

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук

На правах рукописи

Гоголева Виолетта Сергеевна

**Нейроиммунные и гомеостатические функции
лимфотоксина альфа**

Специальность 3.2.7. — Иммунология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

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

Москва – 2024

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- CCL – хемокиновый лиганд
- CCR – хемокиновый рецептор
- ЕАЕ – экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит
- FDC – фолликулярная дендритная клетка
- GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
- HEV – вены высокого эндотелия
- IFN γ – интерферон γ
- IL – интерлейкин
- ILC – лимфоциты врожденного иммунитета
- LT – лимфотоксин
- LTi – клетки-индукторы образования лимфоидной ткани (lymphoid tissue inducer cells)
- LTin – клетки-инициаторы образования лимфоидной ткани (lymphoid tissue initiator cells)
- LT β R – лимфотоксин- β рецептор
- MHC – главный комплекс гистосовместимости (major histocompatibility complex)
- MOG – миелин-олигодендроглиальный гликопротеин
- NIK – NF κ B-индуцирующая киназа
- NO – оксид азота
- ROS – активные формы кислорода
- T_H – Т-хелпер
- TEC – тимусная эпителиальная клетка
- TNF – фактор некроза опухоли
- TNFR – рецептор фактора некроза опухоли
- T_{reg} – регуляторная Т-клетка
- АПК – антиген-презентирующая клетка
- ГЭБ – гематоэнцефалический барьер
- мoДК – моноциты, дифференцирующиеся в эффекторные дендритные клетки
- ПБ – Пейеровы бляшки
- РС – рассеянный склероз
- ТЛО – третичные лимфоидные органы
- ЦНС – центральная нервная система

Оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	2
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. Общая характеристика лимфотоксинов α и β	11
1.2. Основные физиологические функции мембраносвязанной и растворимой форм лимфотоксина	13
1.2.1. Лимфотоксин β в развитии и поддержании гомеостаза лимфоидных органов ...	15
1.2.2. Лимфотоксины α и β в регуляции иммунитета слизистых	19
1.2.3. Лимфотоксины α и β в развитии и функциях иммунных клеток	20
1.3. Функции лимфотоксинов α и β в хроническом воспалении	22
1.3.1. Роль лимфотоксинов α и β в аутоиммунных заболеваниях	23
1.3.2. Рассеянный склероз.....	25
1.3.3. ЕАЕ как модель РС	27
1.3.4. Механизмы развития нейровоспаления	29
1.3.5. Роль лимфотоксинов α и β в развитии РС и ЕАЕ	32
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	36
Мыши	36
Генотипирование	36
Индукция ЕАЕ	37
Введение нейтрализующих антител мышам в модели ЕАЕ	38
Выделение клеток.....	38
<i>Выделение клеток из лимфатических узлов и селезенки.....</i>	<i>38</i>
<i>Выделение клеток из собственной пластинки тонкого кишечника</i>	<i>39</i>
<i>Выделение иммунных клеток из ЦНС</i>	<i>39</i>
Поляризация Т-клеток <i>in vitro</i>	40
Цитофлуориметрический анализ	40
<i>Рестимуляция клеток для внутриклеточной детекции цитокинов</i>	<i>40</i>
<i>Поверхностное окрашивание.....</i>	<i>41</i>
<i>Сортировка клеток</i>	<i>41</i>
<i>Внутриклеточное окрашивание</i>	<i>41</i>
Мультиплексный анализ цитокинов	42
Выделение РНК	43
Обратная транскрипция	44

Количественная ПЦР в реальном времени	44
Гистологический анализ	45
Статистический анализ	46
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ	47
3.1. Исследование эффектов полного генетического удаления лимфотоксина α на гомеостаз иммунной системы	47
3.2. У $Lta^{\Delta/\Delta}$ мышей в норме преобладает дифференцировка Т-клеток в T_H17	49
3.3. Генетическая и фармакологическая нейтрализация лимфотоксина α не приводит к усугублению симптомов ЕАЕ	51
3.4. Мыши с удалением Lta в ILC3 или в Т-клетках развивают различные по динамике развития симптомы ЕАЕ.....	53
3.5. У мышей с удалением Lta в ILC3 клетках на пике ЕАЕ происходит накопление моноцитов, дифференцирующихся в эффекторные дендритные клетки, опосредующие демиелинизацию	54
3.6. Молекулярные формы лимфотоксина α , экспрессирующиеся Т-клетками, выполняют патогенетическую роль в ЕАЕ за счет контроля прайминга T_H -клеток на периферии	57
3.7. Молекулярные формы лимфотоксина α , экспрессирующиеся на В-клетках, выполняют патогенетическую роль в модели rhMOG ₁₋₁₂₅ -индуцированного ЕАЕ, но не в модели MOG ₃₅₋₅₅ -зависимого ЕАЕ.....	63
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ	67
ГЛАВА 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	74
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	78
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	94

ВВЕДЕНИЕ

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 α_3 , далее LT α), так и в мембраносвязанной гетеротримерной форме – LT $\alpha_1\beta_2$ (далее memLT, или LT β). Для исследования биологически значимых эффектов системы цитокинов TNF/LT α /LT β были сконструированы мыши с полной или клеточно-специфичной инактивацией соответствующих молекул. Анализ фенотипа этих мышей позволил охарактеризовать физиологическую роль лимфотоксинов α и β , которая заключается в формировании и поддержании архитектуры лимфоидных органов, а также регуляции иммунного ответа. В дальнейших исследованиях было показано участие лимфотоксинов α и β в патогенезе аутоиммунных заболеваний, в основном за счет индукции формирования третичных лимфоидных органов – эктопических лимфоидных структур, образующихся в очагах хронического воспаления LT β R-опосредованным путем. Эти результаты послужили толчком для создания терапевтических препаратов, блокирующих сигнальный путь, опосредованный лимфотоксинами α и β , 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 α и β как в норме, так и при патологии является непростой задачей. Во-первых, конструирование нокаутных мышей усложняется близким расположением генов, кодирующих TNF, LT α и LT β , что затрудняет прицельное удаление соответствующих генов без затрагивания регуляторных участков соседних генов. Во-вторых, лимфотоксины характеризуются несколькими модальностями передачи сигнала – от растворимого гомотримера LT α или мембранного гетеротримера LT β , с участием минимум трех рецепторов, а именно TNFR1, TNFR2 и LT β R. В-третьих, лимфотоксины продуцируются различными клетками лимфоидного происхождения – лимфоцитами врожденного иммунитета типа 3 (ILC3), Т- и В-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 иммунологии 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 мем LT ; 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 (EAE) – 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 α .

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

1. Определить роль лимфотоксина α в поддержании гомеостаза кишечника и дифференцировке миелоидных клеток *in vitro*.
2. Изучить роль лимфотоксина α в патогенезе экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита с применением полной генетической и фармакологической инактивации лимфотоксина α .
3. Создать мышей с тканеспецифичным удалением *Lta* в $CD19^+$ В-клетках
4. Изучить вклад молекулярных форм лимфотоксина α , 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 иммунологии лимфотоксинов. Так, на *Lta*-дефицитных мышах с нормальной продукцией TNF миелоидными клетками показано, что полное удаление *Lta*

влияет на поддержание гомеостаза ILC3 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 мышцах 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 γ -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 α , 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 α 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 α , 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 мышцах. Полученные данные о вкладе молекулярных форм лимфотоксина α , 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 α 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 α , 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 α , 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 α , TNF или TNFR1, а также мыши с тканеспецифичным удалением гена, кодирующего лимфотоксин α , в ILC3 (ROR γ ⁺), Т-клетках (CD4⁺) и В-клетках (CD19⁺) 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 α , 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 α в гомеостазе тонкого кишечника и дифференцировке миелоидных клеток проводили на мышах с полным удалением *Lta* или *Tnf*, полученных с помощью технологии Cre-loxP (*Lta* ^{Δ/Δ} и *Tnf* ^{Δ/Δ}). Исследование содержания ILC3 в собственной пластинке тонкого кишечника проводили с помощью цитофлуориметрического анализа. Дополнительно проводили анализ состояния иммунной системы *Lta* ^{Δ/Δ} 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* ^{Δ/Δ}) или тканеспецифичным удалением *Lta* в ILC3, Т- и В-клетках. Удаление *Lta* (т.е. гена, кодирующего субъединицу, присутствующую в LT α и в memLT) позволяет изучать эффекты от обеих форм лимфотоксинов, а именно LT α и memLT. В качестве модели аутоиммунного заболевания использовали широко распространенную модель рассеянного склероза на мышах – экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (ЕАЕ). Индукцию заболевания осуществляли иммунизацией MOG₃₅₋₅₅-пептидом (для преимущественного развития Т-клеточнозависимого ответа) или полноразмерным белком rhMOG₁₋₁₂₅ (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 α 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 α не влияет на чувствительность мышей к экспериментальному аутоиммунному энцефаломиелиту.
3. Отдельные функции молекулярных форм лимфотоксина α 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.

Личный вклад автора

В настоящей работе автором были выполнены эксперименты, связанные с изучением роли LT α 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.

Апробация результатов и публикации

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, Этталь, Германия, 10-15 марта 2019.

По теме диссертации опубликовано 5 статей в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI:

- **Гоголева В.С.**, Друцкая М.С., Недоспасов С.А. Иммунобиология лимфотоксина: роль в мышинной модели рассеянного склероза. *Российский иммунологический журнал*, 2023, Том 26, №4, 437 – 442.
- **Gogoleva V.S.**, Kuprash D.V., Grivennikov S.I., Tumanov A.V., Kruglov A.A., Nedospasov S.A. LT α , TNF, and ILC3 in Peyer’s Patch Organogenesis. *Cells*, 2022, 11(12):1970.
- **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, 12, 661900.
- 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, 107(6):893-905. (обзор)
- **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, Том 83, №9, 1368 – 1384. (обзор)

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Общая характеристика лимфотоксинов α и β

Лимфотоксин (LT) – цитокин суперсемейства TNF, являющийся ближайшим гомологом TNF. Изначально лимфотоксин был описан как цитотоксический фактор, продуцируемый лимфоцитами в ответ на стимуляцию митогенами или специфическим антигеном *in vitro* [1, 2]. Позже было установлено, что лимфотоксин и TNF обладают сходством как в структурной гомологии, так и в биологической активности, включая способность вызывать некроз опухолевых клеток [3]. Из-за такой вырожденности сигналов лимфотоксин был назван TNF β , однако позднее был описан второй компонент мембранного LT комплекса, LT β [4], и новый LT рецептор (Crowe et al. 1994), что привело к обнаружению уникальных функций лимфотоксина, не перекрывающихся с TNF, а также переименованию TNF β в лимфотоксин α (LT α) [5]. Гены, кодирующие TNF, LT α и LT β , расположены близко друг к другу в кластере TNF/LT внутри локуса MHC [6].

На данный момент известно, что лимфотоксин может существовать в двух формах: растворимого гомотримера LT α_3 и мембраносвязанного гетеротримера (LT $\alpha_1\beta_2$ или LT $\alpha_2\beta_1$). Растворимая форма лимфотоксина LT α_3 (sLT α_3) может, как и TNF, взаимодействовать с рецепторами TNFR1 и TNFR2, однако имеются данные, указывающие на то, что преимущественная передача сигнала от LT α_3 происходит через TNFR1 [7, 8]. Примечательно, что и для TNF также было показано, что его растворимая форма (sTNF) преимущественно взаимодействует с TNFR1, тогда как мембраносвязанный TNF (tmTNF) может взаимодействовать как с TNFR1, так и с TNFR2 [9, 10]. При этом наиболее физиологически значимые эффекты tmTNF связаны с передачей сигнала через TNFR2 [9].

Сигнальные пути, запускаемые при связывании LT α_3 с рецепторами TNF, включают активацию канонического пути NF κ B и программируемую клеточную гибель [11]. Канонический путь NF κ B активируется через рекрутирование белков TRAF2/5 и последующее фосфорилирование комплекса I κ B, что приводит к транслокации транскрипционного фактора p50/p65 в ядро клетки. Это приводит, в частности, к активации транскрипции генов, кодирующих провоспалительные цитокины и факторы, необходимые для выживания и пролиферации клеток [12, 13]. Запуск программируемой клеточной гибели обусловлен наличием на внутриклеточной части TNFR1 так называемого «домена смерти» (от англ.: death domain), который благодаря гомотипичекому взаимодействию с другими белками каскада обеспечивает возможность сборки нескольких цитоплазматических комплексов, что приводит в том числе к апоптозу или некроптозу [14].

Мембраносвязанная форма $LT\alpha_1\beta_2$ (tm $LT\alpha_1\beta_2$, memLT) имеет свой уникальный рецептор – $LT\beta R$ [15]. Помимо мембраносвязанной формы LT, другим лигандом для $LT\beta R$ является еще один член суперсемейства TNF – LIGHT [16]. При этом LIGHT может связываться и с рецептором HVEM (Herpesvirus entry mediator) [17]. Взаимодействие лигандов $LT\alpha_1\beta_2$ и LIGHT с рецептором $LT\beta R$ приводит к активации как канонического, так и неканонического пути NF κ B [18]. Интересно, что для активации сигнальных путей, индуцируемых $LT\alpha_1\beta_2$, достаточно димеризации рецептора $LT\beta R$, в отличие от характерного взаимодействия лигандов суперсемейства TNF с гомотримерными рецепторами [19]. Неканонический путь NF κ B включает активацию киназы NIK, которая происходит через связывание TRAF3. Это приводит к транслокации комплекса p52/RelB в ядро и индукции экспрессии генов, кодирующих хемокины и молекулы адгезии [20].

В недавних исследованиях *in vitro* было показано, что мембраносвязанная гетеротримерная форма лимфотоксина $LT\alpha_2\beta_1$ (tm $LT\alpha_2\beta_1$), несмотря на свою ассиметричную структуру, может связываться с TNFR1 и TNFR2 [21]. Однако наличие такого эффективного взаимодействия и его биологическая значимость *in vivo* пока не изучены.

Компоненты системы TNF/ $LT\alpha$ / $LT\beta$ имеют различные профили экспрессии. Так, продукция лимфотоксина, в отличие от TNF, характерна для клеток лимфоидного происхождения, таких как лимфоциты врожденного иммунитета типа 3 (ILC3), В-клетки и Т-клетки [22]. TNF же производится различными типами клеток миелоидного и лимфоидного ряда, а также резидентными клетками ЦНС. Экспрессия TNFR1 (p55) убиквитарна, тогда как TNFR2 экспрессируется на клетках гематопозитического происхождения, нейронах и эндотелиальных клетках [11]. Экспрессия $LT\beta R$ характерна для стромальных и эпителиальных клеток, а также для клеток миелоидного происхождения, таких как моноциты и дендритные клетки [23]. Альтернативный лиганд $LT\beta R$ – LIGHT – продуцируется незрелыми дендритными клетками и Т-клетками [24].

Таким образом, система лигандов и рецепторов TNF/ $LT\alpha$ / $LT\beta$ представляет собой сложную сеть взаимодействий, которая играет важную роль в регуляции иммунных и воспалительных процессов. Структурное сходство, близкое расположение генов и перекрывающиеся взаимодействия с рецепторами определяют сложность изучения системы лигандов и рецепторов TNF/ $LT\alpha$ / $LT\beta$.

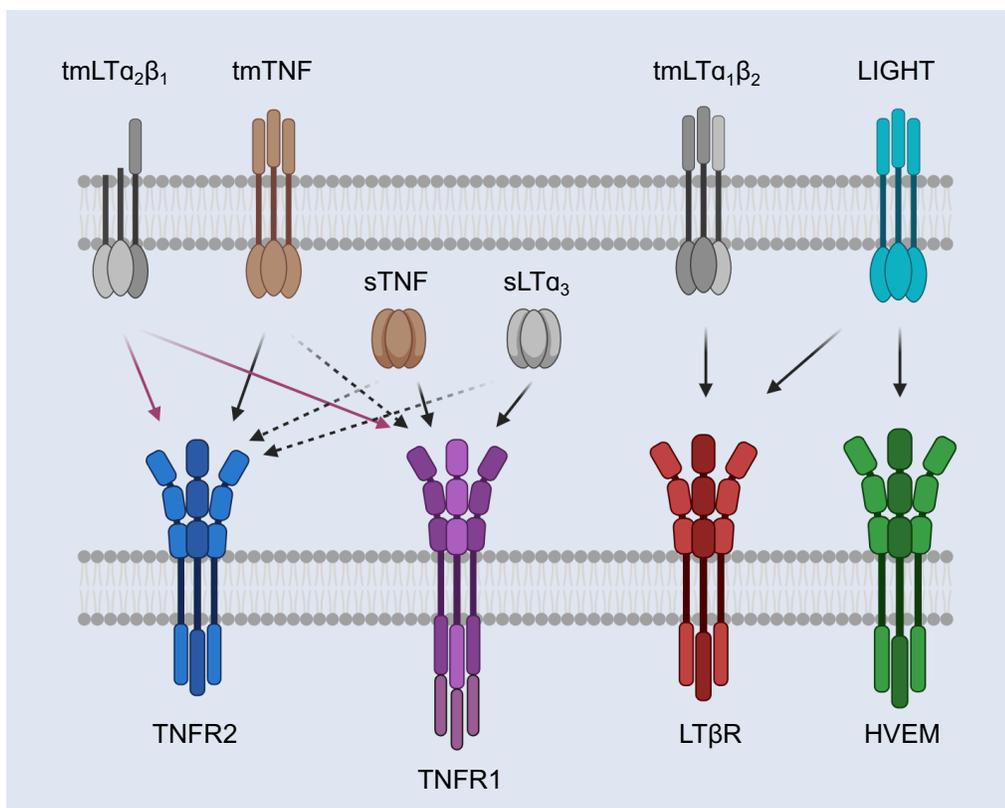


Рисунок 1. Общая схема взаимодействия цитокинов и рецепторов системы TNF/LT. Представлено схематическое изображение связывания рецепторов и лигандов. Сплошной стрелкой черного цвета обозначены преимущественные взаимодействия, пунктирной – второстепенные. Сплошной стрелкой фиолетового цвета показаны связывания, продемонстрированные в *in vitro* системе. Рисунок выполнен с помощью BioRender.

1.2. Основные физиологические функции мембраносвязанной и растворимой форм лимфотоксина

Для исследования биологических функций системы цитокинов TNF/LTα/LTβ были получены мыши с полной или клеточно-специфичной инактивацией соответствующих молекул (Таблица 1). Анализ фенотипа этих мышей позволил охарактеризовать основные физиологические функции лимфотоксина.

Таблица 1. Структура лимфоидных органов у мышей с инактивацией компонентов системы TNF/LT α /LT β

Генотип мышей	Тимус	Селезенка		Лимфатические узлы		ПБ	Ссылка
		В/Т-зоны	ФДК/ГЦ	мЛУ	пЛУ		
<i>Lta</i> ^{-/-}	○	◐	●	●	●	●	[25-27]
<i>Lta</i> ^{Δ/Δ}	НД	◐	●	●	●	●	[28]
<i>Lta</i> ^{ΔT}	НД	○	○	○	○	○	[29]
<i>Lta</i> ^{ΔILC3, T}	НД	○	○	●	●	●	[29]
<i>Ltb</i> ^{-/-} и <i>Ltb</i> ^{Δ/Δ}	○	◐	●	○	◐, развивают шейные ЛУ	●	[30, 31]
<i>Ltb</i> ^{ΔB}	НД	○	◐	○	○	◐	[32]
<i>Ltb</i> ^{ΔT}	НД	○	○	○	○	○	[32, 33]
<i>Ltb</i> ^{ΔILC3, T}	НД	НД	НД	○	●	●	[29]
<i>Ltbr</i> ^{-/-}	◐	●	●	●	●	●	[34, 35]
<i>Tnfsf14</i> ^{-/-} (LIGHT)	○	○	○	○	○	○	[36]
<i>Tnfsf14</i> ^{-/-} / <i>Ltb</i> ^{Δ/Δ}	○	◐	НД	●	●	●	[36]
<i>Tnf</i> ^{-/-}	○	◐	●	○	○	○	[37, 38]
<i>Tnf</i> ^{Δ/Δ}	НД	◐	●	○	○	●	[39]
<i>Tnf</i> ^{-/-} / <i>Lta</i> ^{-/-}	◐	●	●	●	●	●	[40, 41]
<i>Tnf</i> ^{Δ/Δ} / <i>Ltb</i> ^{Δ/Δ}	○	◐	●	○	◐, развивают крестцовые ЛУ	●	[42]
<i>Tnf</i> ^{Δ/Δ} / <i>Lta</i> ^{Δ/Δ} / <i>Ltb</i> ^{Δ/Δ}	○	●	●	●	●	●	[43]
<i>Tnfr1</i> ^{-/-}	○	○	●	○	○	●	[44, 45]
<i>Tnfr1</i> ^{-/-}	○	НД	●	○	○	◐	[46]
<i>Tnfr2</i> ^{-/-}	○	○	○	○	○	○	[47, 48]
<i>Tnfrsf14</i> ^{-/-} (HVEM)	НД	○	○	○	○	○	[49]

Примечание. ГЦ – герминальные центры, ПБ – Пейеровы бляшки, мЛУ – мезентериальные лимфатические узлы, пЛУ – периферические лимфатические узлы, ФДК – фолликулярные дендритные клетки. Символы: «-/-» - удаление гена по классической нокаутной технологии, «Δ» - удаление гена с помощью Cre-loxP технологии. Условные обозначения указывают на степень

нарушения: ● – сильно нарушено или отсутствует, ● – заметно снижено, ○ – снижено, ○ – незначительно снижено, ○ – нет сильных нарушений, НД – нет данных.

1.2.1. Лимфотоксин β в развитии и поддержании гомеостаза лимфоидных органов

Первая и самая подробно изученная функция лимфотоксинов – это контроль развития вторичных лимфоидных органов. Так, при полной генетической инактивации *Lta* или *Ltbr* мыши не развивают периферические лимфатические узлы и Пейеровы бляшки – лимфоидные органы, ассоциированные с кишечником [27, 34]. Интересно, что удаление *Ltb* приводит к отсутствию почти всех периферических лимфатических узлов, кроме шейных и мезентериальных лимфатических узлов [30, 31]. Такие различия в фенотипах мышей с дефицитом *Lta* и *Ltb* могут указывать на возможную роль растворимой формы $LT\alpha_3$ в процессе развития лимфоидных органов, однако прямых доказательств на текущий момент этому нет. В дальнейших экспериментах с фармакологической блокировкой TNFR1 или $LT\beta R$ *in utero* было показано, что именно сигнальная ось $LT\alpha_1\beta_2/LT\beta R$ играет критическую роль в формировании вторичных лимфоидных органов [50]. Однако позднее на мышах с двойным нокаутом по *LIGHT* и $LT\alpha_1\beta_2$ было обнаружено, что лиганд *LIGHT* также может участвовать в формировании лимфоидных органов, а именно мезентериальных лимфатических узлов [36].

Роль лимфотоксина β в образовании лимфоидной ткани связана с его ролью как медиатора взаимодействия между клетками-индукторами лимфоидной ткани (*LTi*, lymphoid tissue inducer cells), экспрессирующими $LT\alpha_1\beta_2$, и клетками-организаторами – стромальными клетками (*LTo*), экспрессирующими $LT\beta R$ [51]. Так, закладка лимфатических узлов и Пейеровых бляшек начинается с привлечения из крови клеток-индукторов *LTi* в место формирования лимфоидной ткани. Критически важным моментом является индукция экспрессии хемокинов на мезенхимальных клетках-организаторах для привлечения предшественников клеток-индукторов (*pre-LTi*). Для лимфатических узлов индуктором экспрессии хемокина CXCL13 на мезенхимальных клетках является ретиноевая кислота [52]. Далее CXCL13 привлекает предшественники клеток-индукторов (*pre-LTi*) для формирования клеточных скоплений [53], что, в свою очередь, приводит к запуску сигнального пути TRANCE [54]. Именно активация TRANCE приводит к индукции экспрессии $LT\alpha_1\beta_2$ на предшественниках клеток-индукторов, которые затем дифференцируются в зрелые *LTi*.

В формировании Пейеровых бляшек (Рисунок 2) во время образования зачатка критически важную роль выполняет взаимодействие ARTN на предшественниках клеток-организаторов с

лигандом RET на CD11c⁺ гематopoэтических предшественниках, также известных как клетки-инициаторы (LTi, lymphoid tissue initiator cells) [55]. Это первичное взаимодействие в зачатке Пейеровых бляшек происходит независимо от LTi, т.к., скорее всего, активация RET в CD11c⁺ клетках-инициаторах индуцирует в них экспрессию LT $\alpha_1\beta_2$, а также кластеризацию гематopoэтических клеток [55, 56]. Затем CD11c⁺ клетки-инициаторы взаимодействуют с клетками-организаторами, экспрессирующими LT β R, которые, в свою очередь, продуцируют IL-7, обеспечивающий выживание LTi [57]. Только после этих событий LTi в зачатке Пейеровых бляшек начинают экспрессировать LT $\alpha_1\beta_2$. Стоит отметить, что на протяжении многих лет оставался открытым вопрос о вкладе TNF в развитие Пейеровых бляшек, так как существовали противоречия относительно формирования ПБ у мышей с генетической инактивацией TNF (Таблица 1): мыши, у которых TNF был удален с помощью классической нокаутной технологии, развивали ПБ [46], тогда как ПБ отсутствовали у мышей в случае вырезания гена *Tnf* с помощью loxP-Cre технологии [39]. В этот вопрос не внесли ясности и разночтения в опубликованных фенотипах для мышей с инактивацией TNFR1 – от существенного [44] до незначительного [46] уменьшения количества ПБ (Таблица 1). В недавнем исследовании было подтверждено, что TNF важен для формирования ПБ: удаление TNF, экспрессирующегося на ROR γ t⁺ клетках, предположительно, на LTi, но не на CD11c⁺ клетках-инициаторах, приводит к полному отсутствию ПБ [58], что вносит уточнение в существующую модель формирования ПБ (Рисунок 2).

Первичное взаимодействие LTi, экспрессирующих LT $\alpha_1\beta_2$, со стромальными клетками, экспрессирующими LT β R, приводит к дифференцировке последних в стромальные клетки-организаторы [59]. В результате такого взаимодействия стромальные клетки индуцируют экспрессию хемокинов CCL19, CCL21 и молекул адгезии, привлекающих гематopoэтические клетки и способствующих дальнейшему развитию лимфоидных органов [59]. В этом случае именно ось LT $\alpha_1\beta_2$ /LT β R играет ключевую роль в поддержании положительной обратной связи: сигнальный путь LT β R увеличивает экспрессию TRANCE и IL-7, необходимого для выживания

LTi, что, в свою очередь, приводит к увеличению количества LTi, экспрессирующих $LT\alpha_1\beta_2$, соответственно, увеличивая валентности для связывания с $LT\beta R$ [60, 61].

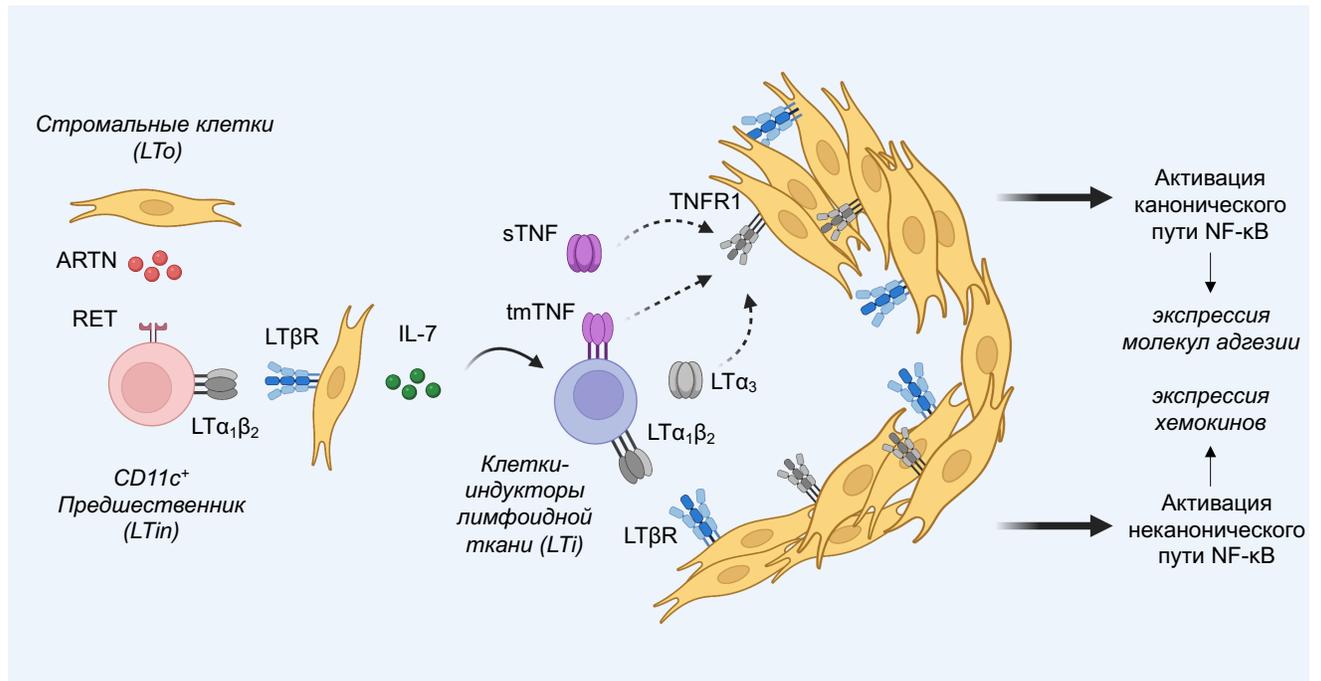


Рисунок 2. Модель потенциального вклада лимфотоксинов и TNF в развитие Пейеровых бляшек. Стромальные клетки (LTo) продуцируют ARTN, который связывается с рецептором RET на $CD11c^+$ гематопоэтических клетках (LTin). Активация RET приводит к индукции экспрессии $LT\alpha_1\beta_2$ на $CD11c^+$ клетках-инициаторах. Далее $CD11c^+LT\alpha_1\beta_2^+$ клетки-инициаторы взаимодействуют с $LT\beta R^+$ стромальными клетками-организаторами, что приводит к продукции IL-7, обеспечивающего выживание LTi. LTi начинают экспрессировать $LT\alpha_1\beta_2$, который взаимодействует с $LT\beta R$ на стромальных клетках, что приводит к активации неканонического пути NF-κB. LTi могут также экспрессировать tmTNF и продуцировать в растворимом виде TNF и $LT\alpha_3$, которые связываются с TNFR1, предположительно, на стромальных клетках, что приводит к активации канонического пути NF-κB. Неканонический и канонический пути NF-κB, взаимодействуя, продуцируют хемокины и молекулы адгезии, которые привлекают и удерживают лимфоциты в ПБ. Рисунок выполнен с помощью BioRender.

Вторая функция лимфотоксина β – поддержание структурной организации лимфоидных органов взрослого организма. Так, мыши с дефицитом *Lta*, *Ltb* и *Ltbr* имеют нарушения в микроархитектуре лимфоидных органов, что выражается в отсутствии фолликулярных дендритных клеток (FDC) в селезенке, необходимых для нормального функционирования В-клеток во вторичных лимфоидных фолликулах [62]. Эти результаты были подтверждены в экспериментах с фармакологической блокировкой $LT\beta R$, которая приводила к возникновению нарушений в структуре маргинальной зоны селезенки и В-клеточных фолликулов, а также ухудшению гуморального иммунного ответа при иммунизации мышей эритроцитами барана [63]. Интересно, что клеточным источником лимфотоксина β , необходимым для развития FDC в селезенке, являются В- и Т-клетки, а критическим регулятором гуморального иммунного ответа при иммунизации эритроцитами барана являются только В-клетки [32]. Другая популяция стромального компартмента лимфоидных органов, функции которой зависят от сигнального пути $LT\beta R$ – это фибробластные ретикулярные клетки (FRC). Так, активация $LT\beta R$ на $CCL19^+$ предшественниках FRC необходима для их последующего созревания, функционально необходимого для эффективного противовирусного ответа, опосредуемого Т-клетками [64].

Кроме того, сигнальный путь $LT\beta R$ необходим для поддержания структуры маргинального синуса селезенки и обеспечения миграции иммунных клеток в селезенке путем регуляции экспрессии молекулы адгезии MAdCAM-1 на эндотелиальных клетках, взаимодействующих с $\alpha 4\beta 7$ на иммунных клетках [65]. Рециркуляция лимфоцитов в лимфатические узлы также зависит от $LT\beta R$: блокировка $LT\beta R$ с помощью слитого белка $LT\beta R$ -Ig ($LT\beta R$ -IgG1 человека, также называемого $LT\beta R$ -Fc), приводила к уменьшению экспрессии MAdCAM-1 и PNA_d на венах высокого эндотелия (HEV), что затрудняло эффективную рециркуляцию лимфоцитов [66]. Интересно, что гомеостаз и созревание HEV зависит от прямого взаимодействия с дендритными клетками и последующей активации сигнального пути $LT\beta R$ [67]. Вдобавок, лимфотоксин β , экспрессируемый В-клетками, необходим для дифференцировки периваскулярных фибробластов, ответственных за разделение Т- и В-зон белой пульпы селезенки [68].

Данных о роли сигнального пути $LT\beta R$ в поддержании первичных лимфоидных органов – тимусе и костном мозге – намного меньше по сравнению с количеством данных о его роли в поддержании структуры вторичных лимфоидных органов. Противоречивые результаты были получены в экспериментах по изучению роли сигнального пути $LT\beta R$ в механизмах центральной толерантности в тимусе [69]. Предположительно, $LT\beta R$ контролирует развитие медуллярных тимусных эпителиальных клеток (mTEC), играющих ключевую роль в негативной селекции в тимусе [70, 71]. Другая функция $LT\beta R$ заключается в регуляции экспрессии хемокинов в

медуллярном слое тимуса, что определяет направление миграции тимоцитов в процессе селекции [72]. Кроме этого, гомеостатическая гиперпродукция белков, кодируемых генами человеческого локуса TNF/LT (hTNF/LT Tg), приводила к уменьшению общего количества дважды отрицательных (DN) тимоцитов, ассоциированного с повышением уровня апоптоза на стадии DN2 и уменьшением выживания тимоцитов на стадии DN1 [73]. Вероятно, это связано с тесной взаимосвязью дифференцировки кортикальных тимусных эпителиальных клеток (сТЕС) и созревания тимоцитов, так как у hTNF/LT Tg мышей было также уменьшено содержание сТЕС в тимусе [73]. Кроме этого, было показано, что у hTNF/LT Tg мышей нарушается гомеостаз периферических Т-лимфоцитов [74].

Наиболее вероятно, что главным клеточным источником LT, участвующим в инволюции тимуса, являются Т-клетки. Так, у мышей со сверхэкспрессией LT α и LT β в Т-клетках происходила схожая с hTNF/LT Tg мышами инволюция тимуса за счет уменьшения абсолютного количества DN тимоцитов. Более того, перенос костного мозга из трансгенных мышей, экспрессирующих LT α и LT β под контролем промотора Lck, в мышей с удалением TNFR1 или LT β R не приводил к инволюции тимуса в отличие от реципиентов дикого типа, то есть именно активация сигнальных путей TNFR1 и LT β R в стромальном компартменте отвечает за инволюцию тимуса [75]. Кроме того, считается, что именно участие LT β R в негативной селекции тимоцитов определяет наличие признаков системного воспаления и аутоиммунитета во взрослом организме. Это отчасти подтверждается тем, что у мышей с индуцибельной делецией LT β R во взрослом организме не происходит изменений в микроархитектуре медуллярного слоя тимуса [76].

Таким образом, лимфотоксин, а именно его мембраносвязанная форма LT $\alpha_1\beta_2$, является многофункциональным цитокином, который играет важную роль в поддержании гомеостаза иммунной системы путем участия в развитии лимфоидных органов во время эмбриогенеза и обеспечении их нормального функционирования во взрослом состоянии.

1.2.2. Лимфотоксины α и β в регуляции иммунитета слизистых

Третья функция лимфотоксинов α и β заключается в регуляции гомеостаза слизистых оболочек организма. Известно, что LT контролирует продукцию антител класса IgA, необходимых для защиты кишечника от патогенов и поддержания состава микробиоты. Интересно, что растворимая и мембраносвязанная формы лимфотоксина по-разному участвуют в этом процессе, что служит наиболее ярким примером, когда абсолютно разграничены функции LT α_3 и LT $\alpha_1\beta_2$. Так, растворимая форма лимфотоксина LT α_3 , продуцируемая ROR γ t⁺ лимфоцитами врожденного

иммунитета типа 3 (ILC3), обеспечивает индукцию IgA, зависимую от Т-клеток, за счет хоуминга Т-клеток в собственную пластинку тонкого кишечника. А экспрессия мембраносвязанной формы лимфотоксина $LT\alpha_1\beta_2$ на ILC3 обеспечивает взаимодействие с дендритными клетками, индуцируя в них экспрессию iNOS, что в итоге приводит к переключению изотипа антител, продуцируемых В-лимфоцитами, на IgA [29]. Более того, у мышей с удалением лимфотоксина α в ILC3 наблюдались изменения в составе микробиоты: происходила экспансия сегментированных нитчатых бактерий (SFB) и уменьшалась представленность Bacteroidetes в тонком кишечнике [29]. Вероятно, это происходит посредством сигнального пути $LT\beta R$, так как для $Ltbr^{-/-}$ мышей показано большее содержание SFB по сравнению с контрольными мышами дикого типа. Такое увеличение связано с участием $LT\beta R$ в индукции экспрессии IL-23 и IL-22 в толстом кишечнике, что является необходимым для регуляции ответа в слизистых в контексте метаболического синдрома [77]. Предположительно, ключевым клеточным источником лимфотоксина β , необходимым для продукции IL-22, являются $ROR\gamma^+$ ILC3, как было показано в модели инфекции *Citrobacter rodentium*. Лимфотоксин β на $ROR\gamma^+$ ILC3 способствует развитию в кишечнике лимфоидных фолликулов, обеспечивающих необходимое микроокружение для последующего взаимодействия между $ROR\gamma^+$ ILC3 и $LT\beta R^+$ дендритными клетками. Активация сигнального пути $LT\beta R$ индуцирует продукцию IL-23 дендритными клетками, что, в свою очередь, активирует синтез IL-22 $ROR\gamma^+$ ILC3 по принципу положительной обратной связи. IL-22 стимулирует IL-22R на эпителиальных клетках, что запускает выработку антимикробных белков RegIII γ и RegIII β , необходимых для элиминации бактериальных патогенов в слизистых [78].

Стоит отметить, что некоторые нарушения в работе иммунной системы у мышей с инактивацией сигнального пути, опосредованного LT, также зависят от состава микробиоты. Так, увеличение селезенки у $Ltbr^{-/-}$ мышей, ассоциированное с повышением количества нейтрофилов, зависит именно от микробиоты, т.к. введение антибиотиков таким мышам уменьшает как размер селезенки, так и абсолютное количество нейтрофилов. Такой же фенотип наблюдается у $Ltbr^{-/-}$ мышей в безмикробных условиях germ free, но не в менее строгих условиях SPF (specific pathogen-free, свободных от патогенной флоры), причем было показано, что лимфотоксин β контролирует размер селезенки именно за счет экспрессии на $ROR\gamma^+$ ILC3 клетках [79].

1.2.3. Лимфотоксины α и β в развитии и функциях иммунных клеток

Четвертая функция лимфотоксинов α и β – это участие в развитии различных популяций иммунных клеток. Большая роль отводится сигнальному пути, опосредованному лимфотоксином β ,

в поддержании гомеостаза субпопуляций миелоидных клеток. Довольно неожиданными стали результаты последних лет, демонстрирующих участие $LT\beta R$ в «экстренном» миелопоэзе, активируемом в контексте системного воспаления. Оказалось, что во время системного воспаления рециркулирующие В-клетки, экспрессирующие $LT\alpha_1\beta_2$, накапливаются в костном мозге и взаимодействуют с $LT\beta R^+$ мезенхимальными стволовыми клетками, что, в свою очередь, подавляет лимфопоэз за счет ингибирования продукции $IL-7$ [80].

Что касается дифференцированных субпопуляций миелоидных клеток, то $memLT$ необходим для привлечения дендритных клеток в лимфоидные органы [81]. Кроме этого, в экспериментах со смешанными костномозговыми химерами было обнаружено, что мембраносвязанная форма лимфотоксина на В-клетках активирует сигнальный путь $LT\beta R$ на классических дендритных клетках, что помогает, во-первых, поддерживать гомеостаз дендритных клеток, во-вторых, обеспечивает их пролиферацию [82, 83]. Оказалось, что $LT\beta R$ играет ключевую роль в дифференцировке дендритных клеток с фенотипом $CD11b^+Esam^{hi}$, которые необходимы для эффективного прайминга $CD4^+$ Т-клеток [84]. В последних исследованиях было показано, что существует некоторая вырожденность в сигналах $LT\beta R^+$ дендритным клеткам: $LT\alpha_1\beta_2$ не только на В-клетках, но и на $ILC3$ способствует поддержанию нормального количества классических дендритных клеток в селезенке, а также терминальной дифференцировке $Sirp\alpha^+CD4^+Esam^{hi}$ дендритных клеток, которые критически необходимы для поляризации Т-клеток [85]. Лимфотоксин β важен для поддержания гомеостаза дендритных клеток и в других лимфоидных образованиях, в т.ч. в изолированных лимфоидных фолликулах и криптобляшках (cryptopatches) кишечника. Связывание $LT\alpha_1\beta_2$ на $CCR6^+$ $ILC3$ с $LT\beta R$ на дендритных клетках приводит к их дифференцировке в дендритные клетки, ассоциированные с изолированными лимфоидными фолликулами и криптобляшками, которые экспрессируют гены, связанные с иммунорегуляторными функциями в кишечнике, в том числе $IL-22BP$. В дальнейшем такие дендритные клетки путем продукции $IL-22BP$ контролируют метаболизм липидов [86]. У мышей с индуцибельной инактивацией $LT\beta R$ было обнаружено уменьшение процентного содержания нейтрофилов, ассоциированное с уменьшением уровня экспрессии $CXCL2$ в селезенке, что свидетельствует о роли $LT\beta R$ в привлечении нейтрофилов в селезенку [76]. Кроме этого, $LT\beta R$ на нейтрофилах важен и для их функциональности, хотя это происходит через связывание с $LIGHT$: $LIGHT/LT\beta R$ взаимодействие ингибирует дыхание и гликолиз в нейтрофилах, что обеспечивает мышам резистентность в модели DSS-индуцированного колита [87, 88]. В поддержании гомеостаза другой субпопуляции миелоидных клеток – моноцитов – в основном показана роль TNF и $TNFR1$ [89], однако имеются данные *in vitro* о том, что растворимая форма лимфотоксина $LT\alpha_3$ индуцирует

экспрессию молекул адгезии в клеточной линии эндотелиальных клеток, что способствует их адгезии с моноцитами [90].

Лимфотоксин участвует и в гомеостазе клеток лимфоидного ряда. Во-первых, показано, что удаление *Lta*, но не TNFR1 или TNFR2, приводит к уменьшению количества НК-клеток в лимфоидных органах и снижению их противоопухолевой активности в моделях перевиваемых опухолей [91, 92]. Позднее был объяснен механизм: взаимодействие между $LT\alpha_1\beta_2$ на $ROR\gamma^+$ ILC3 и $LT\beta R$ на стромальных клетках необходимо для нормального развития НК-клеток в костном мозге и их функциональной активности [93]. Для В-клеток в условиях *in vitro* показано, что лимфотоксин может участвовать в пролиферации лимфобластоидных В-клеточных линий [94, 95]. В различных инфекционных моделях также были получены данные, свидетельствующие об участии лимфотоксина в поляризации $CD4^+$ Т-клеток. Так, показано, что экспрессия лимфотоксина β на В-клетках стимулирует миграцию $CXCR5^+$ дендритных клеток в В-клеточную зону, что необходимо для последующего развития T_H2 -клеток в модели инфекции *Heligmosomoides polygyrus* [96].

Таким образом, лимфотоксин β регулирует иммунный ответ путем влияния на развитие и дифференцировку различных популяций иммунных клеток.

1.3. Функции лимфотоксинов α и β в хроническом воспалении

Учитывая все вышеперечисленные функции лимфотоксинов в гомеостазе иммунной системы, можно предположить, что лимфотоксины принимают участие и в воспалительных процессах. Довольно хорошо изучена роль лимфотоксинов в остром воспалении в модели бактериальных и вирусных инфекций, в том числе потому, что изучение функций лимфотоксинов в этом контексте было необходимо для понимания их функциональной значимости в поддержании гомеостаза лимфоидных органов [97, 98]. Изучение роли лимфотоксина α в контексте хронического воспаления началось с описания фенотипа трансгенных мышей с экспрессией $LT\alpha$ под контролем промотора RIP (rat insulin promoter II), в результате чего наблюдалась эктопическая экспрессия $LT\alpha$ в поджелудочной железе, почках и коже. Оказалось, что результатом такой эктопической экспрессии $LT\alpha$ является воспаление островков Лангерганса в поджелудочной железе, ассоциированное с инфильтрацией Т- и В-клеток [99]. Дальнейшая характеристика таких мышей выявила, что инфильтраты мононуклеарных клеток в почках RIP- $LT\alpha$ мышей морфологически напоминают лимфоидные органы с характерными Т- и В-зонами, а также с реорганизацией сосудов, ассоциированной с повышением уровня экспрессии молекул адгезии MAdCAM-1, ICAM-1, VCAM-1 [100]. Создание и описание трансгенных мышей с экспрессией $LT\beta$ под контролем промотора RIP подтвердило фенотип RIP- $LT\alpha$ мышей, а скрещивание этих мышей между собой

привело даже к более массивной инфильтрации лейкоцитов в островки Лангерганса с ярко выраженной компартиментализацией Т-, В-клеточных зон и FDC, а также увеличением транскрипции генов, кодирующих критические факторы лимфоидного неогенеза – CCL21, CCL19 и CXCL13 [101]. Показано, что эктопическая экспрессия LIGHT, другого лиганда LT β R, может стимулировать образование третичных лимфоидных органов (ТЛО) в островках Лангерганса NOD (non obese diabetic) мышей, спонтанно развивающих диабет [102]. Возможно, лимфотоксин α важен для формирования третичных лимфоидных органов именно в контексте образования лимфатических сосудов, так как у RIP-LT α мышей формирование лимфатических сосудов в неиммунных органах предшествует формированию ТЛО [103].

Таким образом, при индукции экспрессии лимфотоксинов α и β под конститутивным промотором RIP у мышей начинается хроническое воспаление в неиммунных органах, ассоциированное с образованием лимфоидных органов *de novo*. Результаты этих работ послужили отправной точкой для предположения, что лимфотоксины могут выполнять патогенетическую функцию в хроническом воспалении за счет индукции образования ТЛО.

1.3.1. Роль лимфотоксинов α и β в аутоиммунных заболеваниях

Пятая функция лимфотоксинов связана с их участием в воспалительных процессах. Хроническое воспаление является одной из причин развития аутоиммунных процессов. Повышенное содержание уровня LT α и LT β в крови и в пораженных тканях было обнаружено у пациентов с ревматоидным артритом [104, 105] и рассеянным склерозом [106, 107]. Доказательство связи LT α с патогенезом аутоиммунных заболеваний было наглядно продемонстрировано на пациенте с ревматоидным артритом, у которого не было положительного клинического эффекта после терапии инфликсимабом – моноклональным антителом против TNF. Однако переключение этого пациента на этанерцепт, слитый белок TNFR2-Fc, который помимо TNF блокирует еще и LT α_3 , привело к ремиссии заболевания [108]. Таким образом, различие в специфичности инфликсимаба и этанерцепта может объяснять эффективность терапии у этого пациента. Более того, в синовиальной оболочке суставов этого пациента была обнаружена повышенная экспрессия LT α [108].

В дальнейшем роль лимфотоксинов была изучена в различных экспериментальных моделях заболеваний на мышах. В модели колита с переносом CD45RB^{hi} Т-клеток иммунодефицитным реципиентам было показано снижение воспаления и пролиферации крипт в кишечнике при введении мышам слитого белка LT β R-Fc, блокирующего взаимодействие LT $\alpha_1\beta_2$ /LT β R и

LIGHT/LT β R [109]. Этот результат был подтвержден и в модели химически-индуцированного колита [110], что привело к выводу, что лимфотоксин β играет важную роль в патогенезе заболеваний, опосредуемых активностью Т-клеток. Так, с помощью скрещивания non-obese diabetic (NOD) мышей с мышами, экспрессирующими LT β R-Fc под контролем CMV-промотора, показана патогенетическая роль лимфотоксина в развитии инсулин-зависимого диабета за счет отсутствия антиген-специфичных Т-клеток [111]. У IL-14 α -трансгенных мышей, развивающих синдром Шегрена, характеризующийся поражением желез внешней секреции, в слюне повышен уровень экспрессии мРНК, кодирующей LT α . Более того, при скрещивании таких трансгенных мышей с мышами, дефицитными по LT α , восстанавливается нормальная секреция слюнных желез [112]. В модели коллаген-индуцированного артрита применение анти-LT α , но не LT β R-Ig, уменьшало тяжесть симптомов и воспаление суставов, скорее всего за счет деплеции LT α ⁺ антиген-специфичных T_H1- и T_H17-клеток [113]. Кроме этого, LT α может индуцировать продукцию провоспалительных цитокинов фибробластоподобными синовиоцитами, а также стимулировать их пролиферацию [114].

Другой механизм, за счет которого лимфотоксин β может участвовать в хроническом воспалении, – это формирование ТЛО. ТЛО представляют собой эктопические лимфоидные структуры, которые образуются в очагах хронического воспаления [115]. Такие структуры характеризуются: 1) организованными скоплениями лимфоцитов с анатомически различимыми Т- и В-зонами, 2) наличием PNA⁺ венул высокого эндотелия внутри или вокруг скопления лимфоцитов, что обеспечивает экстравазацию CD62L⁺ иммунных клеток, 3) наличием признаков переключения классов В-клеток и реакций герминальных центров в В-клеточных фолликулах, 4) наличием зрелых дендритных клеток в Т-зоне, 5) экспрессией характеристических хемокинов, участвующих в организации вторичных лимфоидных органов: CCL19, CCL21 и CXCL13, которые привлекают CCR7⁺ дендритные клетки, наивные Т-клетки, CXCR5⁺ В-клетки и T_H [116]. Формирование ТЛО описано в патогенезе ревматоидного артрита, где в синовиальной оболочке суставов происходит накопление дендритных клеток и лимфоцитов с выраженными Т- и В-зонами, присутствуют фолликулярные дендритные клетки и PNA⁺ венулы высокого эндотелия, а также экспрессируются хемокины CXCL13 и CCL21 [117, 118]. Характеристические ТЛО так же описаны для слюнных желез пациентов с синдромом Шегрена [119, 120]. Более того, для моделирования синдрома Шегрена были сконструированы мыши с эктопической экспрессией LT $\alpha\beta$ в слюнных и слезных железах, у которых наблюдалось образование ТЛО [121]. Наконец, образование В-клеточных фолликулов в оболочках мозга ассоциировано с началом развития прогрессирующей формы рассеянного склероза в более раннем возрасте [122].

Все описанные выше результаты послужили толчком для создания терапевтических препаратов, блокирующих сигнальные пути, опосредованные лимфотоксинами. Действительно, были проведены клинические испытания эффективности ранее упомянутых LT β R-Ig (клиническое название – баминерцепт) и анти-LT α (клиническое название – патеклизумаб) в терапии ревматоидного артрита [123, 124] и синдрома Шегрена [125]. К сожалению, в этих испытаниях ни один из препаратов не показал значимой клинической эффективности, что могло указывать на недостаточно изученные механизмы действия лимфотоксинов в патогенезе аутоиммунных заболеваний. Предметом исследования этой работы является изучение роли лимфотоксина α в контексте модели рассеянного склероза на мышах, о чем будет подробно рассказано далее.

1.3.2. Рассеянный склероз

Рассеянный склероз (РС) – это комплексное аутоиммунное заболевание, характеризующееся воспалением и демиелинизацией в ЦНС, что приводит к разрушению миелиновой оболочки нейронов и нарушению проводимости нервных сигналов. В отличие от многих нейродегенеративных заболеваний, РС диагностируется довольно рано, средний возраст – всего 32 года. На данный момент в мире насчитывается примерно 2.8 миллиона пациентов с РС, при этом частота заболеваемости увеличилась на 30% по сравнению с 2013 годом [126]. РС сопровождается нарушением множества неврологических функций, а ранний возраст постановки диагноза и его хроническое течение приводят к утрате работоспособности и ухудшению качества жизни. Кроме того, РС является достаточно гетерогенным заболеванием с сильно различающимися между пациентами клиническими симптомами и непредсказуемым течением, что затрудняет разработку эффективных методов терапии. Несмотря на различия в симптоматике и ходе развития заболевания у разных пациентов, выделяют несколько типов РС. Самой часто встречающейся формой РС является рецидивирующе-ремиттирующий тип (RRPC), диагностируемый у 85-90% пациентов и характеризующийся периодами обострения и ремиссии. Развитие RRPC можно разделить на несколько стадий. Первую стадию, известную как **доклиническую**, чаще всего обнаруживают случайно по очагам демиелинизации на МРТ исследовании, так как у пациентов отсутствуют симптомы заболевания [127]. Хотя этиология РС до сих пор не полностью ясна, предполагается, что на ранней стадии в развитие заболевания вносят вклад генетические факторы, а также факторы окружающей среды. На генетическую предрасположенность приходится более 30% общего риска развития заболевания [128], при этом факторы окружающей среды, такие как инфекции

герпесвирусами, тип питания и соответствующие изменения в микробиоте, курение и уровень витамина D, также вносят вклад в развитие РС [129].

Риск развития РС в течение жизни у родственников первой степени родства и монозиготных близнецов выше в 7 и в 100 раз, соответственно, чем у общей популяции, что позволяет предположить, что восприимчивость к РС контролируется генетическими факторами [130]. Одним из главных генетических факторов, связанных с риском развития РС, являются полиморфизмы в локусе HLA, при этом выделяются варианты в генах *HLA* класса II *HLA-DRB1* (например, гаплотип *HLA-DRB1*15:01*) и *HLA-DPB1*, а также в генах *HLA* класса I *HLA-A* и *HLA-B* [131, 132]. В недавнем крупном исследовании было выявлено 233 генетических варианта, связанных с предрасположенностью к РС, 32 из которых расположены в локусе HLA, 200 – вне локуса HLA, 1 – в X-хромосоме [128]. Оказалось, что гены, для которых были описаны полиморфизмы, ассоциированные с предрасположенностью к РС, широко представлены в Т-, В-клетках, НК-клетках, дендритных клетках и микроглии, что подчеркивает роль иммунной системы в развитии РС [128].

Среди факторов окружающей среды, ассоциированных с повышенным риском возникновения РС, самым изученным является инфекция вирусом Эпштейна-Барр (ВЭБ). В недавнем многолетнем исследовании Bjornevik et al. проанализировали антитела к ВЭБ у когорты размером 10 миллионов человек, служивших в армии США в течение 20 лет (1993-2013 гг.). У 801 человека был диагностирован РС, 35 из них были изначально серонегативными по ВЭБ, а 34 человека были инфицированы ВЭБ до начала РС. На момент развития РС практически все пациенты были серопозитивными по ВЭБ, и только 1 – серонегативным, что подтверждает гипотезу о взаимосвязи инфекции ВЭБ и возникновения РС, предположительно, за счет кросс-реактивности антигенов ВЭБ и антигенов ЦНС [133]. Другим фактором, ассоциированным с риском возникновения РС, являются изменения в составе микробиоты. Так, анализ состава микробиоты 576 пациентов с РС показал увеличение содержания *Akkermansia muciniphila*, *Ruthenibacterium lactatiformans*, *Hungatella hathewayi*, *Eisenbergiella tayi* и уменьшение содержания *Faecalibacterium prausnitzii* и видов рода *Blautia* по сравнению с контрольной группой, жившей в тех же бытовых условиях [134].

Следующая стадия развития РС связана с появлением **клинических симптомов**, которые чередуются с периодами ремиссии. На этой стадии происходит атака аутореактивных клеток иммунной системы на миелиновую оболочку нервных волокон ЦНС. Затем лимфоциты путем продукции цитокинов и хемокинов активируют резидентные клетки ЦНС (астроциты и микроглию) и привлекают миелоидные клетки в ЦНС, что приводит к образованию очагов

демиелинизации [135]. Мишенью всех клинически одобренных способов терапии РС являются периферические лимфоциты. Механизмы действия терапевтических препаратов можно разделить на 3 группы: 1) иммуномодуляция, 2) ингибирование миграции иммунных клеток в ЦНС и 3) деплеция Т- и В-клеток [130].

Примерно через 10-15 лет у 80% пациентов с РРРС развивается **вторично-прогрессирующая форма (ВПРС)**, которая представляет собой прогрессирующую стадию заболевания. На этой стадии уже не происходит массовой инфильтрации иммунных клеток в ЦНС, поэтому текущие методы лечения эффективны только в активной стадии ВПРС [136]. На поздних стадиях заболевания происходит нейродегенерация, в которой участвуют активированные резидентные клетки ЦНС [137]. Примерно у 10-15% пациентов наблюдается постепенное ухудшение неврологических функций от начала заболевания (без ремиссий), такое состояние называется **первично-прогрессирующим РС (ППРС)** [138].

Таким образом, рассеянный склероз является комплексной патологией ЦНС, развитие которой связано с нарушением иммунорегуляции, что подтверждается эффективностью текущих иммунотерапевтических болезнь-модифицирующих препаратов. Однако остаются открытыми многие вопросы, ответы на которые могут стать основой для диагностики рассеянного склероза на предклинической стадии, поиска новых мишеней для разработки терапевтических препаратов следующего поколения и лечения прогрессирующих форм РС. Механизмы развития рассеянного склероза в основном изучаются в экспериментальных моделях на мышах, и одной из наиболее распространенных моделей является экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (ЕАЕ).

1.3.3. ЕАЕ как модель РС

Модель экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЕАЕ) стала катализатором в развитии терапевтических подходов, направленных на изменение течения РС, включая создание первого синтетического полимера из аминокислот – Глатирамер ацетата [139], первого средства для перорального применения – Финголимода [140] и первого моноклонального антитела против α 4-интегрина – Натализумаба [141]. Кроме этого, с помощью модели ЕАЕ были описаны основополагающие механизмы иммунной толерантности и развития РС как такового.

ЕАЕ может быть индуцирован 2 способами – активным и пассивным. При активной индукции мышей иммунизируют нейроспецифичными антигенами в полном адьюванте Фрейнда и затем вводят коклюшный токсин для улучшения проницаемости гематоэнцефалического барьера [142]. В качестве антигенов для иммунизации могут быть использованы пептиды основного белка

миелина (MBP, myelin basic protein), протеолипидного белка (PLP, proteolipid protein) или миелино-олигодендроцитарного гликопротеина (MOG, myelin oligodendrocyte protein) [143]. Различные комбинации генетических линий мышей и используемых для иммунизации антигенов вызывают различные формы заболевания. Например, иммунизация мышей линии C57BL/6 MOG₃₅₋₅₅-пептидом вызывает острую изолированную аутоиммунную атаку ЦНС, опосредованную CD4⁺ Т-клетками, которая напоминает обострение РРС [144]. При этом существуют протоколы иммунизации мышей линии C57BL/6 полноразмерным белком MOG, результатом которой является изолированная атака ЦНС патогенетическими аутоантителами [145, 146]. Иммунизация мышей линии SJL PLP₁₃₉₋₁₅₁-пептидом приводит к развитию заболевания с периодами обострения и ремиссии (РРС), при этом результатом иммунизации MOG₃₅₋₅₅-пептидом мышей линии NOD (non-obese diabetic) является вторично-прогрессирующее заболевание [144].

При пассивной индукции антиген-специфичные Т-клетки от иммунизированных доноров переносятся в организм неиммунизированных реципиентов [147]. Кроме того, существуют модели спонтанного развития ЕАЕ у мышей с модифицированными Т-клеточными рецепторами, распознающими специфичные для ЦНС антигены. У так называемых 2D2 мышей Т-клеточный рецептор распознает MOG₃₅₋₅₅-пептид, и 30% таких мышей спонтанно развивают оптический неврит, являющийся одним из клинических симптомов РС [148]. При этом, если скрестить 2D2 мышей на IgH^{MOG} мышей, значительный репертуар антител которых направлен на распознавание MOG [149], 60% таких мышей будут развивать спонтанный ЕАЕ, что говорит о важной роли кооперации Т- и В-клеток в индукции заболевания [150]. В дополнение к этому, мыши на генетической основе SJL/J с трансгенным Т-клеточным рецептором, распознающим MOG₉₂₋₁₀₆, не только спонтанно развивают ЕАЕ с периодами обострения и ремиссии, но и характеризуются экспансией аутоантитело-продуцирующих В-клеток [151].

Таким образом, несмотря на ряд ограничений, использование модели ЕАЕ для исследования механизмов заболевания способствовало развитию различных способов терапии. Важно отметить, что каждая из существующих моделей ЕАЕ воспроизводит различные аспекты РС, а разнообразие моделей позволяет объединить полученные данные в единую картину патогенеза РС.

1.3.4. Механизмы развития нейровоспаления

Развитие нейровоспаления в РС и в модели ЕАЕ можно разделить на несколько фаз (Рисунок 3) [152].

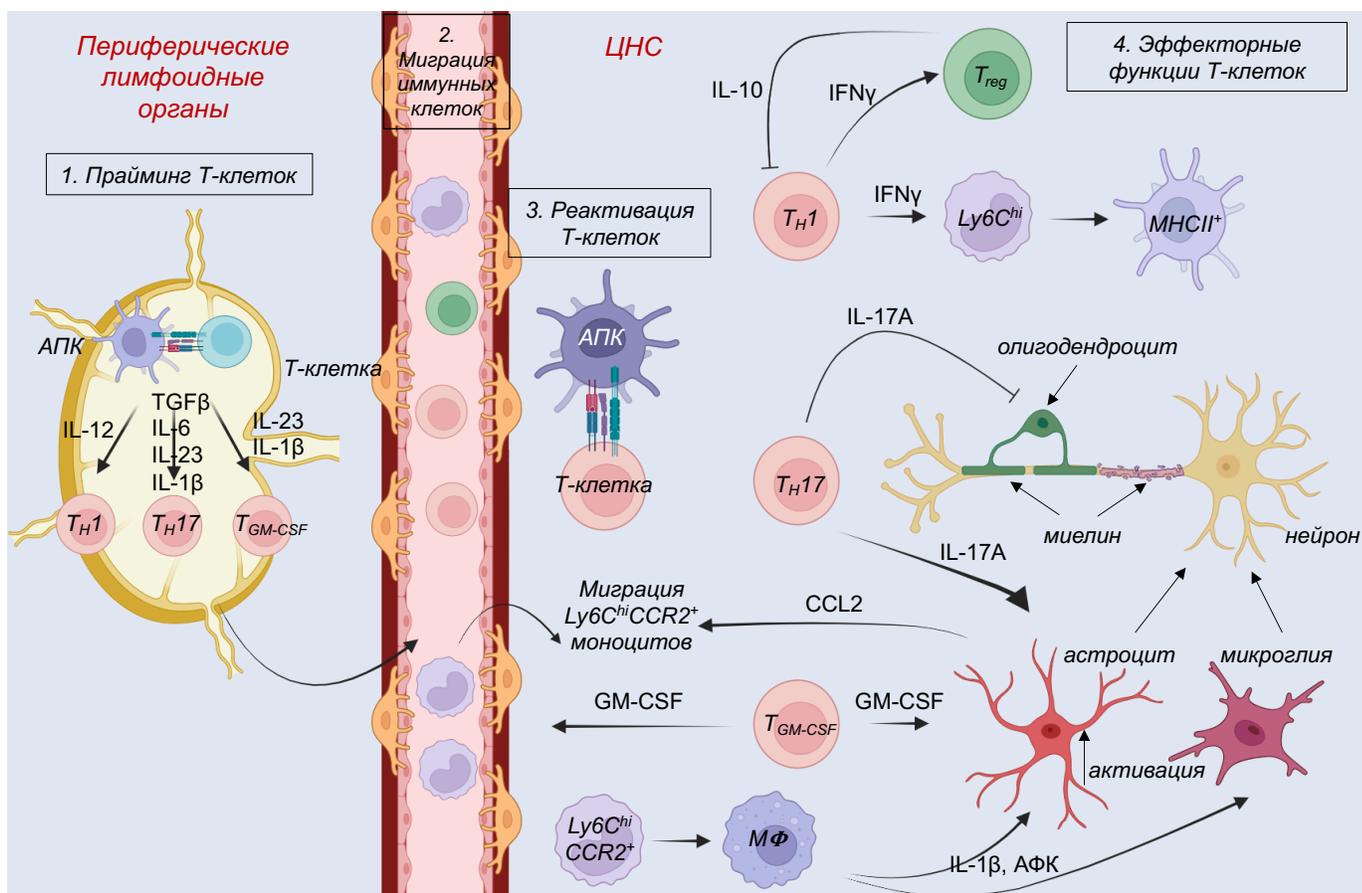


Рисунок 3. Механизмы развития нейровоспаления. 1. В периферических лимфоидных органах происходит презентация антигена наивным Т-клеткам (прайминг), и под действием различных цитокинов происходит последующая дифференцировка в Т_H1, Т_H17, Т_{GM-CSF}. 2. Эффекторные Т-клетки мигрируют в паренхиму ЦНС путем прохождения одного из трех барьеров (гематоэнцефалический, гематолептоменингеальный, гематоцереброспинальный). 3. В ЦНС происходит реактивация Т-клеток, приводящая к выработке ими цитокинов. 4. Патогенетические ТН-клетки продуцируют IFN γ , IL-17A, GM-CSF, которые способствуют дальнейшему привлечению в ЦНС миелоидных клеток, а также активации резидентных клеток ЦНС. Активированные иммунные клетки и резидентные клетки ЦНС за счет продукции провоспалительных цитокинов и других эффекторных молекул стимулируют гибель олигодендроцитов, повреждение аксонов нейронов и демиелинизацию. Рисунок выполнен с помощью BioRender.

На **первой** стадии происходит взаимодействие антиген-презентирующих клеток (АПК) и Т-клеток во вторичных лимфоидных органах (прайминг), что приводит к активации Т-клеток и их последующей дифференцировке в различные эффекторные субпопуляции в зависимости от цитокинового микроокружения.

В качестве АПК на периферии могут выступать классические дендритные клетки и макрофаги, также была показана ключевая роль В-клеток в этом процессе [153, 154]. Такие АПК представляют Т-клеткам в комплексе МНС различные значимые для развития РС аутоантигены, в том числе MBP, MOG, PLP, при этом стоит отметить, что аутоантигены, ассоциированные с РС, все еще продолжают открывать [155, 156].

Известно, что CD4⁺ T_H клетки играют ключевую роль в патогенезе как РС [157, 158], так и ЕАЕ [159]. Считается, что наиболее патогенетическими субпопуляциями являются T_H1 и T_H17, поскольку адаптивный перенос этих клеток наивным мышам может индуцировать ЕАЕ [160]. T_H1-клетки приобретают свой фенотип, характеризующийся экспрессией транскрипционного фактора T-bet и продукцией цитокина IFN γ , под воздействием IL-12 [161]. Для поляризации в T_H17-клетки необходимы IL-6, TGF β , IL-23 и IL-1 β [162]. Затем T_H17-клетки экспрессируют ROR γ t и продуцируют IL-17A, IL-17F, IL-21 и IL-22 [161]. При этом в последние годы появляется все больше исследований, показывающих пластичность T_H популяций [163]. Так, показано, что экспрессия ROR γ t характерна также для T_{GM-CSF}-клеток, продуцирующих GM-CSF и играющих абсолютно патогенетическую роль в развитии ЕАЕ [164]. Для поляризации в субпопуляцию T_{GM-CSF} необходимы IL-23 и IL-1 β [165].

На образцах крови пациентов с РС было показано, что увеличение содержания IFN γ ⁺IL-17A⁺ T_H17-клеток ассоциировано с фазами обострения, тогда как повышенное содержание IL-17A⁺ T_H17-клеток, экспрессирующих IL-10, ассоциировано с ремиссией [166]. В 2019 году с помощью высокопроизводительных методов иммунофенотипирования у пациентов с РС была описана сигнатура T_H, характеризующаяся экспрессией GM-CSF, TNF, IFN γ , IL-2, CXCR4 [158]. Эти результаты подчеркивают функциональную значимость пластичности T_H популяций.

На **второй** стадии Т-клетки мигрируют в ЦНС, проходя через какой-либо из 3 основных барьеров ЦНС: 1) гематоэнцефалический, что обеспечивает инфильтрацию клеток в паренхиму ЦНС, 2) гематолептоменингеальный, что обеспечивает инфильтрацию в пространство под мягкой оболочкой мозга (pia mater) и, частично, в спинномозговую жидкость, 3) гематоцереброспинальный, что обеспечивает миграцию из периферической крови в спинномозговую жидкость [130]. Миграция через эти барьеры обусловлена межклеточными взаимодействиями, опосредованными молекулами адгезии ICAM-1 и VCAM-1 [167], а также хемокинами, например, CCL20 [168].

На **третьей** стадии происходит реактивация Т-клеток в ЦНС. В качестве АПК выступают 1) моноциты, дифференцирующиеся в периваскулярном пространстве в дендритные клетки [169], 2) классические дендритные клетки [170], 3) тканерезидентные макрофаги оболочек [171], 3) МНСII⁺

макрофаги синусов твердой мозговой оболочки [172], 4) В-клетки [173]. Кроме этого, было показано, что ILC3 могут выступать в качестве АПК [174]. Однако имеются сведения, что взаимодействие между АПК и Т-клетками в оболочках мозга может наоборот подавлять аутоиммунные реакции, образуя иммунорегуляторную нишу [175].

На **четвертой** стадии Т-клетки после реактивации выполняют свои эффекторные функции, заключающиеся в активации резидентных клеток ЦНС, привлечении и последующей активации моноцитов, а также амплификации воспаления. Так, T_H1 -клетки в ЦНС путем выделения $IFN\gamma$ обеспечивают дифференцировку $Ly6C^{hi}$ моноцитов в $MHCII^+$ эффекторные дендритные клетки (moDC, monocyte-derived dendritic cells) [176]. При этом роль $IFN\gamma$ в развитии патологии при РС или ЕАЕ не так однозначна, поскольку мыши с удалением $IFN\gamma$ развивают ЕАЕ [177]. Одним из возможных объяснений является его участие в поддержании супрессорной активности регуляторных Т-клеток [178].

Патогенетические функции T_H17 -клеток в патологии РС и ЕАЕ в основном связаны с их участием в поддержании целостности различных барьеров организма. Так, показано, что активация $IL-17R$ на эндотелиальных клетках ГЭБ приводит к разрушению целостности плотных контактов ГЭБ [179]. Более того, сейчас существует концепция, что вклад $IL-17A$ и $IL-17F$ в развитие ЕАЕ больше связан с их ролью в поддержании гомеостаза кишечника, чем с энцефалитогенными функциями [180]. Однако $IL-17$ имеет и прямые эффекторные функции в ЦНС: 1) индуцирует продукцию хемокинов в астроцитах, в том числе $CCL2$, необходимого для привлечения моноцитов [181], 2) подавляет созревание и выживание олигодендроцитов [182].

T_{GM-CSF} путем продукции GM-CSF необходимы для миграции $Ly6C^{hi}CCR2^+$ моноцитов в ЦНС [183] и для последующего приобретения ими фенотипа moMACs (monocyte-derived macrophages), для которых характерна продукция $IL-1\beta$, активных форм кислорода, а также фагоцитарная активность [176]. Интересно, что на мышях с гиперпродукцией GM-CSF показано, что только GM-CSF достаточно для индукции нейровоспаления, ассоциированного с инфильтрацией в ЦНС moMACs [184]. GM-CSF также индуцирует экспрессию MAFG в астроцитах, ассоциированную с их провоспалительной активностью [185].

Инфильтрировавшие иммунные клетки вместе с активированными резидентными клетками ЦНС участвуют в демиелинизации и повреждении нейронов [135]. Существуют механизмы, связанные с подавлением иммунного ответа при патологии РС и ЕАЕ, опосредуемые регуляторными Т- и В-клетками. Так, регуляторные $CD4^+$ Т-клетки подавляют аутоиммунное нейровоспаление путем продукции $IL-10$ [186], а также способствуют ремиелинизации путем выделения $CCN3$ [187]. Кроме этого, экспрессия TNFR2 на регуляторных Т-клетках обеспечивает

их супрессорную активность, а также защиту от развития ЕАЕ [188]. Регуляторные В-клетки ингибируют заболевание путем продукции IL-10 и IL-35 [189, 190]. Более того, в недавних исследованиях было показано, что IL-10-продуцирующие В-клетки мигрируют в ЦНС из кишечника и являются IgA⁺ антитело-продуцирующими клетками [146]. Другой популяцией клеток с возможной регуляторной функцией являются ILC3. Так, ILC3 в периферических лимфатических узлах подавляют ЕАЕ, однако механизмы такой регуляции иммунного ответа еще предстоит изучить [174].

1.3.5. Роль лимфотоксинов α и β в развитии РС и ЕАЕ

В настоящее время роль лимфотоксинов в развитии РС считается в основном патогенетической. На пациентах с РС показано, что экспрессия LT α повышена в очагах демиелинизации и мононуклеарных клетках в спинномозговой жидкости [106, 107]. Анализ цитокинового профиля периферических мононуклеаров, выделенных из крови пациентов с ремиттирующим типом РС, выявил увеличение продукции LT α Т-клетками и В-клетками во время периодов обострения [191]. В подтверждение к этим результатам у пациентов с РС повышена продукция LT α_3 CD19⁺ В-клетками, которые регулируют T_H1 и T_H17 ответ [192]. В работе Duddy et al. показано, что продукция LT α характерна для В-клеток памяти, а терапия митоксантроном, синтетическим цитостатиком, приводит к уменьшению продукции LT α_3 стимулированными В-клетками [193]. Недавние исследования по изучению метилирования ДНК в В-клетках, выделенных из пациентов с ремиттирующим РС, показали, что изменения в метилировании локуса *LTA* могут быть связаны с риском возникновения РС [194]. Более того, полиморфизм в гене *LTA* ассоциирован с повышенным риском развития РС [195]. *Post mortem* анализ образцов головного мозга 6 пациентов с прогрессирующей формой РС показал, что в ЦНС таких пациентов происходит накопление популяции CD161⁺LT β ⁺ Т-клеток, по фенотипу схожих с T_H17/T_{FH} [196].

В то же время данные о роли LT в модели ЕАЕ остаются противоречивыми. В ранних экспериментах введение антител к TNF/LT α в модели с пассивной индукцией ЕАЕ предотвращали развитие МВР-зависимого ЕАЕ, что указывало на патогенетическую роль TNF и/или LT α [197]. Подтверждение этих результатов было получено на мышах с генетической инактивацией *Lta*, которые были абсолютно резистентны к развитию MOG₃₅₋₅₅-индуцированного ЕАЕ [198]. Однако позднее было показано, что у таких мышей с конвенциональным удалением *Lta* есть нарушения в продукции TNF миелоидными клетками [28], что поднимает вопрос о достоверности результатов. Более того, в инфекционной модели *Lta* ^{$\Delta\Delta$} мыши без *neo*-кассеты были менее восприимчивы к

заражению *Mycobacterium tuberculosis* по сравнению с мышами с конвенциональным удалением *Lta* и мышами с удалением *Tnf* [199]. Фенотип резистентности *Lta*-дефицитных мышей к индукции ЕАЕ косвенно противоречил данным по адоптивному переносу костного мозга из *Lta*-дефицитных мышей в RAG1^{-/-} реципиентов, так как последующая иммунизация приводила к развитию заболевания, как и у мышей дикого типа [200]. В этой же работе было показано, что мыши с двойным нокаутом TNF/LT α были абсолютно резистентны к индукции ЕАЕ [200], что в совокупности приводило только к одному однозначному выводу: для индукции ЕАЕ необходим TNF. Стоит отметить, что другие исследования не обнаружили влияния удаления *Tnf/Lta* на развитие ЕАЕ, однако эти эксперименты были проведены на мышах, полученных на смешанной генетической основе [201].

В дальнейших исследованиях было показано, что, действительно, генетическая или фармакологическая блокировка TNF приводят к отложенному началу заболевания и усилению клинических симптомов на поздних стадиях [202, 203]. Причем для TNF показано, что важны как его клеточный источник, так и локализация иммунного ответа. Так, в ЦНС TNF выполняет патогенетическую функцию: TNF, продуцируемый миелоидными клетками, участвует в привлечении воспалительных клеток в ЦНС, TNF, продуцируемый Т-клетками, регулирует инфильтрацию миелоидных клеток в ЦНС. Во вторичных лимфоидных органах уменьшает продукцию IL-6 и IL-12 антиген-презентирующими клетками [203]. В целом, в модели ЕАЕ довольно четко продемонстрированы функции рецепторов TNF: TNFR1 выполняет патогенетическую роль [204], тогда как TNFR2 – протективную [188, 205]. Однако несмотря на убедительные результаты в доклинических моделях РС, клинические испытания Lenercapt, антагониста TNFR1, не только не показали эффективность, но наоборот ухудшали симптомы у пациентов с РС [206].

Что касается мембраносвязанной формы LT β , имеются сведения о том, что мыши с дефицитом *Ltb* были восприимчивы к развитию ЕАЕ и развивали более слабые симптомы заболевания по сравнению с мышами дикого типа, однако эти результаты были получены на смешанной генетической основе [198]. Мыши с удалением *Ltb* развивают шейные лимфатические узлы, которые, как было показано на мышах с трансгенным Т-клеточным рецептором, специфичным к PLP, могут служить местом прайминга энцефалитогенных Т-клеток [207]. Этот факт вносит очередную неизвестную переменную в понимание системы цитокинов TNF/LT, поскольку в контексте ЕАЕ сложно сравнивать *Lta*- и *Ltb*-дефицитных мышей. Однако стоит отметить, что эксперименты на *aly/aly* мышах с точечной мутацией в киназе NIK показали, что прайминг Т-клеток может происходить в отсутствие вторичных лимфоидных органов. Результатом

экспериментов с пересадкой костного мозга из мышей *aly/aly* в реципиентов дикого типа стало развитие клинических симптомов ЕАЕ, что указывает на возможную независимость структурных дефектов в иммунной системе и развитие Т-клеточнозависимого иммунного ответа при подкожной иммунизации [208].

В дальнейшем эксперименты по изучению сигнальных путей, опосредованных $LT\beta R$, проводили с использованием слитого белка $LT\beta R$ -Ig, блокирующего взаимодействие $LT\alpha_1\beta_2/LT\beta R$ и $LIGHT/LT\beta R$. Применение $LT\beta R$ -Ig в модели МВР-индуцированного ЕАЕ на крысах предотвращало развитие заболевания [209]. Это было подтверждено экспериментами на мышах линии SJL, при иммунизации PLP₁₃₉₋₁₅₁-пептидом которых развивается заболевание с периодами обострений и ремиссий. Так, введение $LT\beta R$ -Ig после иммунизации PLP₁₃₉₋₁₅₁-пептидом приводило к уменьшению обострений на поздних стадиях заболевания, что коррелировало с уменьшением выработки IFN γ Т-клетками и минимальными признаками демиелинизации [209]. Однако в модели с иммунизацией MOG₃₅₋₅₅-пептидом мышей линии C57BL/6 последующее введение $LT\beta R$ -Ig не влияло на развитие заболевания. Одним из объяснений такого фенотипа была необходимость дополнительного введения коклюшного токсина, влияющего на продукцию хемокинов [209]. Более того, в модели химически-индуцированной нейродегенерации, которая не зависит от Т-клеток, введение $LT\beta R$ -Ig уменьшало уровень демиелинизации, а также ускоряло процессы ремиелинизации [210]. Интересно, что при генетическом удалении $LT\beta R$ была обнаружена его двойственная роль: скорее всего, $LT\beta R$ стимулирует как процессы демиелинизации, так и процессы ремиелинизации [210]. Эти результаты согласуются с данными, полученными на мышах с дефицитом $LIGHT$. Так, $LIGHT$ -дефицитные мыши развивают хроническое заболевание в модели MOG₃₅₋₅₅-индуцированного ЕАЕ, в связи с усиленной активацией миелоидных клеток в ЦНС [211]. Однако, возможно, что у $LIGHT$ -дефицитных мышей также есть проблемы с ремиелинизацией на хронической стадии заболевания.

В нескольких исследованиях была показана патогенетическая роль лимфотоксина за счет участия в формировании ТЛО. Введение $LT\beta R$ -Ig снижало экспрессию хемокинов CXCL10, CXCL13 в ЦНС, уменьшало инфильтрацию Т-клетками и ограничивало формирование В-клеточных фолликулов [212]. Píkor et al. показали, что интеграция сигналов от IL-17, IL-22 и $LT\alpha\beta$ в воспаленных оболочках головного мозга способствует ремоделированию ретикулярных стромальных клеток, что приводит к формированию ТЛО [213]. Более того, взаимодействие между Т_H17-клетками, экспрессирующими $LT\alpha\beta$, и $LT\beta R^+$ стромальными клетками было необходимо для запуска продукции IL-17. Авторы этого исследования также показали, что у пациентов с РС повышена экспрессия $LT\alpha\beta$ и $LIGHT$ на активированных Т-клетках [213]. Оказалось, что

конститутивное повышение уровня $LT\alpha$ в оболочках головного мозга может приводить к формированию ТЛО и развитию патологии головного мозга, сходной с РС. Хроническая локальная гиперпродукция $LT\alpha$ в оболочках мозга вызывала формирование ТЛО с Т-зонами с фибробластоподобными ретикулярными клетками, а также с В-зонами с сетью фолликулярных дендритных клеток. В этих инфильтратах наблюдался высокий уровень экспрессии CCL19, CCL21, CXCL13 [214].

Таким образом, имеется достаточное число указаний на патогенетическую роль лимфотоксинов в патологии РС и ЕАЕ. Тем не менее, многие из них требуют переосмысления, во-первых, из-за сложной биологии системы TNF/LT и широкого спектра выполняемых этой системой функций, во-вторых, из-за отсутствия доказанной эффективности терапевтических препаратов, блокирующих сигнальные пути лимфотоксина.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Мыши

Работу проводили на ранее сконструированных линиях мышей с полным удалением *Lta* [28], полным удалением *Tnf* [39], полным удалением *Tnfrsf1a* [45], тканеспецифичным удалением *Lta* в ILC3 и Т-клетках (*Lta*^{flox/flox} × *Rorc* (*yt*)-Cre^{Tg}, обозначенных как *Lta*^{ILC3,T}) или в Т-клетках (*Lta*^{flox/flox} × *Cd4*-Cre^{Tg}, обозначенных как *Lta*^{ΔT}) [29]. Для получения мышей с тканеспецифичным удалением *Lta* в В-клетках (*Lta*^{ΔB}) *Lta*^{flox/flox} мышей скрещивали с *Cd19*-Cre мышами [215]. Все линии мышей разводили и поддерживали на генетической основе C57BL/6. В качестве контролей дикого типа были взяты либо мыши C57BL/6, либо *Lta*^{flox/flox} мыши из того же помета, что и мыши, несущие ген Cre-рекомбиназы. В экспериментах были использованы самки и самцы возраста 9-12 недель. Мышей разводили и содержали в specific-pathogen free (SPF) условиях на базе питомника для лабораторных животных SPF-категории «Пушино», ФИБХ РАН им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова. Экспериментальных животных содержали в конвенциональных условиях в специально оборудованном помещении лаборатории молекулярных механизмов иммунитета ИМБ им. Энгельгардта РАН. Эксперименты на генетически-модифицированных мышах в модели ЕАЕ были одобрены Биоэтическим комитетом ИМБ РАН (Протокол №3 от 27.10.2022).

Генотипирование

Генетический материал выделяли из образцов биопсии хвоста или ушей мышей с использованием лизирующего буфера, содержащего 10X Gitschier buffer (166 мМ (NH₄)₂SO₄, 670 мМ Tris-HCl, 67 мМ MgCl₂, 50 мМ β-меркаптоэтанол, 67 мкМ Na₂EDTA, pH 8.8), 5% Тритон X-100 и 0.25 мг/мл протеиназы К, и инкубацией на термошейкере при 55 °С в течение ночи. Реакцию останавливали путем инкубации лизатов при 95 °С в течение 10 минут.

Генотипирование мышей проводили методом ПЦР. Для этого в качестве ДНК-матрицы использовали лизаты, предварительно разведенные в 11 раз. ПЦР проводили в реакционной смеси, содержащей 10X DreamTaq Green Buffer (Thermo Scientific), 0.2 мМ dNTP (Thermo Scientific), 0.5 мкМ прямых и обратных праймеров и 5 Ед/мкл DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Scientific). В работе были использованы следующие праймеры (Таблица 2):

Таблица 2. Список праймеров и протоколов ПЦР, использованных для генотипирования мышей

Реакция	Название праймера	Последовательность праймера	Программа амплификации	Размер продуктов, kb
<i>Lta</i> floxed	LTa-F1	GCGGCAGGCATGTCAAG	95°C 3 мин, 35 x (95°C 60 с, 63°C 60 с, 72°C 60 с), 72°C 5 мин	0.283 – wt
	LTa-R1	GCCGCAGGGACTAGCAG		0.383 – floxed
<i>Lta</i> KO	LTa-F1	GCGGCAGGCATGTCAAG		0.643 – KO
	LTa-R2	CTCCCAAGTGAGTTTTCCACG		
<i>Rorc</i> (<i>γt</i>)- Cre ^{Tg}	Primer 3	CCCCCTGCCAGAAACACT		1.0 – ROR ^{γt} Cre Tg
	Primer 120	TCTCTGACCAGAGTCATCCTTAGC		
<i>Cd19</i> - <i>Cre</i>	CD19.8	AATGTTGTGCTGCCATGCCTC		0.4 – CD19 Cre knock-in 0.5 – wt
	CD19.9	GTCTGAAGCATTCACCGGAA		
	Lck2	AATGTTGCTGGATAGTTTTTACTGC		
<i>Cd4</i> - Cre ^{Tg}	CD4-Cre1	ATCAAGGTCCTGAGGAAGAG	95°C 3 мин, 35 x (95°C 40 с, 60°C 45 с, 72°C 60 с), 72°C 5 мин	0.240 – CD4 Cre Tg 0.330 – wt
	CD4-Cre2	ACCTCATCACTCGTTGCATC		
	CD4-Cre3	CTAGGAGTTGTGCTGCACAG		

Индукция ЕАЕ

Индукцию экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЕАЕ) проводили путем подкожной иммунизации мыши 100 мкг пептида MOG₃₅₋₅₅ (AnaSpec) или 100 мкг рекомбинантного человеческого белка MOG₁₋₁₂₅ (rhMOG₁₋₁₂₅, любезно предоставлен А.А. Белогуровым, ИБХ РАН) в полном адьюванте Фрейнда (Sigma) с добавлением 5 мг/мл *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (BD Difco).

Приготовление эмульсии MOG₃₅₋₅₅ с полным адьювантом Фрейна проводили на ультразвуковом гомогенизаторе Bandelin SONOPULS HD 2070 с зондом MS72. Для гомогенизации использовали следующие параметры: время гомогенизации – 8 секунд, колебания (пульсации) – 60%, амплитуда – 80%. Суспензию хранили на льду и не допускали нагревания. Гомогенизацию проводили по всему объему суспензии, общее количество циклов гомогенизации составляло 12. Далее проводили механическую гомогенизацию в течение 5 циклов длительностью 8 секунд каждый на приборе ИКА T10 basic ULTRA-TURRAX.

Для приготовления суспензии с полноразмерным рекомбинантными MOG-белком rhMOG₁₋₁₂₅ и полный адъювант Фрейнда тщательно эмульгировали с помощью системы спаренных шприцев, соединенных трехходовым инфузионным краном (Braun).

Для повышения проницаемости гематоэнцефалического барьера мышам внутрибрюшинно вводили 200 нг коклюшного токсина (Pertussis toxin, Sigma) в день иммунизации и через 2 дня после иммунизации MOG₃₅₋₅₅-пептидом или белком rhMOG₁₋₁₂₅. Оценку клинических симптомов заболевания проводили по стандартной шкале: 0 – отсутствие признаков ЕАЕ, 0.5 – потеря тонуса хвоста в дистальной части, 1 – полная потеря тонуса хвоста, 1.5 – полная потеря тонуса хвоста и нарушение рефлекса переворачивания, 2 – полное нарушение рефлекса переворачивания, 2.5 – частичный двусторонний паралич задних конечностей и нарушение походки, 3 – полный паралич одной задней конечности, частичный паралич другой задней конечности, 3.5 – полный двусторонний паралич задних конечностей, 4 – полный двусторонний паралич задних конечностей и частичный паралич передних конечностей, 4.5 – полный паралич передних и задних конечностей, 5 – полная потеря двигательных функций и изнуренное состояние.

Введение нейтрализующих антител мышам в модели ЕАЕ

Для фармакологической блокировки TNF или LTα *in vivo* вводили 200 мкг нейтрализующих TNF антител (клон ХТ3.11, BioXCell) или 100 мкг нейтрализующих LTα антител [113] (любезно предоставлены Jane Grogan), разведенных в PBS. Мыши получали инъекции внутрибрюшинно каждые 3 дня, начиная с 4-го дня после иммунизации MOG₃₅₋₅₅-пептидом. Контрольным мышам вводили PBS внутрибрюшинно.

Выделение клеток

Выделение клеток из лимфатических узлов и селезенки

Лимфатические узлы и селезенку механически диссоциировали и пропускали через клеточный фильтр (70 мкм). Клеточные суспензии осаждали центрифугированием (300g, 4°C, 7 минут), суспензии спленоцитов инкубировали в течение 2 минут при комнатной температуре в растворе АСК (1.5 М NH₄Cl, 100 мМ KHCO₃, 10 мМ Na₂EDTA) для лизиса эритроцитов. Далее суспензию спленоцитов отмывали центрифугированием в большом объеме PBS с добавлением 2% FBS (Gibco). Клетки все время хранили на льду в PBS с 2% FBS.

Выделение клеток из собственной пластинки тонкого кишечника

Тонкий кишечник извлекали и помещали в охлажденный PBS. Кишечник очищали от Пейеровых бляшек и жировой ткани, после чего разрезали продольно, промывали от содержимого в холодном растворе PBS и разрезали на фрагменты длиной 1 см.

Для выделения ILC3 кусочки ткани дважды инкубировали в HBSS с добавлением 10 мМ HEPES и 5 мМ EDTA при 37°C в течение 20 минут. Образцы дважды промывали, измельчали и инкубировали в HBSS с добавлением 2% FBS, 0.5 мг/мл коллагеназы D (Roche), 0.5 мг/мл ДНКазы I (Sigma Aldrich), 0.5 Ед/мл диспазы (Gibco) при 37 °С в течение 20 мин. Далее клеточные суспензии пропускали через сито с размером пор 70 мкм, после чего центрифугировали (1300g, 25°C, 20 минут, без ускорения и торможения) в градиенте Перколла 40/80 (GE Healthcare) [216].

Для выделения Т-клеток кусочки ткани дважды инкубировали в PBS с добавлением 2% FBS и 5 мМ EDTA в течение 15 минут при 37°C. Затем ткань измельчали и дважды инкубировали в среде RPMI 1640 (Capricorn Scientific), содержащей 2 мМ L-глутамин (Gibco), 100 Ед/мл пенициллина (Thermo Fisher Scientific), 100 мг/мл стрептомицина (Thermo Fisher Scientific), 1 мг/мл коллагеназы D (Roche), 1 мг/мл диспазы (Gibco) и 2% FBS при 37°C при 220 об/мин. Затем клеточные суспензии гомогенизировали с помощью шприца с иглой 1,2 × 30 мм, фильтровали через сито с размером пор 70 мкм, центрифугировали, дважды промывали в PBS с добавлением 2% FBS и лизировали в растворе АСК по вышеописанному протоколу.

Выделение иммунных клеток из ЦНС

Иммунные клетки, инфильтрировавшие в ЦНС, выделяли в соответствии с протоколом, описанным в работе [217]. Вкратце, мышей подвергали анестезии и проводили транскардиальную перфузию с использованием 0.9% раствора NaCl в течение 3-5 минут. Затем извлекали головной и спинной мозг, механически гомогенизировали их на мелкие фрагменты при помощи лезвия. Клетки осаждали центрифугированием (300g, 4°C, 7 минут), после чего проводили ферментативную диссоциацию. Для этого был использован раствор DPBS с добавлением 2 мг/мл ДНКазы I (Roche) и 5 мг/мл коллагеназы II (Gibco). Клетки инкубировали с ферментами в течение 30 минут при 37°C. Реакцию останавливали путем добавления большого объема холодного PBS с 2% FBS. Полученные суспензии клеток гомогенизировали с помощью шприца с иглой размером 18G x 1,5". Затем проводили разделение фракции иммунных клеток в градиенте плотности Перколла (GE Healthcare) 30/37/70 при центрифугировании (500g, 25°C, 40 минут, без ускорения и торможения).

Поляризация Т-клеток *in vitro*

Наивные CD4⁺ Т-клетки выделяли из селезенки и лимфатических узлов (паховых, подмышечных, плечевых) с помощью магнитной сепарации MACS с использованием набора для выделения наивных CD4⁺ Т-клеток (Miltenyi) по протоколу производителя. После этого клетки культивировали в концентрации 1×10^5 клеток/лунку в 200 мкл среды Advanced RPMI 1640 (Gibco) с добавлением 10% FCS, 2 мМ L-глутамин, 100 Ед/мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина, 1 мМ пирувата натрия, 50 мМ 2-меркаптоэтанола, 10 мМ HEPES и 1% заменимых аминокислот в течение 5 дней при 37°C, 5% CO₂ в 96-луночных планшетах с U-образным дном в трех технических повторах, которые объединяли между собой перед анализом.

Для поляризации *in vitro* клетки стимулировали в присутствии 1 мкг/мл α-CD3 (коллекция in-house DRFZ), 6 нг/мл α-CD28 (коллекция in-house DRFZ) и 10 мкг/мл α-IFN-γ (BioXCell) – поляризация в T_{H0}; или в присутствии дополнительно добавленных 2 нг/мл TGFβ (Miltenyi), 10 нг/мл IL-6 (Miltenyi), 10 нг/мл IL-23 (Miltenyi) – поляризация в T_{H17}; или в присутствии 1 мкг/мл α-CD3 (коллекция in-house DRFZ), 6 нг/мл α-CD28 (коллекция in-house DRFZ) и дополнительно добавленных 4 нг/мл IL-12 (Miltenyi), 10 нг/мл IL-2 – поляризация в T_{H1}.

Цитофлуориметрический анализ

Цитофлуориметрический анализ проводили на приборе BD FACSCanto II или BDFACSAria III (BD). Подсчет количества клеток проводили с помощью Countess Automated Cell Counter (Thermo Fisher) или путем добавления к окрашенным образцам микросфер CountBright Absolute Counting Beads (Molecular Probes) согласно протоколу производителя. Полученные данные анализировали с помощью FlowJo Software (BD). Стратегия выделения популяций представлена в Приложении (Приложение, Рисунок 19, 20).

Рестимуляция клеток для внутриклеточной детекции цитокинов

Для поликлональной рестимуляции CD4⁺ Т-клетки инкубировали в течение 4 часов при 37°C, 5% CO₂ в присутствии 50 нг/мл форбол-12-миристан-13-ацетата (ФМА) (Sigma Aldrich), 500 нг/мл иономицина (Sigma Aldrich) и 3 мкг/мл брэфельдина А (eBioscience).

Для антиген-специфичной рестимуляции CD4⁺ Т-клетки инкубировали в течение 6 часов при 37°C, 5% CO₂ в присутствии 20 мкг/мл MOG₃₅₋₅₅-пептида и 3 мкг/мл брэфельдина А. Специфичность Т-клеток к MOG₃₅₋₅₅-пептиду оценивали по экспрессии на них CD40L (CD154) и CD44.

Поверхностное окрашивание

Клеточные суспензии переносили в 96-луночный планшет с V-образным дном и осаждали центрифугированием (300g, 4°C, 7 минут) в PBS с 2% FBS. Для блокировки неспецифичного связывания антител с Fcγ-рецепторами клетки инкубировали в течение 20 минут при 4°C с антителами к CD16/CD32 (клон 2.4G2, коллекция in-house DRFZ), после чего клетки отмывали центрифугированием в PBS с 2% FBS. К клеткам добавляли эпитопспецифичные антитела к поверхностным маркерам (**Таблица 3**). Для окрашивания мертвых клеток использовали Fixable Viability Dye (eBioscience).

Сортировка клеток

Для сортировки клеток суспензии спленоцитов инкубировали с антителами к CD16/CD32 (2.4G2, коллекция in-house DRFZ) в течение 20 минут при 4°C, после чего клетки отмывали в PBS с 2% FBS и осаждали центрифугированием. К клеткам добавляли эпитопспецифичные антитела к поверхностным маркерам (**Таблица 3**). Для окрашивания мертвых клеток использовали Fixable Viability Dye (eBioscience). Популяцию CD45⁺CD4⁻CD19⁺ сортировали на приборе BD FACS Aria III Cell Sorter (BD Biosciences, США) с чистотой >90%. Затем для индукции экспрессии лимфотоксина 1×10^6 отсортированных В-клеток стимулировали 10 мкг/мл анти-CD40 (FGK45, коллекция in-house DRFZ) в течение 7 часов.

Внутриклеточное окрашивание

Для окрашивания транскрипционных факторов использовали набор FoxP3 / Transcription Factor Staining Buffer Set (ThermoFisher), для окрашивания цитокинов использовали набор BD Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences), следуя рекомендациям производителей.

Вкратце, клетки фиксировали в течение 1 часа при 4°C в растворе для фиксации и пермеабиллизации, после чего клетки отмывали центрифугированием (400g, 4°C, 7 минут) в пермеабиллизирующем буфере. Внутриклеточное окрашивание эпитопспецифичными антителами проводили в пермеабиллизирующем буфере в течение ночи при 4°C (**Таблица 3**). От избытка антител клетки отмывали в пермеабиллизирующем буфере и осаждали центрифугированием (400g, 4°C, 7 минут).

Таблица 3. Список антител, использованных для цитофлуориметрического анализа

Антиген	Клон	Производитель
Поверхностное окрашивание		
CD45	30-F11	Biologend
CD11b	M1/70	Biologend
Ly6C	HK1.4	Invitrogen
Gr-1	RB6-8C5	Invitrogen
CD11c	N418	eBioscience
MHCII	M5/114.15.2	Biologend
TCR β	H57-597	Invitrogen
CD4	RM4-5	Biologend
CD44	IM7	Biologend
CD62L	MEL-14	Biologend
CCR6	29-2L17	Biologend
B220	RA3-6B2	Biologend
CD19	6D5	Biologend
Внутриклеточное окрашивание		
CD40L	MR1	Biologend
FoxP3	FJK-16s	Invitrogen
ROR γ t	B2D	Invitrogen
GM-CSF	MP1-22E9	Biologend
IFN γ	XMG1.2	Biologend
IL-17A	eBio17B7	Invitrogen

Мультиплексный анализ цитокинов

Многопараметрический анализ цитокинов проводили в клеточных супернатантах и в образцах сыворотки крови. Сбор крови проводили из щеки мыши в пробирки Greiner Bio-One Mini Collect Z Serum Sep, инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут, после чего образцы центрифугировали при 3000g, 25°C, 30 минут и отбирали супернатант.

Для определения концентрации цитокинов и хемокинов использовали наборы Mouse T_H17 Magnetic Bead Panel (#MTH17MAG-47K, Merck) и MILLIPLEX MAP Mouse Cytokine/Chemokine

Magnetic Bead Panel (#МСУТМАG-70К-РХ32, Merck) в соответствии с рекомендациями производителя. Вкратце, в 96-луночные планшеты добавляли стандарты с известными концентрациями и образцы, после чего к ним добавляли буфер для разведения и смесь магнитных микросфер, покрытых антителами к одному виду анализата. К образцам сывороток также добавляли смесь белков сыворотки (Serum Matrix), после чего планшеты инкубировали в течение ночи при 4°C и постоянном перемешивании на орбитальном шейкере.

Микросферы отмывали с помощью специального буфера на магнитной подложке, после чего проводили инкубацию со вторичными антителами, конъюгированными с биотином, в течение 1 часа при комнатной температуре и постоянном перемешивании. Далее добавляли стрептавидин, конъюгированный с фикоэритрином, инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре и постоянном перемешивании и отмывали от микросфер на магнитной подложке. Анализ проводили на приборе MAGPIX (Luminex), концентрации анализатов определяли по интенсивности флуоресценции фикоэритрина на каждом типе микросфер. Полученные данные анализировали с помощью MILLIPLEX Analyst Software (Merck).

Выделение РНК

Выделение РНК проводили с помощью TRIzol Reagent (Sigma) по протоколу производителя. Измельченные фрагменты ЦНС или клеточные осадки растворяли в 1 мл TRIzol Reagent и хранили при -80°C. Далее в случае с ЦНС проводили гомогенизацию образцов с помощью двух шприцев объемом 2 мл, после чего образцы центрифугировали при 12000g, 4°C, 10 минут для избавления от липидов, супернатант переносили в чистую пробирку. Остальные этапы были идентичны для ЦНС и клеточных осадков. Так, образцы инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут для полной диссоциации нуклеопротеиновых комплексов. Затем в соотношении 1:10 добавляли 1-бromo-3-хлоропропан (Sigma) для разделения фаз, интенсивно перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут. Далее образцы центрифугировали при 12000g, 4°C, в течение 20 минут и отбирали в чистую пробирку водную фазу, содержащую РНК. Затем к полученной водной фазе добавляли 4 мкг очищенного от РНКаз гликогена (Thermo Fisher), ледяной изопропанол (Sigma) в соотношении 1:1 и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут. Образцы центрифугировали при 12000g, 4°C, 15 минут, супернатант отбирали, осадок отмывали центрифугированием в 1 мл 75% этанола. Далее отбирали супернатант, образовавшийся осадок высушивали и растворяли в воде, обработанной диэтилпирикарбонатом. Концентрацию РНК измеряли с помощью спектрофотометра NanoPhotometer N50 Touch (IMPLEN).

Обратная транскрипция

На первом этапе проводили удаление геномной ДНК из образцов РНК. Для этого 1 мкг РНК обрабатывали ДНКазой I (Thermo Fisher), растворенной в 10-кратном реакционном буфере с добавлением MgCl₂ (Thermo Fisher), при 37°C в течение 30 минут. Для остановки реакции добавляли 1 мкл 50 мМ ЭДТА (Thermo Fisher) и инкубировали при 65°C в течение 10 минут. Для синтеза первой цепи кДНК использовали 1 мкг РНК, синтез проводили с Oligo (dT)₁₈ праймерами и обратной транскриптазой RevertAid M-MuLV по стандартному протоколу производителя (Thermo Fisher).

Количественная ПЦР в реальном времени

Реакцию количественной ПЦР в реальном времени проводили в объеме 20 мкл с добавлением 5X реакционной смеси qPCRMix-HS SYBR+LowROX (Евроген). Праймеры подбирали по критерию отжига на стыке экзонов, разницы между температурами отжига не более 2°C с помощью сервиса PrimerBlast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Праймеры были синтезированы компаниями “Синтол” и “Евроген” (Таблица 4). Работу проводили на приборе 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Использовали следующий протокол: предварительная денатурация при 95°C в течение 10 минут, 40 циклов – денатурация при 95°C в течение 15 с, отжиг при 61°C в течение 30 с и элонгация при 72°C в течение 20 с. В качестве референсного гена использовали β-актин. Анализ относительного уровня экспрессии проводили с помощью метода 2^{-ΔΔCt} [218].

Таблица 4. Нуклеотидные последовательности использованных в работе праймеров

Ген	Прямой праймер (5'-3')	Обратный праймер (5'-3')
<i>Actb</i>	CTCCTGAGCGCAAGTACTCTGTG	TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCC
<i>Ccl19</i>	GGGGTGCTAATGATGCGGAA	GTTGCCTTTGTTCTTGGCAGA
<i>Ccl21</i>	CCGGCAATCCTGTTCTCACC	ATGGTTGAAGCAGGGCAAGG
<i>Cxcl13</i>	CAGGCCACGGTATTCTGGAAG	TCACTGGAGCTTGGGGAGTT
<i>Icam1</i>	AGTGGGTTCGAAGGTGGTTCT	TCCAGCCGAGGACCATACAG
<i>Il6</i>	GTTCTCTGGGAAATCGTGGA	TGTA CTCCAGGTAGCTATGG
<i>Il23a</i>	CGGGACATATGAATCTACTAAGAG	GTTGTCCTTGAGTCCTTGTG
<i>Lta</i>	ATGGCATCCTGAAACCTGCTGC	GGGAGTTGTTGCTCAAAGAGAAGC
<i>Vcam1</i>	GACAGCCCACTAAACGCGAA	TCCTTGGGGAAAGAGTAGAT

Гистологический анализ

Для анализа уровня демиелинизации образцы спинного мозга выделяли на пике ЕАЕ: проводили транскардиальную перфузию мышей с помощью PBS и 10% забуференного нейтрального формалина (NBF, BioVitrum), после чего извлекали позвоночник и фиксировали в течение ночи в 10% NBF при комнатной температуре. После фиксации ткани отмывали большим объемом PBS (4 раза × 1 час каждый) для полного удаления 10% NBF. Обезвоживание образцов спинного мозга проводили путем инкубации в 70% спирте в течение ночи, после чего извлекали спинной мозг из позвоночника и проводили его разделение на отделы (шейный, грудной, поясничный). Обезвоживание образцов продолжали путем инкубации в 96% спирте в течение 2 часов, после чего переносили образцы в изопропанол (Acros Organics) (2 раза × 30 минут, 1 раз × 1.5 часа). Далее образцы инкубировали в ксилоле (Acros Organics) (2 раза × 1 час) с последующей постепенной пропиткой ткани парафином (Paraplast, Leica) (2 раза × 2-3 часа). Изготовление парафиновых блоков проводили на станции для заливки блоков в парафин EG 1150 (Leica). Пропитанные парафином образцы спинного мозга помещали в самодельные формы и заливали расплавленным парафином. Срезы толщиной 5 мкм изготавливали на микротоме CUT 4055 (Slee Mainz) и помещали в каплю воды на предметные стекла (BioVitrum). Депарафинизацию срезов проводили путем инкубации в ксилоле (2 раза × 3 минуты), после чего срезы инкубировали в течение 3 минут в этаноле убывающей концентрации (96%, 80%, 70%) и помещали в дистиллированную воду на 3 минуты. Затем срезы инкубировали в растворе Luxol fast blue (LFB, предоставлен Marco Prinz) в течение ночи при 60°C, после чего дифференцировали окрашивание промывкой в 96% этаноле, дистиллированной воде (2 минуты), 0.05% растворе карбоната лития (30 секунд), 70% этаноле (30 секунд) и дистиллированной воде (1 минута). Повторяли этап дифференцирования до тех пор, пока серое и белое вещество не становились различимыми. Далее проводили инкубацию с 0.5% иодной кислотой (Sigma) в течение 5 минут при комнатной температуре, после чего срезы промывали в дистиллированной воде и инкубировали в реагенте Шиффа (Sigma) в течение 15 минут при комнатной температуре. Далее промывали под проточной водой в течение 5 минут, инкубировали в гематоксилине в течение 90 секунд, после чего срезы промывали под проточной водой. Дегидратацию срезов проводили в течение 2 минут в этаноле возрастающей концентрации (70%, 80%, 96%), в течение 30 секунд в изопропанол и дважды в течение 1 минуты в ксилоле. Накрывали покровным стеклом, предварительно добавив Diamount Mounting Media Xylol Free (DiaPath). Изображения были получены с помощью микроскопа Leica DM4000 B LED и обработаны в программе ImageJ.

Образцы паховых лимфатических узлов быстро замораживали на сухом льду или в предварительно охлажденном 2-метилбутане (Sigma). Заливку проводили с помощью Frozen Section Compound (Leica). Срезы изготавливали на криотоме CM3050 S (Leica) и помещали на предметные стекла с адгезивным покрытием (BioVitrum). Срезы высушивали и фиксировали в ацетоне при -20°C . Для иммуногистохимического анализа использовали криосрезы толщиной 7 мкм. Перед окрашиванием срезы обводили водонепроницаемым маркером, чтобы уменьшить объем наносимых антител. Все инкубации проводили в самодельной влажной камере для предотвращения высыхания срезов. Блокировку неспецифического связывания проводили путем инкубации срезов в Roti-ImmunoBlock (ROTH Art.T144.1), растворенном в соотношении 1:10 в TBS с добавлением 0.1% Tween-20 (TBST) и 2% BSA. Срезы инкубировали при комнатной температуре в течение 40 минут в водной камере, затем отмывали TBST+2%BSA. Образцы инкубировали со следующими антителами в TBST+2%BSA в течение ночи при 4°C : anti-CD3-FITC (145-2C11, BD), anti-B220-APC (RA3-6B2, Biolegend). Далее отмывали 3 раза в TBST в течение 5 минут при комнатной температуре, добавляли FluoromountG, содержащий DAPI (Invitrogen), накрывали покровными стеклами и сушили в течение ночи при 4°C в темноте. Изображения были получены с использованием микроскопа Leica DM4000 B LED и обработаны в программе ImageJ.

Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили с помощью GraphPad Prism 9. Выборки проверяли на нормальность распределения с помощью критериев Шапиро-Уилка или Колмогорова-Смирнова. В случае нормального распределения, для сравнения выборок использовали t-критерий Стьюдента или one-way ANOVA. В противном случае использовали непараметрические тесты Манна-Уитни или Крускала-Уоллиса. Различия считали достоверными при $p < 0.05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Исследование эффектов полного генетического удаления лимфотоксина α на гомеостаз иммунной системы

Исследование физиологических и нейроиммунных функций лимфотоксина α было начато с относительно недавно описанных для них функций – поддержания гомеостаза кишечника и участия в дифференцировке миелоидных клеток. Для четкого разграничения функций лимфотоксина α и TNF использовали *Lta*-дефицитных мышей без кассеты, ответственной за резистентность к неомицину (*neo*-кассеты) (*Lta* ^{$\Delta\Delta$}) [28] (Рисунок 4А). 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* [28]. Кроме этого, в инфекционной модели *Lta* ^{$\Delta\Delta$} мыши без *neo*-кассеты были менее восприимчивы к заражению *Mycobacterium tuberculosis* по сравнению с мышами с конвенциональным удалением *Lta* и мышами с удалением *Tnf* [199]. Дополнительным контролем для разграничения функций лимфотоксинов и TNF служили мыши, дефицитные по *Tnf* (*Tnf* ^{$\Delta\Delta$}) [39] и мыши с удалением TNFR1 (*Tnfrsf1a* ^{$-/-$} , далее *Tnfr1* ^{$-/-$}) [45].

Поскольку основным клеточным источником лимфотоксинов, участвующим как в образовании лимфоидных органов, так и в регуляции иммунитета слизистых являются ROR γ ⁺ ILC3 (Глава 2), было проанализировано содержание ILC3 в собственной пластинке тонкого кишечника с помощью цитофлуориметрического анализа (Приложение, Рисунок 19). Оказалось, что у *Lta* ^{$\Delta\Delta$} мышей повышено процентное содержание ROR γ ⁺ ILC3 в тонком кишечнике (Рисунок 4Б), что дает основание предположить, что отсутствие ПБ у таких мышей не связано с уменьшением количества ILC3, в том числе клеток-индукторов. При этом такой же фенотип наблюдался у мышей с удалением TNF и TNFR1 (Рисунок 4Б), что позволяет заключить, что TNF и лимфотоксин α , помимо ключевой роли в формировании ПБ, необходимы и для поддержания гомеостаза ILC3 в тонком кишечнике взрослого организма.

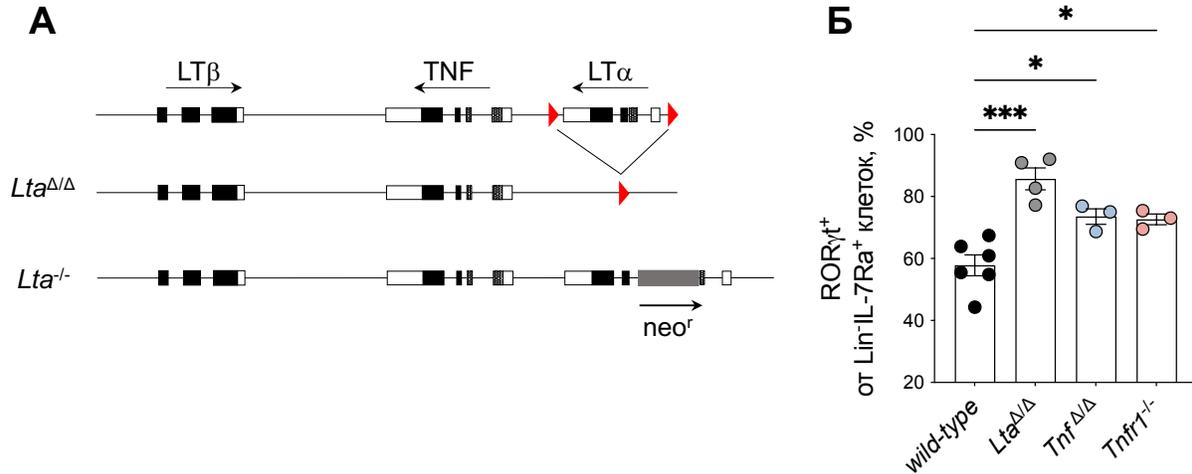


Рисунок 4. Лимфотоксин α важен для поддержания гомеостаза ILC3 в тонком кишечнике. (А) Сравнение различных способов генетического таргетирования LTα. Сверху – схема локуса дикого типа, в центре – получение мышей без *neo*-кассеты (*Lta*^{Δ/Δ}), снизу – получение мышей с конвенциональным удалением *Lta*, у которых сохраняется *neo*-кассета (*Lta*^{-/-}). (Б) Процентное содержание RORγ^{t+} ILC3 клеток, выделенных как VD-CD45⁺Lin⁻IL-7Rα⁺ среди клеток собственной пластинки тонкого кишечника. Каждый символ соответствует индивидуальной мыши, результаты представлены как среднее значение ± SEM и подтверждены в 3 независимых экспериментах. **P* < 0.05, *** *P* < 0.001, one-way ANOVA.

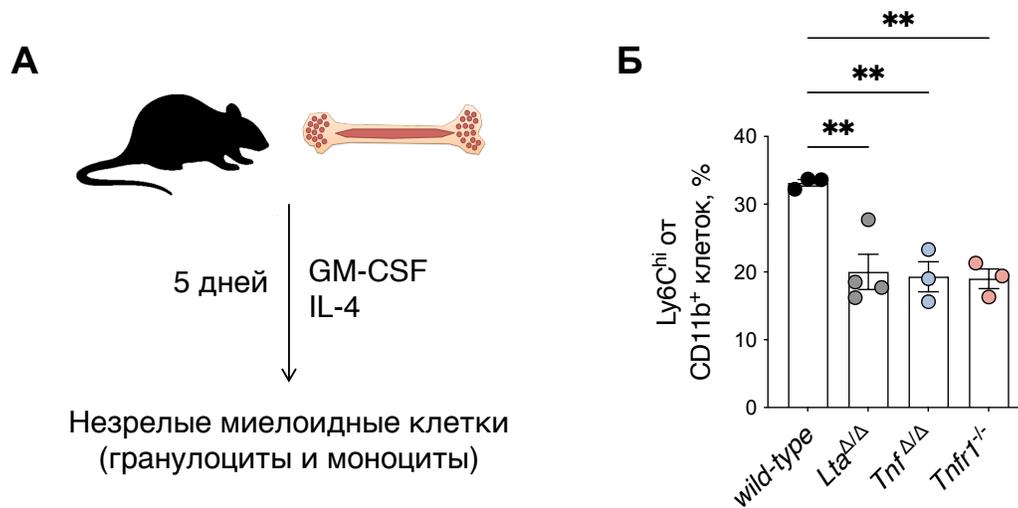


Рисунок 5. Удаление лимфотоксина α и TNF влияет на дифференцировку незрелых миелоидных клеток *in vitro*. (А) Схема эксперимента: клетки костного мозга, выделенные из мышей дикого типа (wild-type) или с удалением *Lta*, *Tnf* или *Tnfr1* культивировали в течение 5 дней в присутствии GM-CSF и IL-4. На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

Поскольку в последнее время появилось много данных о роли лимфотоксина (в основном memLT) в дифференцировке миелоидных клеток в различных иммунных компартментах, было решено оценить развитие незрелых миелоидных клеток в культурах костного мозга *in vitro* (Рисунок 5А). Было выявлено, что генетическое удаление *Lta*, *Tnf* или *Tnfr1* приводит к уменьшению дифференцировки миелоидных клеток в Ly6C^{hi} моноциты (Рисунок 5Б). Эти результаты согласуются с ранее полученными данными об уменьшении количества миеломонобластов в культурах костного мозга, полученных из мышей с дефицитом *Tnf* или *Lta* [219]. Предположительно, такой фенотип может наблюдаться за счет ключевой роли сигнального пути, опосредованного TNFR1, в выживании моноцитов [89].

Таким образом, лимфотоксин α , предположительно, за счет связывания с TNFR1, необходим для поддержания гомеостаза ILC3 в тонком кишечнике, а также может участвовать в дифференцировке миелоидных клеток в моноциты.

3.2. У $Lta^{\Delta/\Delta}$ мышей в норме преобладает дифференцировка Т-клеток в T_H17

Физиологические отличия в уровне продукции TNF в мышцах с конвенциональным удалением *Lta* по сравнению с $Lta^{\Delta/\Delta}$ мышами без *neo*-кассеты указывали на то, что полученные ранее данные о роли лимфотоксинов в различных экспериментальных моделях заболеваний на мышцах могли быть ошибочно интерпретированы. В качестве экспериментальной модели, в контексте которой можно изучать функции лимфотоксинов, была выбрана модель MOG₃₅₋₅₅-индуцированного ЕАЕ. Во-первых, имеются клинические наблюдения о роли LT α в патогенезе РС и ЕАЕ (Глава 1, пункт 3.5), во-вторых, ранее было показано, что при подкожной иммунизации вне зависимости от наличия лимфатических узлов (что критически важно учитывать при экспериментах на мышцах с инактивацией сигнальных путей, опосредуемых лимфотоксином) будет происходить эффективный Т-клеточнозависимый ответ, характерный для MOG₃₅₋₅₅-индуцированного ЕАЕ [208]. Перед началом работы с этой моделью было решено оценить, насколько эффективно у $Lta^{\Delta/\Delta}$ мышей развиваются T_H17 -клетки в норме, несмотря на отсутствие лимфатических узлов. В связи с этим были проведены эксперименты по поляризации Т-клеток *in vitro* (Приложение, Рисунок 20Д) с оценкой содержания критически важных в развитии ЕАЕ популяций T_H17 и T_{reg} в селезенке и в собственной пластинке тонкого кишечника у $Lta^{\Delta/\Delta}$ мышей в норме.

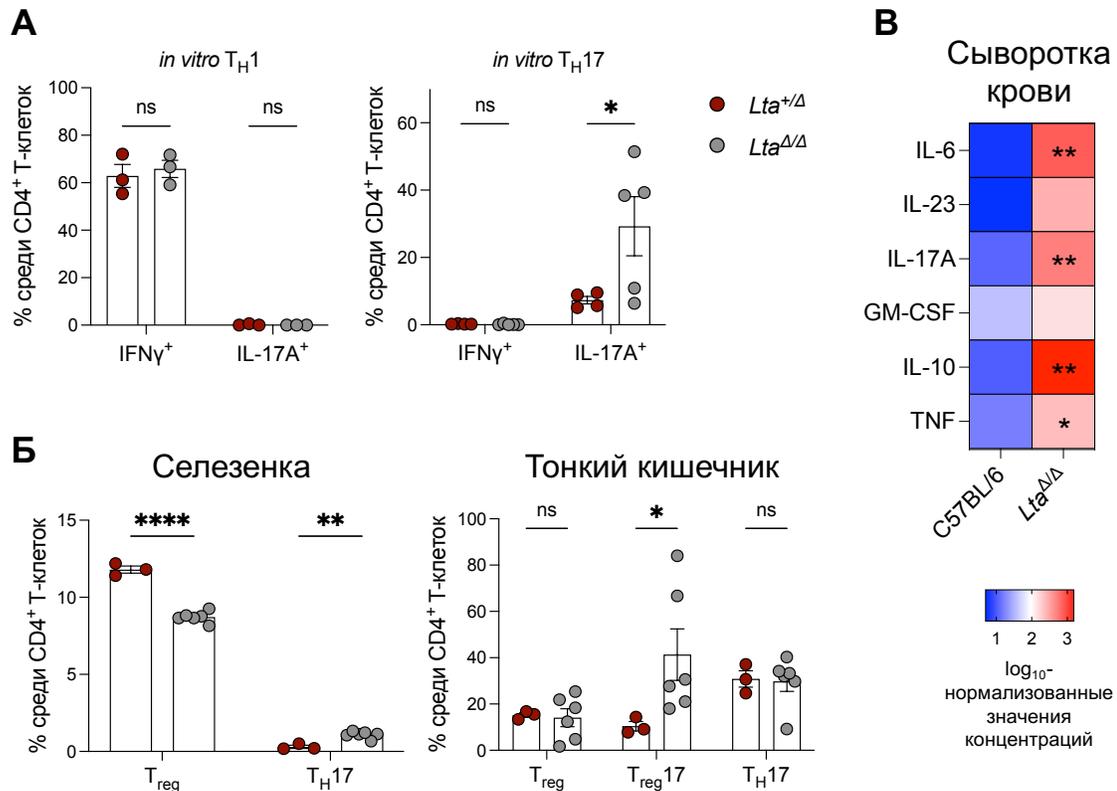


Рисунок 6. Анализ развития T_{H17}-клеток у *Lta* ^{Δ / Δ} мышей в норме. (А) Процентное содержание IFN γ ⁺ и IL-17A⁺ Т-клеток, дифференцированных из обогащенных CD4⁺ Т-клеток *in vitro* в течение 5 дней в присутствии α -CD3, α -CD28, IL-12, IL-2 (*in vitro* T_{H1}) или в присутствии α -CD3, α -CD28, α -IFN γ , TGF β , IL-6, IL-23 (*in vitro* T_{H17}) и рестимулированных ФМА/иономицином. **(Б)** Процентное содержание T_{reg} и T_{H17} в селезенке и собственной пластинке тонкого кишечника *Lta*^{+/ Δ} (литтермейт-контроль) и *Lta* ^{Δ / Δ} мышей. **(В)** Тепловая карта, изображающая log₁₀-нормализованные значения концентраций цитокинов в сыворотке мышей дикого типа (C57BL/6) и *Lta* ^{Δ / Δ} мышей в норме. Результаты представлены как среднее значение \pm SEM и подтверждены в 2 независимых экспериментах. Каждый символ на графике соответствует индивидуальной мыши. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, *****P* < 0.0001, ns – недостоверные отличия, t-критерий Стьюдента.

Оказалось, что Т-клетки, выделенные из селезенки *Lta* ^{Δ / Δ} мышей, могут дифференцироваться как в T_{H1}, так и в T_{H17} субпопуляции (Рисунок 6А). Более того, такие Т-клетки даже более склонны к дифференцировке в T_{H17} (Рисунок 6А), что подтверждается повышением их процентного содержания в селезенке и собственной пластинке тонкого кишечника (Рисунок 6Б). В дополнение к этому, было обнаружено повышение концентраций T_{H17}-ассоциированных цитокинов, IL-6 и IL-17A, в сыворотке крови *Lta* ^{Δ / Δ} мышей (Рисунок 6В). В то же время в тонком кишечнике было увеличено содержание популяции ROR γ ⁺FoxP3⁺ T_{reg17} (Рисунок 6Б), обладающих более сильной супрессорной активностью по сравнению с классическими FoxP3⁺ T_{reg} [220], что может говорить о регуляции активного эффекторного ответа. Подтверждением этой

гипотезы является повышение продукции противовоспалительного цитокина IL-10 в сыворотке крови *Lta*^{ΔΔ} мышей в норме (Рисунок 6В).

Таким образом, в организме *Lta*^{ΔΔ} мышей преобладающим типом Т_H-клеток являются Т_H17, что может быть связано с отсутствием лимфатических узлов. Однако не исключено, что у таких мышей формируется адаптация, связанная с подавлением активного эффекторного ответа с помощью Т_{reg}17 в тонком кишечнике и IL-10 на системном уровне.

3.3. Генетическая и фармакологическая нейтрализация лимфотоксина α не приводит к усугублению симптомов ЕАЕ

На первом этапе для исследования функций молекулярных форм лимфотоксина α были проведены эксперименты на мышах с полным удалением *Lta* (то есть с полным удалением LTα, входящим в состав как растворимого LTα, так и мемLT) и интактной экспрессией TNF (*Lta*^{ΔΔ} мыши). Для этого мышей подвергали MOG₃₅₋₅₅-индуцированному ЕАЕ по схеме, представленной на Рисунке 7. Было обнаружено, что *Lta*^{ΔΔ} мыши восприимчивы к ЕАЕ и развивали заболевание, схожее по динамике с заболеванием мышей дикого типа (Рисунок 8А), что прямо противоречило имеющимся в литературе данным об абсолютной резистентности мышей с удалением *Lta* [198], но подтверждало результаты о нормальном развитии ЕАЕ у *Lta*-дефицитных мышей с нормальной продукцией TNF [200].

Иммунная система *Lta*-дефицитных мышей характеризуется отсутствием лимфатических узлов и, как было показано, в норме преобладающим Т_H17-эффекторным ответом (Рисунок 6). В связи с этим для валидации полученных результатов динамику развития ЕАЕ, наблюдаемую у *Lta*-дефицитных мышей, сравнивали с таковой в экспериментах с фармакологической блокировкой LTα, которые блокируют как мембраносвязанную, так и растворимую формы лимфотоксина. Для этого мышам дикого типа (C57BL/6) вводили нейтрализующие антитела к LTα [113] каждые 3 дня, начиная с 4-го дня после индукции ЕАЕ. Параллельно, для определения TNF-подобной активности лимфотоксина α другой экспериментальной группе вводили антитела к TNF, контрольные мыши получали инъекции PBS. Было обнаружено, что при фармакологической блокировке LTα мыши развивали заболевание, схожее по симптоматике с мышами дикого типа (Рисунок 8Б), что совпадало с результатами, полученными на мышах с генетическим удалением *Lta*. В то же время при фармакологической блокировке TNF мыши демонстрировали отложенное начало и более тяжелое течение заболевания (Рисунок 8Б), что согласуется с имеющимися в литературе данными

[221, 222], однако говорит о том, что в контексте ЕАЕ, предположительно, не реализуется TNF-подобная функция LT α .

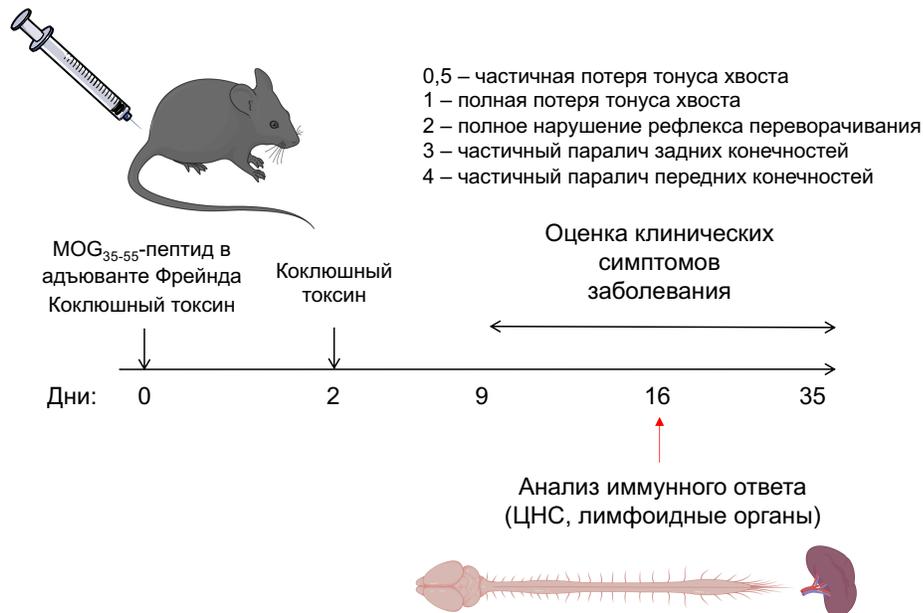


Рисунок 7. Схема индукции экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЕАЕ). Мышам подкожно вводили 100 мкг MOG₃₅₋₅₅-пептида в полном адьюванте Фрейнда и внутривентриально вводили 200 нг коклюшного токсина в тот же день и на второй день после иммунизации. Оценка клинических симптомов проводили ежедневно, начиная с 9-го дня после иммунизации по указанной шкале. Анализ иммунного ответа в ЦНС и в периферических лимфоидных органах проводили на эффекторной фазе ЕАЕ, на 15-16 день после иммунизации.

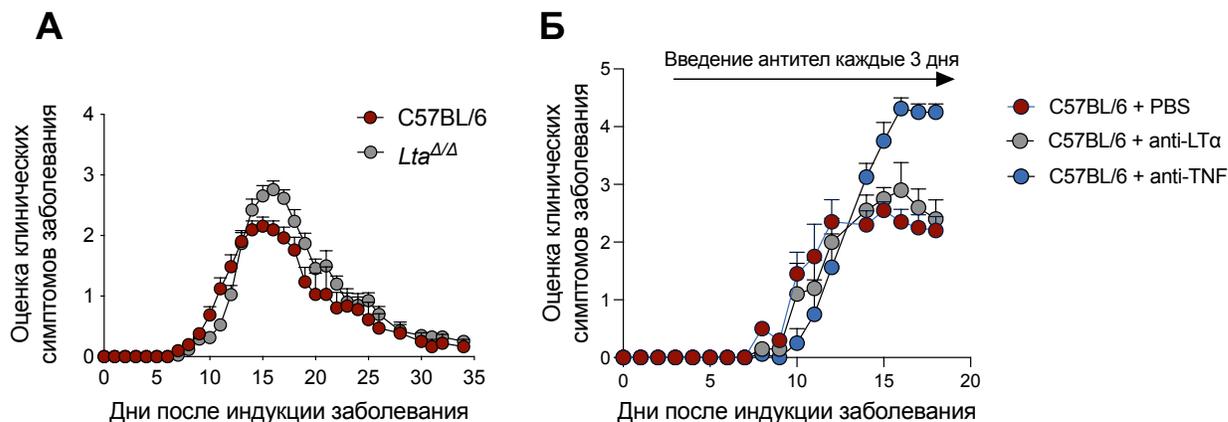


Рисунок 8. Генетическая или фармакологическая нейтрализация лимфотоксина α не приводит к ухудшению симптомов ЕАЕ. (А) Развитие клинических симптомов ЕАЕ у мышей дикого типа (C57BL/6) и мышей с удалением *Lta*. Результаты представлены как среднее значение \pm SEM и подтверждены в 7 независимых экспериментах. (Б) Динамика развития клинических симптомов ЕАЕ у мышей дикого типа на фоне нейтрализации LT α или TNF с введением PBS в качестве контроля. Антитела вводили каждые 3 дня, начиная с 4-го дня после иммунизации MOG₃₅₋₅₅-пептидом. Результаты представлены как среднее значение \pm SEM и подтверждены в 2 независимых экспериментах.

3.4. Мыши с удалением *Lta* в ILC3 или в Т-клетках развивают различные по динамике развития симптома ЕАЕ

На следующем этапе работы изучали роль основных клеточных источников лимфотоксинов, а именно ILC3 и Т-клеток, в патогенезе ЕАЕ, поскольку для ILC3 [174] и Т-клеток [113] показан высокий уровень экспрессии *Lta* в модели ЕАЕ. Для этого проводили иммунизацию MOG₃₅₋₅₅-пептидом в полном адьюванте Фрейнда ранее полученных мышей с тканеспецифичной инактивацией *Lta* в RORγt⁺ ILC3 и Т-клетках (*Lta*^{ILC3,T}) или только Т-клетках (*Lta*^{ΔT}), в качестве контрольных мышей использовали *Lta*^{flx/flx} мышей [29]. Кроме этого, в качестве дополнительного контроля использовали мышей с полным удалением лимфотоксина (*Lta*^{ΔΔ}). Было обнаружено, что у *Lta*^{ILC3,T} мышей происходит увеличение как максимальной оценки заболевания (Рисунок 9Б), так и общей тяжести заболевания по сравнению с *Lta*^{flx/flx} и *Lta*^{ΔT} мышами (Рисунок 9В).

При этом мыши с инактивацией *Lta* только в Т-клетках демонстрировали умеренную тяжесть заболевания (Рисунок 9Б) и относительно легкое течение ЕАЕ (Рисунок 9В). Таким образом, молекулярные формы лимфотоксина α, продуцируемые ILC3, выполняют протективную функцию в модели ЕАЕ, тогда как молекулярные формы лимфотоксина α из Т-клеток играют патогенетическую роль.

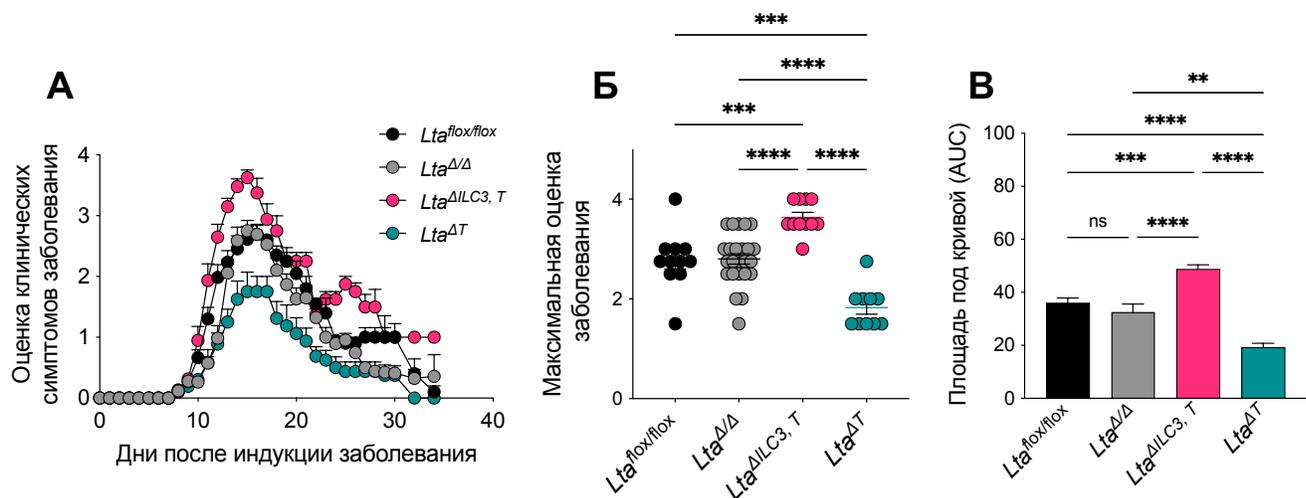


Рисунок 9. У *Lta*^{ILC3,T} и *Lta*^{ΔT} мышей наблюдается различное течение ЕАЕ. (А) Развитие клинических симптомов ЕАЕ у мышей дикого типа (*Lta*^{flx/flx}) (n=15), мышей с полным удалением *Lta* (*Lta*^{ΔΔ}) (n=17), мышей с удалением *Lta* в ILC3 и Т-клетках (*Lta*^{ILC3,T}) (n=15) и с удалением *Lta* только в Т-клетках (*Lta*^{ΔT}) (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.

3.5. У мышей с удалением *Lta* в ILC3 клетках на пике ЕАЕ 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 у мышей как с полным, так и с ILC3-специфичным удалением *Lta* наблюдалось повышенное накопление в ЦНС $Ly6C^{hi}CD11c^{+}MHCII^{+}$ моДК, играющих патогенетическую роль в модели ЕАЕ [183] (Рисунок 10А). При этом в норме в организме *Lta*^{ΔILC3,T} мышей не происходило увеличения содержания $Ly6C^{hi}$ моноцитов (Рисунок 11), то есть накопление моноцитов происходило только в контексте заболевания.

Известно, что для приобретения моноцитами зрелого воспалительного фенотипа моДК необходим $IFN\gamma$, тогда как GM-CSF необходим для выполнения ими эффекторных функций [176]. В соответствии с этим именно у *Lta*^{ΔILC3,T}, но не у *Lta*^{ΔΔ} мышей происходило накопление $IFN\gamma$ - и GM-CSF-продуцирующих Т-клеток в ЦНС (Рисунок 10Б, В). Для проверки функциональной активности моДК [223] 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 10Г). 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 10Б), не наблюдалось ни увеличения инфильтрации $IFN\gamma^{+}$ и $GM-CSF^{+}$ Т_H-клеток, ни очагов демиелинизации, что может говорить об отсутствии созревания моДК и объяснять симптоматику ЕАЕ (Рисунок 11).

Ранее предполагалось, что лимфотоксины, а именно лимфотоксин β выполняет патогенетическую функцию в развитии аутоиммунных заболеваний за счет участия в формировании ТЛО. В модели ЕАЕ развитие ТЛО в основном изучают в моделях с адоптивным переносом Т-клеток, однако было показано, что ТЛО формируются и в модели активного ЕАЕ, индуцированного MOG₃₅₋₅₅-пептидом [213]. В связи с этим было решено оценить уровень экспрессии молекул, ассоциированных с образованием ТЛО, в ЦНС *Lta*^{ΔILC3,T} мышей на пике развития ЕАЕ. Анализ не выявил различий в уровне экспрессии генов, кодирующих молекулы адгезии (ICAM-1, VCAM-1) и хемокины (CXCL13, CCL19, CCL21), ассоциированные с образованием ТЛО, что позволяет нам предположить, что у *Lta*^{ΔILC3,T} мышей происходит нормальное формирование ТЛО (Рисунок 12).

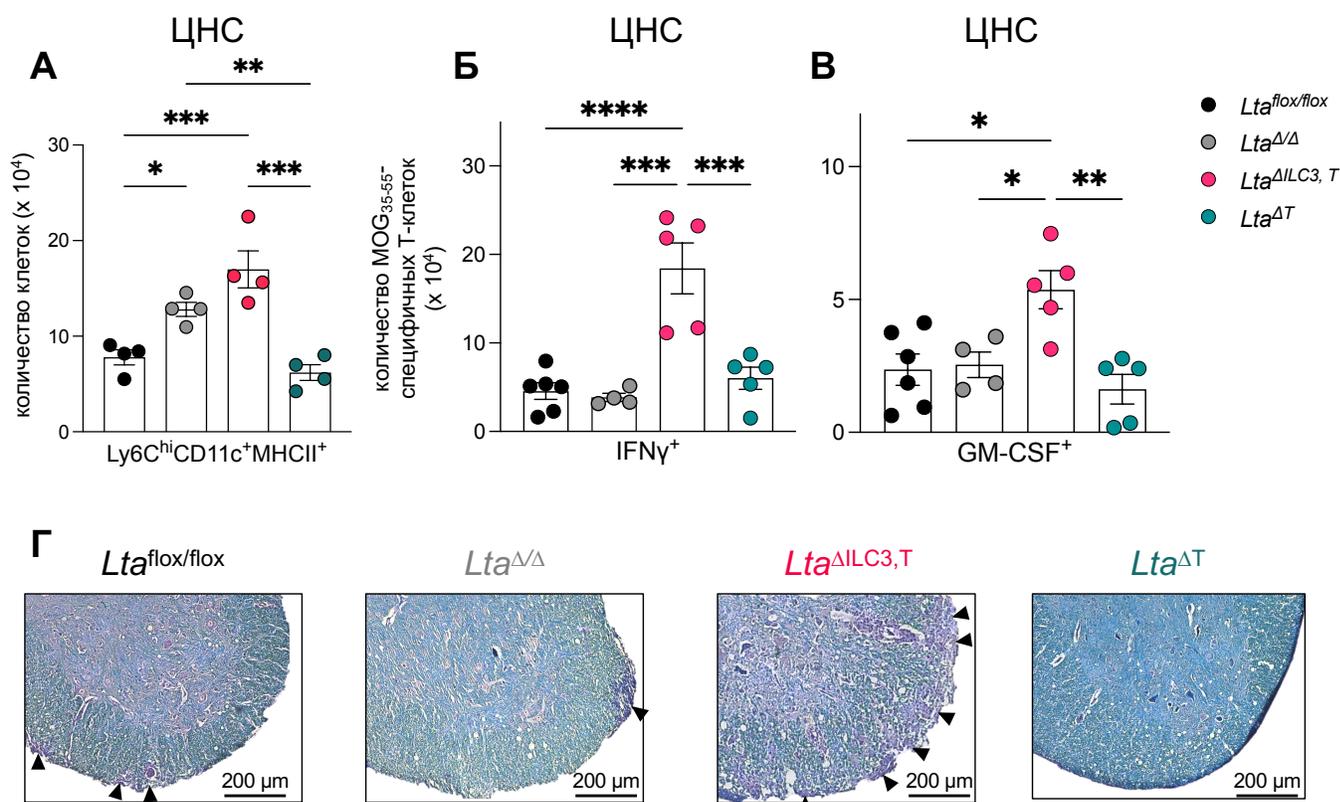


Рисунок 10. У мышей с удалением *Lta* в ILC3 клетках происходит накопление моДК в ЦНС на пике ЕАЕ, предположительно, IFN γ - и GM-CSF-опосредованным путем. (А) Количество моДК в ЦНС на пике клинических симптомов ЕАЕ. (Б) Количество IFN γ ⁺ и (В) GM-CSF⁺ CD4⁺ Т-клеток, рестимулированных MOG₃₅₋₅₅, в ЦНС на 16 день после иммунизации. (Г) Репрезентативные фотографии гистологического окрашивания LFB/PAS срезов спинного мозга мышей дикого типа (*Lta*^{flox/flox}), с полным удалением *Lta* (*Lta*^{Δ/Δ}), удалением *Lta* в ILC3 и Т-клетках (*Lta*^{ΔILC3, T}) и удалением *Lta* только в Т-клетках (*Lta*^{ΔT}), выделенных на пике ЕАЕ. Увеличение 10X, масштаб – 200 мкм, стрелки указывают на очаги демиелинизации (окрашены фиолетовым). Результаты представлены как среднее значение ± 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.

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

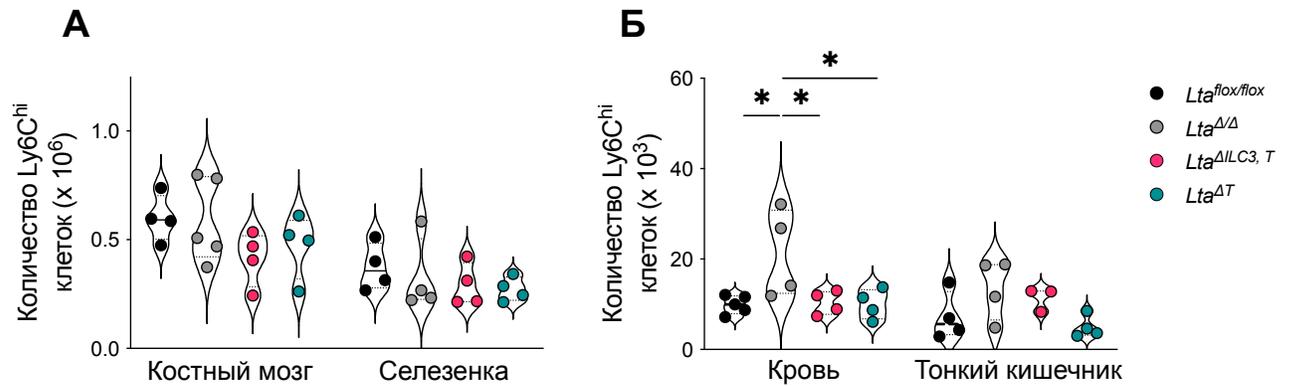


Рисунок 11. У *Lta*^{ΔILC3, T} мышей в норме не повышается количество Ly6C^{hi} моноцитов. Абсолютное количество CD11b⁺Ly6C^{hi}Ly6G⁻ моноцитов в (А) костном мозге и селезенке, (Б) крови и собственной пластинке тонкого кишечника, выделенных из наивных мышей дикого типа (*Lta*^{flx/flx}), мышей с полным удалением *Lta* (*Lta*^{ΔΔ}), мышей с удалением *Lta* в ILC3 и Т-клетках (*Lta*^{ΔILC3, T}), и мышей с удалением *Lta* только в Т-клетках (*Lta*^{ΔT}).

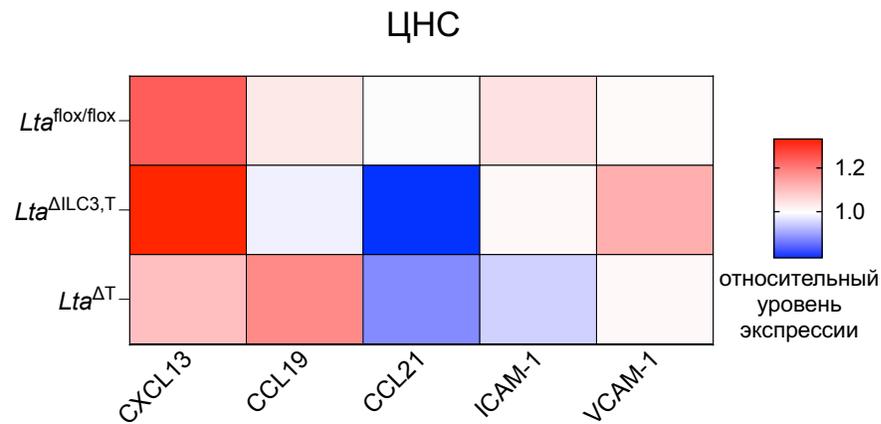


Рисунок 12. При удалении молекулярных форм лимфотоксина α из ILC3, скорее всего, происходит нормальное формирование ТЛО в ЦНС. Тепловая карта, изображающая относительный уровень экспрессии генов, кодирующих CXCL13, CCL19, CCL21, ICAM-1, VCAM-1 в ЦНС мышей дикого типа (*Lta*^{flx/flx}), мышей с удалением *Lta* в ILC3 и Т-клетках (*Lta*^{ΔILC3, T}) и мышей с удалением *Lta* только в Т-клетках (*Lta*^{ΔT}) на пике заболевания.

3.6. Молекулярные формы лимфотоксина α , экспрессирующиеся Т-клетками, выполняют патогенетическую роль в ЕАЕ за счет контроля прайминга Т_H-клеток на периферии

Ранее было обнаружено, что у $Lta^{\Delta T}$ мышей симптомы ЕАЕ были выражены слабее, чем у $Lta^{\text{flox/flox}}$ мышей, $Lta^{\Delta/\Delta}$ мышей и $Lta^{\Delta\text{ILC3,T}}$ мышей (Рисунок 9). В соответствии с этим у $Lta^{\Delta T}$ мышей не было выявлено очагов демиелинизации в ЦНС (Рисунок 10Г). Кроме того, ЦНС $Lta^{\Delta T}$ мышей характеризовалась уменьшением инфильтрации Т_H17 на пике ЕАЕ (Рисунок 13А). В то же время в ЦНС $Lta^{\Delta/\Delta}$ и $Lta^{\Delta T}$ мышей было повышено абсолютное количество регуляторных Т-клеток (Рисунок 13Б), 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.

Уменьшение инфильтрации Т_H17 в ЦНС может быть связано с нарушением миграции патогенетических Т-клеток, ассоциированным с уменьшением экспрессии CCR6 [168]. Стратегия анализа экспрессии CCR6 на Т-клетках представлена в Приложении на Рисунке 21Г. Было выявлено, что экспрессия CCR6 на Т_H17-клетках не изменялась ни в ЦНС, ни в дренирующих лимфатических узлах $Lta^{\Delta T}$ мышей (Рисунок 13В), что свидетельствует о нормальной миграции Т_H17 в ЦНС.

Поскольку известно, что экспрессия мембраносвязанного лимфотоксина на антиген-специфичных Т-клетках необходима для их прайминга дендритными клетками [224], было выдвинуто предположение, что снижение тяжести ЕАЕ у $Lta^{\Delta T}$ мышей связано с изменениями в антиген-специфичном прайминге Т-клеток на периферии. Для изучения прайминга CD4⁺ Т-клеток в лимфатических узлах и селезенке $Lta^{\text{flox/flox}}$ и $Lta^{\Delta T}$ мышей иммунизировали MOG₃₅₋₅₅-пептидом в полном адъюванте Фрейнда с последующими двухкратным введением коклюшного токсина и исследовали иммунный ответ в лимфоидных органах через 9 дней после иммунизации (Приложение, Рисунок 21В). Было выявлено, что у $Lta^{\Delta T}$ мышей происходит снижение процентного содержания активированных CD44⁺CD40L⁺ MOG₃₅₋₅₅-специфичных CD4⁺ Т-клеток (Рисунок 14А). Более того, у таких мышей было снижено как процентное содержание (Рисунок 14А), так и общее количество MOG₃₅₋₅₅-специфичных CD4⁺ Т-клеток, продуцирующих IL-17A (Рисунок 14Б) и GM-CSF (Рисунок 14В), в селезенке и лимфатических узлах на начальном этапе развития ЕАЕ. Полученные результаты свидетельствуют о нарушении прайминга Т-клеток во вторичных лимфоидных органах на фоне генетической инактивации Lta .

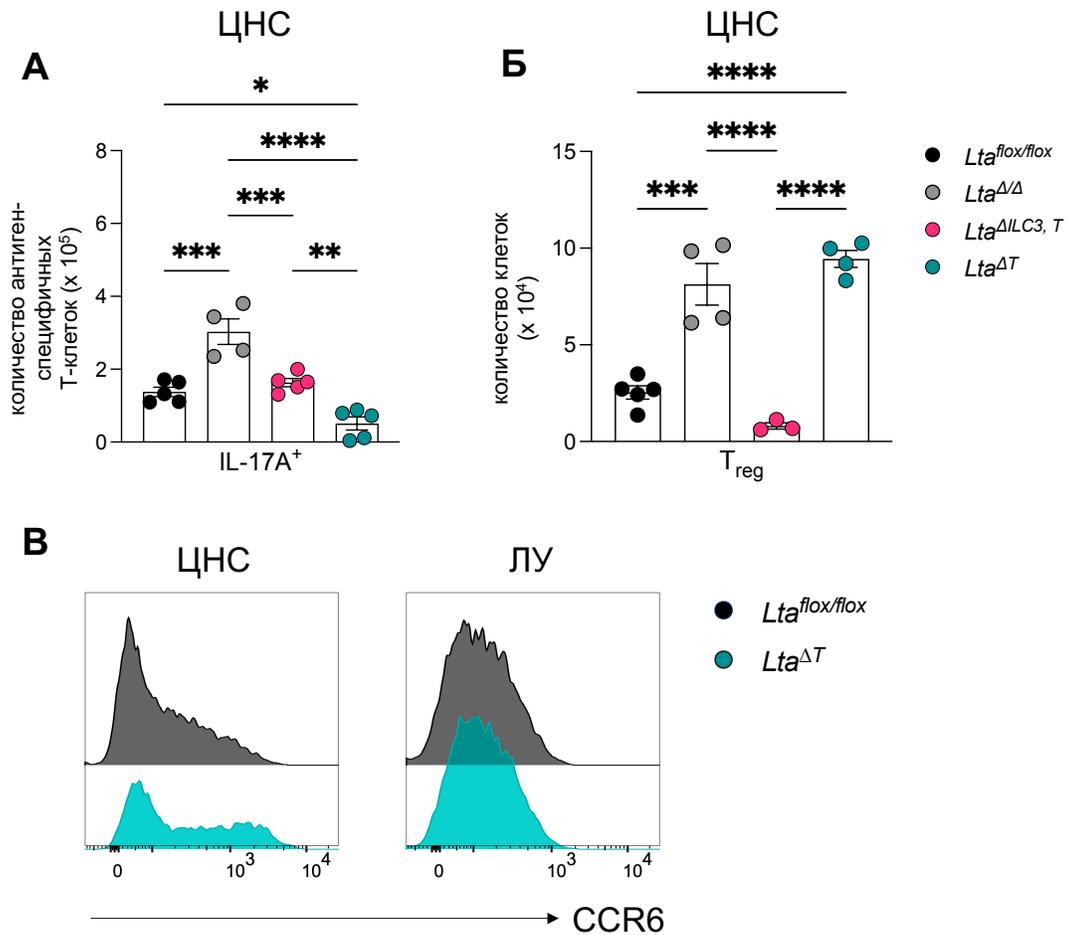


Рисунок 13. В ЦНС *Lta*^{ΔT} мышей на пике ЕАЕ снижена инфильтрация Т_H17, но повышена инфильтрация Т_{reg}. (А) Количество IL-17A⁺ CD4⁺ Т-клеток, рестимулированных MOG₃₅₋₅₅ и (Б) Количество регуляторных Т-клеток в ЦНС мышей дикого типа (*Lta*^{flox/flox}), с полным удалением *Lta* (*Lta*^{ΔΔ}), удалением *Lta* в ILC3 и Т-клетках (*Lta*^{ΔILC3, T}) и удалением *Lta* только в Т-клетках (*Lta*^{ΔT}) в ЦНС на 16 день после иммунизации. Каждый символ соответствует значению для индивидуальной мыши. (В) Репрезентативные гистограммы интенсивности флуоресценции CCR6 на Т_H17-клетках, выделенных из ЦНС и лимфатических узлов (ЛУ) *Lta*^{flox/flox} и *Lta*^{ΔT} мышей. Результаты представлены как среднее значение ± SEM и подтверждены в 3 независимых экспериментах. **P* < 0.05, ** *P* < 0.01, *** *P* < 0.001, **** *P* < 0.0001, one-way ANOVA.

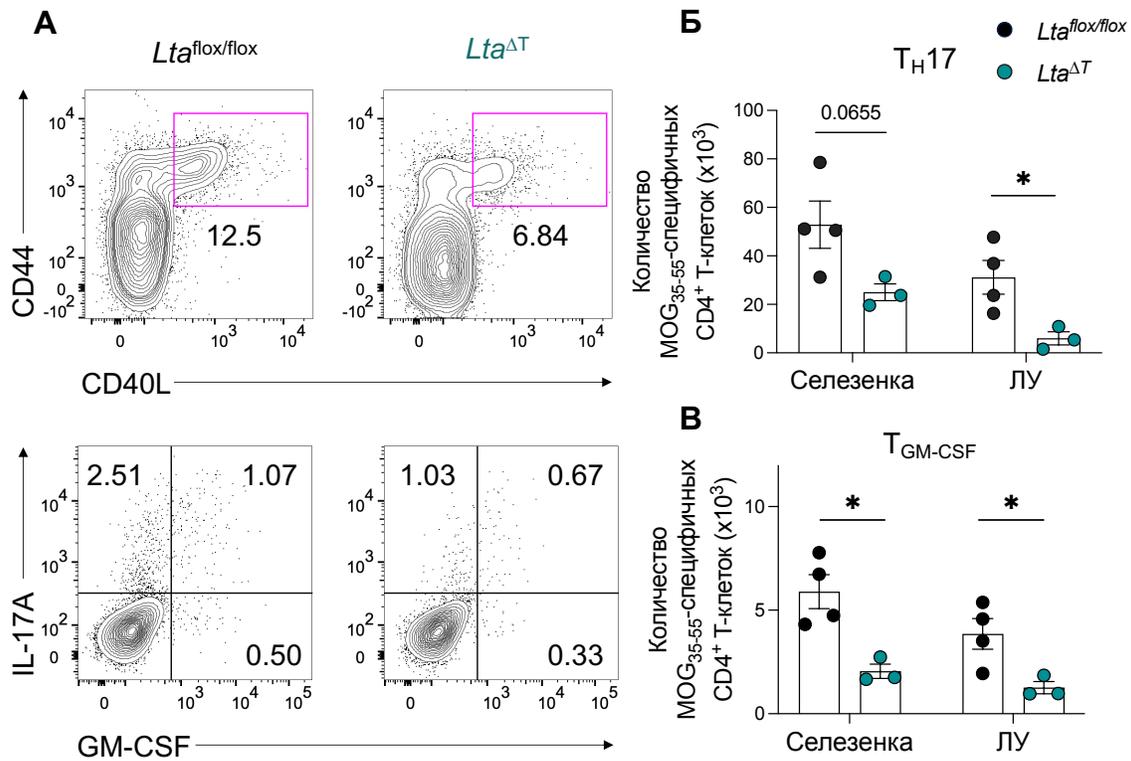


Рисунок 14. Молекулярные формы лимфотоксина α на Т-клетках необходимы для прайминга антиген-специфичных Т-клеток во вторичных лимфоидных органах. (А) Репрезентативные поточечные диаграммы активированных Т-клеток, рестимулированных MOG₃₅₋₅₅ и выделенных как VD-TCR β^+ CD4⁺CD44^{hi}CD40L^{hi} (верхняя панель), и IL-17A⁺ и GM-CSF⁺ CD4⁺ Т-клеток, рестимулированных MOG₃₅₋₅₅ (нижняя панель), в лимфатических узлах мышей дикого типа (*Lta^{flox/flox}*) и мышей с удалением *Lta* только в Т-клетках (*Lta^{ΔT}*) на 9 день после иммунизации MOG₃₅₋₅₅ в полном адьюванте Фрейнда. (Б) Количество Т_{H17}-клеток, рестимулированных MOG₃₅₋₅₅, в селезенке и лимфатических узлах (ЛУ) на 9 день после иммунизации. (В) Количество Т_{GM-CSF}-клеток, рестимулированных MOG₃₅₋₅₅, 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 на (Б) и (В) соответствует значению для индивидуальной мыши. * $P < 0.05$, t-критерий Стьюдента.

Для анализа того, влияет ли удаление молекулярных форм лимфотоксина α из Т-клеток в норме на поляризацию Т_H-клеток, во-первых, оценивали уровень активации Т-клеток, выделенных из селезенки и лимфатических узлов, при поликлональной стимуляции с помощью ФМА/иономицина, во-вторых, проводили эксперименты по поляризации Т-клеток *in vitro*. Различий в процентном содержании CD44⁺ Т-клеток и экспрессии CD44 на Т-клетках обнаружено не было, что свидетельствует о нормальной способности Т-клеток активироваться в отсутствие *Lta*

(Рисунок 15А). Кроме того, не было выявлено различий в дифференцировке как в T_H1 , так и в T_H17 субпопуляций при добавлении соответствующих цитокинов *in vitro* (Рисунок 15Б).

В совокупности эти данные свидетельствуют о том, что инактивация *Lta* в Т-клетках предотвращает развитие антиген-специфичных, а именно MOG₃₅₋₅₅-специфичных Т-клеток, в модели ЕАЕ.

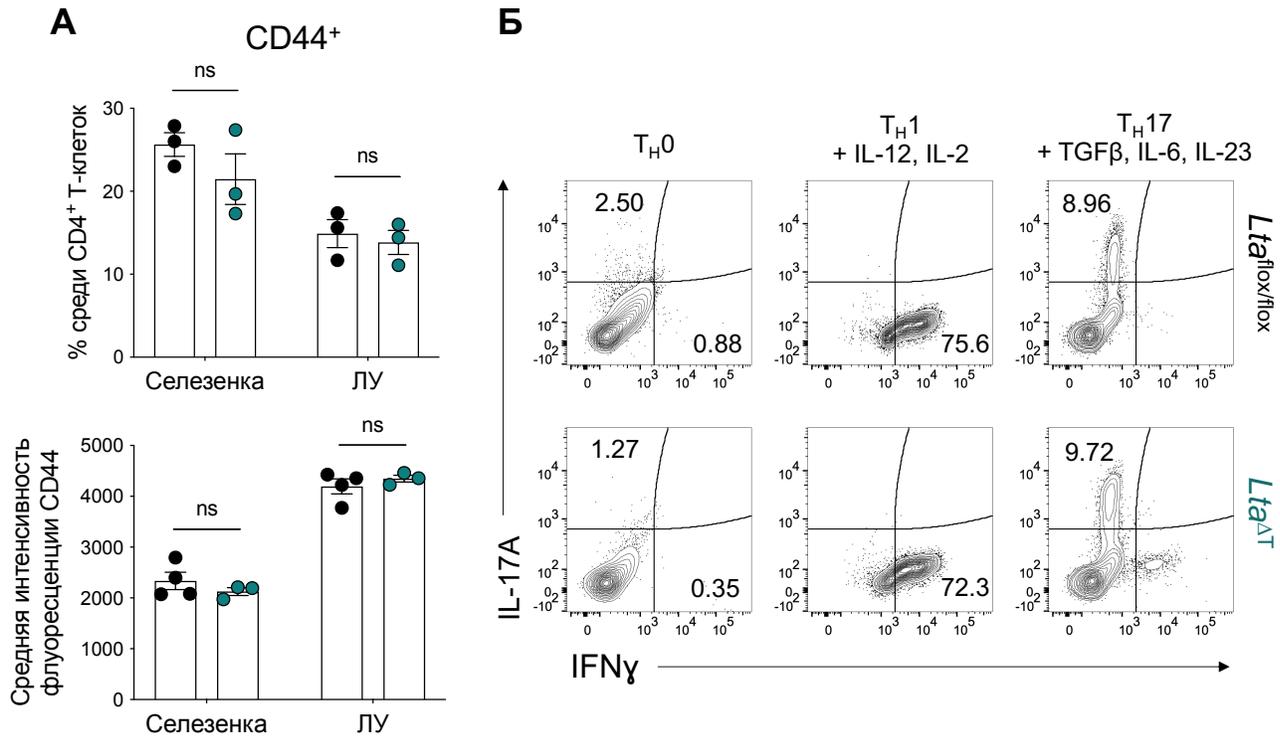


Рисунок 15. Т-клетки, выделенные из лимфоидных органов *Lta^{ΔT}* мышей в наивном состоянии, показывают нормальную поликлональную активацию и дифференцировку *in vitro*. (А) Процентное содержание CD44⁺ клеток (верхняя панель) и средняя интенсивность флуоресценции CD44 (нижняя панель) среди CD4⁺ Т-клеток, активированных ФМА/иономицином, выделенных из селезенки и лимфатических узлов дикого типа (*Lta^{flox/flox}*) и мышей с удалением *Lta* только в Т-клетках (*Lta^{ΔT}*). Каждый символ соответствует значению для индивидуальной мыши. (Б) Репрезентативные поточечные диаграммы IFN γ ⁺ и IL-17A⁺ Т-клеток, дифференцированных из обогащенных CD4⁺ Т-клеток *in vitro* в течение 5 дней в присутствии α -CD3, α -CD28 и указанных цитокинов в T_H0 , T_H1 , T_H17 субпопуляции и рестимулированных ФМА/иономицином. Результаты представлены как среднее значение \pm SEM и подтверждены как минимум в 2 независимых экспериментах. ns – недостоверные отличия, t-критерий Стьюдента.

Известно, что взаимодействие *memLT* с $LT\beta R$ необходимо для оптимального прайминга $CD4^+$ Т-клеток [224]. В связи с этим было выдвинуто предположение, что лимфотоксин (скорее всего, *memLT*) на Т-клетках регулирует продукцию цитокинов, необходимых для последующей дифференцировки Т-клеток, на этапе прайминга во вторичных лимфоидных органах. Для этого выделяли спленоциты из *Lta^{flox/flox}* и *Lta^{ΔT}* мышей на 9-й день после индукции ЕАЕ, культивировали их в присутствии MOG₃₅₋₅₅-пептида в течение 72 часов, затем проводили измерение концентраций цитокинов и хемокинов в супернатантах с помощью мультиплексного анализа.

В подтверждение к уменьшению абсолютного количества антиген-специфичных IL-17А- и GM-CSF-продуцирующих Т-клеток при культивировании спленоцитов, выделенных из мышей с удалением *Lta* в Т-клетках, происходило снижение концентраций IL-17А и GM-CSF (Рисунок 16А). Далее был оценен уровень экспрессии генов, кодирующих IL-6 и IL-23, необходимых для поляризации в T_H17 в лизатах культивированных спленоцитов. Оказалось, что в отсутствие *Lta* происходило снижение уровня экспрессии гена, кодирующего IL-6 (Рисунок 16Б), что свидетельствует о том, что лимфотоксины, продуцируемые Т-клетками, не только контролируют продукцию эффекторных цитокинов Т-клетками, но и могут играть важную роль непосредственно на этапе дифференцировки. Кроме того, у *Lta^{ΔT}* мышей снижался уровень CCL20 (Рисунок 16В), который, как было показано, необходим не только для миграции Т-клеток, но и участвует в прайминге Т-клеток на периферии [225, 226].

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.

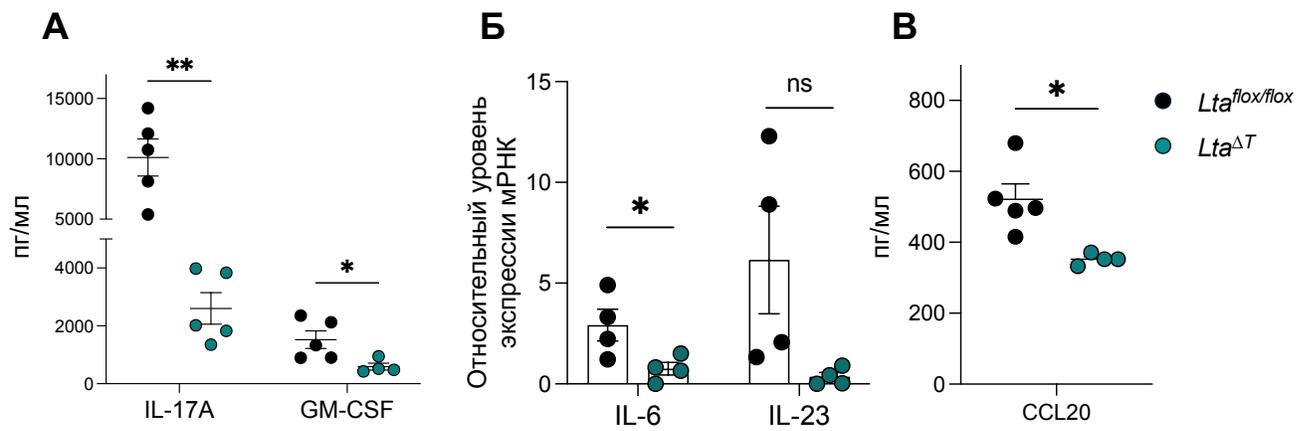


Рисунок 16. В селезенке *Lta^{ΔT}* мышей на начальной фазе ЕАЕ снижена продукция эффекторных цитокинов. Мультиплексный анализ концентраций (пг/мл) (А) IL-17A и GM-CSF, (В) CCL20 в супернатантах спленоцитов, выделенных из *Lta^{flox/flox}* и *Lta^{ΔT}* мышей на 9-й день после иммунизации MOG₃₅₋₅₅ в полном адьюванте Фрейнда и культивированных в течение 72 часов в присутствии MOG₃₅₋₅₅-пептида. (Б) Относительный уровень экспрессии мРНК *Il6* и *Il23* в лизатах культивированных спленоцитов. Результаты представлены как среднее значение ± SEM и подтверждены в 2 независимых экспериментах. Каждый символ соответствует значению для индивидуальной мыши. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ns – недостоверные отличия, t-критерий Стьюдента.

3.7. Молекулярные формы лимфотоксина α , экспрессирующиеся на В-клетках, выполняют патогенетическую роль в модели ghMOG₁₋₁₂₅-индуцированного ЕАЕ, но не в модели MOG₃₅₋₅₅-зависимого ЕАЕ

Известно, что В-клетки пациентов с РС характеризуются повышенной продукцией ЛТ α [192, 227, 228]. В связи с этим была изучена динамика ЕАЕ у мышей с тканеспецифичным удалением *Lta* в В-клетках (*Lta* ^{Δ B}). Для этого скрещивали *Lta*^{fllox/fllox} мышей с мышами, несущими специфичный для В-клеток Cre-делитер CD19^{Cre} [215]. Делецию подтверждали путем анализа экспрессии *Lta* в отсортированных CD19⁺ В-клетках (Приложение, Рисунок 21Е), стимулированных анти-CD40, с помощью количественной ПЦР в реальном времени (Рисунок 17А). Дополнительно оценивали разделение Т- и В-зон в лимфатических узлах *Lta* ^{Δ B} мышей и обнаружили, что, как и у *Ltb* ^{Δ B} мышей [32], в ЛУ *Lta* ^{Δ B} мышей сохранялись сегрегированные Т- и В-зоны (Рисунок 17Б).

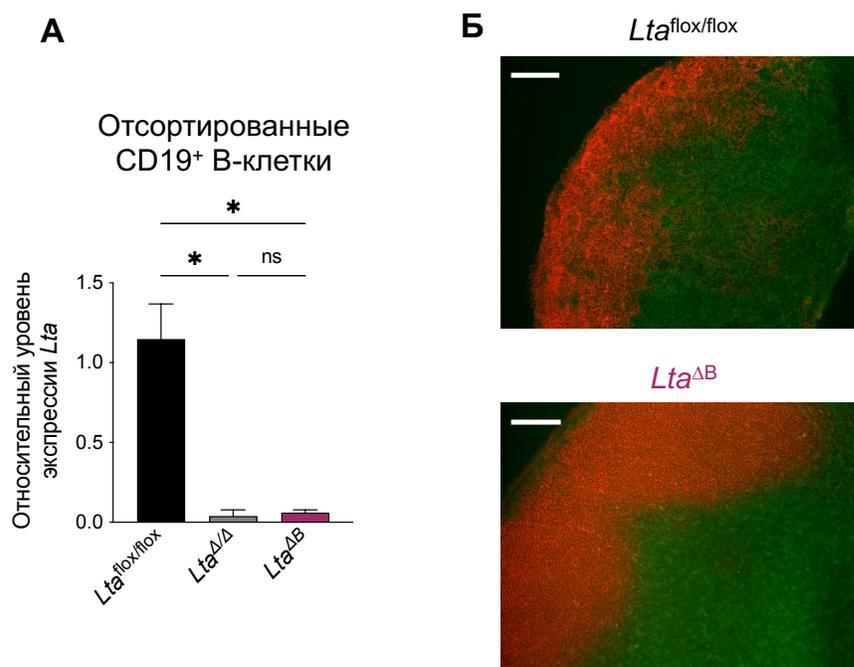


Рисунок 17. Характеристика *Lta* ^{Δ B} мышей. (А) Относительный уровень экспрессии *Lta* в отсортированных CD19⁺ В-клетках, выделенных из селезенок мышей дикого типа (*Lta*^{fllox/fllox}), с полным удалением *Lta* (*Lta* ^{Δ Δ}) и с удалением *Lta* только в CD19⁺ В-клетках (*Lta* ^{Δ B}) и активированных с помощью anti-CD40 в течение 7 часов. В качестве референсного гена использовали β -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.

При индукции у таких мышей MOG₃₅₋₅₅-зависимого ЕАЕ было выявлено, что при удалении *Lta* в В-клетках не происходит изменений в динамике развития клинических симптомов ЕАЕ (Рисунок 18А). В соответствии с динамикой симптомов ЕАЕ не было обнаружено значимых отличий в процентном содержании патогенетических Т_H-клеток, продуцирующих цитокины, в ЦНС (Рисунок 18Б). В сыворотке крови *Lta*^{flox/flox} и *Lta*^{ΔB} мышей не было различий в продукции ИЛ-6 на пике заболевания (Рисунок 18В). Учитывая тот факт, что в модели MOG₃₅₋₅₅-индуцированного ЕАЕ В-клетки обладают антигенпрезентирующей функцией [153], была проанализирована экспрессия МНСII на В-клетках в ЦНС, лимфатических узлах и селезенке на пике ЕАЕ (Приложение, Рисунок 21Ж). Анализ экспрессии МНСII на В-клетках не выявил существенных различий между *Lta*^{flox/flox} и *Lta*^{ΔB} мышами (Рисунок 18Г).

Поскольку у *Lta*^{ΔB} мышей в лимфатических узлах сохранялась сегрегация Т- и В-зон (Рисунок 17Б), что, согласно имеющимся в литературе данным, не влияет на созревание аффинности и переключение изотипов антител при подкожной иммунизации [208], на следующем этапе исследования мышей иммунизировали полноразмерным рекомбинантным человеческим белком MOG (rhMOG₁₋₁₂₅). Этот белок индуцирует образование патогенетических анти-MOG аутоантител, способствующих индукции демиелинизации в ЦНС [229].

Оказалось, что в модели rhMOG₁₋₁₂₅-индуцированного ЕАЕ *Lta*^{ΔB} мыши были менее восприимчивы к индукции заболевания, чем контрольные мыши дикого типа (Рисунок 19А, Б). Это могло быть связано с нарушением синтеза аутоантител, однако анализ содержания rhMOG₁₋₁₂₅-специфичных IgG в сыворотке крови *Lta*^{flox/flox} и *Lta*^{ΔB} мышей в динамике после иммунизации не выявил различий в выработке rhMOG₁₋₁₂₅-специфичных аутоантител (Рисунок 19В). Анализ сыворотки крови мышей с удалением *Lta* в В-клетках выявил уменьшение концентрации ИЛ-6 (Рисунок 19Г), для которого показана патогенетическая роль в модели ЕАЕ [230]. Поскольку известно, что Т-клетки необходимы для индукции заболевания при иммунизации rhMOG₁₋₁₂₅ [231], была изучена продукция цитокинов CD4⁺ Т_H-клетками на пике ЕАЕ. В результате этого анализа снижение провоспалительного ответа на системном уровне было подтверждено уменьшение процентного содержания IFN γ -продуцирующих Т-клеток в лимфатических узлах (Рисунок 19Д).

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о том, что В-клетки являются критически важным источником молекулярных форм лимфотоксина α только в модели rhMOG₁₋₁₂₅-зависимого ЕАЕ.

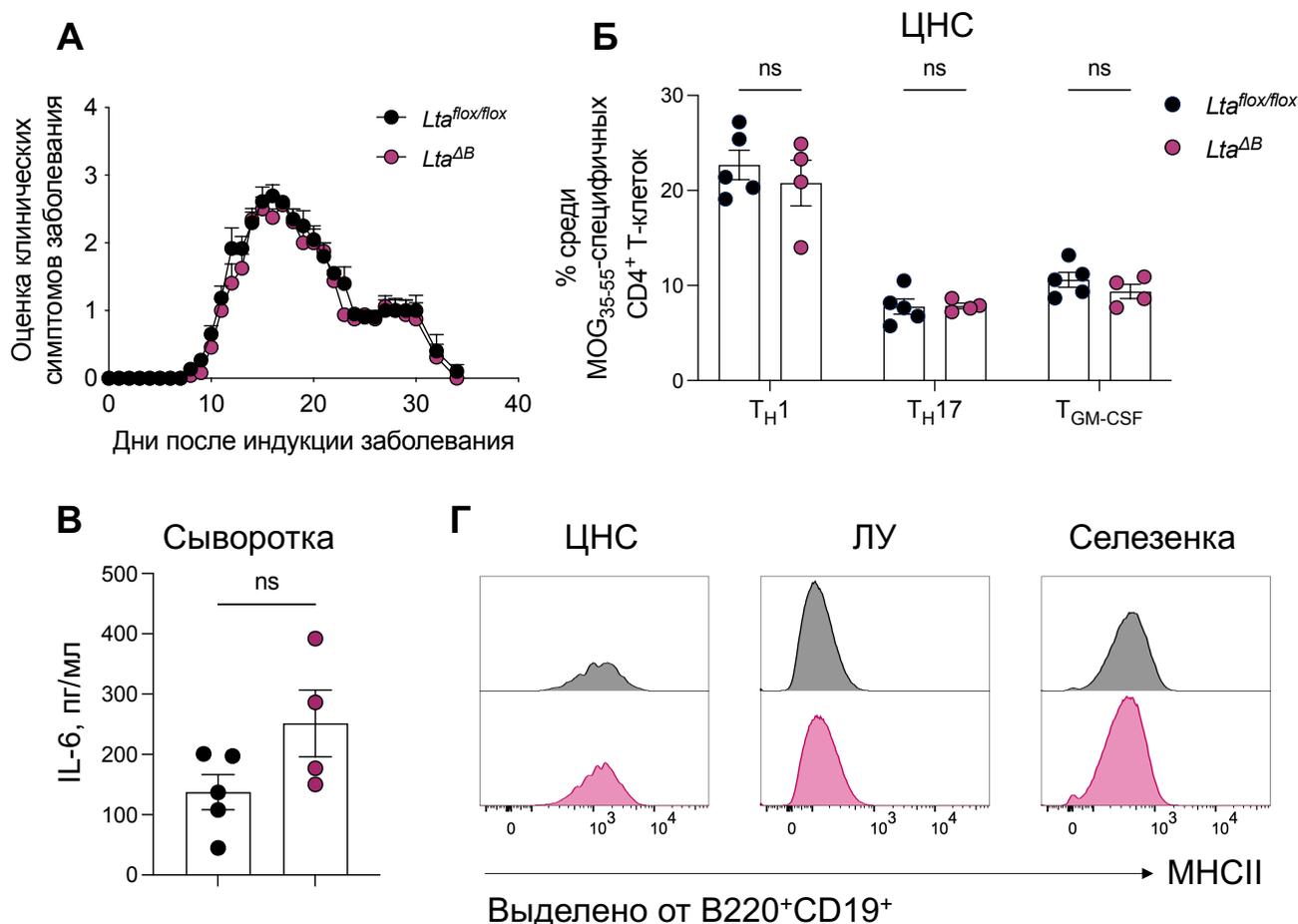


Рисунок 18. Молекулярные формы лимфотоксина α из В-клеток не играют выраженной роли в патогенезе MOG₃₅₋₅₅-индуцированного ЕАЕ. (А) Развитие клинических симптомов ЕАЕ у мышей дикого типа (*Lta^{flox/flox}*) (n=12) и мышей с удалением *Lta* в В-клетках (*Lta^{ΔB}*) (n=12), иммунизированных MOG₃₅₋₅₅-пептидом в полном адьюванте Фрейнда. (Б) Процентное содержание MOG₃₅₋₅₅-специфичных Т_{H1}, Т_{H17}, Т_{GM-CSF} в ЦНС на пике ЕАЕ. (В) Концентрация IL-6 в сыворотке крови на пике заболевания. Каждый символ на (Б) и (В) соответствует значению для индивидуальной мыши. (Г) Репрезентативные поточечные гистограммы флуоресценции MHCII на B220⁺CD19⁺ В-клетках, выделенных из ЦНС, лимфатических узлов (ЛУ) и селезенки *Lta^{flox/flox}* и *Lta^{ΔB}* мышей на пике ЕАЕ. Результаты представлены как среднее значение \pm SEM и подтверждены в 3 независимых экспериментах. * $P < 0.05$, t-критерий Стьюдента.

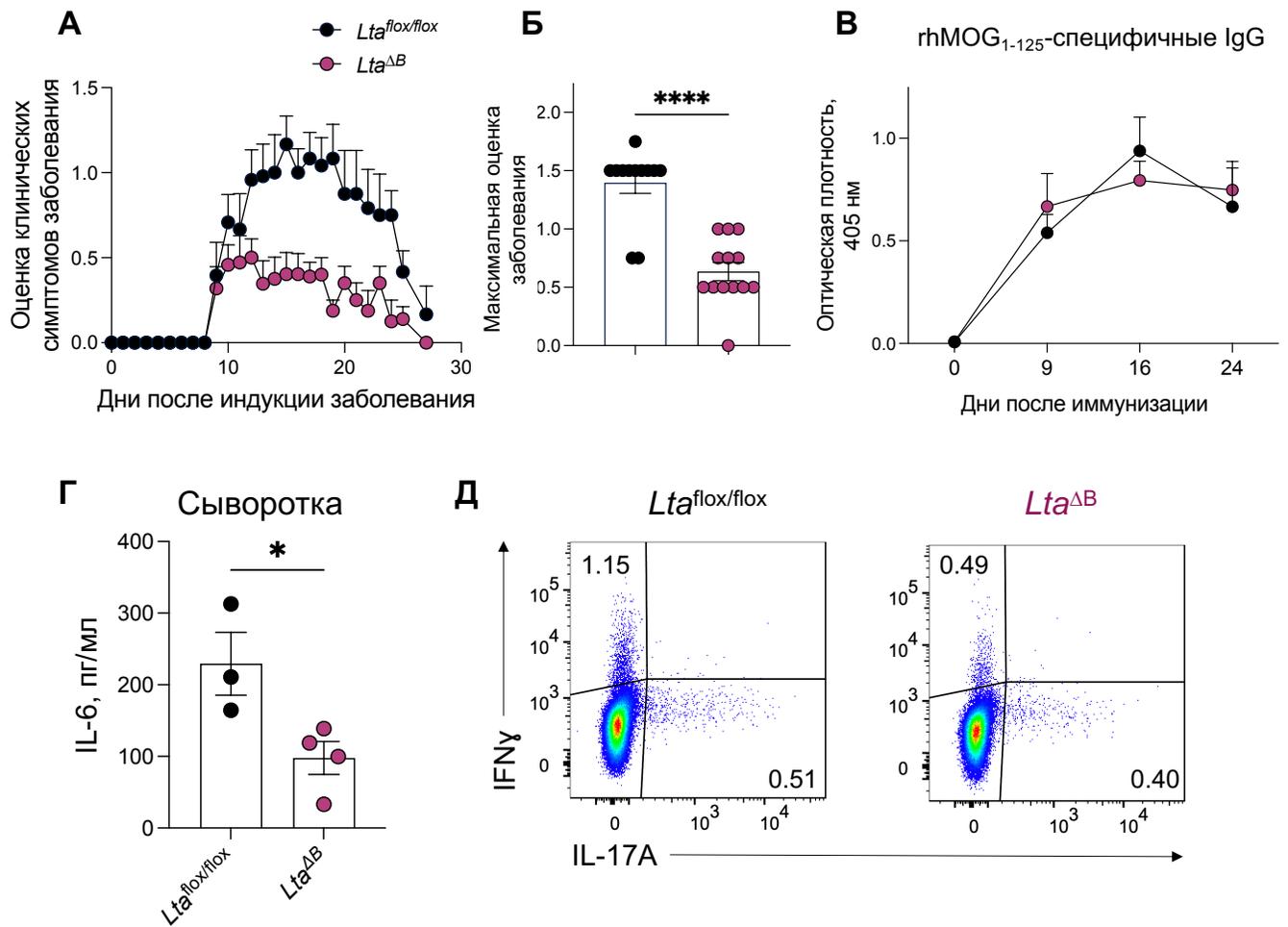


Рисунок 19. Молекулярные формы лимфотоксина α из В-клеток выполняют патогенетическую роль в модели rhMOG₁₋₁₂₅-индуцированного ЕАЕ. (А) Развитие клинических симптомов ЕАЕ у мышей дикого типа ($Lta^{flox/flox}$) (n=12) и мышей с удалением Lta в В-клетках ($Lta^{\Delta B}$) (n=13), иммунизированных белком rhMOG₁₋₁₂₅ в полном адьюванте Фрейнда. **(Б)** Максимальная оценка клинических симптомов ЕАЕ. **(В)** Значения оптической плотности rhMOG₁₋₁₂₅-специфичных IgG в сыворотке крови мышей, иммунизированных rhMOG₁₋₁₂₅ 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 γ^+ и IL-17A $^+$ Т-клеток, выделенных из лимфатических узлов $Lta^{flox/flox}$ и $Lta^{\Delta B}$ 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.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

Лимфотоксин, член суперсемейства TNF, был открыт более 50 лет назад в лабораториях G. Granger и В. Waksman. Изначально лимфотоксин был описан как растворимый цитотоксический фактор, продуцируемый лимфоцитами в ответ на стимуляцию митогенами или специфическим антигеном *in vitro* [1, 2]. Позже было установлено, что лимфотоксин и TNF схожи как по структуре, так и в биологической активности, включая способность вызывать некроз опухолевых клеток *in vitro* [3]. Из-за этого «классический» лимфотоксин временно получил название TNF β [5].

Следующая важная веха в истории изучения лимфотоксина пришлось на 1993-1994 гг., когда был описан LT β , образующий мембранный гетеротримерный комплекс с LT α [4], а также уникальный рецептор для этой мембраносвязанной формы – LT β R [15]. Эти открытия привели к обнаружению уникальных функций лимфотоксина, не перекрывающихся с TNF, а также к переименованию TNF β в LT α . Параллельно были созданы первые мыши с генетическим удалением *Lta*, у которых был обнаружен абсолютно уникальный фенотип – отсутствие лимфатических узлов и Пейеровых бляшек [27]. После этих открытий последовал целый ряд работ, показывающих, что лимфотоксин β критически важен для развития и поддержания функций вторичных лимфоидных органов [30, 31, 34, 50, 51].

Позднее, по мере расцвета Cre-loxP технологии и в связи с получением альтернативно сконструированных нокаутных мышей, в мышах с «классическим» (конвенциональным) удалением *Lta* был обнаружен артефакт, связанный как с геномной организацией TNF/LT геномного локуса, так и с техническими аспектами дизайна таргетирующей генетической конструкции. Оказалось, что у мышей с конвенциональным удалением *Lta* нарушена продукция TNF миелоидными клетками, что связано с наличием в дальней предпромоторной области гена *Tnf* кассеты, ответственной за устойчивость к неомицину [28]. Этот артефакт поставил под сомнение некоторые фенотипические свойства, описанные на мышах с конвенциональным удалением *Lta*, хотя главные выводы о роли LT α в развитие лимфоидных органов и гомеостаз иммунной системы под сомнение не ставились.

Стоит отметить, что интерпретация фенотипов, полученных на мышах с удалением *Tnf* или *Lta*, представляет сложности из-за: 1) структурного сходства [22], 2) близкого расположения генов [6], 3) перекрывающихся взаимодействий с рецепторами [232]. В связи с такими особенностями системы TNF/LT неудивителен тот факт, что некоторые известные из литературы наблюдения до сих пор остаются противоречивыми.

4.1. Роль молекулярных форм лимфотоксина α в патогенезе ЕАЕ

Первой важной проблемой, исследованию которой и посвящена основная часть работы, является роль лимфотоксинов в различных экспериментальных моделях аутоиммунных заболеваний. Известно, что эктопическая экспрессия LT α у мышей связана с индукцией воспаления, ассоциированного с формированием третичных лимфоидных органов [99]. В подтверждение этому, в большинстве исследований в качестве основной патогенетической функции лимфотоксинов при воспалительных заболеваниях являлось участие LT α и LT β в формировании третичных лимфоидных органов [213, 214]. На основе таких результатов классиками в области изучения лимфотоксина были созданы терапевтические препараты, блокирующие лимфотоксины, однако клинические испытания патеклизумаба (анти-LT α) и баминерцепта (LT β R-Ig) в терапии ревматоидного артрита [123, 124] и синдрома Шегрена [125] не показали клинической эффективности. Эти результаты могут указывать как на сложную роль лимфотоксинов в патогенезе аутоиммунных заболеваний, так и на необходимость создания более специфичных фармакологических блокаторов.

В качестве экспериментальной модели аутоиммунного заболевания, в контексте которой можно изучать функции лимфотоксина, была выбрана модель MOG₃₅₋₅₅-индуцированного ЕАЕ. Во-первых, ввиду клинических наблюдений о роли LT α в патогенезе рассеянного склероза и ЕАЕ, во-вторых, поскольку ранее было показано, что при подкожной иммунизации вне зависимости от наличия лимфатических узлов будет происходить эффективный Т-клеточнозависимый ответ, характерный для MOG₃₅₋₅₅-индуцированного ЕАЕ, что критически важно учитывать при проведении экспериментов на *Lta*-дефицитных мышах [208]. На первом этапе работы была изучена динамика развития клинических симптомов на мышах с полным удалением *Lta* без *neo*-кассеты. Оказалось, что *Lta* ^{Δ/Δ} мыши не только восприимчивы к MOG₃₅₋₅₅-индуцированному ЕАЕ (Рисунок 8А), но и развивают симптомы, схожие по динамике с заболеванием у мышей дикого типа. Этот результат прямо противоречит имеющимся в литературе данным об абсолютной резистентности мышей с конвенциональным удалением *Lta* к ЕАЕ [198], но согласуется с результатами группы Sedgwick о нормальном развитии ЕАЕ у RAG-дефицитных мышей, после адоптивного переноса костного мозга из *Lta*-дефицитных мышей с нормальной продукцией TNF [200]. Примечательно, что, в совокупности с имеющимися литературными данными, результат настоящей работы подтверждает гипотезу о том, что в первоначальных экспериментах на мышах с конвенциональным удалением *Lta* [198] были сделаны неверные выводы об абсолютно патогенетической роли LT α .

Фенотип, полученный на *Lta* ^{Δ/Δ} мышах, был подтвержден и в экспериментах с фармакологической блокировкой LT α у мышей дикого типа на фоне развития ЕАЕ (Рисунок 8Б). В

соответствии с клинической картиной заболевания у *Lta*^{ΔΔ} мышей наблюдалось уменьшение демиелинизации спинного мозга по сравнению с контрольными мышами дикого типа (Рисунок 10Г), а также увеличение абсолютного количества регуляторных Т-клеток в ЦНС (Рисунок 13Б). При этом восприимчивость, а не абсолютная резистентность мышей с полным удалением *Lta* может объясняться инфильтрацией в ЦНС таких мышей *Ly6C^{hi}МНСII⁺CD11c⁺* моноцитов (Рисунок 10А) и IL-17А-продуцирующих Т-клеток (Рисунок 13А).

Ранее для TNF была установлен вклад отдельных типов клеток иммунной системы в патогенез экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита [203] и экспериментального артрита [233]. Было выдвинуто предположение, что, как и TNF, лимфотоксины из определенного типа клеток могут выполнять защитную роль в ЕАЕ, тогда как лимфотоксины, продуцируемые другой популяцией клеток, выполняют патогенетическую роль. Критический анализ этой гипотезы начался с изучения динамики развития ЕАЕ у мышей с удалением *Lta* в ILC3 и Т-клетках, поскольку для ILC3 [174] и Т-клеток [113] был детектирован высокий уровень экспрессии *Lta* в модели ЕАЕ. Было установлено, что удаление *Lta* в ILC3 приводит к значительному ухудшению клинических симптомов, тогда как удаление *Lta* в Т-клетках, наоборот, улучшало динамику развития ЕАЕ (Рисунок 9). Эти результаты подтвердили гипотезу о разностороннем (в т.ч. противоположно направленном) вкладе молекулярных форм лимфотоксина α в патогенез ЕАЕ в зависимости от клеточного источника.

Кроме этого, в ЦНС *Lta*^{ΔILC3,T} мышей наблюдалась повышенная инфильтрация моноцитов, дифференцирующихся в эффекторные дендритные клетки (Рисунок 10А), выполняющих патогенетическую роль в модели ЕАЕ [183], что повторяет фенотип *Lta*^{ΔΔ} мышей. Однако только у *Lta*^{ΔILC3,T} мышей накопление *Ly6C^{hi}МНСII⁺CD11c⁺* клеток коррелировало с увеличением абсолютного количества IFNγ- и GM-CSF-продуцирующих Т-клеток на пике ЕАЕ (Рисунок 10Б, В). Дальнейший анализ выявил, что у *Lta*^{ΔILC3,T} мышей происходила более выраженная демиелинизация спинного мозга (Рисунок 10Г), что согласуется с усилением клинических симптомов ЕАЕ.

Интересно, что анализ уровня экспрессии генов, кодирующих ключевые для формирования ТЛО молекулы – CXCL13, CCL19, CCL21, ICAM-1, VCAM-1 – не выявил различий с контрольной группой мышей дикого типа, а также мышами с удалением *Lta* в ILC3 и Т-клетках, либо только в Т-клетках (Рисунок 16В). Ранее было показано, что *Rorc*^{-/-} мыши не развивают ЕАЕ, что, предположительно, связано с отсутствием у них LTi [234]. В то же время у *aly/aly* мышей с точечной мутацией в киназе NIK, опосредующей эффекты от сигнала через LTβR, развивается ЕАЕ [208], что ставит вопрос об избыточности механизмов формирования ТЛО. Отсутствие изменений

в уровне экспрессии характерных для ТЛО молекул в ЦНС $Lta^{\Delta IL3, T}$ мышей может быть связано и с выбором модели ЕАЕ, так как формирование ТЛО в модели ЕАЕ изучается в основном в экспериментах с адоптивным переносом энцефалитогенных Т-клеток. Однако против этой гипотезы выступают результаты, опубликованные в работе *Pikor et al.*, которые демонстрируют наличие ремоделирования стромального компартмента ЦНС и в модели MOG₃₅₋₅₅-индуцированного ЕАЕ [213]. Ухудшение клинических симптомов в ходе развития ЕАЕ $Lta^{\Delta IL3, T}$ мышей не исключает возможности того, что ТЛО в нейровоспалении могут регулировать и подавлять аутореактивный иммунный ответ. Однако эта гипотеза требует дальнейшего изучения.

С другой стороны, оказалось, что молекулярные формы лимфотоксина α , экспрессируемые Т-клетками, выполняют патогенетическую роль в модели ЕАЕ, о чем свидетельствуют менее выраженные симптомы ЕАЕ (Рисунок 9), снижение инфильтрации T_H17 (Рисунок 13А) и повышение количества регуляторных Т-клеток в ЦНС $Lta^{\Delta T}$ мышей (Рисунок 13Б). Эти результаты не только согласуются с ранее опубликованными данными об участии сигнальной оси $LT\beta R$ в индукции T_H17 -зависимого ответа в оболочках головного мозга, в частности, через $LT\alpha\beta$ на Т-клетках [213], но и подразумевают роль мембраносвязанного комплекса $LT\beta$. Более того, полученные в ходе работы результаты согласуются с известными из литературы данными об уменьшении симптомов ЕАЕ при деплеции $LT\alpha$ -экспрессирующих T_H -клеток у МВР-TCR-трансгенных мышей [113].

Нарушение прайминга антиген-специфичных T_H -клеток во вторичных лимфоидных органах, скорее всего, является основным механизмом, способствующим снижению тяжести заболевания у $Lta^{\Delta T}$ мышей (Рисунок 14). Эти результаты напрямую подтверждают ранее полученные данные о том, что экспрессия мембраносвязанного гетеротримера лимфотоксина $\alpha\beta$ на антиген-специфичных Т-клетках необходима для их эффективного прайминга [224]. Более того, в настоящей работе было показано, что лимфотоксины, продуцируемые Т-клетками, регулируют продукцию ключевых эффекторных цитокинов T_H -клеток – $IL-17A$ и $GM-CSF$, а также влияют на продукцию $CCL20$ на этапе прайминга во вторичных лимфоидных органах (Рисунок 16). Предположительно, как $LT\beta$, так и TNF участвуют в прайминге антиген-специфичных T_H -клеток на периферии (данные не представлены), что говорит о вырожденности этой функции. В совокупности, полученные в настоящей работе результаты свидетельствуют о том, что избирательное таргетирование $LT\alpha$ на Т-клетках может быть рассмотрено как потенциальная мишень в терапии аутоиммунных заболеваний. Ранее подобная концепция нейтрализации биологического действия цитокинов только из основного «патогенетического» источника была

разработана для TNF, что привело к созданию биспецифичных антител, блокирующих TNF только из миелоидных клеток [235].

Несмотря на то, что у пациентов с РС В-клетки характеризуются повышенным уровнем LT α [192, 227, 228], было показано, что В-клетки не являются критически важным источником LT α в модели MOG₃₅₋₅₅-индуцированного ЕАЕ. Однако в модели rhMOG₁₋₁₂₅-индуцированного ЕАЕ, опосредованной образованием аутоантител, *Lta*^{ΔB} мыши были менее восприимчивы к индукции ЕАЕ по сравнению с мышами дикого типа, что позволяет предположить важную роль молекулярных форм лимфотоксина α , продуцируемых В-клетками, именно в этом специфичном контексте. При этом патогенетическая роль В-клеточного лимфотоксина α опосредована их влиянием на продукцию цитокинов Т-клетками в лимфатических узлах (Рисунок 19). Необходимы дальнейшие исследования, чтобы определить, может ли аутокринный LT α являться фактором выживания для субпопуляций В-клеток в этой модели ЕАЕ [94, 95].

Настоящая работа, однако, обладает как минимум двумя ограничениями: 1) отсутствие лимфатических узлов и возникновение следующих за этим возможных компенсаторных эффектов в иммунной системе *Lta*^{ΔILC3,T} и *Lta*^{ΔΔ} мышей, а также 2) отсутствие разделения вклада мембраносвязанной и растворимой форм лимфотоксина. Компенсаторные эффекты иммунной системы были учтены путем анализа содержания Т_H-клеток в норме у мышей, не формирующих лимфатические узлы, а также путем прямого сравнения динамики ЕАЕ у *Lta*^{ΔILC3,T} и *Lta*^{ΔΔ} мышей. Также используемые в работе генетические системы не позволяют четко разграничить вклад LT α и LT β в патогенез ЕАЕ. Важно уточнить, что у *Ltb*-дефицитных мышей развиваются шейные лимфатические узлы, а лимфатические сосуды оболочек мозга связаны с шейными лимфатическими узлами [236], которые могут служить местом для запуска иммунного ответа на ЦНС-специфичные антигены [237]. Этот факт добавляет еще одну переменную в разграничение функций LT α и LT β , поскольку показано, что место прайминга Т_H-клеток определяет их эффекторные функции [238]. Разработка мышей с индуцибельной делецией LT α или LT β , как в случае с LT β R [76], в перспективе поможет определить индивидуальный вклад различных форм лимфотоксина. Другим подходом к разделению вклада LT α и LT β является использование специфичных блокаторов растворимой и мембраносвязанной форм лимфотоксина. Вклад растворимой формы лимфотоксина α был исследован ранее в экспериментах с введением мышам Этанерцепта, блокирующим как TNF, так и растворимый LT α , в сравнении с XPro1595, блокатором растворимой формы TNF. Оказалось, что введение Этанерцепта не защищает мышей от развития ЕАЕ [239], как и в представленных в настоящей работе результатах по генетической и фармакологической нейтрализации лимфотоксина α (Рисунок 8). Более того, блокировка

мембраносвязанной формы лимфотоксина с помощью слитого белка LT β R-Ig была эффективна только при моделировании заболевания с периодами обострений и ремиссий, но не в модели с иммунизацией MOG₃₅₋₅₅-пептидом [209], что подчеркивает неоднозначную роль лимфотоксинов в патогенезе ЕАЕ.

Таким образом, сопоставление результатов экспериментов с полной генетической и фармакологической инактивацией LT α выявили неоднозначную и противоположную по направленности роль молекулярных форм лимфотоксина α в патогенезе ЕАЕ, которая связана с различным вкладом ILC3 и Т-клеток в патогенез MOG₃₅₋₅₅-индуцированного ЕАЕ. Дополнительно было показано, что молекулярные формы лимфотоксина α , продуцируемые В-клетками, вносят вклад в развитие аутоантитело-ассоциированного ЕАЕ, индуцированного иммунизацией полноразмерным белком rhMOG₁₋₁₂₅. Полученные результаты могут, хотя бы отчасти, объяснять неожиданный провал клинических испытаний, направленных на блокировку сигнальных путей, опосредованных лимфотоксином, а также поставить вопрос о разработке новых терапевтических агентов, основанных на блокировке лимфотоксина (предположительно, memLT) из Т-клеток, а также молекулярных форм лимфотоксина α из В-клеток в случае аутоантитело-ассоциированных демиелинизирующих патологий.

4.2. Роль лимфотоксина α в гомеостазе иммунной системы

Еще одной важной проблемой является изучение функций лимфотоксинов в гомеостазе. В рамках настоящей работы была исследована роль лимфотоксина α 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 α , TNF и TNFR1 в качестве альтернативного подхода по установлению TNF-подобной активности лимфотоксина α (то есть растворимой формы LT α ₃). Выявлено, что как при полном удалении лимфотоксина α , так и при полном удалении TNF и TNFR1 в собственной пластинке тонкого кишечника происходит увеличение процентного содержания ROR γ ⁺ ILC3, что показывает участие этих молекул не только в формировании зачатка Пейеровых бляшек (Рисунок 2), но и в поддержании гомеостаза тонкого кишечника во взрослом организме (Рисунок 4Б). Эти результаты позволяют предположить, что, во-первых, отсутствие ПБ, скорее всего, не связано с уменьшением количества ILC3, в том числе клеток-индукторов, во-вторых, вклад TNF и лимфотоксинов в формирование ПБ и поддержание гомеостаза тонкого кишечника является вырожденным. Интересно, что в экспериментах с культурами незрелых миелоидных клеток также была

продемонстрирована вырожденность сигнальных путей, опосредованных LT α , TNF и TNFR1. Уменьшение содержания моноцитарной популяции в культурах мышей с удалением *Lta*, *Tnf* или *Tnfr1* (Рисунок 5Б) подтверждает известные из литературы данные о том, что TNF и лимфотоксин α необходимы для выживания общего моноцитарного предшественника [219]. Кроме этого, известно, что сигнальный путь, опосредованный TNFR1, играет ключевую роль в выживании моноцитов [89]. В то же время анализ абсолютного количества моноцитов в различных иммунных компартаментах *Lta* ^{Δ/Δ} мышей выявил увеличение количества Ly6C^{hi} моноцитов в крови (Рисунок 11Б), но не в костном мозге или селезенке. Это может происходить в связи с общим накоплением иммунных клеток в крови у мышей с дефицитом по *Lta*. Однако нельзя исключать того факта, что наблюдаемые изменения происходят только в системе *in vitro*. Дальнейшие исследования по изучению влияния дефицита генов, кодирующих LT α , TNF и TNFR1, в репортерных мышках, у которых можно отследить судьбу моноцитов и их предшественников *in vivo*, могут помочь понять, необходимы ли эти молекулы для функционирования моноцитарной популяции миелоидных клеток.

Результаты этой части работы демонстрируют, что полное удаление *Lta* и *Tnf* ассоциировано с нарушениями некоторых функций иммунной системы в гомеостазе, тем самым подтверждая предложенную ранее концепцию о перспективности клеточно-специфичного подхода к блокировке TNF [235] и показанную в настоящей работе роль молекулярных форм LT α , зависимую от клеточных источников, в патогенезе ЕАЕ. Суммируя, TNF и лимфотоксин α на ROR γ t⁺ ILC3 критически важны в процессе формирования иммунной системы для развития ПБ (Рисунок 2), более того, лимфотоксин α на ROR γ t⁺ ILC3 выполняют протективную роль в аутоиммунитете, то есть важно избегать блокировки LT на ILC3. При этом, для разработки новых терапевтических подходов стоит рассмотреть ингибирование молекулярных форм LT α на Т- и В-клетках не только ввиду их патогенетической функции в аутоиммунитете, но и ввиду отсутствия критических нарушений при удалении LT на этих клеточных популяциях в гомеостазе [29, 32] (Рисунок 17).

ГЛАВА 5. 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 α в мышинной модели рассеянного склероза, экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите. Во-первых, было показано, что *Lta*-дефицитные мыши с нормальной продукцией TNF миелоидными клетками восприимчивы к индукции MOG₃₅₋₅₅-индуцированного ЕАЕ. Эти результаты были подтверждены в экспериментах с фармакологической блокировкой с помощью уникального реагента – моноклональных антител к LT α . Кроме того, в работе впервые установлена разная по направленности роль молекулярных форм лимфотоксина α , производимых ILC3, Т- и В-клетками, в патогенезе ЕАЕ. Так, было выявлено, что защитную роль выполняют молекулярные формы лимфотоксина α из ILC3, тогда как их экспрессия Т-клетками (предположительно, именно мембранного LT комплекса) усугубляет динамику развития ЕАЕ. Для В-клеток, продуцирующих молекулярные формы лимфотоксина α , показана ключевая роль в патогенезе аутоантителозависимой модели ЕАЕ. Результаты работы вносят вклад в понимание молекулярных механизмов патологии нейровоспаления, а также демонстрируют различные функции лимфотоксина α , зависящие от 3 составляющих: 1) клеточного источника, 2) времени и 3) локализации. Такая неоднозначная роль молекулярных форм лимфотоксина α 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 α в гомеостазе дополняют имеющиеся сведения о физиологической роли лимфотоксинов, а также могут быть использованы для прогнозирования возможных побочных эффектов при применении Этанерцепта 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 α . 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 MOG₃₅₋₅₅-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 γ - 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 α , продуцируемые В-клетками, выполняют патогенетическую роль только в модели rhMOG₁₋₁₂₅-индуцированного ЕАЕ.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю искреннюю благодарность своему научному руководителю – Сергею Артуровичу Недоспасову – за предоставленную возможность присоединиться к увлекательному путешествию в научный мир энтузиастов, изучающих иммунологию абсолютно уникального суперсемейства TNF. Спасибо Вам за то, что помогли делать первые шаги в науке, учили развивать критическое мышление, а также личным примером демонстрировали, КАК ученому надо стратегически мыслить. Мне очень повезло учиться у Вас – человека, стоявшего у истоков ключевых открытий в области суперсемейства TNF. Хочу искренне поблагодарить Марину Сергеевну Друцкую за всестороннюю поддержку на всех этапах работы – от первого и до последнего рисунка настоящей работы и ценные советы (научные и жизненные). Отдельное спасибо Сергею Артуровичу и Марине Сергеевне за возможность пообщаться с блестящими учеными в рамках лекций, стажировок и конференций.

От всей души благодарю Камар-Сулу Атретханы за обучение всем экспериментальным методикам, передачу искренней любви к науке и неоценимую помощь в профессиональном становлении.

Мне посчастливилось поучиться у настоящих знатоков в области изучения TNF – Андрея Алексеевича Круглова, Дмитрия Владимировича Купраша, Алексея Валерьевича Туманова, Сергея Игоревича Гривенникова, каждому из которых я благодарна за помощь в написании научных статей и вдохновение. Отдельно хочу поблагодарить Андрея Алексеевича Круглова за интересные дискуссии, критические комментарии и ценные советы на всех этапах работы, а также за помощь в предоставлении уникальных реагентов, используемых в работе. От всей души благодарю Дмитрия Владимировича Купраша за душевные разговоры и обсуждения глобальных научных вопросов. Также хочу поблагодарить Ильгиза Альбертовича Муфазалова за помощь в написании научной статьи и ценные замечания.

Эта работа не была бы воплощена в жизнь без наших коллабораторов – питомника «Пуцино» (ФИБХ РАН) в лице Александра Чернова и Алексея Анатольевича Белогурова (ИБХ РАН) – которые беспрерывно обеспечивали нас критически важными ресурсами. Спасибо Ирине Владимировне Астраханцевой (НТУ Сириус) за помощь в предоставлении *Mycobacterium tuberculosis*.

Спасибо Рафаелу Шаэновичу Казаряну за ценные советы, организационную помощь на всех этапах работы и решение любых вопросов. Хочу выразить благодарность Руслану Зварцеву за обсуждение самых разных тем и готовность прийти на помощь в любом экстренном случае.

Огромное спасибо Ольге Намакановой, Екатерине Губернаторовой, Екатерине Горшковой, Таисии Юраковой, Денису Анисову, Анне Шейновой, Анастасии Яковлевой, Федору Сысонову, Тимуру Бойко, Светлане Пуртовой, Александру Воронцову, Егору Мячеву, Екатерине Булековой и всем бывшим сотрудникам лаборатории молекулярных механизмов иммунитета за создание дружественной рабочей атмосферы, помощь в выполнении некоторых экспериментов, мотивацию и поддержку.

Отдельно благодарю студентов, с которыми я работала – Соню Марьянчик, Арину Дыгай, Тьи Нгуен, Александра Воронцова – за их помощь на разных этапах этой работы.

Выражаю благодарность Кириллу Корнееву и всем сотрудникам лаборатории передачи внутриклеточных сигналов в норме и патологии ИМБ РАН за готовность помочь в любое время в любых ситуациях, за обсуждение различных научных вопросов и за дружбу.

Кроме того, я благодарна всем сотрудникам кафедры иммунологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова за приобретение сильнейших фундаментальных знаний в области иммунологии и за возможность обучаться с невероятно талантливыми людьми. Благодарю многих сотрудников ИМБ РАН за участие в моем профессиональном росте и создании приятной рабочей обстановки. Огромное спасибо всем сотрудникам, поддерживающим техническую работу Института, в том числе, Сергею Зимодро за то, что предоставлял возможность работать по выходным без перебоев, чего требовала экспериментальная модель ЕАЕ.

Наконец, бесконечно благодарю свою маму за то, что всегда поддерживала, направляла на истинный путь и заражала своим оптимизмом. Отдельная благодарность всем моим друзьям за то, что всегда были рядом и верили в меня больше, чем я сама. Хотела бы посвятить диссертацию своей бабушке и поблагодарить за воспитание волевых качеств, так необходимых в научной карьере.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Granger G. A., Williams T. W. Lymphocyte cytotoxicity in vitro: activation and release of a cytotoxic factor // *Nature*. – 1968. – Т. 218, № 5148. – С. 1253-4.
2. Ruddle N. H., Waksman B. H. Cytotoxicity mediated by soluble antigen and lymphocytes in delayed hypersensitivity. 3. Analysis of mechanism // *J Exp Med*. – 1968. – Т. 128, № 6. – С. 1267-79.
3. Gray P. W., Aggarwal B. B., Benton C. V., Bringman T. S., Henzel W. J., Jarrett J. A., Leung D. W., Moffat B., Ng P., Svedersky L. P., et al. Cloning and expression of cDNA for human lymphotoxin, a lymphokine with tumour necrosis activity // *Nature*. – 1984. – Т. 312, № 5996. – С. 721-4.
4. Browning J. L., Ngam-ek A., Lawton P., DeMarinis J., Tizard R., Chow E. P., Hession C., O'Brine-Greco B., Foley S. F., Ware C. F. Lymphotoxin beta, a novel member of the TNF family that forms a heteromeric complex with lymphotoxin on the cell surface // *Cell*. – 1993. – Т. 72, № 6. – С. 847-56.
5. Недоспасов С. А. На свете есть только один фактор некроза опухолей // *Медицинская иммунология*. – 2020. – Т. 22, № 6. – С. 1221-1224.
6. Muller U., Jongeneel C. V., Nedospasov S. A., Lindahl K. F., Steinmetz M. Tumour necrosis factor and lymphotoxin genes map close to H-2D in the mouse major histocompatibility complex // *Nature*. – 1987. – Т. 325, № 6101. – С. 265-7.
7. Medvedev A. E., Espevik T., Ranges G., Sundan A. Distinct roles of the two tumor necrosis factor (TNF) receptors in modulating TNF and lymphotoxin alpha effects // *J Biol Chem*. – 1996. – Т. 271, № 16. – С. 9778-84.
8. Bossen C., Ingold K., Tardivel A., Bodmer J. L., Gaide O., Hertig S., Ambrose C., Tschopp J., Schneider P. Interactions of tumor necrosis factor (TNF) and TNF receptor family members in the mouse and human // *J Biol Chem*. – 2006. – Т. 281, № 20. – С. 13964-71.
9. Grell M., Douni E., Wajant H., Lohden M., Clauss M., Maxeiner B., Georgopoulos S., Lesslauer W., Kollias G., Pfizenmaier K., Scheurich P. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor // *Cell*. – 1995. – Т. 83, № 5. – С. 793-802.
10. Sedger L. M., McDermott M. F. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future // *Cytokine Growth Factor Rev*. – 2014. – Т. 25, № 4. – С. 453-72.
11. Atrekhany K. N., Gogoleva V. S., Drutskaya M. S., Nedospasov S. A. Distinct modes of TNF signaling through its two receptors in health and disease // *J Leukoc Biol*. – 2020. – Т. 107, № 6. – С. 893-905.
12. Vallabhapurapu S., Karin M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system // *Annu Rev Immunol*. – 2009. – Т. 27. – С. 693-733.
13. Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation // *Cold Spring Harb Perspect Biol*. – 2009. – Т. 1, № 6. – С. a001651.
14. Varfolomeev E., Vucic D. Intracellular regulation of TNF activity in health and disease // *Cytokine*. – 2018. – Т. 101. – С. 26-32.
15. Crowe P. D., VanArsdale T. L., Walter B. N., Ware C. F., Hession C., Ehrenfels B., Browning J. L., Din W. S., Goodwin R. G., Smith C. A. A lymphotoxin-beta-specific receptor // *Science*. – 1994. – Т. 264, № 5159. – С. 707-10.
16. Schneider K., Potter K. G., Ware C. F. Lymphotoxin and LIGHT signaling pathways and target genes // *Immunol Rev*. – 2004. – Т. 202. – С. 49-66.
17. Granger S. W., Rickert S. LIGHT-HVEM signaling and the regulation of T cell-mediated immunity // *Cytokine Growth Factor Rev*. – 2003. – Т. 14, № 3-4. – С. 289-96.
18. Dejardin E., Droin N. M., Delhase M., Haas E., Cao Y., Makris C., Li Z. W., Karin M., Ware C. F., Green D. R. The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways // *Immunity*. – 2002. – Т. 17, № 4. – С. 525-35.

19. Sudhamsu J., Yin J., Chiang E. Y., Starovasnik M. A., Grogan J. L., Hymowitz S. G. Dimerization of LTbetaR by LTalpha1beta2 is necessary and sufficient for signal transduction // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2013. – T. 110, № 49. – C. 19896-901.
20. Sun S. C. The non-canonical NF-kappaB pathway in immunity and inflammation // *Nat Rev Immunol.* – 2017. – T. 17, № 9. – C. 545-558.
21. Kucka K., Lang I., Zhang T., Siegmund D., Medler J., Wajant H. Membrane lymphotoxin-alpha(2)beta is a novel tumor necrosis factor (TNF) receptor 2 (TNFR2) agonist // *Cell Death Dis.* – 2021. – T. 12, № 4. – C. 360.
22. Ruddle N. H. Lymphotoxin and TNF: how it all began-a tribute to the travelers // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2014. – T. 25, № 2. – C. 83-9.
23. Ware C. F. Network communications: lymphotoxins, LIGHT, and TNF // *Annu Rev Immunol.* – 2005. – T. 23. – C. 787-819.
24. Ward-Kavanagh L. K., Lin W. W., Sedy J. R., Ware C. F. The TNF Receptor Superfamily in Co-stimulating and Co-inhibitory Responses // *Immunity.* – 2016. – T. 44, № 5. – C. 1005-19.
25. Banks T. A., Rouse B. T., Kerley M. K., Blair P. J., Godfrey V. L., Kuklin N. A., Bouley D. M., Thomas J., Kanangat S., Mucenski M. L. Lymphotoxin-alpha-deficient mice. Effects on secondary lymphoid organ development and humoral immune responsiveness // *J Immunol.* – 1995. – T. 155, № 4. – C. 1685-93.
26. Matsumoto M., Lo S. F., Carruthers C. J., Min J., Mariathasan S., Huang G., Plas D. R., Martin S. M., Geha R. S., Nahm M. H., Chaplin D. D. Affinity maturation without germinal centres in lymphotoxin-alpha-deficient mice // *Nature.* – 1996. – T. 382, № 6590. – C. 462-6.
27. De Togni P., Goellner J., Ruddle N. H., Streeter P. R., Fick A., Mariathasan S., Smith S. C., Carlson R., Shornick L. P., Strauss-Schoenberger J., et al. Abnormal development of peripheral lymphoid organs in mice deficient in lymphotoxin // *Science.* – 1994. – T. 264, № 5159. – C. 703-7.
28. Liepinsh D. J., Grivennikov S. I., Klarmann K. D., Lagarkova M. A., Drutskaya M. S., Lockett S. J., Tessarollo L., McAuliffe M., Keller J. R., Kuprash D. V., Nedospasov S. A. Novel lymphotoxin alpha (LTalpha) knockout mice with unperturbed tumor necrosis factor expression: reassessing LTalpha biological functions // *Mol Cell Biol.* – 2006. – T. 26, № 11. – C. 4214-25.
29. Kruglov A. A., Grivennikov S. I., Kuprash D. V., Winsauer C., Prepens S., Seleznik G. M., Eberl G., Littman D. R., Heikenwalder M., Tumanov A. V., Nedospasov S. A. Nonredundant function of soluble LTalpha3 produced by innate lymphoid cells in intestinal homeostasis // *Science.* – 2013. – T. 342, № 6163. – C. 1243-6.
30. Alimzhanov M. B., Kuprash D. V., Kosco-Vilbois M. H., Luz A., Turetskaya R. L., Tarakhovsky A., Rajewsky K., Nedospasov S. A., Pfeffer K. Abnormal development of secondary lymphoid tissues in lymphotoxin beta-deficient mice // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1997. – T. 94, № 17. – C. 9302-7.
31. Koni P. A., Sacca R., Lawton P., Browning J. L., Ruddle N. H., Flavell R. A. Distinct roles in lymphoid organogenesis for lymphotoxins alpha and beta revealed in lymphotoxin beta-deficient mice // *Immunity.* – 1997. – T. 6, № 4. – C. 491-500.
32. Tumanov A., Kuprash D., Lagarkova M., Grivennikov S., Abe K., Shakhov A., Drutskaya L., Stewart C., Chervonsky A., Nedospasov S. Distinct role of surface lymphotoxin expressed by B cells in the organization of secondary lymphoid tissues // *Immunity.* – 2002. – T. 17, № 3. – C. 239-50.
33. Tumanov A. V., Grivennikov S. I., Shakhov A. N., Rybtsov S. A., Koroleva E. P., Takeda J., Nedospasov S. A., Kuprash D. V. Dissecting the role of lymphotoxin in lymphoid organs by conditional targeting // *Immunol Rev.* – 2003. – T. 195. – C. 106-16.
34. Futterer A., Mink K., Luz A., Kosco-Vilbois M. H., Pfeffer K. The lymphotoxin beta receptor controls organogenesis and affinity maturation in peripheral lymphoid tissues // *Immunity.* – 1998. – T. 9, № 1. – C. 59-70.

35. Lucas B., James K. D., Cosway E. J., Parnell S. M., Tumanov A. V., Ware C. F., Jenkinson W. E., Anderson G. Lymphotoxin beta Receptor Controls T Cell Progenitor Entry to the Thymus // *J Immunol.* – 2016. – T. 197, № 7. – C. 2665-72.
36. Scheu S., Alferink J., Potzel T., Barchet W., Kalinke U., Pfeffer K. Targeted disruption of LIGHT causes defects in costimulatory T cell activation and reveals cooperation with lymphotoxin beta in mesenteric lymph node genesis // *J Exp Med.* – 2002. – T. 195, № 12. – C. 1613-24.
37. Marino M. W., Dunn A., Grail D., Inglese M., Noguchi Y., Richards E., Jungbluth A., Wada H., Moore M., Williamson B., Basu S., Old L. J. Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1997. – T. 94, № 15. – C. 8093-8.
38. Pasparakis M., Alexopoulou L., Episkopou V., Kollias G. Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response // *J Exp Med.* – 1996. – T. 184, № 4. – C. 1397-411.
39. Kuprash D. V., Tumanov A. V., Liepinsh D. J., Koroleva E. P., Drutskaya M. S., Kruglov A. A., Shakhov A. N., Southon E., Murphy W. J., Tessarollo L., Grivennikov S. I., Nedospasov S. A. Novel tumor necrosis factor-knockout mice that lack Peyer's patches // *Eur J Immunol.* – 2005. – T. 35, № 5. – C. 1592-600.
40. Korner H., Cook M., Riminton D. S., Lemckert F. A., Hoek R. M., Ledermann B., Kontgen F., Fazekas de St Groth B., Sedgwick J. D. Distinct roles for lymphotoxin-alpha and tumor necrosis factor in organogenesis and spatial organization of lymphoid tissue // *Eur J Immunol.* – 1997. – T. 27, № 10. – C. 2600-9.
41. Grech A. P., Riminton D. S., Gabor M. J., Hardy C. L., Sedgwick J. D., Godfrey D. I. Increased thymic B cells but maintenance of thymic structure, T cell differentiation and negative selection in lymphotoxin-alpha and TNF gene-targeted mice // *Dev Immunol.* – 2000. – T. 8, № 1. – C. 61-74.
42. Kuprash D. V., Alimzhanov M. B., Tumanov A. V., Anderson A. O., Pfeffer K., Nedospasov S. A. TNF and lymphotoxin beta cooperate in the maintenance of secondary lymphoid tissue microarchitecture but not in the development of lymph nodes // *J Immunol.* – 1999. – T. 163, № 12. – C. 6575-80.
43. Kuprash D. V., Alimzhanov M. B., Tumanov A. V., Grivennikov S. I., Shakhov A. N., Drutskaya L. N., Marino M. W., Turetskaya R. L., Anderson A. O., Rajewsky K., Pfeffer K., Nedospasov S. A. Redundancy in tumor necrosis factor (TNF) and lymphotoxin (LT) signaling in vivo: mice with inactivation of the entire TNF/LT locus versus single-knockout mice // *Mol Cell Biol.* – 2002. – T. 22, № 24. – C. 8626-34.
44. Neumann B., Luz A., Pfeffer K., Holzmann B. Defective Peyer's patch organogenesis in mice lacking the 55-kD receptor for tumor necrosis factor // *J Exp Med.* – 1996. – T. 184, № 1. – C. 259-64.
45. Pfeffer K., Matsuyama T., Kundig T. M., Wakeham A., Kishihara K., Shahinian A., Wiegmann K., Ohashi P. S., Kronke M., Mak T. W. Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection // *Cell.* – 1993. – T. 73, № 3. – C. 457-67.
46. Pasparakis M., Alexopoulou L., Grell M., Pfizenmaier K., Bluethmann H., Kollias G. Peyer's patch organogenesis is intact yet formation of B lymphocyte follicles is defective in peripheral lymphoid organs of mice deficient for tumor necrosis factor and its 55-kDa receptor // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1997. – T. 94, № 12. – C. 6319-23.
47. Erickson S. L., de Sauvage F. J., Kikly K., Carver-Moore K., Pitts-Meek S., Gillett N., Sheehan K. C., Schreiber R. D., Goeddel D. V., Moore M. W. Decreased sensitivity to tumour-necrosis factor but normal T-cell development in TNF receptor-2-deficient mice // *Nature.* – 1994. – T. 372, № 6506. – C. 560-3.
48. Matsumoto M., Mariathasan S., Nahm M. H., Baranyay F., Peschon J. J., Chaplin D. D. Role of lymphotoxin and the type I TNF receptor in the formation of germinal centers // *Science.* – 1996. – T. 271, № 5253. – C. 1289-91.

49. Wang Y., Subudhi S. K., Anders R. A., Lo J., Sun Y., Blink S., Wang Y., Wang J., Liu X., Mink K., Degrandi D., Pfeffer K., Fu Y. X. The role of herpesvirus entry mediator as a negative regulator of T cell-mediated responses // *J Clin Invest.* – 2005. – T. 115, № 3. – C. 711-7.
50. Rennert P. D., Browning J. L., Mebius R., Mackay F., Hochman P. S. Surface lymphotoxin alpha/beta complex is required for the development of peripheral lymphoid organs // *J Exp Med.* – 1996. – T. 184, № 5. – C. 1999-2006.
51. Mebius R. E., Rennert P., Weissman I. L. Developing lymph nodes collect CD4+CD3- LTbeta+ cells that can differentiate to APC, NK cells, and follicular cells but not T or B cells // *Immunity.* – 1997. – T. 7, № 4. – C. 493-504.
52. van de Pavert S. A., Olivier B. J., Goverse G., Vondenhoff M. F., Greuter M., Beke P., Kusser K., Hopken U. E., Lipp M., Niederreither K., Blomhoff R., Sitnik K., Agace W. W., Randall T. D., de Jonge W. J., Mebius R. E. Chemokine CXCL13 is essential for lymph node initiation and is induced by retinoic acid and neuronal stimulation // *Nat Immunol.* – 2009. – T. 10, № 11. – C. 1193-9.
53. Luther S. A., Ansel K. M., Cyster J. G. Overlapping roles of CXCL13, interleukin 7 receptor alpha, and CCR7 ligands in lymph node development // *J Exp Med.* – 2003. – T. 197, № 9. – C. 1191-8.
54. Vondenhoff M. F., Greuter M., Goverse G., Elewaut D., Dewint P., Ware C. F., Hoorweg K., Kraal G., Mebius R. E. LTbetaR signaling induces cytokine expression and up-regulates lymphangiogenic factors in lymph node anlagen // *J Immunol.* – 2009. – T. 182, № 9. – C. 5439-45.
55. Veiga-Fernandes H., Coles M. C., Foster K. E., Patel A., Williams A., Natarajan D., Barlow A., Pachnis V., Kioussis D. Tyrosine kinase receptor RET is a key regulator of Peyer's patch organogenesis // *Nature.* – 2007. – T. 446, № 7135. – C. 547-51.
56. Patel A., Harker N., Moreira-Santos L., Ferreira M., Alden K., Timmis J., Foster K., Garefalaki A., Pachnis P., Andrews P., Enomoto H., Milbrandt J., Pachnis V., Coles M. C., Kioussis D., Veiga-Fernandes H. Differential RET signaling pathways drive development of the enteric lymphoid and nervous systems // *Sci Signal.* – 2012. – T. 5, № 235. – C. ra55.
57. Meier D., Bornmann C., Chappaz S., Schmutz S., Otten L. A., Ceredig R., Acha-Orbea H., Finke D. Ectopic lymphoid-organ development occurs through interleukin 7-mediated enhanced survival of lymphoid-tissue-inducer cells // *Immunity.* – 2007. – T. 26, № 5. – C. 643-54.
58. Gogoleva V. S., Kuprash D. V., Grivennikov S. I., Tumanov A. V., Kruglov A. A., Nedospasov S. A. LTalpha, TNF, and ILC3 in Peyer's Patch Organogenesis // *Cells.* – 2022. – T. 11, № 12.
59. van de Pavert S. A., Mebius R. E. New insights into the development of lymphoid tissues // *Nat Rev Immunol.* – 2010. – T. 10, № 9. – C. 664-74.
60. Honda K., Nakano H., Yoshida H., Nishikawa S., Rennert P., Ikuta K., Tamechika M., Yamaguchi K., Fukumoto T., Chiba T., Nishikawa S. I. Molecular basis for hematopoietic/mesenchymal interaction during initiation of Peyer's patch organogenesis // *J Exp Med.* – 2001. – T. 193, № 5. – C. 621-30.
61. Yoshida H., Naito A., Inoue J., Satoh M., Santee-Cooper S. M., Ware C. F., Togawa A., Nishikawa S., Nishikawa S. Different cytokines induce surface lymphotoxin-alpha/beta on IL-7 receptor-alpha cells that differentially engender lymph nodes and Peyer's patches // *Immunity.* – 2002. – T. 17, № 6. – C. 823-33.
62. Aguzzi A., Kranich J., Krautler N. J. Follicular dendritic cells: origin, phenotype, and function in health and disease // *Trends Immunol.* – 2014. – T. 35, № 3. – C. 105-13.
63. Mackay F., Majeau G. R., Lawton P., Hochman P. S., Browning J. L. Lymphotoxin but not tumor necrosis factor functions to maintain splenic architecture and humoral responsiveness in adult mice // *Eur J Immunol.* – 1997. – T. 27, № 8. – C. 2033-42.
64. Chai Q., Onder L., Scandella E., Gil-Cruz C., Perez-Shibayama C., Cupovic J., Danuser R., Sparwasser T., Luther S. A., Thiel V., Rulicke T., Stein J. V., Hehlhans T., Ludewig B. Maturation of lymph node fibroblastic reticular cells from myofibroblastic precursors is critical for antiviral immunity // *Immunity.* – 2013. – T. 38, № 5. – C. 1013-24.

65. Zindl C. L., Kim T. H., Zeng M., Archambault A. S., Grayson M. H., Choi K., Schreiber R. D., Chaplin D. D. The lymphotoxin LTalpha(1)beta(2) controls postnatal and adult spleen marginal sinus vascular structure and function // *Immunity*. – 2009. – Т. 30, № 3. – С. 408-20.
66. Browning J. L., Allaire N., Ngam-Ek A., Notidis E., Hunt J., Perrin S., Fava R. A. Lymphotoxin-beta receptor signaling is required for the homeostatic control of HEV differentiation and function // *Immunity*. – 2005. – Т. 23, № 5. – С. 539-50.
67. Moussion C., Girard J. P. Dendritic cells control lymphocyte entry to lymph nodes through high endothelial venules // *Nature*. – 2011. – Т. 479, № 7374. – С. 542-6.
68. Schaeuble K., Britschgi M. R., Scarpellino L., Favre S., Xu Y., Koroleva E., Lissandrin T. K. A., Link A., Matloubian M., Ware C. F., Nedospasov S. A., Tumanov A. V., Cyster J. G., Luther S. A. Perivascular Fibroblasts of the Developing Spleen Act as LTalpha1beta2-Dependent Precursors of Both T and B Zone Organizer Cells // *Cell Rep*. – 2017. – Т. 21, № 9. – С. 2500-2514.
69. Zhu M., Brown N. K., Fu Y. X. Direct and indirect roles of the LTbetaR pathway in central tolerance induction // *Trends Immunol*. – 2010. – Т. 31, № 9. – С. 325-31.
70. Venanzi E. S., Gray D. H., Benoist C., Mathis D. Lymphotoxin pathway and Aire influences on thymic medullary epithelial cells are unconnected // *J Immunol*. – 2007. – Т. 179, № 9. – С. 5693-700.
71. Seach N., Ueno T., Fletcher A. L., Lowen T., Mattesich M., Engwerda C. R., Scott H. S., Ware C. F., Chidgey A. P., Gray D. H., Boyd R. L. The lymphotoxin pathway regulates Aire-independent expression of ectopic genes and chemokines in thymic stromal cells // *J Immunol*. – 2008. – Т. 180, № 8. – С. 5384-92.
72. Zhu M., Chin R. K., Tumanov A. V., Liu X., Fu Y. X. Lymphotoxin beta receptor is required for the migration and selection of autoreactive T cells in thymic medulla // *J Immunol*. – 2007. – Т. 179, № 12. – С. 8069-75.
73. Liepinsh D. J., Kruglov A. A., Galimov A. R., Shakhov A. N., Shebzukhov Y. V., Kuchmiy A. A., Grivennikov S. I., Tumanov A. V., Drutskaya M. S., Feigenbaum L., Kuprash D. V., Nedospasov S. A. Accelerated thymic atrophy as a result of elevated homeostatic expression of the genes encoded by the TNF/lymphotoxin cytokine locus // *Eur J Immunol*. – 2009. – Т. 39, № 10. – С. 2906-15.
74. Митин А. Н., Друцкая, М.С., Литвина, М.М., Зварцев, Р.В., Комогорова, В.В., Шарова, Н.И., Донецкова, А.Д., Никонова, М.Ф., Недоспасов, С.А., Ярилин, А.А. Исследование Т-клеток вторичных лимфоидных органов мышей со сверхэкспрессией фактора некроза опухолей и лимфотоксина // *Иммунология*. – 2014. – Т. 4.
75. Heikenwalder M., Prinz M., Zeller N., Lang K. S., Junt T., Rossi S., Tumanov A., Schmidt H., Priller J., Flatz L., Rulicke T., Macpherson A. J., Hollander G. A., Nedospasov S. A., Aguzzi A. Overexpression of lymphotoxin in T cells induces fulminant thymic involution // *Am J Pathol*. – 2008. – Т. 172, № 6. – С. 1555-70.
76. Shou Y., Koroleva E., Spencer C. M., Shein S. A., Korchagina A. A., Yusoof K. A., Parthasarathy R., Leadbetter E. A., Akopian A. N., Munoz A. R., Tumanov A. V. Redefining the Role of Lymphotoxin Beta Receptor in the Maintenance of Lymphoid Organs and Immune Cell Homeostasis in Adulthood // *Front Immunol*. – 2021. – Т. 12. – С. 712632.
77. Upadhyay V., Poroyko V., Kim T. J., Devkota S., Fu S., Liu D., Tumanov A. V., Koroleva E. P., Deng L., Nagler C., Chang E. B., Tang H., Fu Y. X. Lymphotoxin regulates commensal responses to enable diet-induced obesity // *Nat Immunol*. – 2012. – Т. 13, № 10. – С. 947-53.
78. Tumanov A. V., Koroleva E. P., Guo X., Wang Y., Kruglov A., Nedospasov S., Fu Y. X. Lymphotoxin controls the IL-22 protection pathway in gut innate lymphoid cells during mucosal pathogen challenge // *Cell Host Microbe*. – 2011. – Т. 10, № 1. – С. 44-53.
79. Zhang Y., Kim T. J., Wroblewska J. A., Tesic V., Upadhyay V., Weichselbaum R. R., Tumanov A. V., Tang H., Guo X., Tang H., Fu Y. X. Type 3 innate lymphoid cell-derived lymphotoxin prevents microbiota-dependent inflammation // *Cell Mol Immunol*. – 2018. – Т. 15, № 7. – С. 697-709.

80. Lim V. Y., Feng X., Miao R., Zehentmeier S., Ewing-Crystal N., Lee M., Tumanov A. V., Oh J. E., Iwasaki A., Wang A., Choi J., Pereira J. P. Mature B cells and mesenchymal stem cells control emergency myelopoiesis // *Life Sci Alliance*. – 2023. – T. 6, № 4.
81. Abe K., Yarovinsky F. O., Murakami T., Shakhov A. N., Tumanov A. V., Ito D., Drutskaya L. N., Pfeffer K., Kuprash D. V., Komschlies K. L., Nedospasov S. A. Distinct contributions of TNF and LT cytokines to the development of dendritic cells in vitro and their recruitment in vivo // *Blood*. – 2003. – T. 101, № 4. – C. 1477-83.
82. Kabashima K., Banks T. A., Ansel K. M., Lu T. T., Ware C. F., Cyster J. G. Intrinsic lymphotoxin-beta receptor requirement for homeostasis of lymphoid tissue dendritic cells // *Immunity*. – 2005. – T. 22, № 4. – C. 439-50.
83. Wang Y. G., Kim K. D., Wang J., Yu P., Fu Y. X. Stimulating lymphotoxin beta receptor on the dendritic cells is critical for their homeostasis and expansion // *J Immunol*. – 2005. – T. 175, № 10. – C. 6997-7002.
84. Lewis K. L., Caton M. L., Bogunovic M., Greter M., Grajkowska L. T., Ng D., Klinakis A., Charo I. F., Jung S., Gommerman J. L., Ivanov, II, Liu K., Merad M., Reizis B. Notch2 receptor signaling controls functional differentiation of dendritic cells in the spleen and intestine // *Immunity*. – 2011. – T. 35, № 5. – C. 780-91.
85. Vanderkerken M., Baptista A. P., De Giovanni M., Fukuyama S., Browaeys R., Scott C. L., Norris P. S., Eberl G., Di Santo J. P., Vivier E., Saeys Y., Hammad H., Cyster J. G., Ware C. F., Tumanov A. V., De Trez C., Lambrecht B. N. ILC3s control splenic cDC homeostasis via lymphotoxin signaling // *J Exp Med*. – 2021. – T. 218, № 5.
86. Guendel F., Kofoed-Branzk M., Gronke K., Tizian C., Witkowski M., Cheng H. W., Heinz G. A., Heinrich F., Durek P., Norris P. S., Ware C. F., Ruedl C., Herold S., Pfeffer K., Hehlhans T., Waisman A., Becher B., Giannou A. D., Brachs S., Ebert K., Tanriver Y., Ludewig B., Mashreghi M. F., Kruglov A. A., Diefenbach A. Group 3 Innate Lymphoid Cells Program a Distinct Subset of IL-22BP-Producing Dendritic Cells Demarcating Solitary Intestinal Lymphoid Tissues // *Immunity*. – 2020. – T. 53, № 5. – C. 1015-1032 e8.
87. Wege A. K., Huber B., Wimmer N., Mannel D. N., Hehlhans T. LTbetaR expression on hematopoietic cells regulates acute inflammation and influences maturation of myeloid subpopulations // *Innate Immun*. – 2014. – T. 20, № 5. – C. 461-70.
88. Riffelmacher T., Giles D. A., Zahner S., Dicker M., Andreyev A. Y., McArdle S., Perez-Jeldres T., van der Gracht E., Murray M. P., Hartmann N., Tumanov A. V., Kronenberg M. Metabolic activation and colitis pathogenesis is prevented by lymphotoxin beta receptor expression in neutrophils // *Mucosal Immunol*. – 2021. – T. 14, № 3. – C. 679-690.
89. Wolf Y., Shemer A., Polonsky M., Gross M., Mildner A., Yona S., David E., Kim K. W., Goldmann T., Amit I., Heikenwalder M., Nedospasov S., Prinz M., Friedman N., Jung S. Autonomous TNF is critical for in vivo monocyte survival in steady state and inflammation // *J Exp Med*. – 2017. – T. 214, № 4. – C. 905-917.
90. Suna S., Sakata Y., Shimizu M., Nakatani D., Usami M., Matsumoto S., Mizuno H., Ozaki K., Takashima S., Takeda H., Tanaka T., Hori M., Sato H. Lymphotoxin-alpha3 mediates monocyte-endothelial interaction by TNFR I/NF-kappaB signaling // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2009. – T. 379, № 2. – C. 374-8.
91. Iizuka K., Chaplin D. D., Wang Y., Wu Q., Pegg L. E., Yokoyama W. M., Fu Y. X. Requirement for membrane lymphotoxin in natural killer cell development // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1999. – T. 96, № 11. – C. 6336-40.
92. Ito D., Back T. C., Shakhov A. N., Wiltrout R. H., Nedospasov S. A. Mice with a targeted mutation in lymphotoxin-alpha exhibit enhanced tumor growth and metastasis: impaired NK cell development and recruitment // *J Immunol*. – 1999. – T. 163, № 5. – C. 2809-15.

93. Kim T. J., Upadhyay V., Kumar V., Lee K. M., Fu Y. X. Innate lymphoid cells facilitate NK cell development through a lymphotoxin-mediated stromal microenvironment // *J Exp Med.* – 2014. – T. 211, № 7. – C. 1421-31.
94. Seregina T. M., Mekshenkov M. I., Turetskaya R. L., Nedospasov S. A. An autocrine growth factor constitutively produced by a human lymphoblastoid B-cell line is serologically related to lymphotoxin (TNF-beta) // *Mol Immunol.* – 1989. – T. 26, № 3. – C. 339-42.
95. Estrov Z., Kurzrock R., Pocsik E., Pathak S., Kantarjian H. M., Zipf T. F., Harris D., Talpaz M., Aggarwal B. B. Lymphotoxin is an autocrine growth factor for Epstein-Barr virus-infected B cell lines // *J Exp Med.* – 1993. – T. 177, № 3. – C. 763-74.
96. Leon B., Ballesteros-Tato A., Browning J. L., Dunn R., Randall T. D., Lund F. E. Regulation of T(H)2 development by CXCR5+ dendritic cells and lymphotoxin-expressing B cells // *Nat Immunol.* – 2012. – T. 13, № 7. – C. 681-90.
97. Upadhyay V., Fu Y. X. Lymphotoxin signalling in immune homeostasis and the control of microorganisms // *Nat Rev Immunol.* – 2013. – T. 13, № 4. – C. 270-9.
98. Koroleva E. P., Fu Y. X., Tumanov A. V. Lymphotoxin in physiology of lymphoid tissues - Implication for antiviral defense // *Cytokine.* – 2018. – T. 101. – C. 39-47.
99. Picarella D. E., Kratz A., Li C. B., Ruddle N. H., Flavell R. A. Insulinitis in transgenic mice expressing tumor necrosis factor beta (lymphotoxin) in the pancreas // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1992. – T. 89, № 21. – C. 10036-40.
100. Kratz A., Campos-Neto A., Hanson M. S., Ruddle N. H. Chronic inflammation caused by lymphotoxin is lymphoid neogenesis // *J Exp Med.* – 1996. – T. 183, № 4. – C. 1461-72.
101. Drayton D. L., Ying X., Lee J., Lesslauer W., Ruddle N. H. Ectopic LT alpha beta directs lymphoid organ neogenesis with concomitant expression of peripheral node addressin and a HEV-restricted sulfotransferase // *J Exp Med.* – 2003. – T. 197, № 9. – C. 1153-63.
102. Lee Y., Chin R. K., Christiansen P., Sun Y., Tumanov A. V., Wang J., Chervonsky A. V., Fu Y. X. Recruitment and activation of naive T cells in the islets by lymphotoxin beta receptor-dependent tertiary lymphoid structure // *Immunity.* – 2006. – T. 25, № 3. – C. 499-509.
103. Mounzer R. H., Svendsen O. S., Baluk P., Bergman C. M., Padera T. P., Wiig H., Jain R. K., McDonald D. M., Ruddle N. H. Lymphotoxin-alpha contributes to lymphangiogenesis // *Blood.* – 2010. – T. 116, № 12. – C. 2173-82.
104. Robak T., Gladalska A., Stepien H. The tumour necrosis factor family of receptors/ligands in the serum of patients with rheumatoid arthritis // *Eur Cytokine Netw.* – 1998. – T. 9, № 2. – C. 145-54.
105. O'Rourke K. P., O'Donoghue G., Adams C., Mulcahy H., Molloy C., Silke C., Molloy M., Shanahan F., O'Gara F. High levels of Lymphotoxin-Beta (LT-Beta) gene expression in rheumatoid arthritis synovium: clinical and cytokine correlations // *Rheumatol Int.* – 2008. – T. 28, № 10. – C. 979-86.
106. Selmaj K., Raine C. S., Cannella B., Brosnan C. F. Identification of lymphotoxin and tumor necrosis factor in multiple sclerosis lesions // *J Clin Invest.* – 1991. – T. 87, № 3. – C. 949-54.
107. Matuszewicz D., Navikas V., Soderstrom M., Xiao B. G., Haglund M., Fredrikson S., Link H. Multiple sclerosis: the proinflammatory cytokines lymphotoxin-alpha and tumour necrosis factor-alpha are upregulated in cerebrospinal fluid mononuclear cells // *J Neuroimmunol.* – 1996. – T. 66, № 1-2. – C. 115-23.
108. Buch M. H., Conaghan P. G., Quinn M. A., Bingham S. J., Veale D., Emery P. True infliximab resistance in rheumatoid arthritis: a role for lymphotoxin alpha? // *Ann Rheum Dis.* – 2004. – T. 63, № 10. – C. 1344-6.
109. Mackay F., Browning J. L., Lawton P., Shah S. A., Comiskey M., Bhan A. K., Mizoguchi E., Terhorst C., Simpson S. J. Both the lymphotoxin and tumor necrosis factor pathways are involved in experimental murine models of colitis // *Gastroenterology.* – 1998. – T. 115, № 6. – C. 1464-75.

110. Dohi T., Rennert P. D., Fujihashi K., Kiyono H., Shirai Y., Kawamura Y. I., Browning J. L., McGhee J. R. Elimination of colonic patches with lymphotoxin beta receptor-Ig prevents Th2 cell-type colitis // *J Immunol.* – 2001. – T. 167, № 5. – C. 2781-90.
111. Ettinger R., Munson S. H., Chao C. C., Vadeboncoeur M., Toma J., McDevitt H. O. A critical role for lymphotoxin-beta receptor in the development of diabetes in nonobese diabetic mice // *J Exp Med.* – 2001. – T. 193, № 11. – C. 1333-40.
112. Shen L., Suresh L., Wu J., Xuan J., Li H., Zhang C., Pankewycz O., Ambrus J. L., Jr. A role for lymphotoxin in primary Sjogren's disease // *J Immunol.* – 2010. – T. 185, № 10. – C. 6355-63.
113. Chiang E. Y., Kolumam G. A., Yu X., Francesco M., Ivelja S., Peng I., Gribling P., Shu J., Lee W. P., Refino C. J., Balazs M., Paler-Martinez A., Nguyen A., Young J., Barck K. H., Carano R. A., Ferrando R., Diehl L., Chatterjea D., Grogan J. L. Targeted depletion of lymphotoxin-alpha-expressing TH1 and TH17 cells inhibits autoimmune disease // *Nat Med.* – 2009. – T. 15, № 7. – C. 766-73.
114. Calmon-Hamaty F., Combe B., Hahne M., Morel J. Lymphotoxin alpha stimulates proliferation and pro-inflammatory cytokine secretion of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts // *Cytokine.* – 2011. – T. 53, № 2. – C. 207-14.
115. Neyt K., Perros F., GeurtsvanKessel C. H., Hammad H., Lambrecht B. N. Tertiary lymphoid organs in infection and autoimmunity // *Trends Immunol.* – 2012. – T. 33, № 6. – C. 297-305.
116. Dieu-Nosjean M. C., Goc J., Giraldo N. A., Sautes-Fridman C., Fridman W. H. Tertiary lymphoid structures in cancer and beyond // *Trends Immunol.* – 2014. – T. 35, № 11. – C. 571-80.
117. Page G., Lebecque S., Miossec P. Anatomic localization of immature and mature dendritic cells in an ectopic lymphoid organ: correlation with selective chemokine expression in rheumatoid synovium // *J Immunol.* – 2002. – T. 168, № 10. – C. 5333-41.
118. Manzo A., Paoletti S., Carulli M., Blades M. C., Barone F., Yanni G., Fitzgerald O., Bresnihan B., Caporali R., Montecucco C., Ugucioni M., Pitzalis C. Systematic microanatomical analysis of CXCL13 and CCL21 in situ production and progressive lymphoid organization in rheumatoid synovitis // *Eur J Immunol.* – 2005. – T. 35, № 5. – C. 1347-59.
119. Barone F., Bombardieri M., Manzo A., Blades M. C., Morgan P. R., Challacombe S. J., Valesini G., Pitzalis C. Association of CXCL13 and CCL21 expression with the progressive organization of lymphoid-like structures in Sjogren's syndrome // *Arthritis Rheum.* – 2005. – T. 52, № 6. – C. 1773-84.
120. Barone F., Bombardieri M., Rosado M. M., Morgan P. R., Challacombe S. J., De Vita S., Carsetti R., Spencer J., Valesini G., Pitzalis C. CXCL13, CCL21, and CXCL12 expression in salivary glands of patients with Sjogren's syndrome and MALT lymphoma: association with reactive and malignant areas of lymphoid organization // *J Immunol.* – 2008. – T. 180, № 7. – C. 5130-40.
121. Truman L. A., Bentley K. L., Ruddle N. H. Lymphotoxin targeted to salivary and lacrimal glands induces tertiary lymphoid organs and cervical lymphadenopathy and reduces tear production // *Eur J Immunol.* – 2020. – T. 50, № 3. – C. 418-425.
122. Serafini B., Rosicarelli B., Magliozzi R., Stigliano E., Aloisi F. Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis // *Brain Pathol.* – 2004. – T. 14, № 2. – C. 164-74.
123. Emu B., Luca D., Offutt C., Grogan J. L., Rojkovich B., Williams M. B., Tang M. T., Xiao J., Lee J. H., Davis J. C. Safety, pharmacokinetics, and biologic activity of pateclizumab, a novel monoclonal antibody targeting lymphotoxin alpha: results of a phase I randomized, placebo-controlled trial // *Arthritis Res Ther.* – 2012. – T. 14, № 1. – C. R6.
124. Kennedy W. P., Simon J. A., Offutt C., Horn P., Herman A., Townsend M. J., Tang M. T., Grogan J. L., Hsieh F., Davis J. C. Efficacy and safety of pateclizumab (anti-lymphotoxin-alpha) compared to adalimumab in rheumatoid arthritis: a head-to-head phase 2 randomized controlled study (The ALTARA Study) // *Arthritis Res Ther.* – 2014. – T. 16, № 5. – C. 467.
125. St Clair E. W., Baer A. N., Wei C., Noaiseh G., Parke A., Coca A., Utset T. O., Genovese M. C., Wallace D. J., McNamara J., Boyle K., Keyes-Elstein L., Browning J. L., Franchimont N., Smith K.,

- Guthridge J. M., Sanz I., James J. A., Autoimmunity Centers of E. Clinical Efficacy and Safety of Baminercept, a Lymphotoxin beta Receptor Fusion Protein, in Primary Sjogren's Syndrome: Results From a Phase II Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial // *Arthritis Rheumatol.* – 2018. – T. 70, № 9. – C. 1470-1480.
126. Walton C., King R., Rechtman L., Kaye W., Leray E., Marrie R. A., Robertson N., La Rocca N., Uitdehaag B., van der Mei I., Wallin M., Helme A., Angood Napier C., Rijke N., Baneke P. Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition // *Mult Scler.* – 2020. – T. 26, № 14. – C. 1816-1821.
127. Baecher-Allan C., Kaskow B. J., Weiner H. L. Multiple Sclerosis: Mechanisms and Immunotherapy // *Neuron.* – 2018. – T. 97, № 4. – C. 742-768.
128. International Multiple Sclerosis Genetics C. Multiple sclerosis genomic map implicates peripheral immune cells and microglia in susceptibility // *Science.* – 2019. – T. 365, № 6460.
129. Alfredsson L., Olsson T. Lifestyle and Environmental Factors in Multiple Sclerosis // *Cold Spring Harb Perspect Med.* – 2019. – T. 9, № 4.
130. Charabati M., Wheeler M. A., Weiner H. L., Quintana F. J. Multiple sclerosis: Neuroimmune crosstalk and therapeutic targeting // *Cell.* – 2023. – T. 186, № 7. – C. 1309-1327.
131. Baranzini S. E., Oksenberg J. R. The Genetics of Multiple Sclerosis: From 0 to 200 in 50 Years // *Trends Genet.* – 2017. – T. 33, № 12. – C. 960-970.
132. Hollenbach J. A., Oksenberg J. R. The immunogenetics of multiple sclerosis: A comprehensive review // *J Autoimmun.* – 2015. – T. 64. – C. 13-25.
133. Bjornevik K., Cortese M., Healy B. C., Kuhle J., Mina M. J., Leng Y., Elledge S. J., Niebuhr D. W., Scher A. I., Munger K. L., Ascherio A. Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis // *Science.* – 2022. – T. 375, № 6578. – C. 296-301.
134. iMSMS C. Gut microbiome of multiple sclerosis patients and paired household healthy controls reveal associations with disease risk and course // *Cell.* – 2022. – T. 185, № 19. – C. 3467-3486 e16.
135. Filippi M., Bar-Or A., Piehl F., Preziosa P., Solari A., Vukusic S., Rocca M. A. Multiple sclerosis // *Nat Rev Dis Primers.* – 2018. – T. 4, № 1. – C. 43.
136. Mahad D. H., Trapp B. D., Lassmann H. Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis // *Lancet Neurol.* – 2015. – T. 14, № 2. – C. 183-93.
137. Dendrou C. A., Fugger L., Friese M. A. Immunopathology of multiple sclerosis // *Nat Rev Immunol.* – 2015. – T. 15, № 9. – C. 545-58.
138. Klineova S., Lublin F. D. Clinical Course of Multiple Sclerosis // *Cold Spring Harb Perspect Med.* – 2018. – T. 8, № 9.
139. Teitelbaum D., Meshorer A., Hirshfeld T., Arnon R., Sela M. Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by a synthetic polypeptide // *Eur J Immunol.* – 1971. – T. 1, № 4. – C. 242-8.
140. Fujino M., Funeshima N., Kitazawa Y., Kimura H., Amemiya H., Suzuki S., Li X. K. Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats by FTY720 treatment // *J Pharmacol Exp Ther.* – 2003. – T. 305, № 1. – C. 70-7.
141. Yednock T. A., Cannon C., Fritz L. C., Sanchez-Madrid F., Steinman L., Karin N. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin // *Nature.* – 1992. – T. 356, № 6364. – C. 63-6.
142. Hart B. A., Gran B., Weissert R. EAE: imperfect but useful models of multiple sclerosis // *Trends Mol Med.* – 2011. – T. 17, № 3. – C. 119-25.
143. Glatigny S., Bettelli E. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) as Animal Models of Multiple Sclerosis (MS) // *Cold Spring Harb Perspect Med.* – 2018. – T. 8, № 11.
144. Rangachari M., Kuchroo V. K. Using EAE to better understand principles of immune function and autoimmune pathology // *J Autoimmun.* – 2013. – T. 45. – C. 31-9.
145. Liu G., Muili K. A., Agashe V. V., Lyons J. A. Unique B cell responses in B cell-dependent and B cell-independent EAE // *Autoimmunity.* – 2012. – T. 45, № 3. – C. 199-209.

146. Rojas O. L., Probstel A. K., Porfilio E. A., Wang A. A., Charabati M., Sun T., Lee D. S. W., Galicia G., Ramaglia V., Ward L. A., Leung L. Y. T., Najafi G., Khaleghi K., Garcillan B., Li A., Besla R., Naouar I., Cao E. Y., Chiaranunt P., Burrows K., Robinson H. G., Allanach J. R., Yam J., Luck H., Campbell D. J., Allman D., Brooks D. G., Tomura M., Baumann R., Zamvil S. S., Bar-Or A., Horwitz M. S., Winer D. A., Mortha A., Mackay F., Prat A., Osborne L. C., Robbins C., Baranzini S. E., Gommerman J. L. Recirculating Intestinal IgA-Producing Cells Regulate Neuroinflammation via IL-10 // *Cell*. – 2019. – Т. 176, № 3. – С. 610-624 e18.
147. Tanaka Y., Arima Y., Higuchi K., Ohki T., Elfeky M., Ota M., Kamimura D., Murakami M. EAE Induction by Passive Transfer of MOG-specific CD4(+) T Cells // *Bio Protoc*. – 2017. – Т. 7, № 13. – С. e2370.
148. Bettelli E., Pagany M., Weiner H. L., Linington C., Sobel R. A., Kuchroo V. K. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis // *J Exp Med*. – 2003. – Т. 197, № 9. – С. 1073-81.
149. Litzenburger T., Fassler R., Bauer J., Lassmann H., Linington C., Wekerle H., Iglesias A. B lymphocytes producing demyelinating autoantibodies: development and function in gene-targeted transgenic mice // *J Exp Med*. – 1998. – Т. 188, № 1. – С. 169-80.
150. Krishnamoorthy G., Lassmann H., Wekerle H., Holz A. Spontaneous optico-spinal encephalomyelitis in a double-transgenic mouse model of autoimmune T cell/B cell cooperation // *J Clin Invest*. – 2006. – Т. 116, № 9. – С. 2385-92.
151. Pollinger B., Krishnamoorthy G., Berer K., Lassmann H., Bosl M. R., Dunn R., Domingues H. S., Holz A., Kurschus F. C., Wekerle H. Spontaneous relapsing-remitting EAE in the SJL/J mouse: MOG-reactive transgenic T cells recruit endogenous MOG-specific B cells // *J Exp Med*. – 2009. – Т. 206, № 6. – С. 1303-16.
152. 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.
153. Molnarfi N., Schulze-Topphoff U., Weber M. S., Patarroyo J. C., Prod'homme T., Varrin-Doyer M., Shetty A., Linington C., Slavin A. J., Hidalgo J., Jenne D. E., Wekerle H., Sobel R. A., Bernard C. C., Shlomchik M. J., Zamvil S. S. MHC class II-dependent B cell APC function is required for induction of CNS autoimmunity independent of myelin-specific antibodies // *J Exp Med*. – 2013. – Т. 210, № 13. – С. 2921-37.
154. Parker Harp C. R., Archambault A. S., Sim J., Ferris S. T., Mikesell R. J., Koni P. A., Shimoda M., Linington C., Russell J. H., Wu G. F. B cell antigen presentation is sufficient to drive neuroinflammation in an animal model of multiple sclerosis // *J Immunol*. – 2015. – Т. 194, № 11. – С. 5077-84.
155. Lanz T. V., Brewer R. C., Ho P. P., Moon J. S., Jude K. M., Fernandez D., Fernandes R. A., Gomez A. M., Nadj G. S., Bartley C. M., Schubert R. D., Hawes I. A., Vazquez S. E., Iyer M., Zuchero J. B., Teegen B., Dunn J. E., Lock C. B., Kipp L. B., Cotham V. C., Ueberheide B. M., Aftab B. T., Anderson M. S., DeRisi J. L., Wilson M. R., Bashford-Rogers R. J. M., Platten M., Garcia K. C., Steinman L., Robinson W. H. Clonally expanded B cells in multiple sclerosis bind EBV EBNA1 and GlialCAM // *Nature*. – 2022. – Т. 603, № 7900. – С. 321-327.
156. Bronge M., Hogelin K. A., Thomas O. G., Ruhrmann S., Carvalho-Queiroz C., Nilsson O. B., Kaiser A., Zeitelhofer M., Holmgren E., Linnerbauer M., Adzemovic M. Z., Hellstrom C., Jelcic I., Liu H., Nilsson P., Hillert J., Brundin L., Fink K., Kockum I., Tengvall K., Martin R., Tegel H., Graslund T., Al Nimer F., Guerreiro-Cacais A. O., Khademi M., Gafvelin G., Olsson T., Gronlund H. Identification of four novel T cell autoantigens and personal autoreactive profiles in multiple sclerosis // *Sci Adv*. – 2022. – Т. 8, № 17. – С. eabn1823.
157. Schafflick D., Xu C. A., Hartlehnert M., Cole M., Schulte-Mecklenbeck A., Lautwein T., Wolbert J., Heming M., Meuth S. G., Kuhlmann T., Gross C. C., Wiendl H., Yosef N., Meyer Zu Horste G. Integrated

- single cell analysis of blood and cerebrospinal fluid leukocytes in multiple sclerosis // *Nat Commun.* – 2020. – T. 11, № 1. – C. 247.
158. Galli E., Hartmann F. J., Schreiner B., Ingelfinger F., Arvaniti E., Diebold M., Mrdjen D., van der Meer F., Krieg C., Nimer F. A., Sanderson N., Stadelmann C., Khademi M., Piehl F., Claassen M., Derfuss T., Olsson T., Becher B. GM-CSF and CXCR4 define a T helper cell signature in multiple sclerosis // *Nat Med.* – 2019. – T. 25, № 8. – C. 1290-1300.
159. Krishnarajah S., Becher B. T(H) Cells and Cytokines in Encephalitogenic Disorders // *Front Immunol.* – 2022. – T. 13. – C. 822919.
160. Jager A., Dardalhon V., Sobel R. A., Bettelli E., Kuchroo V. K. Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes // *J Immunol.* – 2009. – T. 183, № 11. – C. 7169-77.
161. Fletcher J. M., Lalor S. J., Sweeney C. M., Tubridy N., Mills K. H. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis // *Clin Exp Immunol.* – 2010. – T. 162, № 1. – C. 1-11.
162. Sie C., Korn T., Mitsdoerffer M. Th17 cells in central nervous system autoimmunity // *Exp Neurol.* – 2014. – T. 262 Pt A. – C. 18-27.
163. Tuzlak S., Dejean A. S., Iannacone M., Quintana F. J., Waisman A., Ginhoux F., Korn T., Becher B. Repositioning T(H) cell polarization from single cytokines to complex help // *Nat Immunol.* – 2021. – T. 22, № 10. – C. 1210-1217.
164. Codarri L., Gyulveszi G., Tosevski V., Hesske L., Fontana A., Magnenat L., Suter T., Becher B. RORgammat drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation // *Nat Immunol.* – 2011. – T. 12, № 6. – C. 560-7.
165. Komuczki J., Tuzlak S., Friebel E., Hartwig T., Spath S., Rosenstiel P., Waisman A., Opitz L., Oukka M., Schreiner B., Pelczar P., Becher B. Fate-Mapping of GM-CSF Expression Identifies a Discrete Subset of Inflammation-Driving T Helper Cells Regulated by Cytokines IL-23 and IL-1beta // *Immunity.* – 2019. – T. 50, № 5. – C. 1289-1304 e6.
166. Hu D., Notarbartolo S., Croonenborghs T., Patel B., Cialic R., Yang T. H., Aschenbrenner D., Andersson K. M., Gattorno M., Pham M., Kivisakk P., Pierre I. V., Lee Y., Kiani K., Bokarewa M., Tjon E., Pochet N., Sallusto F., Kuchroo V. K., Weiner H. L. Transcriptional signature of human pro-inflammatory T(H)17 cells identifies reduced IL10 gene expression in multiple sclerosis // *Nat Commun.* – 2017. – T. 8, № 1. – C. 1600.
167. Sonar S. A., Lal G. Differentiation and Transmigration of CD4 T Cells in Neuroinflammation and Autoimmunity // *Front Immunol.* – 2017. – T. 8. – C. 1695.
168. Yamazaki T., Yang X. O., Chung Y., Fukunaga A., Nurieva R., Pappu B., Martin-Orozco N., Kang H. S., Ma L., Panopoulos A. D., Craig S., Watowich S. S., Jetten A. M., Tian Q., Dong C. CCR6 regulates the migration of inflammatory and regulatory T cells // *J Immunol.* – 2008. – T. 181, № 12. – C. 8391-401.
169. Greter M., Heppner F. L., Lemos M. P., Odermatt B. M., Goebels N., Laufer T., Noelle R. J., Becher B. Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis // *Nat Med.* – 2005. – T. 11, № 3. – C. 328-34.
170. Mundt S., Mrdjen D., Utz S. G., Greter M., Schreiner B., Becher B. Conventional DCs sample and present myelin antigens in the healthy CNS and allow parenchymal T cell entry to initiate neuroinflammation // *Sci Immunol.* – 2019. – T. 4, № 31.
171. Schlager C., Korner H., Krueger M., Vidoli S., Haberl M., Mielke D., Brylla E., Issekutz T., Cabanas C., Nelson P. J., Ziemssen T., Rohde V., Bechmann I., Lodygin D., Odoardi F., Flugel A. Effector T-cell trafficking between the leptomeninges and the cerebrospinal fluid // *Nature.* – 2016. – T. 530, № 7590. – C. 349-53.
172. Rustenhoven J., Drieu A., Mamuladze T., de Lima K. A., Dykstra T., Wall M., Papadopoulos Z., Kanamori M., Salvador A. F., Baker W., Lemieux M., Da Mesquita S., Cugurra A., Fitzpatrick J., Sviben S., Kossina R., Bayguinov P., Townsend R. R., Zhang Q., Erdmann-Gilmore P., Smirnov I., Lopes M. B.,

- Herz J., Kipnis J. Functional characterization of the dural sinuses as a neuroimmune interface // *Cell*. – 2021. – T. 184, № 4. – C. 1000-1016 e27.
173. Jelcic I., Al Nimer F., Wang J., Lentsch V., Planas R., Jelcic I., Madjovski A., Ruhrmann S., Faigle W., Frauenknecht K., Pinilla C., Santos R., Hammer C., Ortiz Y., Opitz L., Gronlund H., Rogler G., Boyman O., Reynolds R., Lutterotti A., Khademi M., Olsson T., Piehl F., Sospedra M., Martin R. Memory B Cells Activate Brain-Homing, Autoreactive CD4(+) T Cells in Multiple Sclerosis // *Cell*. – 2018. – T. 175, № 1. – C. 85-100 e23.
174. Grigg J. B., Shanmugavadivu A., Regen T., Parkhurst C. N., Ahmed A., Joseph A. M., Mazzucco M., Gronke K., Diefenbach A., Eberl G., Vartanian T., Waisman A., Sonnenberg G. F. Antigen-presenting innate lymphoid cells orchestrate neuroinflammation // *Nature*. – 2021. – T. 600, № 7890. – C. 707-712.
175. Hsu M., Laaker C., Madrid A., Herbath M., Choi Y. H., Sandor M., Fabry Z. Neuroinflammation creates an immune regulatory niche at the meningeal lymphatic vasculature near the cribriform plate // *Nat Immunol.* – 2022. – T. 23, № 4. – C. 581-593.
176. Amorim A., De Feo D., Friebel E., Ingelfinger F., Anderfuhren C. D., Krishnarajah S., Andreadou M., Welsh C. A., Liu Z., Ginhoux F., Greter M., Becher B. IFN γ and GM-CSF control complementary differentiation programs in the monocyte-to-phagocyte transition during neuroinflammation // *Nat Immunol.* – 2022. – T. 23, № 2. – C. 217-228.
177. Ferber I. A., Brocke S., Taylor-Edwards C., Ridgway W., Dinisco C., Steinman L., Dalton D., Fathman C. G. Mice with a disrupted IFN- γ gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) // *J Immunol.* – 1996. – T. 156, № 1. – C. 5-7.
178. Wang Z., Hong J., Sun W., Xu G., Li N., Chen X., Liu A., Xu L., Sun B., Zhang J. Z. Role of IFN- γ in induction of Foxp3 and conversion of CD4⁺ CD25⁻ T cells to CD4⁺ Tregs // *J Clin Invest.* – 2006. – T. 116, № 9. – C. 2434-41.
179. Kebir H., Kreymborg K., Ifergan I., Dodelet-Devillers A., Cayrol R., Bernard M., Giuliani F., Arbour N., Becher B., Prat A. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation // *Nat Med.* – 2007. – T. 13, № 10. – C. 1173-5.
180. Regen T., Isaac S., Amorim A., Nunez N. G., Hauptmann J., Shanmugavadivu A., Klein M., Sankowski R., Mufazalov I. A., Yogev N., Huppert J., Wanke F., Witting M., Grill A., Galvez E. J. C., Nikolaev A., Blanfeld M., Prinz I., Schmitt-Kopplin P., Strowig T., Reinhardt C., Prinz M., Bopp T., Becher B., Ubeda C., Waisman A. IL-17 controls central nervous system autoimmunity through the intestinal microbiome // *Sci Immunol.* – 2021. – T. 6, № 56.
181. Kang Z., Altuntas C. Z., Gulen M. F., Liu C., Giltiy N., Qin H., Liu L., Qian W., Ransohoff R. M., Bergmann C., Stohlman S., Tuohy V. K., Li X. Astrocyte-restricted ablation of interleukin-17-induced Act1-mediated signaling ameliorates autoimmune encephalomyelitis // *Immunity*. – 2010. – T. 32, № 3. – C. 414-25.
182. Kang Z., Wang C., Zepp J., Wu L., Sun K., Zhao J., Chandrasekharan U., DiCorleto P. E., Trapp B. D., Ransohoff R. M., Li X. Act1 mediates IL-17-induced EAE pathogenesis selectively in NG2⁺ glial cells // *Nat Neurosci.* – 2013. – T. 16, № 10. – C. 1401-8.
183. Croxford A. L., Lanzinger M., Hartmann F. J., Schreiner B., Mair F., Pelczar P., Clausen B. E., Jung S., Greter M., Becher B. The Cytokine GM-CSF Drives the Inflammatory Signature of CCR2⁺ Monocytes and Licenses Autoimmunity // *Immunity*. – 2015. – T. 43, № 3. – C. 502-14.
184. Spath S., Komuczki J., Hermann M., Pelczar P., Mair F., Schreiner B., Becher B. Dysregulation of the Cytokine GM-CSF Induces Spontaneous Phagocyte Invasion and Immunopathology in the Central Nervous System // *Immunity*. – 2017. – T. 46, № 2. – C. 245-260.
185. Wheeler M. A., Clark I. C., Tjon E. C., Li Z., Zandee S. E. J., Couturier C. P., Watson B. R., Scalisi G., Alkwaik S., Rothhammer V., Rotem A., Heyman J. A., Thaploo S., Sanmarco L. M., Ragoussis J., Weitz D. A., Petrecca K., Moffitt J. R., Becher B., Antel J. P., Prat A., Quintana F. J. MAFG-driven astrocytes promote CNS inflammation // *Nature*. – 2020. – T. 578, № 7796. – C. 593-599.

186. Mayo L., Cunha A. P., Madi A., Beynon V., Yang Z., Alvarez J. I., Prat A., Sobel R. A., Kobzik L., Lassmann H., Quintana F. J., Weiner H. L. IL-10-dependent Tr1 cells attenuate astrocyte activation and ameliorate chronic central nervous system inflammation // *Brain*. – 2016. – T. 139, № Pt 7. – C. 1939-57.
187. Dombrowski Y., O'Hagan T., Dittmer M., Penalva R., Mayoral S. R., Bankhead P., Fleville S., Eleftheriadis G., Zhao C., Naughton M., Hassan R., Moffat J., Falconer J., Boyd A., Hamilton P., Allen I. V., Kissenpfennig A., Moynagh P. N., Evergren E., Perbal B., Williams A. C., Ingram R. J., Chan J. R., Franklin R. J. M., Fitzgerald D. C. Regulatory T cells promote myelin regeneration in the central nervous system // *Nat Neurosci*. – 2017. – T. 20, № 5. – C. 674-680.
188. Atretkhany K. 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 // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2018. – T. 115, № 51. – C. 13051-13056.
189. Fillatreau S., Sweeney C. H., McGeachy M. J., Gray D., Anderton S. M. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10 // *Nat Immunol*. – 2002. – T. 3, № 10. – C. 944-50.
190. Shen P., Roch T., Lampropoulou V., O'Connor R. A., Stervbo U., Hilgenberg E., Ries S., Dang V. D., Jaimes Y., Daridon C., Li R., JounEAU L., Boudinot P., Wilantri S., Sakwa I., Miyazaki Y., Leech M. D., McPherson R. C., Wirtz S., Neurath M., Hoehlig K., Meinel E., Grutzkau A., Grun J. R., Horn K., Kuhl A. A., Dorner T., Bar-Or A., Kaufmann S. H. E., Anderton S. M., Fillatreau S. IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases // *Nature*. – 2014. – T. 507, № 7492. – C. 366-370.
191. Romme Christensen J., Bornsen L., Hesse D., Krakauer M., Sorensen P. S., Sondergaard H. B., Sellebjerg F. Cellular sources of dysregulated cytokines in relapsing-remitting multiple sclerosis // *J Neuroinflammation*. – 2012. – T. 9. – C. 215.
192. Bar-Or A., Fawaz L., Fan B., Darlington P. J., Rieger A., Ghorayeb C., Calabresi P. A., Waubant E., Hauser S. L., Zhang J., Smith C. H. Abnormal B-cell cytokine responses a trigger of T-cell-mediated disease in MS? // *Ann Neurol*. – 2010. – T. 67, № 4. – C. 452-61.
193. Duddy M., Niino M., Adatia F., Hebert S., Freedman M., Atkins H., Kim H. J., Bar-Or A. Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis // *J Immunol*. – 2007. – T. 178, № 10. – C. 6092-9.
194. Maltby V. E., Lea R. A., Graves M. C., Sanders K. A., Benton M. C., Tajouri L., Scott R. J., Lechner-Scott J. Genome-wide DNA methylation changes in CD19(+) B cells from relapsing-remitting multiple sclerosis patients // *Sci Rep*. – 2018. – T. 8, № 1. – C. 17418.
195. Fernandes Filho J. A., Vedeler C. A., Myhr K. M., Nyland H., Pandey J. P. TNF-alpha and -beta gene polymorphisms in multiple sclerosis: a highly significant role for determinants in the first intron of the TNF-beta gene // *Autoimmunity*. – 2002. – T. 35, № 6. – C. 377-80.
196. Kaufmann M., Evans H., Schaupp A. L., Engler J. B., Kaur G., Willing A., Kursawe N., Schubert C., Attfield K. E., Fugger L., Friese M. A. Identifying CNS-colonizing T cells as potential therapeutic targets to prevent progression of multiple sclerosis // *Med*. – 2021. – T. 2, № 3. – C. 296-312 e8.
197. Ruddle N. H., Bergman C. M., McGrath K. M., Lingenheld E. G., Grunnet M. L., Padula S. J., Clark R. B. An antibody to lymphotoxin and tumor necrosis factor prevents transfer of experimental allergic encephalomyelitis // *J Exp Med*. – 1990. – T. 172, № 4. – C. 1193-200.
198. Suen W. E., Bergman C. M., Hjelmstrom P., Ruddle N. H. A critical role for lymphotoxin in experimental allergic encephalomyelitis // *J Exp Med*. – 1997. – T. 186, № 8. – C. 1233-40.
199. Allie N., Keeton R., Court N., Abel B., Fick L., Vasseur V., Vacher R., Olleros M. L., Drutskaya M. S., Guler R., Nedospasov S. A., Garcia I., Ryffel B., Quesniaux V. F., Jacobs M. Limited role for lymphotoxin alpha in the host immune response to *Mycobacterium tuberculosis* // *J Immunol*. – 2010. – T. 185, № 7. – C. 4292-301.
200. Sean Riminton D., Korner H., Strickland D. H., Lemckert F. A., Pollard J. D., Sedgwick J. D. Challenging cytokine redundancy: inflammatory cell movement and clinical course of experimental

- autoimmune encephalomyelitis are normal in lymphotoxin-deficient, but not tumor necrosis factor-deficient, mice // *J Exp Med.* – 1998. – T. 187, № 9. – C. 1517-28.
201. Frei K., Eugster H. P., Bopst M., Constantinescu C. S., Lavi E., Fontana A. Tumor necrosis factor alpha and lymphotoxin alpha are not required for induction of acute experimental autoimmune encephalomyelitis // *J Exp Med.* – 1997. – T. 185, № 12. – C. 2177-82.
202. Kassiotis G., Kollias G. Uncoupling the proinflammatory from the immunosuppressive properties of tumor necrosis factor (TNF) at the p55 TNF receptor level: implications for pathogenesis and therapy of autoimmune demyelination // *J Exp Med.* – 2001. – T. 193, № 4. – C. 427-34.
203. Kruglov A. A., Lampropoulou V., Fillatreau S., Nedospasov S. A. Pathogenic and protective functions of TNF in neuroinflammation are defined by its expression in T lymphocytes and myeloid cells // *J Immunol.* – 2011. – T. 187, № 11. – C. 5660-70.
204. Eugster H. P., Frei K., Bachmann R., Bluethmann H., Lassmann H., Fontana A. Severity of symptoms and demyelination in MOG-induced EAE depends on TNFR1 // *Eur J Immunol.* – 1999. – T. 29, № 2. – C. 626-32.
205. Suvannavejh G. C., Lee H. O., Padilla J., Dal Canto M. C., Barrett T. A., Miller S. D. Divergent roles for p55 and p75 tumor necrosis factor receptors in the pathogenesis of MOG(35-55)-induced experimental autoimmune encephalomyelitis // *Cell Immunol.* – 2000. – T. 205, № 1. – C. 24-33.
206. Group T. TNF neutralization in MS: results of a randomized, placebo-controlled multicenter study. The Lenercept Multiple Sclerosis Study Group and The University of British Columbia MS/MRI Analysis Group // *Neurology.* – 1999. – T. 53, № 3. – C. 457-65.
207. Zhang H., Podojil J. R., Luo X., Miller S. D. Intrinsic and induced regulation of the age-associated onset of spontaneous experimental autoimmune encephalomyelitis // *J Immunol.* – 2008. – T. 181, № 7. – C. 4638-47.
208. Greter M., Hofmann J., Becher B. Neo-lymphoid aggregates in the adult liver can initiate potent cell-mediated immunity // *PLoS Biol.* – 2009. – T. 7, № 5. – C. e1000109.
209. Gommerman J. L., Giza K., Perper S., Sizing I., Ngam-Ek A., Nickerson-Nutter C., Browning J. L. A role for surface lymphotoxin in experimental autoimmune encephalomyelitis independent of LIGHT // *J Clin Invest.* – 2003. – T. 112, № 5. – C. 755-67.
210. Plant S. R., Iocca H. A., Wang Y., Thrash J. C., O'Connor B. P., Arnett H. A., Fu Y. X., Carson M. J., Ting J. P. Lymphotoxin beta receptor (Lt betaR): dual roles in demyelination and remyelination and successful therapeutic intervention using Lt betaR-Ig protein // *J Neurosci.* – 2007. – T. 27, № 28. – C. 7429-37.
211. Mana P., Linares D., Silva D. G., Fordham S., Scheu S., Pfeiffer K., Staykova M., Bertram E. M. LIGHT (TNFSF14/CD258) is a decisive factor for recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis // *J Immunol.* – 2013. – T. 191, № 1. – C. 154-63.
212. Columba-Cabezas S., Griguoli M., Rosicarelli B., Magliozzi R., Ria F., Serafini B., Aloisi F. Suppression of established experimental autoimmune encephalomyelitis and formation of meningeal lymphoid follicles by lymphotoxin beta receptor-Ig fusion protein // *J Neuroimmunol.* – 2006. – T. 179, № 1-2. – C. 76-86.
213. Pikor N. B., Astarita J. L., Summers-Deluca L., Galicia G., Qu J., Ward L. A., Armstrong S., Dominguez C. X., Malhotra D., Heiden B., Kay R., Castanov V., Touil H., Boon L., O'Connor P., Bar-Or A., Prat A., Ramaglia V., Ludwin S., Turley S. J., Gommerman J. L. Integration of Th17- and Lymphotoxin-Derived Signals Initiates Meningeal-Resident Stromal Cell Remodeling to Propagate Neuroinflammation // *Immunity.* – 2015. – T. 43, № 6. – C. 1160-73.
214. James Bates R. E., Browne E., Schalks R., Jacobs H., Tan L., Parekh P., Magliozzi R., Calabrese M., Mazarakis N. D., Reynolds R. Lymphotoxin-alpha expression in the meninges causes lymphoid tissue formation and neurodegeneration // *Brain.* – 2022. – T. 145, № 12. – C. 4287-4307.
215. Rickert R. C., Roes J., Rajewsky K. B lymphocyte-specific, Cre-mediated mutagenesis in mice // *Nucleic Acids Res.* – 1997. – T. 25, № 6. – C. 1317-8.

216. Gronke K., Kofoed-Nielsen M., Diefenbach A. Isolation and Flow Cytometry Analysis of Innate Lymphoid Cells from the Intestinal Lamina Propria // *Methods Mol Biol.* – 2017. – T. 1559. – C. 255-265.
217. Mufazalov I. A., Waisman A. Isolation of Central Nervous System (CNS) Infiltrating Cells // *Methods Mol Biol.* – 2016. – T. 1304. – C. 73-9.
218. Schmittgen T. D., Livak K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method // *Nat Protoc.* – 2008. – T. 3, № 6. – C. 1101-8.
219. Drize N. I., Drutskaya M. S., Gerasimova L. P., Manakova T. E., Chertkov I. L., Turetskaya R. L., Kuprash D. V., Nedospasov S. A. Changes in the hemopoietic system of mice deficient for tumor necrosis factor or lymphotoxin-alpha // *Bull Exp Biol Med.* – 2000. – T. 130, № 7. – C. 676-8.
220. Yang B. H., Hagemann S., Mamareli P., Lauer U., Hoffmann U., Beckstette M., Fohse L., Prinz I., Pezoldt J., Suerbaum S., Sparwasser T., Hamann A., Floess S., Huehn J., Lochner M. Foxp3(+) T cells expressing RORgammat represent a stable regulatory T-cell effector lineage with enhanced suppressive capacity during intestinal inflammation // *Mucosal Immunol.* – 2016. – T. 9, № 2. – C. 444-57.
221. Kassiotis G., Pasparakis M., Kollias G., Probert L. TNF accelerates the onset but does not alter the incidence and severity of myelin basic protein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis // *Eur J Immunol.* – 1999. – T. 29, № 3. – C. 774-80.
222. Batoulis H., Recks M. S., Holland F. O., Thomalla F., Williams R. O., Kuerten S. Blockade of tumour necrosis factor-alpha in experimental autoimmune encephalomyelitis reveals differential effects on the antigen-specific immune response and central nervous system histopathology // *Clin Exp Immunol.* – 2014. – T. 175, № 1. – C. 41-8.
223. Yamasaki R., Lu H., Butovsky O., Ohno N., Rietsch A. M., Cialic R., Wu P. M., Doykan C. E., Lin J., Cotleur A. C., Kidd G., Zorlu M. M., Sun N., Hu W., Liu L., Lee J. C., Taylor S. E., Uehlein L., Dixon D., Gu J., Floruta C. M., Zhu M., Charo I. F., Weiner H. L., Ransohoff R. M. Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system // *J Exp Med.* – 2014. – T. 211, № 8. – C. 1533-49.
224. Summers-DeLuca L. E., McCarthy D. D., Cosovic B., Ward L. A., Lo C. C., Scheu S., Pfeffer K., Gommerman J. L. Expression of lymphotoxin-alpha on antigen-specific T cells is required for DC function // *J Exp Med.* – 2007. – T. 204, № 5. – C. 1071-81.
225. Kohler R. E., Caon A. C., Willenborg D. O., Clark-Lewis I., McColl S. R. A role for macrophage inflammatory protein-3 alpha/CC chemokine ligand 20 in immune priming during T cell-mediated inflammation of the central nervous system // *J Immunol.* – 2003. – T. 170, № 12. – C. 6298-306.
226. Liston A., Kohler R. E., Townley S., Haylock-Jacobs S., Comerford I., Caon A. C., Webster J., Harrison J. M., Swann J., Clark-Lewis I., Korner H., McColl S. R. Inhibition of CCR6 function reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis via effects on the priming phase of the immune response // *J Immunol.* – 2009. – T. 182, № 5. – C. 3121-30.
227. McWilliam O., Sellebjerg F., Marquart H. V., von Essen M. R. B cells from patients with multiple sclerosis have a pathogenic phenotype and increased LTalpha and TGFbeta1 response // *J Neuroimmunol.* – 2018. – T. 324. – C. 157-164.
228. Stein J., Xu Q., Jackson K. C., Romm E., Wuest S. C., Kosa P., Wu T., Bielekova B. Intrathecal B Cells in MS Have Significantly Greater Lymphangiogenic Potential Compared to B Cells Derived From Non-MS Subjects // *Front Neurol.* – 2018. – T. 9. – C. 554.
229. Galicia G., Boulianne B., Pikor N., Martin A., Gommerman J. L. Secondary B cell receptor diversification is necessary for T cell mediated neuro-inflammation during experimental autoimmune encephalomyelitis // *PLoS One.* – 2013. – T. 8, № 4. – C. e61478.
230. Barr T. A., Shen P., Brown S., Lampropoulou V., Roch T., Lawrie S., Fan B., O'Connor R. A., Anderton S. M., Bar-Or A., Fillatreau S., Gray D. B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6-producing B cells // *J Exp Med.* – 2012. – T. 209, № 5. – C. 1001-10.
231. Wang A., Rojas O., Lee D., Gommerman J. L. Regulation of neuroinflammation by B cells and plasma cells // *Immunol Rev.* – 2021. – T. 299, № 1. – C. 45-60.

232. Etemadi N., Holien J. K., Chau D., Dewson G., Murphy J. M., Alexander W. S., Parker M. W., Silke J., Nachbur U. Lymphotoxin alpha induces apoptosis, necroptosis and inflammatory signals with the same potency as tumour necrosis factor // *FEBS J.* – 2013. – T. 280, № 21. – C. 5283-97.
233. Kruglov A., Drutskaya M., Schlienz D., Gorshkova E., Kurz K., Morawietz L., Nedospasov S. Contrasting contributions of TNF from distinct cellular sources in arthritis // *Ann Rheum Dis.* – 2020. – T. 79, № 11. – C. 1453-1459.
234. Hatfield J. K., Brown M. A. Group 3 innate lymphoid cells accumulate and exhibit disease-induced activation in the meninges in EAE // *Cell Immunol.* – 2015. – T. 297, № 2. – C. 69-79.
235. Efimov G. A., Kruglov A. A., Khlopchatnikova Z. V., Rozov F. N., Mokhonov V. V., Rose-John S., Scheller J., Gordon S., Stacey M., Drutskaya M. S., Tillib S. V., Nedospasov S. A. Cell-type-restricted anti-cytokine therapy: TNF inhibition from one pathogenic source // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2016. – T. 113, № 11. – C. 3006-11.
236. Louveau A., Smirnov I., Keyes T. J., Eccles J. D., Rouhani S. J., Peske J. D., Derecki N. C., Castle D., Mandell J. W., Lee K. S., Harris T. H., Kipnis J. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels // *Nature.* – 2015. – T. 523, № 7560. – C. 337-41.
237. Castellani G., Croese T., Peralta Ramos J. M., Schwartz M. Transforming the understanding of brain immunity // *Science.* – 2023. – T. 380, № 6640. – C. eabo7649.
238. Hiltensperger M., Beltran E., Kant R., Tyystjarvi S., Lepennetier G., Dominguez Moreno H., Bauer I. J., Grassmann S., Jarosch S., Schober K., Buchholz V. R., Kenet S., Gasperi C., Ollinger R., Rad R., Muschwackh A., Sie C., Aly L., Knier B., Garg G., Afzali A. M., Gerdes L. A., Kumpfel T., Franzenburg S., Kawakami N., Hemmer B., Busch D. H., Misgeld T., Dornmair K., Korn T. Skin and gut imprinted helper T cell subsets exhibit distinct functional phenotypes in central nervous system autoimmunity // *Nat Immunol.* – 2021. – T. 22, № 7. – C. 880-892.
239. Brambilla R., Ashbaugh J. J., Magliozzi R., Dellarole A., Karmally S., Szymkowski D. E., Bethea J. R. Inhibition of soluble tumour necrosis factor is therapeutic in experimental autoimmune encephalomyelitis and promotes axon preservation and remyelination // *Brain.* – 2011. – T. 134, № Pt 9. – C. 2736-54.

ПРИЛОЖЕНИЕ

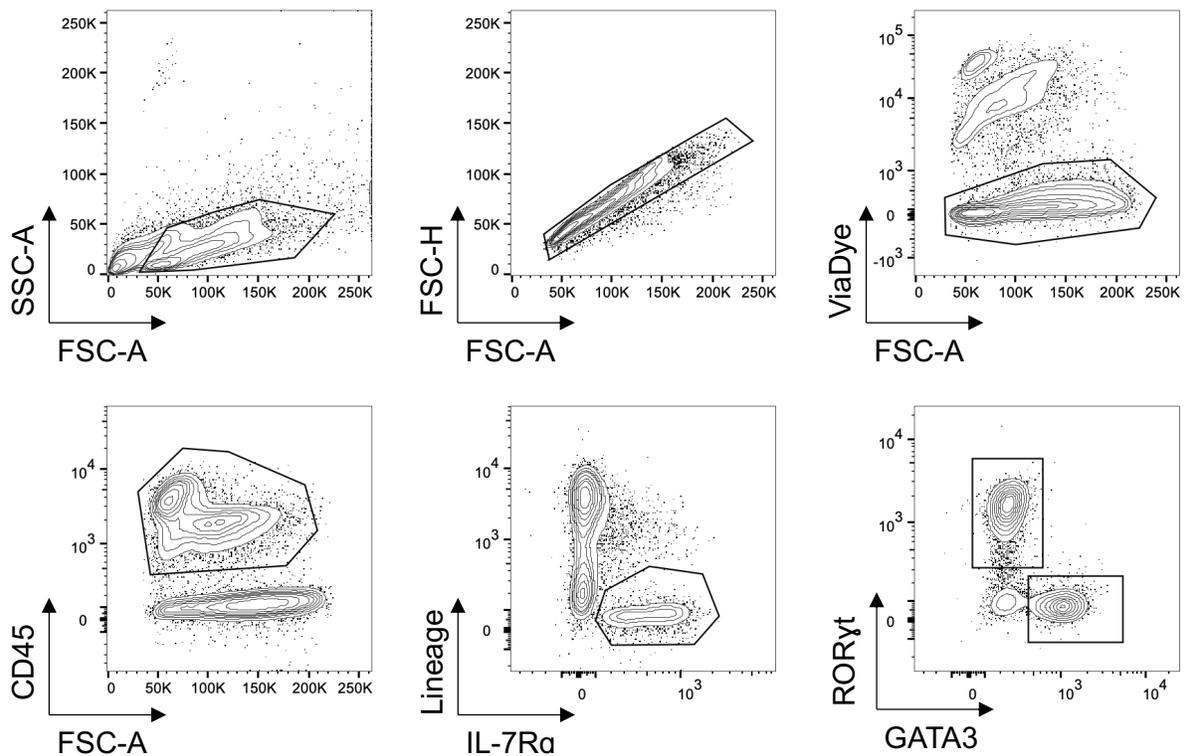
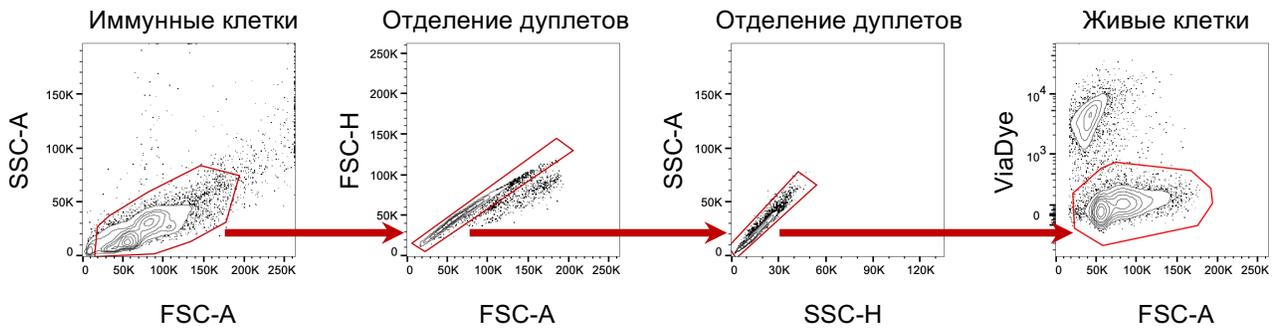
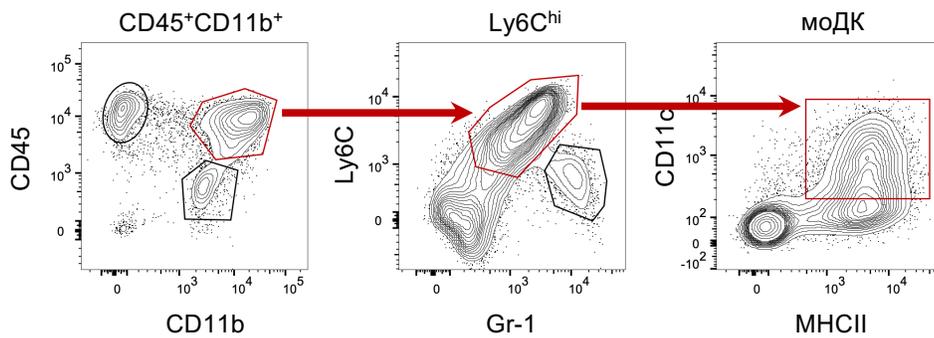


Рисунок 20. Стратегия выделения популяций лимфоцитов врожденного иммунитета типа 3 (ILC3) в собственной пластинке тонкого кишечника с помощью цитофлуориметрического анализа.

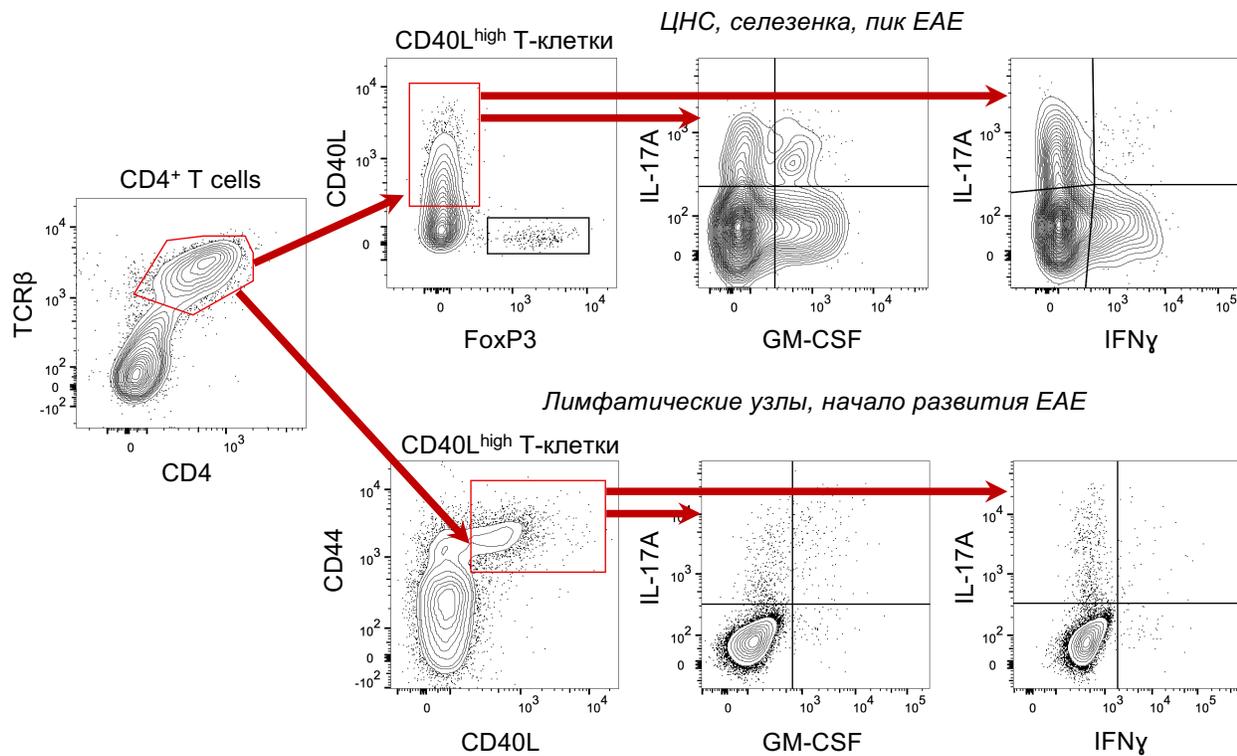
A Предварительное выделение популяций (общее для Б-Ж)



Б *Ex vivo* анализ миелоидных клеток, инфильтрирующих в ЦНС на пике EAE

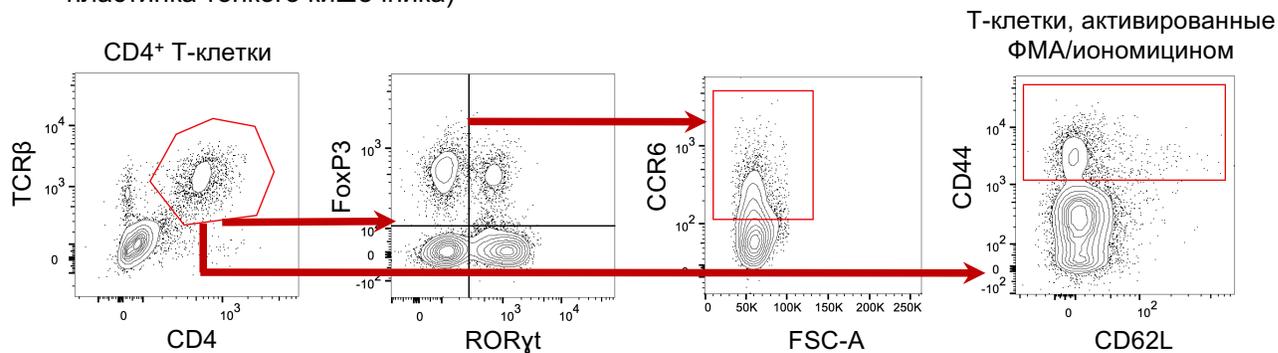


В *Ex vivo* анализ MOG₃₅₋₅₅-специфичных Т-клеток

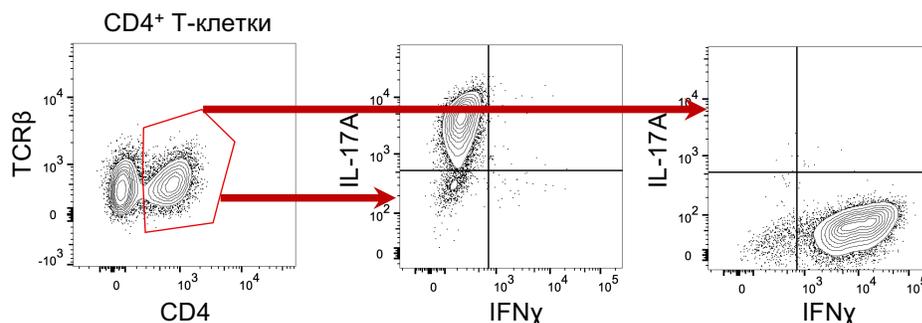


Продолжение на следующей странице

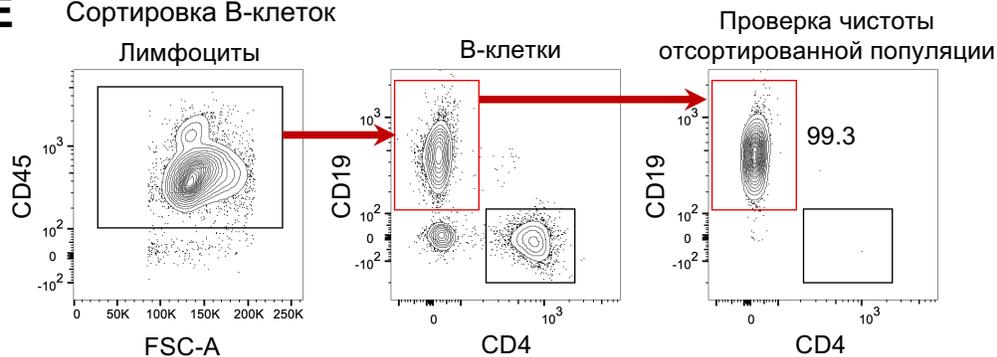
Г *Ex vivo* анализ Т-клеток на пике ЕАЕ и в гомеостазе (ЦНС, селезенка, собственная пластинка тонкого кишечника)



Д *In vitro* анализ поляризации Т-клеток



Е Сортировка В-клеток



Ж *Ex vivo* анализ В-клеток в ЦНС на пике ЕАЕ

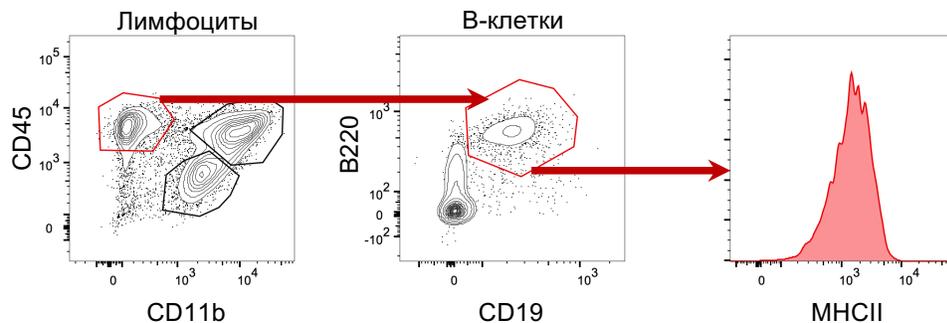


Рисунок 21. Стратегия последовательного выделения популяций иммунных клеток с помощью цитофлуориметрического анализа.