG<sub>1-125</sub>-специфичных IgG в сыворотке крови мышей, иммунизированных rhMOG<sub>1-125</sub> в полном адьюванте Фрейнда, на 0, 9, 16 и 24 дни после иммунизации. (Г) Концентрация IL-6 в сыворотке крови на пике заболевания. (Д) Репрезентативные поточечные диаграммы IFN $\gamma$ <sup>+</sup> и IL-17A<sup>+</sup> T-клеток, выделенных из лимфатических узлов *Lta<sup>flox/flox</sup>* и *Lta<sup>ΔB</sup>* мышей, рестимулированных ФМА/иономицином. Результаты представлены как среднее значение  $\pm$  SEM и подтверждены в 2 независимых экспериментах. \**P* < 0.05, \*\*\*\**P* < 0.0001, t-критерий Стьюдента.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе настоящей работы с помощью ранее полученных уникальных линий мышей были изучены некоторые аспекты иммунобиологии лимфотоксинов. Основная часть работы была посвящена исследованию роли молекулярных форм лимфотоксина  $\alpha$  в мышинной модели рассеянного склероза, экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите. Было показано, что *Lta*-дефицитные мыши с нормальной продукцией TNF миелоидными клетками восприимчивы к индукции MOG<sub>35-55</sub>-индуцированного ЕАЕ. Эти результаты были подтверждены в экспериментах с фармакологической блокировкой с помощью уникального реагента – антител к LT $\alpha$ .

В работе впервые установлена роль различных клеточных источников (ILC3, Т- и В-клеток) молекулярных форм лимфотоксина  $\alpha$  в патогенезе ЕАЕ. Так, было выявлено, что защитную роль выполняют молекулярные формы лимфотоксина  $\alpha$  из ILC3, тогда как их экспрессия Т-клетками усугубляет динамику развития ЕАЕ. Для В-клеток, продуцирующих молекулярные формы лимфотоксина  $\alpha$ , показана ключевая роль в патогенезе аутоантитело-зависимой модели ЕАЕ. Результаты работы вносят вклад в понимание молекулярных механизмов патологии нейровоспаления, а также демонстрируют различные функции лимфотоксинов, зависящие от 3 составляющих: 1) клеточного источника, 2) времени и 3) локализации. Такая неоднозначная роль молекулярных форм лимфотоксина  $\alpha$  может объяснять отсутствие эффективности блокаторов лимфотоксинов в терапии аутоиммунных заболеваний, а также свидетельствует о необходимости разработки новых подходов к фармакологической нейтрализации лимфотоксинов из конкретных типов клеток.

Полученные результаты о TNF-подобной функции лимфотоксина  $\alpha$  в гомеостазе дополняют имеющиеся сведения о физиологической роли лимфотоксинов, а также могут быть использованы для прогнозирования возможных побочных эффектов при применении Этанерцепта, блокатора TNF и растворимой формы LT $\alpha$ , в терапии аутоиммунных заболеваний. С точки зрения фундаментальной иммунобиологии лимфотоксинов результаты настоящей работы подтверждают, что в контексте роли лимфотоксинов в слизистых оболочках и экспериментальных условиях *in vitro* реализуется именно TNF-подобная функция лимфотоксина  $\alpha$ . Кроме этого, в дополнение к данным о роли лимфотоксинов в аутоиммунитете, результаты по изучению эффектов полного удаления TNF/LT в гомеостазе иммунной системы подтверждают гипотезу о необходимости разработки клеточно-специфических терапевтических подходов.

По результатам работы были сформулированы следующие **выводы**:

1.  $LT\alpha$  в норме участвует в поддержании гомеостаза лимфоцитов врожденного иммунитета типа 3 (ILC3) в собственной пластинке тонкого кишечника и в дифференцировке миелоидных клеток в моноциты *in vitro*.
2. Генетическая или фармакологическая инактивация  $LT\alpha$  не влияет на чувствительность мышей к MOG<sub>35-55</sub>-зависимому экспериментальному аутоиммунному энцефаломиелиту (ЕАЕ).
3. У мышей с удалением *Lta* из ILC3 клеток наблюдается тяжелое течение ЕАЕ с интенсивной демиелинизацией, инфильтрацией моноцитов, дифференцирующихся в дендритные клетки, а также IFN $\gamma$ - и GM-CSF-продуцирующих Т-клеток в ЦНС.
4. На фоне генетической инактивации *Lta* в Т-клетках происходит нарушение продукции цитокинов антиген-специфичными Т-клетками во вторичных лимфоидных органах на раннем этапе развития экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита.
5. Молекулярные формы лимфотоксина  $\alpha$ , продуцируемые В-клетками, выполняют патогенетическую роль только в модели rhMOG<sub>1-125</sub>-индуцированного ЕАЕ.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Web of Science, Scopus или РИНЦ:

1. **Гоголева В.С.**, Друцкая М.С., Недоспасов С.А. Иммунобиология лимфотоксина: роль в мышинной модели рассеянного склероза. // Российский иммунологический журнал. – 2023. – Т. 26, №4. – С. 437-442. Двухлетний импакт-фактор РИНЦ = 0.123 (0.93/0.74)<sup>i</sup>.
2. **Gogoleva V.S.**, Kuprash D.V., Grivennikov S.I., Tumanov A.V., Kruglov A.A., Nedospasov S.A. LT $\alpha$ , TNF, and ILC3 in Peyer's Patch Organogenesis // Cells. – 2022. Vol. 11. – P. 1970. Импакт-фактор WoS (JIF) = 7.666 (1.27/0.76).
3. **Gogoleva V.S.**, Atretkhany K.N., Dygay A.P., Yurakova T.R., Drutskaya M.S., Nedospasov S.A. Current Perspectives on the Role of TNF in Hematopoiesis Using Mice With Humanization of TNF/LT System // Frontiers in Immunology. – 2021. – Vol. 12. – P. 661900. Импакт-фактор WoS (JIF) = 8.786 (1.62/1.1).
4. Atretkhany K.N., **Gogoleva V.S.**, Drutskaya M.S., Nedospasov S.A. Distinct modes of TNF signaling through its two receptors in health and disease // Journal of Leukocyte Biology. – 2020. – Vol. 107. – P. 893-905. Импакт-фактор WoS (JIF) = 6.011 (1.5/0.5).
5. **Гоголева В.С.**, Атретханы К.-С.Н., Друцкая М.С., Муфазалов И.А., Круглов А.А., Недоспасов С.А. Цитокины как медиаторы нейровоспаления в экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите. // Биохимия. – 2018. – Т. 83, №9. – С. 1368 – 1384. Импакт-фактор WoS (JIF) = 2.824 (1.96/1.25).

---

<sup>i</sup> В скобках приведен объем публикации в условных печатных листах и вклад автора в условных печатных листах