МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА ПО КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ

Д-р Георги Христов Василев

ИМУНОРЕГУЛАТОРНО ДЕЙСТВИЕ НА МЕЗЕНХИМНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ ВЪРХУ Т-ЛИМФОЦИТИ НА ПАЦИЕНТИ С РЕВМАТОИДЕН АРТРИТ

Научни ръководители:

Проф. д-р Доброслав Станимиров Кюркчиев, дмн

Доц. д-р Мариана Иванова Гойчева, дм

Официални рецензенти:

Проф. д-р Искра Петрова Алтънкова, дмн

Проф. д-р Румен Малинов Стоилов, дм

ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД

За присъждане на образователна и научна степен "***Доктор***"

ДОКТОРСКА ПРОГРАМА "ИМУНОЛОГИЯ"

София, 2021

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ:

На кирилица

ААт – Автоантитела

АНА – Антинуклеарни автоантитела

АТ-МСК – Мезенхимни стволови клетки от адипозна тъкан

МСК – Мезенхимни стволови клетки

ПКМК – Периферни кръвни мононуклеарни клетки

РА – Ревматоиден артрит

РФ – Ревматоиден фактор

На латиница

ACPA – Antibodies against Citrulinated Protein Antigens

Anti-CCP – Antibodies against Cyclic Citrulinated Protein

CRP – C Reactive Protein

IFN-γ – Interferon gamma

IL – Interleukin

sVEGF-A – soluble Vascular Endothelial Growth Factor

PGE_2 – Prostaglandin E_2

IDO – Indoleamine 2,3-dioxygenase

FoxP3 – Forkhead box Protein 3

RORc – Related Orphan Receptor C

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

TCR – T helper Cell Receptor

TGF-β – Transforming Growth Factor beta

Th cell – T helper cell

TNF-α – Tumor Necrosis Factor-α

Tregs – T regulatory cells

MHC – Major Histocompatibility Complex

СЪДЪРЖАНИЕ

1. **ВЪВЕДЕНИЕ** ..... - 7 -
2. **ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР** ..... - 8 -
2.1. Мезенхимни стволови клетки ..... - 8 -
2.1.1. Основна характеристика на мезенхимни стволови клетки ..... - 8 -
2.1.2. Локализация и физиологична рола на МСК ..... - 9 -
2.1.3. Механизми на имуносупресия ..... - 10 -
2.1.3.1. Молекули, експресирани от МСК, осъществяващи контакт-обусловено имуносупресивно действие ..... - 11 -
2.1.3.2. Секреторни молекули, продуцирани от МСК, осъществяващи имуносупресивно действие ..... - 12 -
2.1.3.3. Екзозомален транспорт ..... - 30 -
2.2. Ревматоиден артрит ..... - 31 -
2.2.1. Епидемиология. Генетична предиспозиция. Рискови фактори от страна на околната среда ..... - 32 -
2.2.1.1. Генетични фактори, предразполагащи за развитието на РА ..... - 33 -
2.2.1.2. Фактори на околната среда, асоциирани с повишен риск от развитието на РА ..... - 33 -
2.2.2. Клинични прояви ..... - 34 -
2.2.3. Имунопатогенеза на РА ..... - 35 -
2.2.3.1. Посттранслационно модифициране на собствени структури ..... - 35 -
2.2.3.2. Загуба на толеранс към собствени структури ..... - 37 -
2.2.3.3. Автоантитела при РА ..... - 40 -
2.2.4. Ставно засягане и синовиална патология при РА ..... - 44 -
2.2.5. Роля на Th17 и Treg в имунопатогенезата на РА ..... - 49 -
2.2.5.1. Роля на Th17 хелперните лимфоцити при РА ..... - 51 -
2.2.5.2 Tregs и РА ..... - 54 -
Заключение ..... - 58 -
3. **ЦЕЛ И ЗАДАЧИ** ..... - 61 -
4. **МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ** ..... - 63 -
4.1. Изследвани лица и биологичен материал ..... - 63 -
4.1.1. Подбор на пациенти с ревматоиден артрит ..... - 63 -
4.1.1.1. Включващи и изключващи критерии ..... - 64 -
4.1.1.2. Оценка на болестната активност чрез индекса DAS28-CRP ..... - 65 -
4.1.1.3. Демографски и клинико-лабораторни данни ..... - 66 -
4.1.1.4. Информирано съгласие и вземане на биологичен материал от изследваните пациенти с РА ..... - 66 -
4.1.1.5. Източник на кондиционирани среди ..... - 67 -
4.2. Методи за изследване на автоантитела при пациентите с РА ..... - 68 -
4.2.1. Изследване на антитела срещу CCP ..... - 68 -
4.2.2. Изследване на антитела срещу MCV ..... - 70 -
4.2.3. Изследване на ревматоиден фактор (RF-IgM, IgG и IgA) ..... - 72 -
4.2.4. Определяне на АНА чрез ИИФ на HEp-2 клетъчна линия ..... - 72 -
4.3. Изолиране на мононуклеарни клетки от периферна венозна кръв и култивирането им в кондиционирани среди от АТ-МСК при пациенти с РА ..... - 74 -

4.3.1. Изолиране на мононуклеарни клетки от периферна венозна кръв от пациенти с РА ... - 74 -
4.3.2. Култивиране на ПКМК с кондиционирани среди от АТ-МСК и с контролни среди за клетъчно култивиране ... - 75 -
4.4. Флоуцитометрично изследване на Т17 и Tregs хелперни субпопулации след култивирането им с кондиционирани среди на АТ-МСК ... - 78 -
4.4.1. Определяне на процент на Th17 хелперни лимфоцити след култивирането им с кондиционирани среди на АТ-МСК ... - 78 -
4.4.2. Флоуцитометрично определяне на процент на Tregs след култивирането им с кондиционирани среди на АТ-МСК ... - 80 -
4.5. Флоуцитометрично определяне на процента моноцитни клетки след култивирането им с кондиционирани среди на АТ-МСК ... - 83 -
4.6. Определяне на процент на Т-лимфоцити и моноцитни клетки в етап на ранна и късна апоптоза ... - 84 -
4.7. Имуноензимни методи за определяне на нивата на TGF-β, IL-10, TNF-α, IFN-γ, IL-4, L-6, IL-17, IL-21, IL-23, sVEGF-A, PGE_2, IDO, CCL2, CCL5 и IL-8 в кондиционирани среди от АТ-МСК и TGF-β, IL-10, TNF-α, IFN-γ, IL-4, L-6, IL-17, IL-21, IL-23, sVEGF-A, PGE_2, IDO и CCL2 в среди, получени след клетъчно култивиране на ПКМК в кондиционирани среди от АТ-МСК ... - 86 -
4.8. Статистически методи за обработка на получените резултати ... - 89 -
4.8.1. Дескриптивна статистика ... - 89 -
4.8.2. Тест за определяне нормалността на разпределението (Shapiro-Wilk) ... - 89 -
4.8.3. Тестове за свързани извадки (Т-тест на Student и Wilcoxon matched rank test, Multivariate Hotteling`s T squared) ... - 90 -
4.8.4. Факторен анализ (Principal component Analysis) и Partial Least Squares Analysis ... - 90 -
4.8.5. Метод на опорните вектори (Support VectorMachines) ... - 90 -
4.8.6. Дървета за регресия и класификация (CART Decision Trees) ... - 91 -
4.8.7. Клъстерен анализ ... - 91 -
5. **РЕЗУЛТАТИ** ... - 92 -
5.1. Обобщение на демографските, клиничните и имунологичните характеристики на изследваните пациенти ... - 92 -
5.2. Секреция на цитокини, хемокини и други разтворими молекули от АТ-МСК ... - 93 -
5.3. Клетъчно култивиране на периферни мононуклеарни клетки, получени от пациенти с ревматоиден артрит с кондиционирани среди от АТ-МСК ... - 94 -
5.4. Влияние на кондиционираните среди от АТ-МСК върху Th17 хелперните лимфоцити ... - 95 -
5.5. Влияние на кондиционираните среди от АТ-МСК върху $CD4^+CD25^+FoxP3^-$ефекторни лимфоцити (Teff) ... - 97 -
5.6. Промени в пула на Tregs лимфоцити под действието на среди от АТ-МСК ... - 98 -
5.6.1. Влияние на кондиционирани среди от АТ-МСК върху субпопулацията на $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ ... - 98 -
5.6.2. Влияние на кондиционираните среди от АТ-МСК върху субпопулацията на $CD4^+$ $CD25^-FoxP3^+$ ... - 99 -
5.7. Промяна на процентното съотношение между субпопулациите на Tregs и Th17 хелперните лимфоцити под действие на секреторни фактори в средите от АТ-МСК ... - 99 -
5.8. Ефект на секреторни фактори от АТ-МСК върху експресията на HLA-DR върху моноцитни клетки ... - 100 -
5.9. Влияние върху $CD14^+$ моноцитните клетки при култивиране с кондиционирани среди от АТ-МСК ... - 102 -
5.10. Ефект на АТ-МСК върху експресията на костимулаторния комплекс B7 (CD80/CD86). - 104 -

5.11. Влияние на кондиционираните среди от АТ-МСК върху процесите на апоптоза на Т-хелперите и моноцитните клетки ..... - 104 -
5.12. Влияние на среда от АТ-МСК върху цитокиновата секреция от имунни клетки, изолирани от пациенти с ревматоиден артрит ..... - 104 -
5.12.1. Въздействие на разтворимите медиатори, секретирани от АТ-МСК, върху секрецията на TGF-β ..... - 105 -
5.12.2. Влияние на АТ-МСК върху продукцията на IL-10 ..... - 106 -
5.12.3. Влияние на секреторните медиатори, секретирани от АТ-МСК, върху нивата на TNF-α ..... - 107 -
5.12.4. Влияние на разтворимите фактори, продуцирани от АТ-МСК, върху IL-6 ..... - 107 -
5.12.5. Ефекти на разтворимите фактори, секретирани от АТ-МСК, върху секрецията на IL-17 от ПКМК на пациенти с РА ..... - 108 -
5.12.6. Влияние на разтворимите фактори, секретирани от АТ-МСК, върху нивата на IL-21 от ПКМК на пациенти с РА ..... - 109 -
5.12.7. Разлики в секрецията на разтворим sVEGF-A ..... - 109 -
5.12.8. Ефекти на АТ-МСК върху продукцията на PGE_2 ..... - 110 -
5.12.9. Влияние на разтворимите фактори, продуцирани от АТ-МСК, върху IFN-γ, IL-4, IL-23 и IDO ..... - 111 -
5.12.10. Влияние на разтворимите фактори, продуцирани от АТ-МСК, върху CCL2 ..... - 111 -
5.13. Обобщение на получените резултати чрез мултивариатни статистически анализи ..... - 112 -
5.13.1 Обобщение посредством Heatmap ..... - 112 -
5.13.2. Корекция при проверка на множество хипотези ..... - 113 -
5.13.3. Факторен анализ между нивата на изследваните цитокини в културите на ПКМК от пациенти с РА ..... - 115 -
5.13.4. Многофакторни методи за анализ. Метод на опорните вектори. Дървета за класификация и регресия ..... - 118 -
5.13.5. Метод на опорните вектори (SVM) ..... - 119 -
5.13.6. Дървета за класификация и регресия (CART) ..... - 119 -
5.13.7. PLS – дискриминантен анализ ..... - 120 -
6. **ОБСЪЖДАНЕ** ..... - 123 -
6.1. Характеристика на пациентите ..... - 123 -
6.2. Имунологични параметри на изследваните пациенти ..... - 123 -
6.3. Методологични съображения при култивиране на ПКМК от периферна венозна кръв на пациенти с РА със среди от АТ-МСК ..... - 126 -
6.4. Цитокинова секреция на АТ-МСК ..... - 127 -
6.5. Влияние на кондиционирани среди от АТ-МСК върху Th17 хелперните лимфоцити при пациенти с РА ..... - 130 -
6.6. Влияние на кондиционирани среди от АТ-МСК върху $CD4^+CD25^+FoxP3^-$ ефекторните лимфоцити (Teff) при пациенти с РА ..... - 134 -
6.7. Промени в пула на Treg лимфоцити под действието на среди от АТ-МСК при пациенти с РА ..... - 138 -
6.7.1. Влияние на кондиционирани среди от АТ-МСК върху субпопулацията на $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ ..... - 138 -
6.7.2. Влияние на кондиционирани среди от АТ-МСК върху субпопулацията на $CD4^+CD25^-FoxP3^+$ ..... - 143 -
6.8. Ефект на секреторни фактори от АТ-МСК върху експресията на HLA-DR върху моноцитни клетки при пациенти с РА ..... - 146 -
6.9. Влияние върху експресията на B7 комплекса (CD80/CD86) ..... - 150 -

6.10. Влияние върху $CD14^+$ моноцитни клетки при култивиране с кондиционирани среди от АТ-МСК при пациенти с РА ..... - 152 -
6.11. Влияние на средата от АТ-МСК върху цитокиновата секреция от имунокомпетентни клетки, изолирани от пациенти с ревматоиден артрит ..... - 153 -
6.11.1. Въздействие на разтворимите медиатори, секретирани от АТ-МСК, върху секрецията на TGF-β ..... - 153 -
6.11.2. Ефекти на АТ-МСК върху продукцията на IL-10 ..... - 155 -
6.11.3. Влияние на секреторни медиатори, секретирани от АТ-МСК, върху нивата на TNF-α, IL-6, IL-17A, IL-21 ..... - 156 -
6.11.4. Влияние на секреторни медиатори, секретирани от АТ-МСК, върху нивата на sVEGF-A и PGE2 ..... - 158 -
6.11.5. Влияние на секреторни медиатори, секретирани от АТ-МСК върху нивата на IFN-γ, IL-4, IL-23 и IDO ..... - 159 -
6.11.6. Влияние на секреторни медиатори, секретирани от АТ-МСК, върху нивата на CCL2 ..... - 159 -
6.12. Мултивариантни методи за анализ ..... - 160 -
6.13. Заключение ..... - 161 -
7. **ИЗВОДИ** ..... - 162 -
8. **ПРИНОСИ** ..... - 163 -
8.1. Приноси с потвърдителен характер ..... - 163 -
8.2. Приноси с оригинален характер ..... - 163 -
9. **ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ПРОЯВИ** ..... - 164 -
10. **БИБЛИОГРАФИЯ** ..... - 166 -

1. ВЪВЕДЕНИЕ

Последните няколко десетилетия са белязани от значимо увеличаване на автоимунни заболявания, които, обобщено, включват голям брой състояния с разнолики клинични изяви и полиорганни поражения, но с една обща черта – имунна дисрегулация и автодеструкция. Това поражда нуждата от модерни и усъвършенствани терапевтични стратегии. На този фон добре се открояват и мезенхимните стволови клетки (МСК), които наред със способността си за самообновление, пролиферация и диференциация секретират редица разтворими фактори с имуносупресивна функция. МСК от години попадат в полезрението на учените и широко се дискутира потенциалното им приложение като средство за терапевтично повлияване при широк спектър заболявания. Терапевтичната полза от МСК при автоимунните възпалителни заболявания бихме могли да търсим в потенциала им да осъществяват имунна супресия и да регулират имунния отговор.

Откриването и успешното внедряване на нови терапевтични агенти е фасадата, но зад нея се крие строен фундамент от теоретична и експериментална дейност, чиято цел е да разшифрова ключовите аспекти и етапи на едно заболяване и да интерпретира податливостта на определени ключови „точки" към действието на потенциално приложими терапевтични агенти in vitro и/или чрез клинични изпитвания. В този контекст, настоящият дисертационен труд заема междинно положение между фундаменталния научен подход и бъдещите практически терапевтични подходи. Той е ориентиран към in vitro изучаване влиянието на разтворими фактори, налични в среди на мезенхимни стволови клетки върху добре установени таргетни лимфоцитни субпопулации, играещи ключова роля в патогенезата на ревматоидния артрит, каквито са Treg и Th17 хелперните лимфоцити. Също така се проследява и промяната в секрецията на ключови цитокини като TGF-β, IL-10, TNF-α, IFN-γ, IL-6, IL-17, IL-2, IL-23 и други медиатори при наличие на провежданата терапия.

В по-широк план, дисертационният труд представя и един „многоизмерен" поглед към комбинираното и адитивно паракринно действие на множество различни секреторни молекули върху множество от имунни клетки и ефекторни механизми в контекста на имунна дисрегулация, характерна за ревматоидния артрит.

2. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

2.1. Мезенхимни стволови клетки

Регулацията на имунния отговор е сложен, противоречив и многопластов процес, който цели да запази имунологичната хомеостаза и да предотврати евентуалното развитие на автоимунитет. В процеса на имуномодулация роля играят множество имунокомпетентни клетки, като натрупаните данни потвърждават, че в опазването на имунния толеранс в немалка степен са въвлечени и популации от клетки с нелимфоиден произход. Най-важните от тях са мезенхимните стволови клетки, дендритните клетки и миелоидните супресорни клетки.

2.1.1. Основна характеристика на мезенхимни стволови клетки

Мезенхимните стволови клетки се дефинират като популация от недиференцирани мултипотентни фибробласт-подобни клетки. За първи път са били изолирани от костен мозък, където те подпомагат хемопоезата. МСК са клетки с вретеновидна форма, притежаващи способност за самообновяване, пролиферация и клоногенност. Поради факта, че култивирани МСК пролиферират като адхерентни колония-образуващи клетки, в началото те са били характеризирани от Friedenstein като колония-образуващи фибробласти (*Castro-Manrreza et Montesinos, 2015; Caplan, 2017*). МСК притежават способността да се диференцират в клетки от мезодермалния слой – остеобласти, хондроцити, миоцити и адипоцити. Също така те са способни да се диференцират и в клетки от екто- и еднодермалния слой, като например нервни клетки, хепатоцити и др., процес, обозначаван като трансдиференциация (*Kopen et al., 1999, Pittenger, 1999*). МСК могат да бъдат изолирани от множество тъкани, сред които костен мозък, мускулна тъкан, мастна тъкан, дентална пулпа, плацента, сухожилия, синовиална и амниотична течност. Според минималните критерии

на ISCT (International Society of Cellular Therapy), за да се дефинира една клетъчна популация като МСК, е необходима положителна експресия на повърхностните маркери CD105, CD90, CD73, CD44 при не по-малко от 95% от клетките и при поне 95% от тях отрицателна експресия на хемопоетични маркери CD45, CD34, CD11b, CD14, CD19 и HLA-DR (*Dominici et al., 2006*).

2.1.2. Локализация и физиологична рола на МСК

Важно е да се отбележи, че МСК сами по себе си са обект на цитокинова регулация и не проявяват конститутивно пълния си набор от имуносупресивни свойства. В литературата съществуват данни, че МСК придобиват това свойство след подходящо активиране („праймиране"), способствано от определени проинфламаторни цитокини (IFN-γ в комбинация с TNF-α) (*Ren et al., 2008*). Свойствата на имунорегулация и модулация, оказвани от МСК, могат да бъдат разглеждани в контекста на тяхната основна физиологична роля, а именно да подпомагат процеса на хемопоеза, ангиогенеза, както и да участват в процеса на тъканна регенерация и зарастване на рани. В трабекуларната част на костния мозък МСК, заедно с незрелите прогенитори и прекурсори на клетките на основите кръвни редове, обособяват т.нар. *хемопоетична ниша*. Диференцирайки се в перицити, миофибробласти и други стромални клетки, МСК създават подходяща микросреда, благоприятстваща хемопоезата. Същевременно МСК оказват инхибиращ ефект върху някои от хемопоетичните прогениторни клетки, задържайки ги в Go/G1 фаза на клетъчния цикъл, като по този начин съхраняват резерви от недиференцирани хемопоетични прогениторни клетки. Съществуват данни, че МСК предпазват хемопоетичните прогениторни клетки от апоптотични стимули (*Bocelli-Tyndall et al., 2006*). Някои автори съобщават, че терминално диференцираните МСК, като например фибробласти, хондроцити и фибробласт-подобни клетки, под действието на IFN-γ, унаследяват антипролиферативните свойства на своите прогенитори и способността им да потискат Т-клетъчния отговор (*Haniffa et al., 2007*). Подкрепяйки идеята,

че всички стромални клетки, в различни степени на диференциация, проявяват антипролиферативни свойства, Parsonage et al. изказват хипотезата, че стромалните съединителнотъканни клетки поддържат хомеостазата на периферните левкоцитни популации (*Parsonage et al., 2005*).

МСК имат и свои собствени ниши в периваскуларните пространства, очертаващи съдовете на микроциркулацията от външната страна, като по този начин те имат „достъп“ до почти всички тъкани и възможност за комуникация с различни клетъчни типове. МСК експресират редица хемокинови рецептори (CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR7, CCR8, CCR9, CXCR4, CXCR5, CXCR6), което им дава възможността да осъществяват миграция в посока на повишаваща се хемокинова концентрация. Локалното възпаление и тъканната деструкция водят до отделяне на хемокини. Под влиянието на повишения хемокинов градиент, МСК се преселват в местата на тъканна увреда и взаимодействайки си с клетките на имунната система, спомагат за модулацията на възпалителния отговор и тъканната регенерация – чрез директен клетъчен контакт и/или чрез продукцията на разтворими фактори, като например TGF-β и IL-10.

2.1.3. Механизми на имуносупресия

МСК оказват своя имуносупресивен ефект на различни нива посредством взаимодействие с клетки на вродения и придобития имунен отговор (*Jacobs et al., 2013*). Те са слабоимуногенни, поради ниска експресия на класически молекули от MHC клас I и II. Не експресират костимулаторни молекули от B7 комплекса (CD80/CD86), за тях е по характерна експресията на инхибиторните лиганди като Program Cell Death Receptor Ligand-1, 2 (PD-L1/2) или B7-H1. По литературни данни МСК могат да потискат Т-клетъчната активация и пролиферация в присъствието на митогенни или антигенни стимули (*Aggarwal et Pittenger, 2005*). Освен това МСК повлияват косвено Т-клетъчния отговор чрез потискане на диференцияцията на моноцитите в зрели дендритни клетки и намаляване експресията на костимулаторните CD80/86 повърхностни молекули,

което засяга способността им за антигенно представяне (*Sotiropoulou et al., 2006)*. МСК могат да индуцират апоптоза във вече активирани Т-ефекторни клетки. Под тяхно влияние настъпва намаление в продукцията на IFN-γ от Th1 ефекторните лимфоцити, докато за продукцията на IL-4 от Th2 в присъствието на МСК данните са противоречиви (*Ghannam et al., 2013*). МСК спират диференциацията на наивни $CD4^+$ Т-лимфоцити в посока Th17, както и инхибират продукцията на проинфламаторните IL-17, IL-22, IL-6, IFN-γ, TNF-α от диференцирани Th17 клетки (*Luz-Crawford et al., 2013*). МСК стимулират и диференциацията на наивните Т-лимфоцити в посока към регулаторни $CD4^+FoxP3^+$ Tregs. МСК потискат и В-лимфоцитната пролиферация, активация, както и имуноглобулиновата продукция. Наблюдава се стопиране в G_0/G1 фаза от клетъчния цикъл на В-клетките (*Rosado et al., 2015*). Също така е потисната и тяхната миграция поради намалена експресия на хемокинови рецептори – CXCR4, CXCR5, CCR7 (*Corcione et al., 2006*). МСК оказват и негативно влияние върху цитокиновата секреция, цитотоксичността и пролиферацията на NK клетките, като в механизма на супресия се подозира участието на некласическите MHC молекули (HLA-G, експресирани от МСК), както и секрецията на индоламин, диоксигеназа (IDO), TGF-β и простагландин E_2 (PGE_2) (*Castro-Manrreza et al., 2014*).

Имуносупресивните си ефекти МСК осъществяват или чрез директен клетъчен контакт, или посредством паракринното действие на секретирани разтворими фактори.

2.1.3.1. Молекули, експресирани от МСК, осъществяващи контакт-обусловено имуносупресивно действие

За да инициират директен клетъчен контакт с таргетните клетки, МСК експресират някои адхезионни молекули като например VCAM-1, ICAM-1, ICAM-3 и ендоглин (CD105) (*Krampera et al., 2006*). Основен контактен способ, използван от МСК за осъществяване на супресия и имуномодулация, е

взаимодействието между PD-L1 и PD-L2, експресиран върху МСК и PD-1 рецептора върху таргетната клетка. Ефектът на супресия се осъществява чрез потискане на AKT/mTORC и NF-kb сигналните пътища, имащо за последствие потиснат клетъчен протеинов синтез, понижена продукция на активационния IL-2 и увеличена апоптоза. Тъй като широк набор от имунни клетки (Т- и В-лимфоцити, NK клетки и макрофаги), както и ендотелните клетки експресират PD-1, МСК могат да модулират имунния отговор на множество нива. PD-1/PD-L1 взаимодействието освен че потиска оцеляването, пролиферацията и цитокиновата продукция на активираните Т-ефекторни лимфоцити, също така тласка диференциацията на $CD4^+$ Т-лимфоцити в посока към популация от Т-регулаторни лимфоцити, отличаващи се по експресията на транскрипционния фактор FoxP3 и секретиращи IL-10 и TGF-β. Влиянието на МСК върху Tregs от здрави донори е добре установен и изучен процес.

2.1.3.2. Секреторни молекули, продуцирани от МСК, осъществяващи имуносупресивно действие

В контекста на своята физиологична роля МСК могат да секретират повече от 30 различни секреторни молекули: цитокини, хемокини, ектоензими и др. Тяхното действие върху имунните клетки, и в частност върху пула на Т-хелперните лимфоцити, не би могло да бъде характеризирано като еднопосочно. Разнопосочни наблюдения са налични в литаратурата както по отношение на самостоятелното действие на отделните разтворими фактори, така и върху комбинирания им ефект. Ако трябва да бъде обобщено посредством широко възприетия дихотомен подход за класификация на про- и антиинфламаторна активност, въздействието на средите от МСК върху Т-хелперния компартмент би могло да се определи в по-голяма степен като имунорегулаторно. В настоящия литературен обзор са разгледани само някои секреторни фактори с добре установено имунорегулаторно действие.

- **Transforming Growth Factor β (TGF-β)**

Справка в литературата показва, че човешки МСК (чМСК) от различни източници мастна тъкан (*Melief et al., 2013),* костен мозък (*Brunel et al., 2016*), пъпна връв (*Zhou et al., 2011*) конститутивно секретират TGF-β.

TGF-β е цитокин, член от семейството на разтворимите медиатори, включващ TGF-β, активини, инхибини и множество протеини, определени като костно-морфогенни протеини (BMP), растежни и диференциращи фактори.

TGF-β се състои от три изоформи: TGF-β1, TGF-β2 и TGF-β3. Той често е причисляван функционално към групата на имуносупресивните цитокини, каквито са IL-10 и IL-35, но ако трябва коректно да опишем действието му, то е плейотропно и включва регулиране на фундаментални клетъчни функции като пролиферация, диференциация и апоптоза (*Gordon et Blobe, 2008*). Спектърът на функциите му е сравнително широк: влияе на диференциацията и пролиферацията на Т-хелперните лимфоцити, стимулира нео-ангиогенезата и фибробластната пролиферация (*Taylor, 2009*), има важно влияние върху органогенезата, костното ремоделиране, а също така и върху тромбопоезата.

TGF-β се синтезира в неактивна форма, наречена пре-про-TGF-β комплекс. TGF-β е свързан с димерен пропротеин (Latency associated peptide, LAP) и комплексът TGF-β/LAP се свързва с латентен TGF-β-свързващ протеин (LTBP). След секретирането му LTBP/LAP/TGF-β комплексът се свързва с колаген тип 2 и 4, както и с други съединителнотъканни матриксни протеини (*Taylor, 2009; Annes, 2003*). За освобождаването на TGF-β са необходими ниско pH, протеолитични ензими и свързване към клетъчни рецептори (*Nakamura et al., 2004; Chen et al., 2008*). Свързването на TGF-β със съответните му рецептори води до директно фосфорилиране на SMAD2 и SMAD3, образуващи хетеродимери със SMAD4 (*Li et Flavell, 2008; He et al., 2006*). Хетеродимерните комплекси се транслоцират към ядрото, където упражняват своето действие, регулирайки транскрипцията на таргетни за тях гени. Свързването на TGF-β с неговите рецептори води по SMAD независим механизъм за активирането на RAS-extracelluar signal-regulated kinase (Erk), TGF-β-activated kinase-mitogen-activated protein kinase (MAPK), kinase 4-c- Jun N-terminal kinase (TAK-MKK4-JNK), TAK-MKK3/6-p38, Rho-Rac-cdc42 MAPK и phosphatidylinositol 3-kinase

(PI3K)-Akt път (*Derynck et Zhang, 2003; Yu, 2002*), имащи влияние върху метаболизма и дележния цикъл на клетката. TGF-β осъществява имунорегулаторно действие върху широк спектър от имунни клетки.

Един от най-важните аспекти от ефекторното действие на TGF-β върху Т-хелперните лимфоцити е способността му да потиска продукция им на IL-2 (*Brabletz et al., 1993*), механизъм, обясняващ силното антипролиферативно действие на TGF-β *(Ayoub et Yang, 1996*). Инхибиторният ефект на TGF-β е насочен едновременно към блокиране на продукцията на IL-2 и на сигнално-трансдукционните пътища, активирани под действието на IL-2 (*Belladonna et al., 2008*). Друг аспект от антипролиферативното действие на TGF-β върху Т-хелперните лимфоцити е активирането на циклин-зависимите киназни ихибитори (CKIs): p15, p21, p27 и потискането на промотори на клетъчни цикъл като C-myc, cyclin D2, CDK2 и cyclin E (*Hannon et Beach, 1994; Wolfraim et al., 2004, Polyak et al., 1994*). TGF-β потиска Т-клетъчната пролиферация на наивните Т-хелперни клетки по-силно, отколкото тази на активираните Т-хелпери. Това може да бъде обяснено с намалена експресия на TGF-β II рецепторната субединица при активираните $CD4^+$ Т-лимфоцити (*Cottrez et Groux, 2001*). TGF-β оказва влияние върху посоката на диференциация на наивните Т-хелперни лимфоцити посредством потискане на транскрипционните фактори T-bet, STAT1, STAT4 (определящи Th1 фенотип), както и потискане на Th-2 свързаните GATA3 и STAT6.

TGF-β регулира и инхибира съзряването на дендртитните клетки (ДК) (*Strobl et Knapp, 1999*) и потиска процеса на антигенна презентация, осъществяващ се по автокринен механизъм, посредством продукцията на IDO от ДК (*Belladonna et al., 2008*). Въздействието на TGF-β върху макрофаги, посредством активиране на SMAD3, индуцира продукцията на азотен оксид синтетаза и матриксна металпротеиназа 1. Те от своя страна водят до поляризация на макрофагите в толерогенен фенотип по автокринен механизъм. Освен това TGF-β инхибира MyD88, което води до потисната TLR сигнализация (*Werner*

et al., 2000; Naiki et al., 2005). Процесът на фагоцитоза на апоптотични клетки от макрофаги е също механизъм, водещ до индукцията на TGF-β (*Fadok et al., 1998*). TGF-β има супресивно действие върху NK клетки, мастоцити, гранулоцити и също така инхибира $CD8^+$ Т-клетъчната пролиферация (*Laouar et al., 2005*).

TGF-β активира транскрипционните фактори RORc и FoxP3, отговорни за насочване на клетъчната програма в посока Th17 или iTreg фенотип. TGF-β-медиираната FoxP3 експресия се регулира от различни фактори. IL-2/STAT5 сигналът е съществен фактор за iTreg генериране (*Davidson et al., 2007; Yao et al., 2007; Burchill et al., 2007*). Сигналните пътища Notch и TGF-β съвместно регулират експресията на FoxP3 и регулаторната поддръжка на Т-клетките (*Samon et al., 2008*). Ако трябва да обобщим, действието на TGF-β се състои в блокиране на пролиферацията на ефекторните Т-лимфоцити и стесняване на възможностите за активирането на клетки, секретиращи IL-10. Ефектите му са свързани с намалена способност за антигенна презентация и понижена експресия на костимулаторни молекули.

- **IL-10**

Данните, натрупани в литературата, показват липса на дефинитивен консенсунс по отношение на секрецията на IL-10 от чМСК. IL-10 традиционно се разглежда като основополагащ имуносупресивен цитокин, основен участник в процеса на поддържане на имунен толеранс в периферията. Действието на IL-10 е добре описано и познато, поради което ще бъдат представени най-важните и съществени детайли, характеризиращи антиинфламаторното действие на IL-10. IL-10 потиска секрецията от страна на моноцитни и дендритни клетки на редица проинфламаторни цитикини като TNF-α, IL-1, IL-12, IL-8 (*Kyurkchiev, 2014*) и води до увеличение на секрецията на IL-1 и TNF-α рецепторни антагонисти. Най-съществено е действието на IL-10 върху миелоидни клетки, посредством STAT3 медиирана активация, намалява експресията на костимула-

торни молекули, като B7 комплекса, и потискане експресията на кореспондиращия му рецептор – CD28, върху Т-хелперни лимфоцити (*Mann et al., 2007*). Намалената експресия на костимулаторни молекули в съгласие с принципите на трисигналния модел за Т-клетъчна активация може да насочва диференциацията на Т-хелперните лимфоцити в посока Treg, IL-10^{+} Tr1 или да индуцира клонална анергия. Генерирането на имуносупресивни Т-хелперни клетки индуцира толерогенни дендритни и моноцитни клетки, получава се затворен кръг, при който имуносупресивни клетки пораждат други имуносупресивни клетки – процес, известен като инфекциозен толеранс. В този процес IL-10 играе основна роля.

- **IL-6**

Литературните данни потвърждават секрецията на IL-6 от човешки МСК както конститутивно, така и след активация на МСК от цитокини като IL-1β, IFN-γ. IL-6 е цитокин с плейотропно действие, принадележащ към IL-12 суперсемейството. Физиологичното действие на IL-6 се осъществява посредством свързването му с мембранно-експресирания IL-6-рецептор върху клетките и впоследствие взаимодействието с gp130 води до активиране на JAK-STAT сигнално-трансдукционния път. Експресията на IL-6 рецептора е ограничена около сравнително малък кръг клетъчни популации, докато експресията на gp130 е характерна за почти всички соматични клетки. Свързването на IL-6 с неговия разтвроим рецептор и последващото взаимодйствие с gp130, процес, известен като транссигналинг, осигурява възможност IL-6 да осъществява ефекторните си функции. Комбинацията от два вида сигналинг определя донякъде и двойнственото плейотропно действие на IL-6 (*Rose-John, 2012*). Той участва в редица процеси, като регулация на имунния отговор, хематопоеза, процеси на възпаление, апоптоза и онкогенеза. И ако дихотомизацията на традиционно проинфламаторни и имуносупресивни цитокини е удобен похват, добре описващ и систематизиращ голяма част от цитокините и сигналните мо-

лекули, то по отношение на IL-6 и двата типа ефекторни функции са едновременно застъпени. IL-6, заедно с IL-1β и TNF-α са цитокините, индуциращи секрецията на островазовите протеини, които увеличават неутрофилния инфлукс, експресията на адхезионни молекули и поляризирането в моноцити в M1 макрофагиален тип. IL-6 стимулира Т-клетъчната пролиферация и стимулира В-лимфоцитите. Наред с това комбинацията на IL-6 и TGF-β индуцира експресията на Rorc и по този начин насочва диференциацията на наивните хелперни лимфоцити в посока Th17 фенотип (*Tanaka, 2013*) От друга страна, съгласно натрупаните в литературата данни, IL-6 може да потиска секрецията на IL-1β, TNF-α и IFN-γ и да индуцира секрецията на IL-10 и разтворим рецептор за TNF-α.

По отношение действието на IL-6 върху миелоидни клетки, едно от най-важните действия на IL-6 е STAT3-зависимата индукция на секрецията на IL-10 (*Niemand et al., 2003*). Автокринният ефект на IL-10 е свързан с потискане на диференциацията на моноцити в дендритни клетки и формиране на популация от незрели толерогенни дендритни клетки, секретиращи IL-10, от своя страна свързан с потисната способност за антигенната презентация е понижена експресия на костимулаторни молекули.

- **Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)**

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) е семейство от разтворими фактори, чиято секреция от чМСК е добре установена и описана *(Huber et al., 2006)*. Фамилията на VEGF включва 6 различни изоформи – A, B, C, D, E и placental growth factor (PIGF). Физиологичното действие на тези изоформи е проангиогенно и се осъществява посредством взаимодействието на няколко тирозин-киназни рецептора: VEGFR – 1, 2, 3, и neuropilin (NRP) – 1 и 2. Те се експресират върху ендотелните клетки, ДК, макрофагите и Т-хелперните лимфоцити.

На таблица 1 е показано взаимодействието между различните изоформи на VEGF и кореспондиращите им рецептори.

Таблица 1. Изоформи на VEGF и кореспондиращите им рецептори

Изоформа	**Кореспондиращ рецептор**
VEGF-A	VEGFR-1, VEGFR-2, NRP-1, NRP-2
VEGF-B	VEGFR-1, NRP-1
VEGF-C	VEGFR-2, VEGFR-3
Изоформа	**Кореспондиращ рецептор**
VEGF-D	VEGFR-2, VEGFR-3
VEGF-E	VEGFR-2, NRP-1
PIGF	VEGFR-1, (?)NRP-1

Исторически, откриването и проучването на VEGF семейството се случва в контекста на изучаването на секреторните фактори, продуцирани от различни солидни тумори, водещи до активиране на процеса на неоангиогенеза (*Senger et al., 1983*).

Наличните на този етап данни еднозначно демонстрират, че VEGF може да въздейства върху широк набор имунни клетки и освен в процеса на ангиогенеза, има лимфангиогенно действие и проявява имунорегулаторен ефект (*Sunderkötter et al., 1994*). VEGF регулира апоптозата и оцеляването на хемопоетичните прогениторни клетки. Добре описана е способността на VEGF да потиска узряването на миелоидните клетки. Освен това притежава способността да осъществява „претимичен ефект" върху незрелите Т-клетки, напускащи костния мозък (*Ohm em Carbone, 2001*).

Действието на този растежен фактор върху компартмента от Т-лимфоцитите е плейотропно. Експерименталните данни от приложението на тирозинкиназния инхибитор Sunitinib, блокиращ сигнално-трансдукционния път на VEGFR – 1, 2 и 3, демонстрират намалена експресия на транскрипционния фактор FoxP3 и намалена продукция на IL-10, както и редукция в повърхностната експресия на PD-1 и CTLA-4 върху Т-лимфоцитите (*Le Tourneau et al., 2007*; *Voron et al., 2015*). Ефектът му благоприятства диференциацията в посока към

Th1, както и секрецията на IFN-γ. Voron et al. установяват, че под действието на sVEGF-A се увеличава повърхностната експресия на инхибиторните молекули PD-1, CTLA-4, Tim-3 и Lag-3 върху $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцити, посредством VEGFR2-зависимо активиране на PLCγ-калциневрин-NFAT пътя (*Voron et al., 2015*). Редица проучвания, фокусирани върху туморната имунобиология, демонстрират силната корелация между нивата на разтворимия VEGF и процента на наличните Tregs в туморното микрообкръжение при различни солидни тумори (*Vitale et al., 2010*). Suzuki et al. доказват, че VEGFR2 и neuropilin-1 са силно експресирани върху $FoxP3^+$ Tregs и neuropilin-1 действа като корецептор, многократно увеличаващ свързващия афинитет на рецепторния комплекс (*Soker et al., 1998*). Активирането посредством PLCγ-калциневрин-NFAT пътя усилва имуносупресивния потенциал и пролиферативната способност на Tregs *(Soker et al., 1998; Suzuki et al., 2009*). От друга страна, приложението на Sunitinib при пациенти с бъбречен карцином и на моноклонално атнитяло срещу VEGF (Bevacizumab) при карцином на дебелото черво показва редукция в броя на Tregs (*Ozao-Choy et al., 2009, Terme et al., 2012*). sVEGF-A освен това оказва потискащо влияние върху цитотоксичните свойства на $CD8^+$ Т-лимфоцитите.

Освен директното имуносупресивно действие върху Т-хелперните лимфоцити, VEGF осъществява и косвена имуносупресия чрез генериране на толерогенни MDSC (Myeloid-derived suppressor cells). Известни са две основни популации на MDSC: моноцитна MDSCs (M-MDSC) и полиморфонуклеарни MDSCs (PMN-MDSC). Механизмите, чрез които MDSC предизвикват имуносупресивни ефекти, могат да бъдат групирани в четири класа: изчерпване на хранителните вещества; генериране на оксидативен стрес; влияние върху миграцията на лимфоцитите; генериране на Tregs (*Gabrilovich et al., 2012*). Активирането на VEGFR2, експресиран върху миелоидни клетки, води до JAK/STAT3-зависим стоп в матурацията и насочване в посока толерогенен фе-

нетоп и характерната за MDSC експресия на $Gr1^+CD11b^+$ повърхностни маркери. Един от основните имуносупресивни механизми, характерни за MDSC, е продукцията на TGF-β (*Huang et al., 2006*).

Интерес представлява инхибиторното действие на sVEGF-A върху узряването и активацията на ДК. Основно в механизмите на индуциране на толерегенни ДК е въвлечена sVEGF-A изоформата, действаща върху VEGFR-1, VEGFR-2, NRP-1, NRP-2 рецепторите (*Soker et al., 1998*). VEGF индуцира стоп в узряването на незрелите ДК и в активацията и антигенното представяне посредством VEGFR-1 зависимо инхибиране на NF-kB пътя. Под действието на sVEGF-A се увеличава продукцията на имуносупресивния ензим IDO от дендритните клетки (*Marti et al., 2014*).

- **Простагландин E_2 (PGE_2)**

PGE_2 е ейкозаноид, продукт на ензимното оксигениране на арахидоновата киселина от ензимите циклооксигеназа 1 и 2 (COX 1 и 2). Биосинтезът на PGE_2 се определя от COX 1 и COX 2, като експресията на COX 1 е конститутивна, т.е. постоянна, и не се влияе, докато експресията на COX 2 се повишава под действието на проинфламаторни медиатори като IL-1β и TNF-α (*Smith et al., 1996*). Физиологичната роля на повечето медиатори от простагландиновото семейство по-често е проинфламаторна, неразривно свързана с началните фази на възпалението: вазодилататативна и увеличаваща съдовия пермеабилитет. PGE_2 притежава редица антиинфламаторни и имуномодулаторни свойства (*Chan and Moore, 2010; Fabricius et al., 2009*) и е идентифициран от учените Aggarwal и Pittenger (*Aggarwal et Pittenger, 2005*) като медиатор с ключово действие в комуникацията между чМСК и различни имунокомпетнтни клетки. PGE_2 осъществествява своето биологично действие посредством свързване със съответните рецептори: EP1, EP2, EP3 и EP4 (*Harris et al., 2002*). Действието на PGE_2, подобно на много други цитокини и разтворими медиатори, е плейотропно, т.е. може да бъде както проинфламаторно, така и антиинфламаторно, в зависимост от контекста или от съответните рецептори, експресирани

от дадена клетъчна субпопулация. Редица публикации в литературата ясно показват способността му да регулира Th17 клетъчната диференциация чрез свързването с EP2/EP4, с последващо увеличение на вътреклетъчния cAMP и реализиране на проинфламаторно действие (*Boniface et al., 2009).* Що се отнася до имуносупресивния ефект на PGE_2, добре описан в литературата, от значение е способността му да потиска продукцията на INF-γ и да увеличава продукцията на IL-4, IL-5 и IL-10, както и да инхибира диференциацията на наивни Т-хелпери в посока Th1 (*Kanan et Chain, 2006*). Относно влиянието на PGE_2 върху В-клетките, свързването с EP2/EP4 е механизъм, индуциращ превключване на имуноглобулиновия клас в посока IgE или IgG1 (*Fedyk and Phipps, 1996*). В допълнение, PGE_2 има инхибиторен ефект върху антигенното представяне на ДК и макрофагите, посредством повишена секреция на IL-10 и потискане секрецията на IL-12p70, TNF-α и IL-1β [37, 38]. В допълнение към това, чМСК конститутивно експресират PGE_2 като това представлява автокринен механизъм, чрез който те регулират своята пролиферативна способност по cAMP-зависим механизъм (*Kleiveland et al., 2008*). При клетъчно кокултивиране на човешки ПКМК и чМСК (без съвпадение по алелите на MHC) се откриват повишени секреторни нива IL-6, IL-8, PGE_2 и VEGF от страна на чМСК. Най-голямо е повишението на PGE_2, което е приблизително десетократно.

Доказано е, че селективното инхибиране на PGE_2 води до възстановяване на Т-клетъчната пролиферация (*Kuci et al., 2013*). Паракринното влиянието на PGE_2, продуциран от МСК, комбинирано с контактно-клетъчни взаимодействия (Notch сигнален път) между чМСК и дендритните клетки води до индуциране на толерогенен фенотип, свързан с понижаване на експресията на CD40, CD80, CD86 и HLA-DR върху дендритните клетки (*Li et al., 2008; Zhang et al., 2004*). В своите експериментални постановки Maggini et al. демонстрират, че имуносупресивният ефект върху М1 поляризирани макрофаги, който се осъществява от разтворими фактори, продуцирани от МСК от костен мозък, може да бъде инхибиран чрез въвеждане на инхибитор на COX-2 (*Maggini et al., 2010*). Освен това те демонстрират, че МСК от костен мозък конститутивно

експресират PGE_2 в концентрации, достатъчни да потиснат продукцията на TNF-α и IL-6 от активирани макрофаги (*Spaggiari et al., 2009*). Kim и Hematti описват нов тип алтернативно активирани макрофаги, получени след кокултивиране с човешки МСК, характеризиращи се с потиснато секретиране на IL-12, IL-6 и TNF-α и увеличена продукция на IL-10 с висока експресия на CD206 (маркер, характерен за толерогенни макрофаги) (*Kim et Hematti, 2009*). И двете публикации акцентират върху ролята на PGE_2 и описаните фенотипни промени в активираните макрофаги (*Kim et Hematti, 2009, Maggini et al., 2010*). В експеримeтални модели на култивиране на човешки моноцити, добити от периферна венозна кръв с чМСК, Spaggiari et al. доказват, че добавянето на GM-CSF и IL-4, което нормално води до диференциация на моноцитните клетки в незрели дендритни клетки, няма такъв ефект под действието на PGE_2 (*Spaggiari et al., 2009*). Кокултивирането на зрели дендритни клетки с чМСК инхибира производството на IL12p70 (*Spaggiari et al., 2009*), като се счита, че отново сред факторите, отговорни за ефекта, важно място заема PGE_2. Факторите от средата, които могат да увеличават експресията на PGE_2 от МСК, са TNF-α и LPS (чрез взаимодействие с TLR-4 и активиране на MyD88 сигналния път). Обсъжда се евентуалното действие и на други TLR агонисти.

- **Индоламин 2,3-диоксигеназа (IDO)**

Съгласно натрупаните данни в литературата, чМСК експресират конститутивно ниски нива на IDO. Експресията му може да се увеличи след подходяща активация на МСК. Добре описано в тази насока е действието на IFN-γ и някои лиганди на Toll-like рецептори върху МСК. По литературни данни МСК от различни източници могат да експресират IDO (*Nauta et al., 2005).* IDO е скоростоопределящият ензим, който катализира разграждането на аминокиселината триптофан до различни триптофанови метаболити и куриренин. Метаболитният път е известен още като куриренинов път, изпълняващ важна имуносупресивна и антибактериална роля. Последствията от триптофановата деплеция и натрупване на междинни метаболитни продукти и куриренин има

важни последствия върху Т-хелперния пул. Води до арест в Т-хелперната пролиферация, индукция на апоптоза при Th2 лимфоцити, понижена експресия на ζ веригата на Т-клетъчния рецепторен комплекс, намалена продукция на IL-10, увеличение на експресията на CTLA-4, изместване на Т-лимфоцитната диференциация в посока Tregs и Tr1 (*Ivanova-Todorova et al., 2009*). Блокирането на действието на IDO чрез специфични инхибитори води до бройни и функционални промени в пула на Treg и изместане в посока Th1 и Th17 тип имунен отговор (*Yang et al., 2009*).

- **Азотен оксид**

Азотният оксид (NO) е комплексен медиатор на възпалението и често разпознаван като освновен механизъм за имуномодулация от страна на МСК (*Sato et al., 2006, Pautz et al.,* 2010). Азотен оксид синтетазата (NOS) е ензим, който катализира продукцията на азотен оксид от L-аргинин. Съществуват три изоформи на ензима: невронална, ендотелна и индуцируема форма (iNOS). Основно индуцируемата форма се екпресира от макрофаги и МСК главно след провъзпалителни стимули (*Knowles et Moncada, 1994*). По литературни данни продукцията на азотен оксид води до редукция на Т-клетъчната пролиферация и намалена фосфорилация на STAT5 в Т-хелперните лимфоцити (*Malik et Yuspa, 2012*). По отношение на имуносупресивната роля на NO се смята, че този механизъм е основен при МСК от миши произход, докато при човешки МСК, съответно култивирани с човешки мононуклеарни клетки, индуцирането на NO не води до супресивен ефект (*Ling et al., 2014*).

- **Аденозин**

Продукцията на извънклетъчен аденозин е още един механизъм, чрез който МСК могат да осъществяват своя имуносупресивен ефект. Тя е свързана с експресията на два ензима – екзонуклеази CD39 и CD73, които катализират превръщането на АТФ в аденозин. Аденозинът осъществява силно имунорегулаторно действие посредством свързването с аденозиновите рецептори A1-A4, обширно екпресирани върху Т-хелперни лимофицити, дендритни клетки и макрофаги *(Mandapathil et al., 2009)*. Аденозинът може да потиска секрецията на IL-12 и TNF-α и да стимулира секрецията на IL-10 от дендритните

клетки *(Huang et al., 2008*). Взаимодействието на аденозина с A_{2A}, аденозиновия рецептор върху активирани Т-хелперни лимфоцити, директно инхибира производството на IL-2, IL-4, INF-γ и TNF-α с деветдесет процента *(Lappas et al., 2005).* В допълнение, той увеличава имуносупресивния потенциал и пролиферативната способност на Treg, а също и насочва в посока диференциация на наивните хелперни лимфоцити към Treg *(Bopp et al., 2009).*

- **Хемоксигеназа (Heme oxygenase)**

Хемоксигеназата (ХО-1) е ензим, участващ в железния метаболизъм (катаболизиращ разграждането на хема до биливердин и свободно желязо). Различават се три ензимни изоформи. ХО-1 притежава антиапоптотични, антиинфламаторни, проангиогенни и имуносупресивни свойства. Експресията на ХО-1 може да се индуцира в отговор на оксидативен стрес или под действието на проинфламаторни цитокини. Продукцията на ХО-1 насочва диференциацията на наивните T_0-лимфоцити в посока TGF-β продуциращи Th3 (*Chabanner et al., 2007*), благоприятстващи имунния толеранс. Mougiakakos et al. посочват, че апликацията на чМСК *in vivo* удължава времето до появата на реакция на отхвърляне на присадката след сърдечни трансплантации при миши модели, докато блокирането на ХО-1 води до противоположен ефект (*Mougiakakos et al., 2011*). В миши линини, с knock-out по гена за ХО-1, се открива намаление на секрецията на растежни и проангиогенни фактори със също добре известен и описан имуносупресивен потенциал: SDF-1, VEGF и HGF (*Zarjou et al., 2011*).

- **Hepatocyte growth factor (HGF)**

HGF е хепатоцитен митоген и функцията му в частност е свързана с процесите на чернодробна регенерация. Освен това HGF е клетъчен растежен фактор, произвеждан от МСК с важна функция в процесите на органогенеза, ангиогенеза, миогенеза и хемопоеза. По литературни данни може да има регенеративни свойства при някои невро-дегенеративни заболявания, като множествена склероза (*Bai et al., 2012*). При миши модели на алогенна трансплантация на хемопоетични стволови клетки прилагането на HGF може да потисне проявите на остра реакция на трансплантата срещу гостоприемника (GVHD)

(*Kuroiwa et al., 2001*). Di Nicola et al. демонстрират, че прилагането на анти-HGF блокиращи антитела намалява инхибиращия ефект на МСК върху алогенната Т-клетъчна пролиферация при изследване на смесена лимфоцитна реакция (Mixed Lymphocyte Reaction – MLR) (*Di Nicola et al., 2002*). Те доказват също, че едновременното прилагане на анти-HGF и анти-TGF-β моноклонални антитела напълно може да блокира инхибицията на Т-клетъчната пролиферация, опосредствана от МСК (*Di Nicola et al., 2002*).

- **Галектиново семейство**

Галектините са клас протеини, принадлежащи към лектиновото семейство, характеризиращи се със способност да свързват β-галактозиди, експресирани върху Т-клетъчната повърхност. По този механизъм осъществяват имуносупресивния си и/или проапоптотичен ефект. Галектин-1 е силно експресиран, както на транскрипционно, така и на протеиново ниво в човешки МСК. Gieseke et al. демонстрират важната роля на галектин-1 за имуномодулаторните функции на МСК. В опитни постановки на смесена лимфоцитна реакция кокултивирането с МСК с knock-out по галектини-1 спрямо МСК без knock-out по същия ген води до възстановяване на продукцията на IFN-γ и пролиферацията на алореактивните Т-клетки (*Gieseke et al., 2010*). В условия на кокултивиране на смесени лимфоцитни култури с човешки МСК се открива сигнификантна редукция в нивата на IFN-γ, TNF-α, IL-2, IL-12 и потискане на Th1, за сметка на благоприятстване на Th2 хелперния фенотип (*Ungerer et al., 2014*). Установява се намалената поляризация в посока Th2 при блокиране на галектин-1 протеиновия синтез при човешки МСК.

- **Leukemia Inhibitory factor (LIF)**

Leukemia Inhibitory factor (LIF) е протеин, подобен на IL-6, който се експресира конститутивно от човешки МСК. Кокултивирането на чМСК с човешки Т-лимфоцити води до седемкратно увеличение на синтеза на LIF. Един от ефектите на LIF е да стимулира диференциацията на наивните Т-хелпери в посока Treg (*Nasef et al., 2008*).

- **TNF-α stimulated gene/protein 6 (TSG-6)**

Друг медиатор с имуносупресивно действие, секретиран от човешки МСК, е TNF-α stimulated gene/protein 6 (TSG-6) (*Romano et al., 2019*). TSG-6 най-общо би могъл да бъде определен като мултифункционален протеин, участващ в процесите на възпаление, формиране на екстрацелуларен матрикс и клетъчна миграция. TSG-6 има добре охарактеризиран силен антиинфламаторен ефект. Един от доказаните механизми, чрез които той се реализира, е посредством свързването на TSG-6 към и съответно блокирането на CD44 (рецептора за хиелуронан), експресиран върху неутрофили. Описаното свързване с CD44 възпрепятства миграцията на неутрофили в ранните етапи на възпалителния процес (*Wisniewski et Vilcek, 1997*). Вземайки предвид ролята на неутрофилите в синовиалното възпаление и образуването на автоантигени чрез освобождаване на неутрофилни екстрацелуларни капани (neutrophil exstracelular traps – NETs), продукцията на TSG-6 от МСК е допълнителен фактор, повлияващ имунопатогенетичните механизми при РА. При миши модели с индуциран миокарден инфаркт, последвалата инфузия на човешки МСК води до успешно редуциране на възпалително-некротичната зона и подобряване на миокардната помпена функция (*Lee et al., 2009*). Сравнявайки ефекта им с човешки МСК с knock-out за TSG-6 гена, Lee et al. недвусмислено демонстрират, че този ефект би могъл да се отдаде на TSG-6 и/или взаимодействието с други цитокинови сигнални пътища. Авторите изтъкват отново способността на TSG-6 да потиска неутрофилния инфлукс в местата на възпаление (*Lee et al., 2009*). В допълнение, TSG-6 може да инхибира процеса на узряване на дендритните клетки чрез потискане експресията на CD80, CD86, МСН клас II и CD11c (*Liu et al., 2014*). Редица автори посочват, че физиологичната роля на TSG-6 е да противодейства на влиянието на TNF-α и IL-1 (*Verma et al., 2009*).

- **sHLA-G**

HLA-G е некласическа молекула, принадлежаща към главния комплекс на тъканната съвместимост. Различават се 7 негови протеинови изоформи: от

HLA-G1 до G4, които са мембранно-свързани, и 3 разтворими изоформи – HLA-G5, G6 и G7 (*Carosella et al., 2008*). HLA-G е експресиран основно върху трофобластни и цитотрофобластни клетки. Ролята му е да потиска NK клетъчната функция и синтеза на IFN-γ посредством свързване с ILT-2, KIR2DL4 и CD94/NKG2A рецептори, спомагайки за запазването на имунен толеранс към хаплоидентичния фетус (*Rouas-Freiss et al., 1997*). От друга страна, добре описано е и имуносупресивното действие на HLA-G молекулите при сърдечни трансплантации (*Lila et al., 2002*).

Спектърът на имуносупресивно и модулаторно действие на различните изоформи на HLA-G не се ограничава само върху NK клетъчната популацация, имуносупресивен ефект има също и върху Т- и В-лимфоцитните популации. Взаимодействието на разтворимия HLA-G5 посредством свързване с ILT-2 и ILT-4, експресирани върху Т-хелперни лимфоцити, индуцира поляризация в посока на Tregs и Th2 (*Fainardi et al., 2010*; *Rouas-Freiss et al., 1997*), както и експанзия на вече налични Tregs (*Selmani et al., 2008*).

Справка в литературата показва, че МСК секретират HLA-G5 *(Selmani et al., 2009)*. Освен това чрез механизъм на трогоцитоза мембранно-свързаните форми на HLA-G могат да се пренасят върху клетъчните повърхности на други имунокомпетентни клетки и това да способства за процеса на инфекциозен толеранс. Секрецията на HLA-G5 корелира с нивата на IL-10, като в експериментални постановки на кокултури на чМСК с ПКМК, блокирането на секрецията на HLA-G5 води до понижена продукция на IL-10. Това би могло да бъде обяснено посредством наличието на положителна обратна връзка между тях (*Selmani et al., 2008*).

- **Хемокинова секреция на МСК**

Хемокиновите молекули се разделят в няколко основни семейства полипептидни молекули. Те са със сравнително малка молекулна маса (7.2-13 kDA) и тяхната функция е свързана с процеса на левкоцитната и лимфоцитната адхезия и хемотаксис. В този аспект физиологичната им роля дава отражение на лимфоцитната миграция и хоминг, възпалението и ангиогенезата. По литературни данни в условията на кокултивиране чМСК секретират коститутивно

множество разтворими хемокини като: CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1α), CCL4 (MIP-1β), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL20 (MIP-3α), CCL26 (eotaxin-3), CXCL1 (GROα), CXCL5, CXCL8 (IL-8), CXCL10 (IP-10), CXCL12 (SDF-1) и CX3CL1 (fractalkine) *(Da Silva Meirelles et al., 2009)*. Посочените хемокинови молекули са отговорни за хемоатрактантното действие и привличане на редица имунокомпентени клетки, като Т- и В-лимфоцити, NK клетки, моноцити и неутрофили, а също и ендотелни прогениторни клетки. В голямата си част секретираните от МСК хемокини не оказват директно имуносупресивно или противоположно на това, проинфламаторно действие. Секрецията на хемокини може да се разглежда като механизъм, насочващ хемотаксиса на имунни клетки. Попадайки в обкръжението на МСК, са подложени на паракринното влияние на чМСК, което в зависимост от микрообкръжението може да бъде както имуносупресивно, така и проинфламаторно. В този смисъл секрецията на хемокинови молекули е допълнителен механизъм, спомагащ имунорегулаторния ефект на чМСК. От друга страна, взаимните влияния между МСК и имунните клетки далеч не са едностранни. Привличайки имунни клетки в своето обкръжение, МСК също стават обект на паракринно действие, а и встъпват в директни контактно-клетъчни взаимодействия с имунните клетки. Както е известно, проинфламаторни цитокини като IFN-γ, TNF-α и IL-1β могат да усилват имуносупресивния потенциал на МСК. Следователно хемокиновата секреция не е механизъм за имуносупресия в тесния смисъл на думата. Изключение правят две хемокинови молекули, налични в относително високи концентрации в кондиционираните среди на МСК, съответно CCL2 (MCP-1) и CCL5 (RANTES). В литературата са добре описани механизмите, чрез които те осъществяват директно имуносупресивно действие върху имунните клетки.

- **CCL2 (MCP-1)**

CC-хемокиновият лиганд 2 (CCL2, или MCP-1), посредством свързването си с CCR2 рецептора играе важна роля във фазите на ранния възпалителен отговор, като основната му функция е да увеличава привличането на миелоидни

клетки. Секретира се от широк спектър от имунокомпетентни клетки, както и от епителни, гладкомускулни клетки и фибробласти (*Rafei et al., 2008*). Ефектите на CCL2 върху имунния отговор са двойнствени – комбинира както активиране на проинфламаторни ефекторни пътища, така и имуносупресивни механизми. Едно от добре описаните действия на CCL2 в имуносупресивно направление е да стимулира диференциацията в посока Th2 хелпери чрез активиране на промотор на гена, контролиращ транскрипцията на IL-4 (*Davis, 2007*), а също така да потиска продукцията на IL-12p70 от антиген-представящи клетки. CCL2 се секретира конститутивно във високи количества от човешки МСК, независимо от техния източник. CCL2 може да повлияе разграждането на информационните РНК, отговорни за транслацията на IL-1 и IL-6 *(Nasef et al., 2006)*. Справка в литературата показва, че под въздействието на CCL2 Т-хелперните лимфоцити стават податливи на FAS-медиирана апоптоза. Също така под действието на CCL2 се потиска имуноглобулиновия синтез посредством инхибиране на фосфорилацията на STAT3 и последващо активиране на транскрипционния фактор PAX5 (*Rafei et al., 2008*). Инхибицията на STAT3 води до инхибиране на диференциацията на Т-хелперни лимфоцити в посока Th17. При експериментални миши модели на автоимунен енцефалит потискането на Th17 и впоследствие намаляването на възпалителните инфилтрати са зависими от продукцията на CCL2 от МСК *(Nasef et al., 2006*). Добавянето на CCL2 блокиращи антитела намалява ефекта на МСК.

- **CCL5/RANTES**

CCL5 или RANTES е друг член на CC-хемокиновото семейство, чиято секреция от МСК е добре описана в литературата. Влияе на миграцията на широк кръг имунни клетки, моноцити, лимфоцити и дендритни клетки. Има силно стимулиращо действие върху неутрофилната активация (*Schall, 1991*) и в този смисъл действието му може да бъде оценено като проинфламаторно. От друга страна, CCL5 модулира действието на Bcl-2 и по този начин индуцира Т-клетъчната апоптоза *(Ramhorst et al., 2004)*. CCL5 притежава способност да потиска навлизането на ефекторните Th1 в паметов фенотип (*Weber et al., 2001*).

- **Матриксни металопротеинази (ММП), или инхибитори на матриксните металопротеинази (ММП)**

Матриксните металопротеинази (ММП) са ензими, чиято функция е да разграждат компонентите на екстрацелуларния матрикс, като фибронектин, ламинин и протеогликани (*Malemud, 2006),* което определя и ключовата им функция в процеса на заравстването на рани и тъканно ремоделиране (*Malemud, 2006*). В допълнение към това ММП могат директно да регулират имунния отговор и клетъчната пролиферация поради способността си да разграждат редица цитокини, хемокини, медиатори на възпалението и техните рецептори *(Parks et al., 2004; Cox et al., 2006; McQuibban, 2000; Itoh et al., 2002*). Имуносупресивната функция на ММП-2 и ММП-9 е добре описана по отношение възпалителното ставно засягане при РА *(Itoh et al., 2002*). МСК секретират разтворими ММП-2 и ММП-9, които разграждат CD25 (алфа-субединицата на високоафинитетния рецептор за IL-2). В своите експериментални постановки Ding et al. демонстрират, че въвеждането на инхибитори на ММП-2 и ММП-9 напълно възстановяват Т-клетъчния пролиферативен потенциал, както и повърхностната експресия на CD25 (*Ding et al., 2009*). В експериментални постановки с миши модели на алогенна трансплантация на панкреас въвеждането на МСК значително намалява реакцията на свръхчувствителност от забавен тип, а въвеждането на инхибитори на ММП-2 и ММП-9 напълно блокира описаното имуносупресивно действие (*Ding et al., 2009*).

От друга страна, МСК секретират и редица тъканни инхибитори на металопротеиназите (ТИМП), като ТИМП-1, 2, 3 и 4. Shen et al. демонстрират, че ТИМП-3, продуциран от миши МСК от костен мозък, регулира пролиферацията и диференцията на хемопоетични стволови клетки в костномозъчната ниша *(Shen et al., 2010; Lozito and Tuan, 2010).*

2.1.3.3. Екзозомален транспорт

Продукцията и освобождаването на екзозомални клетъчни везикули (ЕВ) е допълнителен механизъм, чрез който МСК упражняват модулаторно действие върху имунните клетки. Екзозомалните клетъчни везикули служат за пренасяне основно на транскрипционни фактори, микро-РНК, както и цитокини.

В допълнение на това, микровезикуларния транспорт може да служи и за пренасяне на повърхностно-клетъчни контактни молекули, процес, известен като трогоцитоза. ЕВ могат да упражняват както активиращо, така и регулаторно действие. Повечето от натрупаните експериментални данни на този етап в литературата демонстрират, че ЕВ, секретирани от човешки МСК от различни източници, могат успешно да потискат Т- и В-клетъчната пролиферация *(Blazquez et al., 2014, Conforti et al., 2014)*, да потенцират популацията на Treg *(Zhang et al., 2014)*, да потискат популацията на Th17 *(Favaro et al., 2015)*, да увеличават продукцията на IL-10 *(Del Fattore et al., 2015)* и да индуцират ДК и миелоидни клетки с толерогенен фенотип *(Favaro et al., 2015)*.

Ако трябва да обобщим, на този етап е документирана секрецията на около 30 различни разтворими фактора от страна на МСК, със силно изразено действие върху имунния отговор. Разгледани поотделно, голямата част от факторите са цитокини с плейотропно действие, като например IL-6, но груповият ефект на множеството разтворими фактори в средите на АТ-МСК съгласно натрупаните в литературата данни е асоцииран предимно с имуносупресия и модулация на имунния отговор. Общият им спектър на действие може да бъде сведен до благоприятстване на диференциацията на наивните Т-хелперни лимфоцити в посока регулаторен фенотип, потискане на пролиферацията на активираните ефекторни Т-лимфоцити и насочването им в посока диференциация в регулаторен фенотип, потискане узряването на ДК, потенциране на превръщането на кръвните моноцити в толерогенни М2 макрофаги, имунорегулаторно влияние върху В-клетъчния компартамент. Именно поради едновременното потискане на имунния отговор на множество нива, МСК се разглеждат като обещаващ подход за терапевтично повлияване при заболявания с автоимунен генезис, като например РА (*Torres-Torrillas et al., 2019*).

2.2. Ревматоиден артрит

Ревматоидният артрит (РА) е хронично системно заболяване с автоимунен генезис, засягащо преимуществено периферните стави. Терминът *ревматоиден артрит* за пръв път е въведен от Гарод през 1859 г. Въпреки препратките към възпалителни заболявания със ставно засягане, наподобяващи РА,

направени от Galen, Sydenham и Heberden, първото точно описание на заболяването е от Landri през 1800 г. Тогава е формулирано и наименованието „*la goutte asthénique primitive*", погрешно съдържащо в себе си препратка към подаграта (goutte), но въпреки това в диференцалнодиагностичен план предложеното описание ясно очертава най-характерните клинични белези на РА.

Днес ние разпознаваме РА като едно от най-честите системни автоимунни възпалителни заболявания. Характеризира се с хронично ставно възпаление и синовиална хиперплазия, производство на специфични автоантитела, деструкция на ставния хрущял и подлежащата кост и системни нарушения, причинени главно от секреция на автоатителата, провъзпалителни цитокини и матриксни металопротеинази. Важен отличителен белег на РА е прогресиращото симетрично увреждане на диартродиалните стави, което намира отражение в изразен болков синдром, загуба на функция, структурни увреждания и съответни рентгенографски находки – стесняване на ставната междина, костни ерозии, анкилози, деформации, сублуксации. От гледна точка на своята етиология, патогенеза и клиничен ход РА е хетерогенно заболяване. Ако трябва да бъде обобщено, в основата на развитието му лежат сложните взаимно допълващи се влияния на генетично детерминирано и унаследяемо предразположение, фактори на околната среда и придобити дефекти на нормалните имунорегулаторни механизми, потискащи патологичната имунна активация в отговор на потенциално патогенни, а нерядко и на физиологични стимули.

2.2.1. Епидемиология. Генетична предиспозиция. Рискови фактори от страна на околната среда

Заболяемостта от РА или процентът на новите случаи, възникнали за даден период, варира в зависимост от географския район и е между 20 и 50 случая на 100 000 души/година. Наблюдават се два пика на изява на болестта – на възраст между 20 и 40 години и второ плато между 45- и 75-годишна възраст, след което заболяемостта рязко намалява. Като цяло той е хронично инвалидизиращо състояние, което може да повлияе най-продуктивните години от живота на човека. РА засяга около 0.5-2% от световното население, като съотношението на жени към

мъже е изместено към женския пол в съотношение 2:1. По отношение на генетичната предиспозиция РА е полигенно автоимунно заболявания с ниска степен на пенетрантност и конкордантност (*Gonzalez et al., 2007*).

2.2.1.1. Генетични фактори, предразполагащи за развитието на РА

Наследствеността при РА варира между 60-70% (*Van der Helm-van Mil et al., 2005*). Многобройните геномни асоциативни проучвания показват, че са идентифицирани около 101 рискови единични нуклеотидни полиморфизъма, създаващи възприемчивост към заболяването *(Eyre et al., 2012)*. Генните локуси от HLA системата, асоциирани с най-висок риск за развитие на РА, са HLA-DR4 (*04:01, *04:04, *04:05, и *04:08), също така HLA-DR1 (*01:01), DR6 (*14:02), DR10 (*10:01), а HLA-DR9 (*09) в частност се асоциира с повишен риск за развитие на РА при азиатци. Сходството между изброените генни вариации, кодиращи β-веригата на HLA-DR комплекса (HLA-DRB1)- е носителството на обща пептидна последователност, която засяга региона от 71 до 74 аминокиселинна позиция. Носителството на тази обща пептидна последователност се означава в литературата със събирателното понятие „споделен епитоп“ („shared epitope”) (*Murphy et al., 2017*) и показва най-силна асоциация с развитието на РА, който е позитивен за АСРА (*Yarwood et al., 2014*). Носителството на споделен епитоп се среща средно в около 40% от АСРА-положителните пациентите с РА и само при 2% от АСРА-негативните *(Van der Woude et al., 2009*). В групата на АСРА-отрицателните болни с РА е намерена силна асоциая с HLA-DRB1*03 и *13 (*Lee et al., 2007*).

Най-силен генетичен риск извън HLA системата придава носителството на някои полиморфизми на гена, кодиращ протеин-тирозин фосфатаза 22 (PTPN22) (*Carlton et al., 2005*). Промените в други генни локуси, асоциирани с повишена предиспоцизия към развитие на РА, са в *TRAFI/C5*, *STAT4*, *PADI4*, *IRF5*, *FCGR*, *IL2RA*, *ILRB*, *CD40*, *CCL21* и *CCR6* (*Klareskog et al., 2006*).

2.2.1.2. Фактори на околната среда, асоциирани с повишен риск от развитието на РА

Един от най-силните негенетични рискови фактори за развитието на РА е тютюнопушенето. Това е пример за комбинираното и взаимнодопълващо се влияние

между унаследен генетичен терен и експозиция на токсини. Тютюнопушенето модифицира и увеличава неколкократно риска за развитие на РА при носителите на "споделен епитоп". Предполгаемият механизъм е индуциране на процес на вторично модифициране, известен като цитрулинизация на пептиди.

Не бива да се омаловажава и ролята на непатогенни и патогенни микроорганизми като независим и модифициращ фактор за развитието на РА. Данните от литературата ясно демонстрират, че начало на автореактивния процес при РА може да бъде именно аберантен имунен отговор, осъществен в хода на „реактивност" срещу патогенни и непатогенни микроорганизми (*Kurko et al., 2013*). В тази връзка доказана роля имат следните микроорганизми: Human parvovirus B19, Rubela virus, Human retrovirus 5, Alphaviruses, Hepatitis B-virus, Epstein-Barr virus, Borrelia burgdorferi, Mycoplasma, Mycobacterium tuberculosis, Esherihia coli, Proteus mirabilis, Porphyromonas gingivalis (*Tobón et al., 2010*).

2.2.2. Клинични прояви

Основните клинични прояви на РА са свързани със ставното засягане, но в хода на болестта може да бъдат изявени и извънставни симптоми. Възпалителният артрит при РА се характеризира със ставна болка и оток (синовит) на множество стави (полиартрит), придружени с дълготрайна сутрешна скованост и симетричен тип на ставното ангажиране. Рентгенографската находка свидетелства за ерозивен артрит, с деструкция на хиалинния хрущял и подлежащата кост. В хода на заболяването настъпва хиперплазия на синовиална тъкан, известна като панус, въвличат се сухожилията и други периставни структури. Последици на ерозивния полиартрит са ставните деформации, с кореспондираща загуба на функция. Аксиалното засяга е сравнително рядко и се манифестира при 30-50% от случаите, обхваща предимно цервикалния регион на гръбнака, а засягането на дисталните интерфалангеални стави не е характерно за РА. Има и увеличен риск за развитие на остеопороза (*Jeffery, 2014*).

РА е мултиситемно заболяване, извънставни прояви се срещат при около 40% от случаите. Първи по важност се нареждат усложненията от страна на кардиоваскуларната система, като смъртността вследствие на кардиоваскуларни усложения е от 2 до 3 пъти по-висока в сравнение с общата популация. (*Solomon et al.,*

2003). Най-тежкото усложнение от страна на сърдечно-съдовата система е васкулитът. Белодробната интерстициална фиброза, перикардитът и плевритът допълнително допринасят за хетерогенността в клиничния фенотип на РА (*Giles, 2019*).

2.2.3. Имунопатогенеза на РА

РА е заболяване, протичащо с изразена хетерогенност по отношение на клиничния ход, автоантителния профил и терапевтичния отговор (*Weyand et al., 1995*). На този етап са идентифицирани повече от 100 генни локуса, придаващи предразположение за развитие на РА (*Abo-El Wafa et al., 2017*). Комбинацията от клинична и серологична хетерогенност, стъпваща върху силно вариабилен генетичен терен са дали основание на редица автори да поставят под въпрос нозологичната цялост на РА (*Chemin et al., 2016*). От това произтичат затрудненията при представяне в обобщаващ план на етапите от основните етиопатогенетични последователности, водещи от здраве до болест. Въпреки това патогенезата на РА може да бъде сведена до серия от комплексни и взаимосвързани времево-пространствени ограничени събития. Първото от тях може да бъде охарктеризирано като остър проинфламаторен стимул, произтичащ от фактори на околната среда и водещ до стимулация на фибробластоподобните синовиални клетки (ФСК), с последващо производство на възпалителни медиатори, миграция и активация на имунни клетки. Следват повтарящи се проинфламаторни стимули, водещи до ангажиране на антиген-специфичните механизми на придобития имунен отговор в лимфните възли или слезката. Пречупването на периферния толеранс към собствени структури и проявите на автореактивност формират следващия етап. Основен етап, бележещ прогресията към разгърнато заболяване, се характеризира с прояви на автореактивност или персистиращ автоимунитет, свързани с трайна невъзможност на механизмите на имуносупресия да потиснат патологичната имунна активация, насочена срещу собствени ставни и извънставни структури.

2.2.3.1. Посттранслационно модифициране на собствени структури

На този етап, от наличните данни в световната литература два основни процеса на вторична модификация са с доказана асоциация с развитието на заболяване: ензимното цитрулиниране и неензимното карбамилиране. Те водят до поява

на нови епитопи, често наричани „променено свое" („altered-self"). Променените собствени антигени се отличават с по-висока имуногенност. Конкретен пример са цитрулинираните собствени антигени, които могат да активират вродения имунен отговор посредством свързване с Toll-like рецептор 2 и 4 и да индуцират секреция наTNF-α, IL-1β и IL-6 *(Hatterer et al., 2016*).

- **Ензимно цитрулиниране**

Ензимното цитрулиниране е процес на вторична, посттранслационна модификация на протеините. Ензимите, които го катализират, са пептидил-аргинин деаминазите (PAD). Функцията на PAD е да катализират превръщането на пептидиларгинина в пептидилцитрулин (*Vossenaar et al., 2003*). Процесът е калций-зависим. Замяната с цитрулин увеличава многократно афинитета за разпознаване на цитрулинирани олигопетиди от HLA клас II молекулите, носители на „споделен епитоп", което е свързано и с увеличената антигенна презентация на цитрулинирани олигопептиди. Различиват се 5 изоформи на PAD, експресиращи се от различни клетъчни субтипове (*Chang and Han, 2006*).

Физиологичната роля на цитрулинизацията е свързана с вторично модифициране на протеините кератин и филагрин под действието на PAD4 и е неразделна част от физиологичния процес на кератинизация (*Vossenaar et al., 2003*). При физиологични условия хистоновите белтъци (H3, H4) също подлежат на модификация посредством PAD4-зависима цитрулинизация, чрез което се осъществява епигенетичен контрол върху генната транскрипция (*Vossenaar et al., 2003*). Интерес представлява фактът, че нивата на естрогените могат да влияят върху експресията на PAD4 (*Dong et al., 2007*). Тютюнопушенето е допълнителен фактор, който индуцира неспецифично алвеолно възпаление и води до отделяне на PAD2 и PAD4 от инфилтриращите макрофаги (*Lee et al., 2008*). Един от описаните механизми е посредством повишената продукция на кислородни радикали (*Dong et al., 2007*). Проинфламаторната възпалителна среда, създавана от TFN-α, IL-1β и IL-6 увеличава отделянето на ензимите PAD2 и PAD4 от моноцити и макрофаги. PAD2 и PAD4 също се отделят и от неутрофилите, претърпяващи процес на нетоза, процес, водещ до екстернализиране на цитрулинирани хистонови белтъци (*Corsiero et al., 2016*).

- **Карбамилиране**

Това е посттранслационен процес на вторична модификация на протеините, при който лизинът се превръща в хомоцитрулин, вследствие добавяне на метиленова група (*Burska et al., 2014*). Процесът на карбамилирание по своята същност е неензимен и протича като химична реакция между лизина и разтворимия в кръвната плазма цианат (*Mydel et al., 2010*). Цианатът е в равновесие с уреята, но редица състояния, като бъбречно заболяване, възпалително огнище или тютюнопушене, могат да увеличат концентрацията на цианат, което ще доведе до усилен процес на карбамилиране (*Wynckel et al., 2000*). Собствените структури, подложени на карбамилиране, могат да задействат механизмите на вродения имунен отговор, водещи до продукция на TNF-α, IL-1β, IL-18 и инфлукс на имунокомпентентни клетки.

2.2.3.2. Загуба на толеранс към собствени структури

В своята цялост РА ангажира почти всички популации имунни клетки, както и фибробласто-подобните синовиални клетки от мезенхимен произход. Добре известно е, че взаимодействието между АПК и Т-хелперните лимфоцити формира фунционално "гръбнака" на имунния отговор. Следователно възникването на аберантния имунен отговор при РА основателно би могло да бъде потърсено именно на ниво дисрегулация в това взаимодействие. Най-сериозен аргумент, потвърждаващ ролята на АПК и различните субпопулации на Т-хелперни лимфоцити, е именно фактът, че носителството на полиморфизми от клас II на МНС, обобщено в събирателното понятие "споделен епитоп", е най-силният фактор за развитието на РА и също така е обвързано със специфичния автоантителен профил и клиничния фенотип на заболяването (*Martinsson et al., 2017*). Най-характерното проявление от пречупването на автотолеранса при РА е наличието на разнообразни и специфични за РА автоантитела, насочени най-често срещу цитрулинирани или карбамилирани структури, или срещу Fc фрагмента на имунноглобулини от клас IgG (ревматоиден фактор). Продукцията на автоантитела, обединени в двете основни системи – антицитрулинирани (АСРА и антикарбамилирани пептиди (anti-CarP) – носят

белезите на афинитетно узряване *(Martinsson et al., 2017),* изотипно превключване на имуноглобулиновия клас и са директно доказателство за автоимунно отклонение в В-клетъчния компартмент. За синтезирането им е необходимо наличието на автореактивни плазмени клетки или плазмобласти, успешно преминали през процесите на положителна селекция, протичаща в герминативните центрове на вторичната или третичната лимфоидна тъкан. Герминативноцентровата реакция е високоорганизиран процес, протичащ под контрола на автореактивни Т-хелперни лимфоцити, означавани като фоликуларни (Tfh). Широко прието в литературата е, че пречупването на В-клетъчния автотолеранс е вторично и е следствие от появата на автореактивни фоликуларни Т-хелперни лимфоцити в периферията (*Wehr et al., 2019*). Двата основни класа антитела – АЦП и АКП, са насочени срещу широк кръг собствени структури, продукти на ензимни и неензимни реакции на вторично „посттранслационно" модифициране. Интерес представлява фактът, че подобни вторично модифицирани пептидни продукти на ензимното цитрулиниране или карбамилиране не се представят от тимоцитите по време на негативната фаза на тимусната селекция на Т-хелперните лимфоцити (*Kampstra and Toes, 2017*). Следователно не се изгражда централен толеранс срещу подобни структури, продукт на вторична модификация. Наличието на „пропуски" в централния толеранс и поддържането на периферен толеранс и хомеостатично равновесие към тези вторично променени антигени е динамичен процес, постоянно зависещ от интегритета и потенциала на периферните механизми на имуносупресия. Също така това „подлага" механизмите на поддържането на периферния автотолеранс на прякото въздействие на факторите на околната среда. Носителството на "споделен епитоп" засяга процеса на антигенно представяне и води до предилекционно представяне на „артритогенни" пептиди, продукт на посттранслационно модифициране (*Kampstra and Toes, 2017*). Сам по себе си ефектът от представянето на цитрулинирани пептиди на Т-хелперните лимфоцити би могъл да генерира ефекторни проинфламаторни Th17, Th1, Tfh, Th9 субпопулации или регулаторни: Treg, Tr1, Th3; да индуцира клонална анергия, клонална делеция или пък да доведе до процес, известен като "неглижиране". Съгласно принципите на трисигналния модел на Т-хелперна активация, са необходими

още два сигнала – цитокинова среда и контактно-клетъчно взаимодействие, които да променят контекста на антигенното представяне и да способстват за нарушаване на равновесието в посока диференциация в проинфламаторни Т-ефекторни лимфоцити. Именно тук може да бъде търсена и ролята на полиморфизми по някои генни локуси извън HLA системата, асоциирани с РА, като например PTPN22, CTLA4, потискащи функцията на супресорните Tregs, и също проинфламаторни тригери от страна на околната среда, като тютюнопушенето, и от страна на микробиома (*P. gingivalis*). Тези фактори, предизвиквайки неспецифична възпалителна реакция, променят процеса на антигенното представяне и водят до генериране на цитрулинирани и карбамилирани собствени антигени.

Натрупаните данни в литературата дават основание на редица автори да изкажат предположението, че мястото на първоначалния имунологичен конфликт, стоящ зад загубата на периферен толеранс и инициацията на РА, е именно мукозата и съответно мукоза-асоциираната лимфоидна тъкан на дихателните пътища, гастроинтестиналния тракт или букалната лигавица (*Catrina et al., 2014*). Тютюнопушенето отключва неспецифично алвеоларно възпаление и инфилтрация от мононуклеарни клетки и повишена експресия на пептидил-аргинази (PADs), което, съчетано с носителството на "споделен епитоп", може да доведе до пречупване на собствения толеранс към цитрулинирани пептиди, тютюнопушенето увеличава относителния риск от развитието на РА 1.5 пъти (*Catrina et al., 2014*).

Периодонтитът, предизвикван най-често от P. gingivalis, е силен рисков фактор, асоцииран с предиспозиция за развитие на РА. Характерно за P. gingivalis е, че екпресира свои собствени ензими пептидил-аргинази (PADI), катализиращи ензимното цитрулиниране на протеини от екстрацелуларния матрикс. Възникналият в условията на локален възпалителен процес антибактериален имунен отговор е един от възможните механизми, водещи до генериране на АЦП (*Wegner et al., 2010*). Нови проучвания добавят още един допълнителен механизъм към действието на P. gingivalis – бактериалните екзотоксини са мощен стимул за активиране на Toll-like receptor 2 (*De Aquino et al.,*

2014). Това води до увеличаване на продукцията на IL-1 и до потискане на компартмента на Tregs (*Konig et al., 2016*).

Няколко са механизмите, посредством които различните патогенни микроорганизми могат да способстват пречупването на автотолеранса при РА. Това са механизмите на молекулярна мимикрия, „epitope spreading “, индуциране на поликлонална лимфоцитна активация и “bystander” активацията (*Arleevskaya et al., 2016*).

2.2.3.3. Автоантитела при РА

Характерните за РА автоантитела могат да бъдат систематизирани в няколко основни групи: антитела срещу цитрулинирани пептиди (АСРА), антитела срещу карбамилирани пептиди (anti-CarP), ревма-фактори (RF), антитела срещу ацетилирани пептиди, антитела срещу оксидирани пептиди anti-PAD4 anti-RA-33, anti-hnRNP A2 (*De Brito Rocha et al., 2019*).

- **Антитела срещу цитрулинирани пептиди (АСРА)**

Терминът АСРА е събирателен и е въведен, за да се систематизират множеството автоантитела, реагиращи срещу цитрулинирани собствени структури. Някои автори предлагат и обобщаващия термин *цитрулином*, целящ да обхване различни собствени антигени, претърпяващи вторична модификация, свързана със заместване на аргинин с цитрулин. За първи път АСРА попадат в полезрението на научната общност през 1964 г., когато посредством индиректна имунофлоуресценция в серума на болни от РА са открити автоантитела, реагиращи срещу цитоскелетния протеин кератин. Първоначално те са описани като антиперинуклеарен фактор. Впоследствие редица други собствени структури също са идентифицирани като таргетни за АСРА при РА, като например хистони, фибриноген, виментин, фибронектин, α-енолаза, цитокератини (*Song and Kang, 2009)*. Въпреки своя твърде разнороден състав, АСРА имат висока диагностична специфичност за РА, около 98%, и могат да бъдат открити при около 2/3 от пациентите с РА (*Song and Kang, 2009*). Антителата срещу циклични цитролинирани пептиди (ССР) могат да се появят средно около 14 години преди клиничното разгръщане на РА (*Willemze et al., 2012*), като повишаването на техните нива корелира пряко с активността и тежестта на ставното засягане (*Moeez et al., 2013*). АСРА могат да са от клас IgM, IgG, IgA и IgE. АСРА от клас IgM и IgA се откриват при 60% от пациентите с РА

(*Jonsson et al., 1998*). ACPA от изотип IgG1и IgG4 са налични при около 99% от ACPA-положителните пациети, а ACPA от клас IgG2 и IgG3 могат да бъдат установени в серума при съответно 80% и 60% от ACPA положителните пациенти с РА (*Willemze et al., 2012*). Интерес представлява фактът, че броят на изотипните специфичности на ACPA сигнификантно корелира с риска за бъдещи радиографски промени (*Bax et al., 2014*).

- **Антитела срещу карбамилирани пептиди (anti-CapP)**

Другата голяма група от автоантитела, характерни за РА, е групата на автоантителата, насочени срещу собствени карбамилирани пептиди (anti-CarP) (Shi et al., 2011). Anti-CarP се срещат средно в около 45% от пациентите с РА, съответно 45% от клас IgG. Anti-CarP могат да бъдат открити в серумите на 16-30% от ACPA-негативните пациени (*Shi et al., 2011*). От клинична гледна точка присъствието им корелира с болестната активност и рентгенографските увреди (*Shi et al., 2014*). Anti-CarP могат да бъдат детектирани в серуми на здрави индивиди средно около 10 години преди изявата на разгърната клинична симптоматика на заболяването. Те са независим предиктор за влошаване на ставната симптоматика (*Shi et al., 2013*).

- **Ревматоиден фактор (РФ)**

Автоантителата, насочени срещу Fc фрагмента на човешкия серумен гамаглобулин, са описани за пръв път през 1940 г., а през 1948 г. е открита и силната им клнична асоциация с РА. Поради тази причина са наречени ревматоидни фактори. Чувствителността им по отношение на РА варира между 60 и 90%, а специфичността –между 48 и 92% (*Ingegnoli et al., 2013*). Това е така поради факта, че РФ могат да бъдат открити в голям процент при болните със системен лупус еритематозус, системна склероза, при възрастни индивиди, при хронични инфекции и карциноми (*Mc Ardle et al., 2015*). РФ могат да бъдат от класове IgM, IgG и IgA, често присъстват едновременно в серумите на болните и комбинираното им изследване се отличава с висока диагностична стойност. Ролята на РФ в патогенезата на РА може да се обясни с усилване на действието на ACPA и anti-CarP, благоприятствайки образуването на имунни комплекси и съответно тяхното проинфламаторно и деструктивно действие. Появата на РФ във висок титър е свързано с пречупване на В-клетъчния толеранс

съгласно механизма на свързаното разпознаване (linked recognition, процес, противоположен на split tolerance), разгръщане на процес на "epitope spreading", като редица автори съобщават, че Т-клетъчната помощ може да се осъществява от ССР специфични Т-хелперни лимфоцити *(Rao et al., 2017)*. Изложеното до тук добре обяснява и силната корелация между титъра на РФ и активността на ставното възпаление (*Rao et al., 2017*), но показва, че деструктивната роля и мястото на РФ в проинфламаторната каскада при РА са зависими от наличието на други автоантитела и появата на предшестващо синовиално възпаление.

- **Антинуклеарни автоантитела**

Антинуклеарни автоантитела (АНА) са хетерогенна група автоантитела, разпознаващи собствени интрацелуларни антигени, разположение в клетъчното ядро. Конкретни примери за ядрени структури, които могат да бъдат мишени на хуморален имунен отговор и да бъдат разпознавани от АНА, са двойноверижните нуклеинови киселини (dsDNA), едноверижните нуклеинови киселини (ssDNA), нуклеозомалните структури, хистоните, DFS-70, SSA/Ro60, Ro52, SSB/La, Ku, U1RNP, Smith, PCNA. В наши дни изследването на АНА е недилима част от диагностичния и терапевтичния процес на автоимунните заболявания от ревматичния спектър. Това се дължи на високата чувствителност, специфичност, негативна и отрицателна предсказателна стойност на АНА (за положителни следва да се приемат титрите на АНА ≥ 160) при системни автоимунни заболявания като системен лупус еритематозус (СЛЕ), прогресивна системна склероза (ПСС), синдром на Сьогрен, автоимунни миозити и припокриващи форми (*Pisetsky, 2017*). Също така АНА могат да се срещат и при пациенти с РА. Harmon и сътр. съобщават, че положителните титри на АНА могат да се наблюдават при около 40-60% от пациентите с РА (*Harmon, 1986*), а Aitcheson и сътр. установяват, че средно около 40% от болните с РА са положителни за АНА от клас IgG (*Aitcheson et al., 1980*). Невисоката специфичност и чувствителност при РА е в подкрепа на тезата, че АНА не са директно „отговорни" за инициацията и поддържането на затворения кръг на автоимунното възпаление в ревматоидния синовиум. От друга страна,

наличието на АНА при пациенти с РА трябва да се разглежда като част от палитрата от възможни и често появяващи се автоантитела. По този начин те допринасят допълнително за хетерогенния и индивидуален характер на заболяването както в имунологичен, така и в клиничен и терапевтичен план. Природата на появата на АНА в контекста на РА може да бъде представена посредством действието на няколко отделни процеса:

- некро-инфламаторно възпалние;
- неутрофилна нетотична смърт и екстернализация на ядрено съдържимо;
- фагоцитоза и изчистване на апоптотични и некротични материи;
- проинфламаторен възпалителен контекст и потискане на периферните имунорегулаторни механизми;
- епитопно разпростиране (epitope spreading) и епитопно фокусиране (epitope focusing);.

Двата процеса на епитопно разпространение и фокусиране са динамични и в контекста на автоиумунните заболявание имат противоположно действие. Епитопното разпространение е механизмът, стоящ зад появата на „нови" автоантитела, с нови епитопни специфичности (поява на АСРА, RF, АНА и други). Фокусирането от своя страна е процесът, ограничаващ появата на автоантитела с нови епитопни специфичности за сметка на увеличаването на специфичността на вече съществуващите и оформянето на „крайния" автоантитялов профил. От имунопатогенетична гледна точка не само наличието на АНА при РА, но и тяхната липса също е въпрос, свързан с разбирането на природата на обособяващите РА имунни дисрегулации.

Практически отговор на този проблем може да бъде намерен отчасти в появата на симтоми, наподобяващи СЛЕ и АНА, при пациенти с РА, подложени на терапия с моноклонални антитела, насочени срещу TNF-α (*Klapman et al., 2003*). TNF-α е цитокин с плейотропно действие, едно от които е да стимулира и активира кръвните моноцитни клетки и тъканите макрофаги и усилва способността им за фагоцитоза и „вътреклетъчно смилане". Едно от предположенията, обясняващи индукцията на СЛЕ-подобно състояние при блокаж на TNF-α цитокиновия път, е потискане на тъканните макрофаги и постигане на

функционален „дефицит" в процесите на изчистиване на апоптотични и некротични материи в контекста на проинфламаторна цитокинова среда, което, както беше споменато, е един от процесите, свързани с продукцията на АНА. Това определя и важното значение на мониторирането на АНА в хода на осъществяване на съответни терапевтични протоколи при РА.

- **Други автоантитела**

Други автоантитела с диагностична и клинична значимост при РА са: anti-PAD4, anti-BRAF, антитела срещу ацетилирани пептиди, антитела срещу оксидирани пептиди (*De Brito Rocha et al., 2019*).

2.2.4. Ставно засягане и синовиална патология при РА

РА засяга диартродиалните стави. Характерното за устройство на диартродиалните стави **е**, че ставните повърхности са покрити с хиалинен хрущял, пространството, затворено в ставната междина, е изпълнено с вискозна синовиална течност и е оградено със синовална мембрана, която също покрива и неартикулиращи повърхности. Синовиалната мембрана е тънка, липсва базална мембрана и отвън е покрита с фиброзна ставна капсула. Дебелината на синовиума е с няколко клетъчни слоя, които са два вида: стромални фибробласт-подобни синовиоцити (тип Б) и синовиални макрофаги (тип А). По правило синовиалната тъкан е оскъдно кръвоснабдена.

Най-ранните ставни изменения при РА са разрастване на васкуларното русло в синовиума, придружено с микротромбози и периваскуларни възпалителни инфилтрати. Активна роля в процеса на хронифициране на синовиалното възпаление заема ендотелът. Характерни са постоянната експресия на адхезионни молекули като ICAM-1, VCAM-1, експресията на хемоатрактанти и увеличеният съдов пермабилитет поради продукция на хистамин, серотонин и други вазоактивни амини. Неоваскуларизацията, заедно с активирания ендотел, увеличава миграцията и навлизането на имунни клетки в синовиума като 35% от всички имунни клетки, инфилтриращи синовиума, принадлежат към компартмента на Т-хелперните лимфоцити (*Firestein and McInnes, 2020*). На следващ етап активираните $CD69^+$ Т-лимфоцити, инфилтриращи синовиума, понижават експресията на сфингозин фосфатния си рецептор-1 (S1P1), което

блокира напускането на активираните Т-лимфоцитите и допринася за персистирането на имунокомпетенти клетки в синовиума (*Firestein and McInnes, 2020*), сред които и автореактивни.

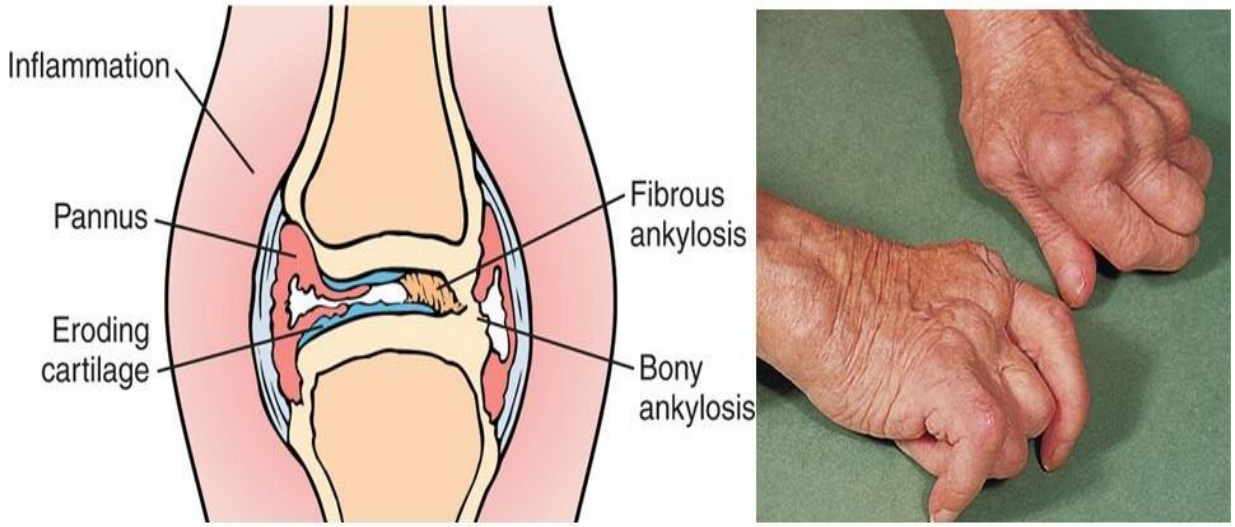
Образуват се имунни комплекс между RF, ACPA и съответните им таргетни антигени – цитрулиниран протеини, част от екстрацелуларния матрикс. Получените антиген-антитяло комплекси могат да активират комплемента по класическия път и отделянето на C3a и C5a. Медиатори на възпалението, като C3a и C5a, имат силно хемоатрактантно действие и увеличават инфлукса на моноцитни клетки и неутрофили в синовиалната тъкан. Антиген-антитяло комплексите могат да бъдат фагоцитирани от инфлитриращите моноцитни и дендритни клетки посредством FC рецептор-медиирана ендоцитоза или ангажиране на съответните рецептори за комплемента: CR1, CR3, CR4, експресирани от фагоцитиращи клетки. Поглъщането на антиген-антитяло комплексите от моноцити води до продукция на проинфламаторни цитокини, като IL-12p70, TNF-α, IL-23, IL-1, IL-8 и GM-CSF, и е съпроводено от фенотипни промени, характерни за зрели АПК – висока експресия на HLA-DR и B7 комплекса. Зрелите дендритни клетки увеличават ексресията си на CCR7, напускат синовиума и навлизат в регионалните лимфни възли, където са способни да активират наивни автореактивни Т-хелперни лимфоцити. Останалите в синовиалната тъкан макрофаги посредством високата си експресия на HLA-DR и високата способност за антигенна презентация осигуряват допълнителен сигнал, потенциращ оцеляването на активираните автореактивни Т-ефекторни лимфоцити в синовиума (*Papadopoulos et al., 2007*). Инфлуксът и персистирането на автореактивни активирани Т-хелпери в синовиума е свързано в повишение в нивата на проинфламаторни цитокини като IL-6, IL-17, IL-21, IL-22, TNF-α, GM-CSF (*McInnes et al., 2015*).

Активни участници в автоимунното синовиално възпаление при РА са и неутрофилите, които под действието на проинфламаторната цитокинова среда (IL-8, IL-17, TNF-α), претърпяват процес на клетъчна смърт, известен като нетоза (*Li et al., 2019*). По литературни данни ACPA и в частност антителата срещу цитрулинирания виментин могат да стимулират неутрофилната нетоза

посредством едновременното ангажиране на TLR2, 4 и FCγ рецепторите. Неутрофилната смърт чрез нетоза води до екстернализиране на ядрени и цитоплазмени структури, формиращи така наречените неутрофилни екстрацелуларни капани (NETs), състоящи се от ядрени структури като декондензиран ядрен хроматин, цитрулинирани хистонови белтъци и цитоплазмени протеини. Най-силно допринасящите за възпалението и ставната деструкция са протеиназа 3, миелопероксидаза, катепсин G, неутрофилна серин протеиназа, калпротектин, катлецидин, цитрулиниран фибриноген, LAMP-2, матриксна металпротеиназа 9, PAD-2, -4 и продукция на кислородни радикали (*O'Donoghue et al., 2013*). Екстернализираните цитрулинирани хистони и катлецидин (LL-37) могат да активират инфламазомата (NLRP3), а също и TLR-2, -4 и по този начин увеличават секрецията на IL-1β, IL-12, IL-23 IL-1β и IL-18 от миелоидни клетки. Редица проучвания демонстрират, че неутрофилната нетоза при ревматоидното синовиално възпаление също така е механизъм, който потенцира и селекцията, и оцеляването на автореактивни B-клетки и формиране на герминативни центрове в синовиума *(O'Neil & Kaplan, 2019*). Поради високата имуногенност на нуклеарните антигени (dsDNA, Nuc, хистони, SP60, HMGB1 и др.), активацията на механизми от вродения имунен отговор (напр. Toll-like рецептори, TLR) води до усилване на синтеза на проинфламаторни цитокини, като интерферон-алфа (IFN-α), IL-6 и IL-12, TNF-α и др. (*Gupta et al., 2010*). Разпознаването им от макрофаги и плазмоцитоидни дендритни клетки води до процес на антигенна презентация и продукция на проинфламаторни цитокини като IL-12p40, IL-23 и B-клетъчния просървайвъл цитокин BAFF (Blys) (*Tillack et al., 2012*). Автореактивните B-клетки, разпознали своя автоантиген (хистони, dsDNA, комплекси П-цитрулинирани хистони) след интернализирането му посредством BCR (B-клетъчен рецептор) медиирана ендоцитоза, получават допълнителен сигнал от ендозомално разположените TLR-3 (TRIF, IRF3) и TLR-7, 8, 9 (MyD88, IRF5, IRF7). Така те увеличават способността си за антигенно представяне, но и същевременно засилват мембранно разположения CD95 и други про-апоптотични молекули и стават податливи на апоптоза по CD95-зависим механизъм и/или цитокинова деплеция. Допълнителен сигнал,

който да ги запази от апоптоза, може да дойде под формата на помощ от автореактивни Т-хелперни лимофицити – процес, известен като загуба на „split tolerance". На следващ етап е взаимодействието между автореактивните В- и Т-хелперни лимфоцити. Появяват се герминативни центрове в синовиума (*Domeier et al., 2017*), последствие от което е продукцията на специфични автоантитела *in situ* в синовиума. Наличните в литературата данни демонстрират, че около 40% от АСРА, произвеждани от синовиалните герминативни центрове, показват висок афинитет срещу цитрулинирани H2A/H2B хистони (*Corsiero et al., 2020*), което е в подкрепа на представения механизъм. При около 40-50% от пациентите с РА в синовиума се откриват високоорганизирани третични лимфоидни фолукули (*Manzo et al., 2010*). Продуцираните в синовиума автоантитела допълнително спомагат за самоподържането на синовиалното възпаление при РА. Освен това АЦП могат да се свързват директно за цитрулинирания глюкозо-регулиран протеин 78 (cit-GRP78), експресиран върху повърхността на макрофафите, което води до продукция на TNF-α (*Lu et al., 2010*). Промененият профил на гликолизиране, засягащ Fc фрагмента на IgG анти-ССР, позволява ССР да се свърже посредством Fc фрагмента си и да блокира експресирания върху дендритни клетки DC-SIGN. Това е механизъм, блокиращ производството на PGE2 от дендритни клетки (*Böhm et al., 2012*).

Отделените от активираните неутрофили и макрофаги матриксни металопротеинази, агрекинази, неутрофилна еластаза, миелопероксидаза, както и други протеолитични ензими (ADAMTS 4, 5) в комбинация с активно отделяните кислородни радикали нанасят необратими структурни поражения върху хиалинния хрущял на засегнатите диартродиални стави, водещи до неговата прогресивна загуба. Проинфламаторната цитокинова среда, създавана от TNF-α, IL-6, IL-17, IL-1b, IL-18, активира синовиалните фибробластни клетки и тяхната пролиферация, водеща до образуване на ексецисивна гранулационна тъкан, известна като панус. Панусообразуването е един от факторите, стоящ в основата на появата на ставен деформитет и загуба на функция (фиг. 1).



***Фигура 1**. Ставно засягане при РА (Адаптирано от учебен онлайн курс на тема „Learning Objectives Degenerative joint disease", автор Jessi Pitts)*

Важен аспект в механизма на ставното засягане при РА е деструкцията на подлежащата кост. Това е свързано с нарушаване на финия баланс между процесите на костно изграждане и костна резоробция, а двете основни клетъчни популации, отговорни за това, са остеобластите и остеокластите. При РА този баланс е променен и изместен в посока на потенциране на остеокластната активност *(Baum and Gravallese, 2013*). Остеокластите са клетки, принадлежащи към миелоидната клетъчна линия, продукт на крайната диференциация на кръвните моноцитни клетки. Характерните за РА повишени нива на TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-17 и GM-CSF водят до дисрегулация в основните пътища, регулиращи остеокластогенезата: RANKL / OPG / RANK, Wnt (*Pettit et al., 2001; Van Tuyl et al., 2010*) и стимулират диференциацията на кръвните моноцити в посока остеокласти. Активираните Th17 са основен източник на RANKL, който, свързвайки се с RANK, експресирасан върху остеокластите, увеличава тяхната активност (*Brennan and McInnes, 2008; Gravallese and Walsh, 2011*). От друга страна, вследствие на проинфламаторната цитокинова среда (TNF-α) в сино-

виума се понижава и секрецията на остеопротегерин (OPG), явяващ се естествен инихибитор на RANKL (*Redlich et al., 2002*), което допълнително потенцира остеокластогенезата и потиска остеобластите.

2.2.5. Роля на Th17 и Treg в имунопатогенезата на РА

Днес е известно, че поддържането на периферен толеранс и хомеостатично равновесие към собствени антигени е динамичен процес, постоянно зависещ от интегритета и потенциала на периферните механизми на имуносупресия. И ако пораждането на автоимунитет е неизбежно следствие от имунната реактивност, то трайното персистиране на автоимунитет и разгръщане на автодеструктивен имунен отговор е пряко доказателство за нарушения хомеостатичен контрол от страна на механизмите на имуносупресия. Нарушаването на този хомеостатичен контрол е пример за дуалистичен подход и е една от модерните концепции за възникването на автоимунните заболявания (*Perricone & Shoenfeld, 2019*). В исторически план, началото ѝ е поставено от Gershon и Kondo, които формулират концепцията за "Т супресорните клетки" (*Gershon et al., 1971*). С времето обаче става ясно, че процесът на имунната супресия не се осъществява от един единствен и специализиран вид имунни клетки. Към днешна дата списъкът на познатите такива включва Tr-1, Th3, $CD4^+FoxP3^+$ (Treg), $CD8^+FoxP3^+$, Bregs, MDSC, МСК и вероятно други. Но ако трябва да посочим един вид имунни клетки, който да е в най-силна степен специализиран и „посветен" в посока имуносупресивно действие, то това е субпопулацията на регулаторните $CD4^+FoxP3^+$ (Tregs) лимфоцити.

Съгласно *apriori* формулираните цели и задачи, ние избрахме да проследим динамиката между две хелперни лимфоцитни субпопулации, тези на Th17 и Tregs под влияние на средите от АТ-МСК при РА. Това беше продиктувано от многобройните данни в литературата, демонстриращи бройните и функци-

онални изменения в пула на Th17 и Treg при РА „подмяната“ на Th1/Th2 парадигмата и извеждането на преден план на концепцията за ролята на Th17/ Treg в патогенезата на РА.

Съгласно наличните в литературата данни в патогенезата на РА Th17 и Tregs субпопулациите представляват две функционално антагонистични Т-хелперни субтипове. Диаметрално противоположните им функции са обвързани с експресията на два различни транскрипциони фактора: FoxP3 при Tregs и RORc (RORγt при мишки) при Th17 хелперните лимфоцити. Под тяхното действие Tregs и Th17 търпят епигенетично препрограмиране, водещо до диаметрална промяна в цитокиновата им продукция и ефекторните функции: Tregs потискат и регулират имунния отговор посредством продукция на TGF-β, IL-10, PGE2, IL-35, а Th17 продуцират основно проинфламаторните IL-17, IL-21, IL-6 и TNF-α. Един от най-важните аспекти от дуализма между Tregs и Th17 е общият им път на диференциация. Експресията на RORc и FoxP3 е едновременно зависима от наличието на TGF-β (*Dardalhon et al., 2008*), като в ранните етапи от Т-хелперната диференциация RORc и FoxP3 се експресират едновременно (*Dardalhon et al., 2008*). Също така действието на TGF-β потиска екпресията на T-bet и GATA-3, основните транскрипционни фактори, определящи съдбата на наивния Т-хелперен лимофцит в посока диференциация в Th1 или Th2 субтип, т.е. изборът между Tregs и Th17 реципрочно потиска Th1 и Th2 субтиповете. Именно поради този факт, подкрепен от редицата емпирични наблюдения (табл. 2 и 3), е една от причините за надграждане към Th1/Th2 парадигмата и дуалистичната пластичност между Tregs и Th17. На следващ етап съотношението TGF-β/IL-6 определя насоката на Т-клетката по посока Tregs или Th17 (*Bettelli et al., 2006*). TGF-β едновременно индуцира синтеза както на FoxP3, така и на RORc, при което FoxP3 директно потиска RORc и диференциацията в Th17. В присъствието на IL-6 този механизъм е блокиран и се осъществява трансформацията по посока Th17 (*Xu et al., 2007*). Диферен-

циацията в посока Th17 допълнително може да се благоприятства и от цитокини като IL-1β, IL-21, IL-23 (*Lee et al., 2009*). Реципрочността и зависимата от цитокиновата среда позиция на този фин баланс е в подкрепа на емпиричните данни за наличието на бройни и функционални нарушения при Tregs и Th17 при РА (табл. 2 и табл. 3). Изучаването на Th17 и Tregs заема централно място в експерименталната постановка и заложените цели на настоящия дисертационен труд, но необходимо уточнение е, че те не са единственият пример за функционален антагонизъм в патогенезата на РА.

2.2.5.1. Роля на Th17 хелперните лимфоцити при РА

Многобройни са данните в литературата, описващи приноса и деструктивната роля на субпопулацията на Th17 хелперните лимфоцити в процесите на хрущялна и костна деструкция и синовиална хиперплазия, поради което редица автори са характеризили РА като Th17 медиирано заболяване (табл. 2).

Т-клетъчната диференциация е епигенетично състояние, обвързано с определен фенотип, транскрипционни фактори, секреция на цитокини и метаболитни пътища и се характеризира със способност за пластичност (*Muranski, 2013*).

Th17 клетките обособяват отделна Т-клетъчна субпопулция, характеризираща се с експресията на транскрипционния фактор retinoic acid-related orphan receptor RORγt, с повърхностната експресия на CD161 и хемокиновия рецептор CCR6 (CD196), и с производството на цитокини, принадлежащи към IL-17 цитокиновото семейство (IL-17A, IL-17F, IL-17A/F), както и TNF-α, IL-21, IL-22, CCL20, IL-26 и GM-CSF. Поляризацията на наивните Т-хелпери в посока Th17 се потенцира от присъствието на IL-6, IL-21, IL-23 и TGF-β (*Maddur, 2012*). Ефекторната функция на Th17 хелперните лимфоцити при здрави индивиди е тясно обвързана с характерния проинфламаторен цитокинов профил и е насочена в посока координиране и потенциране на имунния отговор срещу извънклетъчни патогени, каквито са голяма част от грам-положителните бактерии и гъбите. Този факт е в подкрепа на ролята на микробиома за развитието на РА (*Bodkhe et al., 2019*) и връзката с абнормната активация на Th17 хелперния компартмент.

Таблица 2. Резултати от литературна справка, по отношение на процента на Th17 и концентрацията на IL-17 в периферна кръв, синовиална течност и синовиална тъкан при пациенти с РА

Авторски колектив	Процент на Th17			Нива на IL-17A	
	ПК	СТ	СМ	Серум	СТ
Chabaaud et al., 1999	/	/	↑**	/	/
Kotake et al., 1999	/	/	↑**	/	↑**
Ziolkowska et al., 200	/	/	/	/	↑**
Kageyama et al., 2007	/	/	/	↑*	↑**
Yamada et al., 2008	/	↓***	/	/	/
Shen et al., 2009	↑	/	/	/	/
Shahrara et al., 2008	/	↑***	↑*	/	/
Moran et al., 2009	/	/	↑**	↑**	↑**
Shen et al., 2010	↑	/	/	↑*	/
Gullick et al., 2010	↑	↑**	↑***	/	/
Chen et al., 2011	↑	/	/	↑*	/
Lina et al., 2011	↑	/	/	/	/
Metawi et al., 2011	/	/	/	↑*	↑**
Suurmond et al., 2011	/	/	/	/	↑**
Samson et al., 2012	↑	/	/	/	/
Zhang et al., 2012	↑	/	/	/	/
Van Hamburg et al., 2013	↑	↑***	/	/	/
Niu et al., 2012	↑	/	/	/	/
Kim et al., 2013	↑* ↑**	/	/	↑*	/
Henriques et al., 2013	↑*	/	/	/	/
Sakar and Fox, 2010	↑**	/	/	/	/
Miao et al., 2014	↑*	/	/	/	/
Guggino et al., 2015	↑**	/	/	/	/

ПК: периферна кръв; СТ: синовиална течност; СМ: синовиална мембрана; ↑ – увеличение; ↓ – намаление; = без сигнификантна промяна; / – не е изследвано; спрямо здрави контроли;** спрямо болни с остеоартрит; *** спрямо периферна кръв от пациенти с РА*

При РА Th17 са основният „остеокластогенен“ Т-клетъчен субтип и могат да бъдат представени като свързващото звено между ексцесивната Т-клетъчна активация и процесите на хрущялна и костна деструкция. От тази гледна точка

взаимодействията между Th17 и синовиалните фибробластни клетки, моноцитните клетки и неутрофилите са основоположни. Продуцираният от Th17 RANK лиганд е основният фактор, стимулиращ функционалната активност на остеокластите. Експресията на хемокиновия рецептор CCR6, характерна за Th17, но не и за Th1 и Th2, е тази, която насочва хоминга на Th17 във възпаления синовиум. Високата експресия на клас II молекулите на MHC от АПК в ревматоидния синовиум служи като стимулиращ сигнал, благоприятстващ оцеляването и цитокиновата продукция от автореактивни ефекторни Th17. Основна тук е ролята на IL-17A, който посредством активацията на NF-κβ, MAPK и AP-1 сигнално трансдукционните пътища индуцира активация на фибробластоподобните синовиални клетки. Те се трансформират в перманентно активирани фибробласти, често характеризирани в литературата като „паноцити". Активираните синовиални фибробласти са неподатливи на апоптоза и секретират високи количества на IL-6, TNF-α и IL-15 (*Sen et al., 2001*). Секретираният IL-15, от друга страна, увеличава секрецията на IL-17 от ефекторните Th17 (*Toh et al., 2010*). Описаният порочен кръг е известен като IL-15/Th17/IL-6 ос и води до перманентна активация и пролиферация на фибробластоподобни клетки. IL-17 стимулира и отделянето на ензими – колагенази, отговорни за деструкцията на хиалинния хрущял (*Chabaud et al., 2001*). Паракринният ефект на IL-6, TNF-α и IL-15 върху Th17 е свързан с намалена експресия на CD3, загуба на способност за апоптоза и е един от механизмите за „измъкването" им от хомеостатичен контрол (*Maurice, 1997*). Парадоксално, при РА синовиалните Th17 намаляват повърхностната си ексресия на CD28 и TCRζ, но същевременно усилват секрецията на IL-17 (*Zizzo et al., 2019*), което корелира положително с болестната активност, определена чрез DAS44 скора. *(Zizzo G, unpublished data)*. Предложеното от De Santis et al. обяснение е, че това отразява промяната от антиген-зависим към цитокин-зависим провъзпалителен отговор, при което паракринният ефект на продуцираните проинфламаторни цитокини е в основата на самоподдържащото се автоимунно възпаление. Броят на синовиалните Th17 корелира с болестната активност, степента на неутрофилната инфилтрация в ревматоидния синовиум и нивата на CRP (*Gullick et al., 2010*). Th17 играят важна роля по отношение на усилване на неутрофилния хемотаксис и на процеса на неоангиогенеза (*Zizzo et al., 2019*).

От друга страна, субпопулацията на Th17 хелперните лимфоцити може да оказва влияние върху В-клетъчния компартмент (*Annunziato et al., 2007; Mitsdoerfer et al., 2010*). Това се потвърждава от факта, че Th17 споделят редица общи характеристики с фоликуларните хелперни лимфоцити (Tfh), като например експресия на ICOS, транскрипционен фактор c-Maf и секрецията на високи нива на IL-21 *(Bauquet et al., 2009)*. IL-21 заедно с IL-4 са най-ключовите цитокини, отговорни за В-клетъчната диференциация и пролиферация в контекста на герминативно-центровата реакция. Освен това IL-17, независимо от IL-21, може да стимулира превключването на имуноглобулиновия изотип и да активира формирането на автореактивни герминативни центрове в ревматоидния синовиум (*Hsu et al., 2008; Mitsdoeffer et al., 2010*). В-лимфоцитите имат висока степен на експресия на рецептор за IL-17 и свързването на IL-17 с В-клетъчния IL-17R води до увеличаване експресията на активация-индуцираната цитидин деаминазата (*Bai et al., 2008*). Способността на Th17 да оказва помощ на автореактивните В-лимфоцити, да подпомага създаването на герминативни центрове в синовиума и да стимулира продукцията на автоантитела (*Warrington et al., 2001*) е допълнителен аспект от патогенетичната роля на Th17 при РА.

2.2.5.2 Tregs и РА

Паралелно с формулиране на концепцията за Т-супресорните лимфоцити, Gershon и Kondo въвеждат термина „инфекциозен толеранс", с цел да обобщят редица емпирични наблюдения, налични по това време (*Gershon-Cohen, 1961*). Понастоящем инфекциозният толеранс е разпознат като един от основните механизми, въвлечени в поддържането на периферен имунен толеранс в тъканите и мукозата. Това е процес, при който толерогенна имунна клетка индуцира толерогенно състояние у други имунни клетки вместо ефекторни клетки. Процесът води до „лавинообразен" ефект на взаимозависимо акумулиране на регулаторни имунни клетки. Към днешна дата е известно, че списъкът на регулаторните клетки, въвлечени в процеса, обхваща широк спектър от лимфоидни и нелимфоидни такива. В концептуален план механизмът на „инфекциозния толеранс" е организиран около тезата, че ефекторният и то-

лерогенният/имуносупресивният фенотип могат да бъдат транзиторни състояния, търпящи променливост, в зависимост от контекста на антигенната стимулация, костимулаторни молекули и цитокиновата среда. От друга страна, правилното разбиране на процеса на индуциране на имуносупресивно състояние многократно улеснява и изучаването на механизмите на имуносупресия поради факта, че в концептуален план фенотипните изменения и индуцираните толерогенни фенотипове би трябвало да са взаимозависими и силно корелиращи помежду си. Следователно по силата на дедуктивния подход, проследяването на динамиката в таргетна имуносупресивна популация би било достатъчно, за да спекулираме за цялостната динамика в процеса на развитие на инфекциозен толеранс и също би премахнало затрудненията при диференциране на различни популаци толерогенни имунни клетки. Някои трудности произтичат от пластичността на различните субпопулации регулаторни имунни клетки и липсата на фенотипни маркерки, които да спомогнат за разграничаването им. В исторически план откритието, направено през 2003 г. от Hori (*Hori, 2003*), е, че експресията на транскрипционния фактор fork-head box P3 (FoxP3) може да бъде сигурен демаркационен белег, обвързан с регулаторен фенотип сред експресиращите го $CD4^+$ и $CD8^+$ лимфоцити. На практика важността на $CD4^+FoxP3^+$ Treg лимфоцити се извежда на преден план в механизмите на имуносупресия (*Zhao, 2017*).

Класическият фенотип, характерен за Tregs, е свързан с постоянна интрацелуларна експресия на транскрипционния фактор FoxP3 и есктрацелуларна експресия на CD25 (високоафинитетна субединица, формираща рецептора за IL-2), CD122 (рецептор за γ-веригата на IL-2), NrpI и негативна експресия на CD127 (рецепотор за IL-7). Други характерни повърхностни маркери, често експресирани от Tregs и пряко обвързани с техните имуносупресивно свойстваq са GITR (glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor), PD-L1, CTLA-4, LAG-3 (*Jonuleit et al., 2001; Baecher-Allan et al., 2001; Baecher-Allan et al., 2002*), а транскрипционният фактор Helios е коментиран от редица колективи като маркер, характерен за естествените nTregs *(Thornton et al., 2010).* Tregs имат чувствително по-малък потенциал за пролиферация спрямо ефекторни не-регулаторни клетки, около 10-40 пъти по-слаб (*Baecher-Allan, 2004*).

Според произхода си Tregs могат да бъдат разделени на две основни субпопулации – „естествени" nTregs и индуцируеми iTregs. Естествените nTregs са наречени така, защото тяхната диференциация завършва в тимуса по време на процесите на положителна и отрицателна селекция, тоест те са част от процеса на централния толеранс (*Chen et al., 2003*). nTreg са дългоживеещи, анергични и с нисък пролиферативен потенциал. Оцеляването им е зависимо от TGF-β, а за своята активация и пролиферация са зависими от паракринното действие на IL-2 в комбинация със стимулация върху ТКР *(Li et al., 2006)*. Действието на nTregs е антиген-зависмо (*Tree et al., 2010*) и поради това имуносупресивният им ефект върху автореактивните Т-хелперни лимфоцити най-често се осъществява посредством модулация на антиген представящите клетки, механизъм, известен като „свързана супресия" ("linked suppression"). В процеса на костимулация тук основна роля има CD28. Противоположно на тях, индуцираните iTregs са продукт на диференциацията на наивни Т-хелперни лимфоцити в периферията след праймиране със съответния им антиген в комбинация с TGF-β (*Josefowicz and Rudensky, 2009).* Механизмът, чрез който TGF-β осъществява своите функции, в частност индуциране на транскрипцията на FoxP3, включва взаимодействие на транскрипционните фактори STAT3 и NFAT (*Josefowicz and Rudensky, 2009*), които се свързват към CNS1 генния енхансър и индуцират транскрипцията на FoxP3 *(Tone et al., 2008).* Основна роля като костимулаторна молекула при iTreg има CTLA-4. Имуносупресивният ефект на iTregs е антиген независим, повлиява епигенетичната модификация и те могат да загубят FoxP3^{+} експресията под действие на проинфламаторна цитокинова среда, като например TNF-α и IL-6. Механизмите на имуносуресия, осъществявани от Treg, могат да се разделят на директно или индиректно въздействие. Осъществяват се посредством секреторни разтворими молекули и чрез контактни механизми. Основните разтворими медиатори, секретирани от Tregs и имащи ключова роля по отношение на имуносупресивното им действие, са TGF-β, IL-10, IL-34, IL-35, IDO и аденозин (*Zhao et al., 2017*), а основните контакт-зависими инхибиторни молекули включват PD-L1, CTLA-4, TIGIT, LAG-3. Посредством изброените механизми Treg могат да потискат пролиферацията

и активацията на ефекторни Т-хелперни лимфоцити или да индуцират толерогенен фенотип, свързан с понижено антигенно представяне и намалена гъстота на експресия на костимулаторни молекули от страна на миелоидни клетки.

По отношение мястото на Tregs в патогенезата и механизмите на разгръщане и прогресия на РА, многобройни студии потвърждават множеството бройни и функционални нарушения в пула на регулаторните FoxP3$^+$ Т-лимфоцити. Представената в таблица 3 литературна справка показва само една малка част от наличните проучвания. В конкретния случай публикациите са подбрани въз основа на най-голям брой, включени във всяка отделна публикация, пациенти.

Таблица 3. Резултати от литературна справка по отношение на процента на Tregs в периферна кръв и синовиална течност при пациенти с РА

Авторски колектив	ПК	СТ
Cao et al., 2003	=*	↑**
Cao et al., 2004	↓*	↑**
Van Amelsfort et al., 2004	↑*	↑**
Jiao et al., 2007	↓*	↑**
Han et al., 2008	↑*	/
Sempere-Ortells et al., 2009	↓*	/
Kawashiri et al., 2011	↓*	/
Lina et al., 2011	↓*	/
Niu et al., 2012	↓*	/
Samson et al., 2012	↓*	/
Cuggino et al., 2015	↓*	/

*ПК: периферна кръв; СТ: синовиална течност; ↓ – намаление; = без сигнификантна промяна;/ – не е изследвано; * спрямо здрави контроли; ** спрямо периферна кръв от пациенти с РА.*

TNF-α и IL-17 могат да потискат имуносупресивния потенциал на Tregs *(Van Amelsfort et al., 2007*) и редица автори спекулират, че високите нива на TNF-α при РА могат да са едни от факторите, водещи до нарушаване на функцията на Tregs. Ehrenstein и сътр. докладват, че Tregs, изолирани от пациенти с РА, могат да потискат пролиферацията на автореактивните Т-хелперни субтипове, но е силно намалена способността им да потискат цитокиновата продукция на проинфламаторни цитокини Прилагането на TNF-α блокиращ моноклонален препарат при същата група пациенти води до „подобряване“ способността на Tregs да упражняват контрол върху синтеза на проинфламаторни

циткони като IL-6, IL-17 и да секретират сигнификантно по-високи нива на IL-10 и TGF-β (*Nadkarni et al., 2007*). Flores-Borja et al. свързват описания дефект в компартмента на Tregs с понижена експресия на CTLA-4 от страна на Tregs *(Flores-Borja et al., 2008)*. Важен аспект от действието на високите нива на TNF-α върху Treg е, че водят до повишена експресия на TNFRII, което усилва ефекта на TNF-α върху Tregs субпопулацията и води до потисната експресия на FoxP3 (*Nagar et al., 2010*). Друг механизъм, описан в литературата, е, че TNF-α може да инхибира супресивната активност на Treg, като влияе върху формирането на имунологичен синапс и съответно взаимоотношенията между Tregs и АПК чрез увеличаване на активността на протеин киназа С-тета (PKC-θ) и потискане на функцията на Dlgh1 (Disc large homolog 1). Намаленият брой на Tregs при пациенти с РА би могъл да бъде обяснен с усилена апоптоза сред техния компартмент (*Xiao et al., 2011*), едно от обясненията за което е повишената секреция на TRAIL (Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) от ефекторни Т-хелперни лимфоцити (*Xiao et al., 2011*).

Заключение

Появата на новите терепевтични лекарствени форми: биологични и таргетни синтетични болестопроменящи антиревматични лекарствени средства (БПАРЛ), бележи нова ера в терапията на РА, но все още остават редица непосрещнати необходимости (*Moreland, 2005*). Одобрените за ревматоиден артит биологични БПАРЛ са инжекционни лекарствени форми, съдържащи моноклонални антитела, насочени срещу TNF-α (Адалимумаб, Цертолизумаб, Инфлексимаб) или срещу IL-6 (Тоцилизумаб), докато принципът на действие на таргетните синтетични БПАРЛ е блокиране на JAK/STAT сигнално-трансдукционните пътища (Тофацитиниб, Баритициниб). Тоест биологичните БПАРЛ са прицелени в блокирането на TNF-α или IL-6 сигналните пътища, докато JAK/STAT сигналната инхибиция може да потисне ефекта на широка група цитокини, обобщавани като цитокиново семейство използващи рецептори с обща γC верига. Най-често прилаганите и възприемани като първа линия за биологична терапия биологични БПАРЛ са тези, насочени срещу TNF-α. Въпреки своята терапевтична ефективност спрямо конвенционалните БПАРЛ, счита се, че около 30% от пациентите с РА остават

рефрактерни към биологичните БПАРЛ (*Dalal et al., 2019*). Неефективността на биологичните БПАРЛ би могла да бъде търсена във факта, че блокирането на единичен цитокинов сигнален път не е достатъчно да потисне множеството дисрегулации, характерни за РА. Освен това появата на антитела, насочени срещу биологичното лекарствено средство, могат да „отслабят" ефекта на биологичната терапия, а също да доведат до прояви на странични ефекти, свързани с циркулиращи имунни комплекси, потенциално свързани с автоимунни феномени (*Van Schouwenburg, Rispens and Wolbink, 2013*). Въпреки безспорните терапевтични преимущества на широконавлизащите биологични средства – блокатори на TNF-α, IL-6, anti-CD20, един основен проблем остава нерешен. Радиографска прогресия на ставните поражения се наблюдава дори когато е постигната клинична ремисия по отношение на ставното възпаление и болковия синдром (*Cohen et al., 2007*). Прилагането на биологични и таргетни синтетични БПАРЛ също така е съпроводено с увеличен риск от развитието на активна и латентна туберкулозна инфекция, други инфекци, както и поява на неопластични процеси. Наличието на редица непосрещнати необходимости при терапията на пациенти с РА поражда нуждата от разработването и внедряването на нови стратегии за терапевтично повлияване при РА.

На този фон МСК от години попадат в полезрението и широко се дискутира потенциалното им приложение като средства за терапевтично повлияване в широк спектър заболявания, едно от които е и РА. Редица аргументи могат да бъдат посочени в подкрепа на евентуалната терапевтична полза от МСК при РА. Част от тях са:

✓ МСК могат да потискат и да регулират имунния отговор, като осъществяват сложна комуникация с имунните клетки на множество нива;

✓ Те имат начин на действие, реципрочен на блокирането на цитокинов сигнален път;

✓ Контактът между МСК и имунните клетки е двупосочен и може да усилва имуносупресивния потенциал на МСК, тоест има индивидуален характер;

✓ МСК са слабоимуногенни, което от друга страна е силен аргумент в посока ограничаване на страничните и нежеланите реакции при евентуална инфузия на авто-/алогенни човешки МСК;

✓ МСК освен потискане на имунния отговор биха могли да бъдат полезни и чрез регенераторните си способности за костна, синовиална и хрущялна регенерация.

Способността на синовиалните МСК за диференциация в хондрогенна и остеогенна насока поставя въпроса за евентуалната им възможност да послужат като източник на мултипотентни стволови клетки, които да способстват процесите на хрущялна и костна репарация.

Проучванията на редица колективи демонстрират ефективността на МСК-базирани стратегии за терапевтично повлияване при РА (*Wang et al., 2013, Papadopoulou et al., 2020*). Съгласно Liu et al. алогенната трансплантация на МСК се оказа успешна стратегия за индуциране на ремисия при група от пациенти, рефрактерни към биологични и конвенционални БПАРЛ (*Liu et al., 2015*). Справка в официалната база данни на клиничните проучвания на Националната медицинска библиотека на САЩ показва 12 текущи активни проучвания, посветени на терапевтичните ползи от МСК при РА.

Прилагането и внедряването на нови терапевтични подходи при лечение на РА можем да сравним като „сделка“, своеобразен процес на договаряне, който цели да балансира евентуалните ползи и постигнати цели с дълготрайните последици и странични ефекти от приложената терапия. По отношение познанието за природата на МСК е извървян дълъг път от ранните проучвания на пионерите в областта на МСК от Pittinger до наши дни. Въпреки тези постижения, внедряването на нов терапевтичен подход неминуемо изисква задълбочени познания за механизмите на имуносупресия, осъществявани от МСК, конкретно при пациенти с РА.

3. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на дисертационния труд е да се изследва имунорегулаторното действие на кондиционирани среди от мезенхимни стволови клетки от човешка адипозна тъкан върху Т-лимфоцити на пациенти с ревматоиден артрит. Основни лимфоцитни субпопулации, обект на настоящия дисертационен труд, бяха Th17 и Tregs хелперните лимфоцити.

За постигане на **целта** си поставихме **следните задачи**:

- **По отношение на пациентите с РА**

Проспективен подбор и охарактеризиране на подбраните пациенти с РА. Изследване на антитела срещу CCP, MCV, РФ от класове IgM, IgG и IgA и АНА.

- **По отношение на изследването на секреторни фактори, съдържащи се в средите от АТ-МСК**

Изследване на секреторния профил на кондиционираните среди от АТ-МСК: TGF-β, IL-10, TNF-α, IFN-γ, IL-4, L-6, IL-17A, IL-21, IL-23, sVEGF-A, PGE_2, IDO, CCL2, CCL5 и IL-8.

- **По отношение на изследването на имунорегулаторното действие на среди от АТ-МСК върху Т-хелперни лимфоцити от пациенти с ревматоиден артрит**

1. Изолиране и култивиране на периферни кръвни мононуклеарни клетки (ПКМК) от пациентите с РА и култивирането им съгласно добре установени, описани и публикувани протоколи с кондиционирани среди от АТ-МСК и с контролни среди за клетъчно култивиране.

2. Изследване динамиката в процентното съдържание на Th17 и Tregs субпопулациите в клетъчните култури на ПКМК, култивирани с кондиционирани среди от АТ-МСК, спрямо клетъчни култури на ПКМК, култивирани с контролни среди.

3. Изследване динамиката в процентното съдържание на активирани ефекторни Т-клетки в клетъчните култури на ПКМК, култивирани с кондиционирани среди от АТ-МСК, спрямо клетъчни култури на ПКМК, култивирани с контролни среди.

4. Изследване на фенотипните промени, засягащи пула на моноцитните клетки в клетъчните култури на ПКМК, култивирани с кондиционирани среди от АТ-МСК, спрямо клетъчни култури на ПКМК култивирани с контролни среди – промяна в експресия на HLA-DR; промяна в експресията на CD80/CD86 комплекса; промяна в експресията на CD14 маркера.

5. Оценка на разликите в секрецията на TGF-β, IL-10, TNF-α, IFN-γ, IL-4, L-6, IL-17A, IL-21, IL-23, sVEGF-A, PGE_2, IDO и CCL2 в клетъчните култури на ПКМК, култивирани с кондиционирани среди от АТ-МСК, спрямо клетъчни култури на ПКМК, култивирани с контролни среди.

6. Статистическа обработка на получените резултати.

4. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

4.1. Изследвани лица и биологичен материал

4.1.1. Подбор на пациенти с ревматоиден артрит

Подборът и клиничната оценка на пациентите бяха извършени в Клиниката по ревматология на УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ – София. За периода от септември 2017 до септември 2018 г. последователно бяха анализирани 70 пациенти с диагноза ревматоиден артрит (РА). Бяха събрани и обобщени пълните анамнестични, клинични и наличните лабораторни и имунологични параметри на пациентите, като в допълнение на това всички пациенти бяха изследвани за автоантитела срещу CCP, MCV и RF от класове M, G и A, АНА, а също и CRP. Селектирането на подходящите пациенти, от които на следващ етап да бъдат добити периферни мононуклеарни клетки, беше базирано на *apriori* зададени включващи и изключващи критерии. Съобразно зададените критерии, 17 болни с РА бяха определени като подходящи и последователно включени в експерименталната постановка. **Лимитаци**: Важно ограничение при провеждане на експерименталната дейност по изолирането и култивирането на периферни кръвни мононуклеарни клетки в кондиционирани среди от АТ-МСК беше времеемкостта на опитните постановки. Допълнително това беше съобразено и с друг лимитиращ фактор: ограничения брой налични към времето на селекция на пациентите кондиционирани среди от АТ-МСК (осигурени с любезното съдействие на Тъканна банка „Булген“, в съответствие с *Приложение 1-А към Договор за вземане и изследване и съхраняване на мезенхимни стволови клетки от мастна тъкан).*

Броят на опитните постановки (17), извършени в рамките на дисертационния труд, беше напълно адекватен и сходен с данните за подобни изследвания, налични в научната литература.

Бяха включени 17 пациенти с умерено- и високоактивен РА, от които 16 жени и 1 мъж, на възраст над 18 г. (средна възраст 54 ± 10 години) и средна продължителност на заболяването Median (IQR): 6 години (1-11 години). Всички болни отговаряха на ревизираните класификационни критерии на ACR/EULAR 2010 за РА (табл. 4) и нямаха извънставни прояви на болестта.

***Таблица 4. Ревизирани класификационни критерии на ACR/EULAR 2010 за РА** (Aletaha et al., 2010)*

Критерии		Точки
Периферен артрит	➢ 1 голяма става	**0**
	➢ 2-10 големи стави	**1**
	➢ 1-3 малки стави (± големи стави)	**2**
	➢ 4-10 малки стави (± големи стави)	**3**
	➢ > 10 стави (от които ≥ 1 малка става)	**5**
Серология	➢ Негативен RF и ACPA	**0**
	➢ RFs и/или ACPA позитивни в нисък титър (концентрация ≤ 3 х над горна референтнаграница)	**2**
	➢ RFs и/или ACPA позитивни във висок титър (> 3 х над горна референтна граница)	**3**
Възпалителни реактанти	➢ СУЕ и CRP в референтни граници	**0**
	➢ СУЕ и CRP > горна референтна граница	**1**
Давност на оплакванията	➢ < 6 седмици	**0**
	➢ ≥ 6 седмици	**1**
Наличие на РА при изпълнени критерии с общ сбор ≥ 6 точки		

От гледна точка на провежданата терапия, 3-ма пациенти бяха лекувани с нестероидни противовъзпалителни средства (НСПВС), 7 бяха лекувани само с ниска доза кортикостероиди (10 mg/ден), 7 пациенти бяха лекувани с конвенционални синтетични болестопроменящи антиревматични лекарства (ксБПАРЛ): метотрексат, в комбинация с ниска доза орален кортикостероид.

Селектирането на подходящите пациенти беше базирано на *apriori* зададени включващи и изключващи критерии.

4.1.1.1. Включващи и изключващи критерии

❖ **Критерии за включване на пациентите с РА:**

– Мъже и жени на възраст ≥ 18 години;

– Лица, желаещи и способни да подпишат информирано съгласие за участие в проучването, включително за вземане на биологичен материал – периферна венозна кръв;

– Поставена диагноза РА у възрастни, съобразно ревизираните класификационни критерии за РА на ACR/EULAR (*Aletaha et al., 2010*);

– Наличие на умерена или висока болестна активност, дефинирана като DAS28-CRP > 3.2;

❖ **Критерии за изключване**:

– Диагностицирано друго възпалително ставно заболяване или системно ревматично заболяване (подагра, псориатичен или реактивен артрит, болест на Crohn, лаймска болест, ювенилен идиопатичен артрит, системен лупус еритематодес, системна склеродермия или поли/дерматомиозит);

– Наличие на органоспецифично автоимунно заболяване;

– Предшестваща терапия с биологично или таргетно-синтетично болестопроменящо антиревматично лекарство (бБПАРЛ или тсБПАРЛ);

– Приложение на КС в дневна доза над 10 mg преднизолон (или еквивалент);

– Лица с активна или хронична хепатит B- или C-вирусна инфекция, HIV инфекция или друго активно инфекциозно заболяване;

– Наличие на активна или латентна туберколозна инфекция;

– Съпътстващо малигнено заболяване;

– Съпътстващи тежки или неконтролирани заболявания (включително, но не само: респираторни, чернодробни, бъбречни, гастроинтестинални, ендокринни, кожни, неврологични, психиатрични, хематологични или имунологични/имунодефицитни заболявания);

– Неконтролиран захарен диабет;

– Други соматични или психични заболявания или лабораторни отклонения, които биха могли да повлияят на интерпретацията на резултатите от проучването и по мнение на екипа правят пациента неподходящ;

4.1.1.2. Оценка на болестната активност чрез индекса DAS28-CRP

Активността на заболяването беше измерена посредством Disease Activity Score 28-CRP (DAS28-CRP). DAS28-CRP е комбиниран индекс, включващ следните клинични и лабораторни показатели: брой оточни стави (ОС), брой болезнени стави (БС), серумно ниво на CRP (mg/l), глобална оценка на пациента за болестната активност за предходните 7 дни на визуална аналогова скала (VAS) между 0 и 100 mm ("0": липсва активност, "100": възможно най-висока активност). За калкулирането на DAS-CRP се оценяват 28 стави: проксимални интерфалангеални стави (10 стави), метакарпофалангеални стави (10), гривнени стави (2), лакътни стави (2), раменни стави (2), коленни стави (2).

Ние отчетохме скора с помощта на on line калкулатор (https://www.das-score.nl/das28/DAScalculators/dasculators.html). По-високите стойности на индекса означават по-висока активност на заболяването (van der Heijde et al. 1992).

- Стойност на DAS-CRP >5.1 съответства на висока болестна активност;
- DAS-CRP между 3.2 и 5.1 отговаря на умерена болестна активност;
- DAS-CRP между 2.6 и 3.2 означава ниска болестна активност;
- Стойност на DAS-CRP < 2.6 се интерпретира като ремисия.

4.1.1.3. Демографски и клинико-лабораторни данни

Събрани бяха данни за демографските и клиничните характеристики на заболяването при всеки пациент към момента на включване в проучването, включително давност на заболяването, физикално изследване на ставите за болка и оток, продължителност на сутрешната скованост, общата болка и цялостното състояние, оценени чрез визуално-аналогова скала (VAS), както и за провежданата терапия.

Анализирани бяха изотиповете (RF) от трите имуноглобулинови класа IgG, IgM и IgA в серума на пациентите, антителата срещу CCP, антитела срещу MCV, както и антинуклеарните антитела посредством индиректна имунофлуоресценция (ИИФ) на HEp-2 клетъчен субстрат. Беше тествана серумната концентрация на възпалителния биомаркер CRP и за наличие на възпалителна активност бяха приети стойности на CRP > 6 mg/l. Пробите бяха изработени с любезното съдействие на Клинична лаборатория, УМБАЛ „Св. Иван Рилски" – София.

4.1.1.4. Информирано съгласие и вземане на биологичен материал от изследваните пациенти с РА

Всички участници бяха запознати с целите на изследването и доброволно подписаха информирано съгласие според Декларацията от Хелзинки, като проучването беше одобрено от Комисията по етика на научните изследвания към Медицински университет – София. Личните данни и резултатите от изследването са съхранявани, обработвани и представяни в съответствие със Закона за защита на личните данни, в сила от 01.01.2002 г., изм. ДВ. бр.57 от 13

юли 2007 г. и с Регламент (ЕС) 2016/679 на Европейския парламент и на Съвета, от 27 април 2016 година, относно защитата на физическите лица във връзка с обработването на лични данни и относно свободното движение на такива данни, като е спазен действащият понастоящем Кодекс на професионалната етика – Раздел IV; Лекарска тайна; чл. 51 и чл. 55.

С цел изследване на супресивното действие на среди от АТ-МСК върху имунокомпетентни клетки от пациенти с РА, беше събиран биологичен материал –периферна венозна кръв и кръвен серум. След рутинна венепункция беше взета периферна венозна кръв с вакутейнери за пълна кръв, съдържащи фикол (BD Vaacutainer CPT, NC: 1.0 ml, FICOLL 2.0 mL) и за серум (BD Vacutainer®, CATREF 367955, 5 ml). Кръвните проби на всички лица бяха изследвани в Лабораторията по клинична имунология към УМБАЛ „Свети Иван Рилски“ – София. Серумите бяха отделени съобразно стандартната оперативна процедура в Лабораторията, описани и съхранявани на t -80°C, според изискванията за добра лабораторна практика и според инструкциите на търговските китове.

4.1.1.5. Източник на кондиционирани среди

Кондиционирани среди от АТ-МСК бяха получени с любезното съдействие на Тъканна банка „Булген“ и Клиниката по ортопедия и травматология, УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ“, София. Мастна тъкан беше добита при рутинно ендопротезиране на тазобедрена става от здрави донори, съответстващи по възраст. Тъканната банка доказва АТ-МСК съгласно критериите на International sociaty of cell therapy (*Dominici et al., 2006*). Тези критерии се опират на способност на клетките за клоногенност, трилинейна диференциация и експресия на CD73, CD90, CD105, при липса на експресия на хематопоетични маркери. Кондиционираните среди са ни предоставени при рутинна смяна на среда при клетъчно култивиране на всеки 72 часа (*в съответствие с Приложение 1-А към Договор за вземане и изследване и съхраняване на мезенхимни стволови клетки от мастна тъкан*).

4.2. Методи за изследване на автоантитела при пациентите с РА

4.2.1. Изследване на антитела срещу CCP

С цел да се определи автоантителният профил на пациентите с РА, техните серуми бяха изследвани за наличието на автоантитела срещу CCP. Автоантителата срещу CCP в серумите на болните с РА бяха определени посредством имуноензимен метод (ELISA).

- **Материал за обработка**: серум.
- **Необходими реактиви и консумативи**: QUANTA Lite^{R} CCP 3.1 IgG/Ga ELISA, Inova-QuantaLite^{TM} с каталожен номер:704550). Наборът се съхранява при температура от 2 до 8˚C и е стабилен до изтичане срока на годност.
- **Необходима апаратура**: Elisa reader, Microplate Photometer MPP-96 (Biosan, USA).
- **Принцип на метода**

Използваните в настоящия дисертационен труд китове са твърдофазови ELISA за *in vitro* количествено определяне на автоантитела в биологични материали. При този метод гнездата на съответната микротитърна плака са натоварени с антигени, носители на епитопи, разпознавани от паратопите на анти-CCP автоантителата. След добавяне на изследваната проба, съответните автоантитела се свързват към фиксираните върху гнездата на плаката антигени. След това се добавя биотинилирано антитяло, което също се свързва специфично с FC фрагмента на антителата. Като детекционна система се използва конюгат на horse-radish peroxidase (HRP) със стрептавидин, който се свързва с биотина и след добавяне на субстрата тетраметилбензидин (TMB) протича ензимна реакция с образуване на цветен продукт. Ензимната реакция се стопира с H_2SO_4, след което се извършва спектрофотометрично отчитане. Интензитетът на цветния продукт е в зависимост от количеството антиген в биологичната проба. Построява се крива според калибраторите на всеки кит и по нея се определя количеството на търсения фактор в тестваните проби.

- **Изпълнение на метода**

Изследваните серуми, разредени 1:101, бяха накапвани заедно с предоставените в кита калибратори (от A до E с концентрации съответно 15.625,

31.25, 62.5, 125 и 250 U/ml), две положителни и една отрицателна контрола. Оптичната плътност беше отчитана при дължина на вълната 450/630 nm на Elisa reader (Microplate Photometer MPP-96, Biosan, USA).

- **Вътрешен качествен контрол, калибрация и интерпретация на резултатите**. Тестът бе приет за валиден тогава, когато бяха изпълнени следните критерии:

– абсорбцията (OD) на високоположителната контрола (A) трябва да е много по-висока от нискоположителната контрола, а тя на свой ред да е по-висока от отрицателната контрола.

– OD на калибратор A (15.625 U/ml) > 1.0

– OD на отрицателната контрола ≤ 0.2

– OD на нискоположителната контрола трябва да е 2 пъти повече от OD на (–) контролата или > 0.25.

- **Изчисление**

Индивидуалните стойности на антителата бяха изчислени след построяване на стандартна крива с предоставените в кита калибратори. Отчетените резултати бяха анализирани с Mean% CV функцията в програма за биостатистическа обработка GraphPadPrism 6. За построяване на стандартната крива използвахме четирипараметричен логистичен модел (*Приложение 2*), съгласно указанията на производителя. В допълнение, той беше предпочетен като най-подходящ ($p < 0.05$), спрямо другите математически модели, тъй като имаше най-висок коефицент на корелация ($R^2 = 0.9999$) (фиг. 2). За серуми с OD, по-малка от най-малкия стандарт, беше позволена екстраполация, чрез използване на построеното регресионно уравнение, а серуми с OD, по-високо от най-големия калибратор, бяха разредени и повторно анализирани.

- **Тълкуване и референтни интервали:**

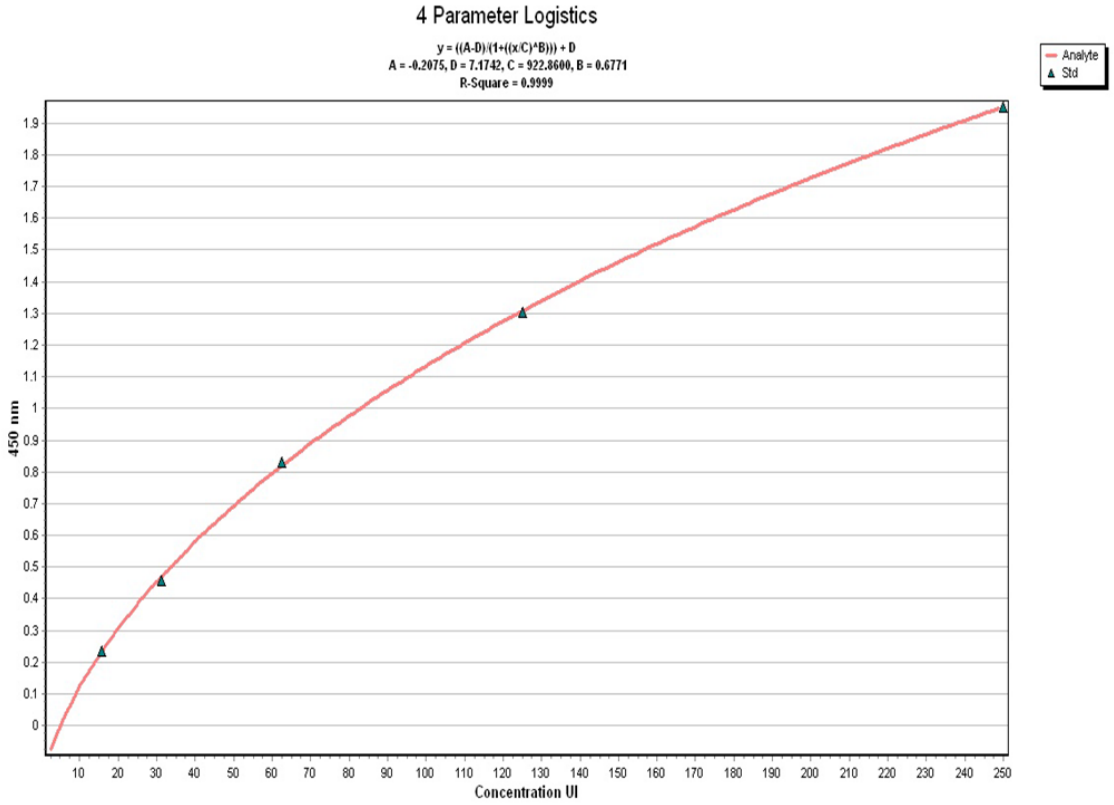
– отрицателен < 20 UI/ml

– слабоположителен > 20 UI/ml

– умереноположителен > 39 UI/ml

– силноположителен > 59 UI/ml

- **Граница на откриване:** 1 UI/ml
- **Диагностична стойност на теста:** чувствителност 70.3% (95%CI, 66-74%); специфичност 97.8% (95% CI, 96-99%)



***Фигура 2**. Стандартна крива, изобразяваща зависимостта между абсорцията (OD) и концентрацията на антителата срещу CCP в използваните калибратори. Зависимостта следва логистично разпределение. Приложено е регресионното уравнение с четири параметъра, R^2= 0.999, p=0.001*

4.2.2. Изследване на антитела срещу MCV

Пълното охарактеризиране на автоантителния профил наложи и изследването на антитела срещу MCV.

- **Материал за обработка:** серум;
- **Необходими реактиви и консумативи:** Anti-MCV ELISA IgG, каталожен номер: 228 на фирмата ORGENTEC Diagnostika GmbH (Mainz-Germany) (фиг. 3).
- **Необходима апаратура:** автоматичен анализатор ALEGRIA^R ORGENTEC GmbH (Meinz, Germany) (фиг. 3).

- **Принцип на метода**: виж 3.2.1
- **Изпълнение на метода**

Системата Alegria^{R} се състои от микроленти с баркод и 8 ямки, наречени тест-ленти Alegria^{R}. Всяка тест-лента съдържа пълен комплект реактиви и е предназначена за изследване на една пациентска проба. Тест-лентата Alegria^{R} съдържа ензимен конюгат, ензимен субстрат, буфер за проба и специфична за теста контрола. Наред с това всяка лента съдържа две ямки, покрити с антиген, които служат като реакционни ямки за една контрола и една пациентска проба.

- **Вътрешен качествен контрол, калибрация и изчисление на резултатите**: с помощта на технологията SMCR (Sensotronic Memorized Calibration) всички тестови данни се прехвърлят към системата чрез индивидуални баркодове на тест-лентите Alegria^{R}. Диапазонът на изчисляване на този анализ Alegria^{R} е 0-1000 UI/ml.
- **Тълкуване на резултатите и референтни интервали**: отрицателен < 20 UI/ml; положителен ≥ 20 UI/ml
- **Граница на откриване**: най-ниското количество откриваеми антитела е 1 UI/ml.
- **Диагностична стойност на теста:** чувствителност – 82.0%; специфичност – 97.8%; ефективност – 93.0%



***Фигура 3**. Съдържание на търговски набор за изследване на Anti-MCV, ORGENTEC GmbH (Meinz, Germany). Автоматичен анализатор ALEGRIA^{R} ORGENTEC GmbH (Meinz, Germany)*

4.2.3. Изследване на ревматоиден фактор (RF-IgM, IgG и IgA)

За допълнителна оценка на имуноогичната активност пациентските серуми бяха изследвани и за ревматоидни фактори (RF) от трите имуноглобулинови класа.

- **Материал за обработка**: серум
- **Необходими реактиви и консумативи**: търговски китове от ORGENTEC Diagnostika GmbH (Mainz-Germany):
  - Rheumatoid Factor IgM, ELISA Кат. Номер 222M;
  - Rheumatoid Factor IgG ELISA Кат. Номер 222G;
  - Rheumatoid Factor IgA ELISA Кат. номер 222A
- **Необходима апаратура**: автоматичен анализатор ALEGRIA^{R} ORGENTEC GmbH (Meinz, Germany).
- **Принцип на метода**: виж 3.2.1;
- **Изпълнение на метода**: виж 3.2.2;
- **Тълкуване на резултатите и референтни интервали *(за RF от трите класа):*** отрицателен < 20 UI/ml; положителен ≥ 20 UI/ml
- **Граница на откриване**: най-ниското количество откриваеми антитела е 1 UI/ml.

Диагностична стойност	**RF IgM**	**RF IgG**	**RF IgA**
Чувствителност	91.7%	83.8%	78.5%
Специфичност	92.9%	91.1%	92.9%
Ефективност	92.7%	86.4%	83.7%

4.2.4. Определяне на АНА чрез ИИФ на HEp-2 клетъчна линия

Оценката на автоантитяловия профил на включените в изследването пациенти включваше и изследване на АНА.

- **Необходими реактиви и консумати**: търговски кит АНА-HEp-2 тест (IFT: HEp-2, EUROIMMUN AG, Germany).

- **Необходима апаратура:**

1) Nikon Eclipse Ci-L (Japan) и софтуерна програма NIS – Elements Analysis D.

2) Авоматизирана система за изработване на слайдове по метода имунофлуоресценция: iPRO IF Processor (Biosystems, Spain).

- **Изпълнение на метода**

Всички серумни проби бяха изследвани за наличие на АНА чрез ИИФ техника по стандартна процедура или посредством автоматизирана система, съобразно инструкциите на фирмата производител. Изследването на АНА чрез индиректна имунофлуоресценция (ИИФ) върху HEp-2 клетки днес е всеобщо приет и унифициран стандарт сред световната имунологична общност. То е неделима част от АНА скрининга на системните и орган-специфичните автоимунни възпалителни заболявания. HEp-2 (CCL-23 from American Type Culture Collection) е акроним от Human epethelioma type 2 cells. Тя е обезсмъртена клетъчна линия, която води началото си от туморна клетъчна популация, получена от човешки ларингеален карцином. Серумните проби на пациентите бяха скринирани в разреждане 1:80 в буфериран физиологичен серум заедно с положителен и отрицателен контролен серум във всяка серия. Положителните серуми в скрининговото разреждане 1:80 бяха изследвани в двукратно падащи разреждания за определяне на крайния титър. Анализирането на имунофлуоресцентните образи с определяне на титър и тип светене, спрямо номенклатурата на International consensus on ANA Patterns" (ICAP), както и определянето на титъра на АНА, бе извършено с флуоресцентен микроскоп Nikon Eclipse Ci-L (Japan) и с помощта на софтуерна програма NIS – Elements Analysis D.

- **Cut off титър**: като АНА положителен (+) се определя резултат с титър над 1:160, докато за АНА отрицателен резултат (-) се приема липса или наличие на флуоресценция с титър под 1:160.

- **Специфичните имунофлуоресцентни образи, установени върху HEp-2 тестовете, са разпределени в 3 основни групи:**

– Ядрени светения ("истинските" АНА) – 15 специфични ИИФ образа;

– Цитоплазмени светения – 9 специфични ИИФ образа;

– Митотични светения – 5 специфични ИИФ образа.

➢ **Първото класификационно дърво за АНА имунофлуоресцентни образи** съгласно ICAP включва 28 типа светене, обозначени с код, представен като абревиатурното съкращение – *AC,* означаващо anti-cell pattern. Всяко светене е дефинирано и описано в детайли, като със символа – се обозначава всеки тип светене, при който се оцветява специфично и хроматина на клетките в различна фаза на митоза.

4.3. Изолиране на мононуклеарни клетки от периферна венозна кръв и култивирането им в кондиционирани среди от АТ-МСК при пациенти с РА

4.3.1. Изолиране на мононуклеарни клетки от периферна венозна кръв от пациенти с РА

С цел да изследваме влиянието на среди от АТ-МСК върху имунокомпетентни клетки, получени от пациенти с РА, от всеки пациент бяха изолирани периферни кръвни мононуклеарни клетки (ПКМК).

➢ **Използвани реактиви**: За отделяне на мононуклеарните клетки от цялостна кръв бяха използвани вакутейнери 8 ml BD Vacutainer^{R} CPT^{TM} (NC: 1.0 ml, FICOLL^{TM}: 2.0 mL;Becton, Dickinson and Company, Boston USA) Каталожен номер: REF 362761.

➢ **Изполвана апаратура и технически средства:**

1) центрофуга (Haereus, Germany);
2) епруветки от 15 мл FALCON (BD, USA);
3) пастьорки (FL MEDICAL, Itally);
4) пипетор (Assistboy, Biosan SIA, Latvia);

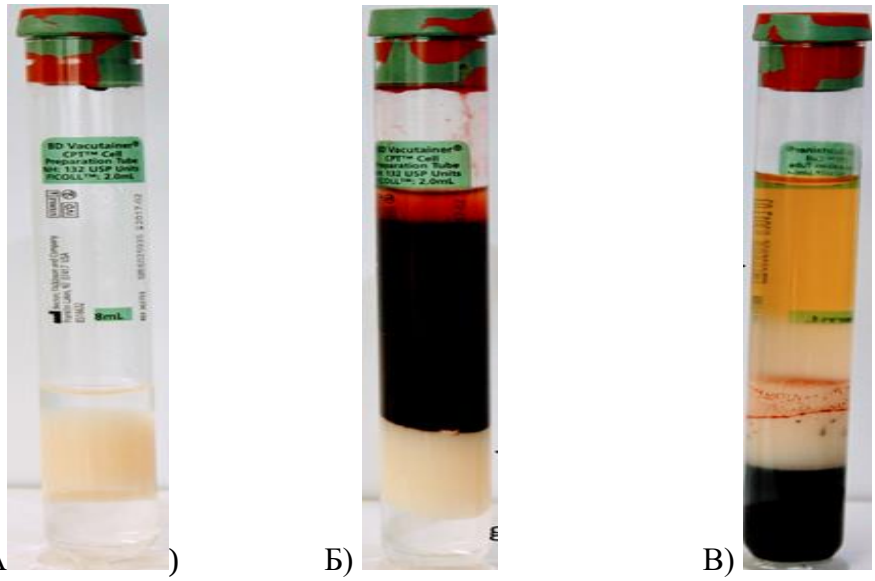
➢ **Принцип на метода:**

BD Vacutainer® CPT™ е система за събиране на кръв, съдържаща 0.1 ml антикоагуланта натриев цитрат и среда за отделяне на кръв, съставена от тиокстропичен полиестеренов гел и разтвор на FICOLL™ Hypaque™. Системата

за отделяне на кръв се възползва от сравнително ниската плътност на мононуклеарните клетки. Същността на т.нар. метод на центруфугиране в плътностен градиент е, че сепарацията става по време на центрофугиране, когато гелната част на средата се придвижва, за да образува преграда, разделяща ПКМК от получената по-плътната фракция (гранулоцити и еритроцити) (фиг. 4). На следващ етап ПКМК могат да бъдат събрани чрез пипетиране.

- **Изпълнение на метода:**

1) Беше взета 8 ml периферна венозна кръв.
2) Вакутейнерите бяха разклатени неколкоратно.
3) В рамките на 10 min от вземането на пробата, вакутейнирите бяха центруфугирани при 1500-1800 g (3000 оборота) за около 20 min в хладилна центруфуга (Haereus, Germany) при температура 15˚C.
4) Периферните ПКМК бяха пипетирани с пастьорка (3 ml) или с пипетор.



А) Б) В)

Фигура 4*. Сепариране на ПКМК с BD Vascutainer CPT. Празен вакутейнер (А), вакутейнер преди центрофугиране (Б), Сепарация на ПКМК от по-плътната фракция (В)*

4.3.2. Култивиране на ПКМК с кондиционирани среди от АТ-МСК и с контролни среди за клетъчно култивиране

- **Използвана апаратура и технически средства:**

1) Нискооборотна центрофуга (Haereus, Germany);

2) Инкубатор с бутилка CO_2: C02CELL 50 Comfort (MMM Medcenter Einrichtungen GMBH, Munchen, Germany);

3) Епруветки от 15 ml FALCON (BD, USA);

4) Пастьорки (FL MEDICAL, Itally);

5) Шест ямкови плаки, Primo multiwell plate ET3006 (EuroClone, Itally);

6) Физиологичен разтвор;

7) DMEM/F12 (PAN Biotech);

8) 10%FBS (Fetal Bovine serum, heat inactivated, sterile-filtered, N4762 – 100 ml, SIGMA^R, USA);

9) Cell Wash (BD CellWASH, BD Biosciences, USA.

- **Работен протокол**

1) Промиване с физиологичен разтвор – епруветката, съдържаща сепарираните ПКМК, се допълва догоре и се центрофугира на 1200 оборота за 10 min.

2) Средата се изхвърля и се добавя физиологичен разтвор до 4 ml и се ресуспендира добре с пастьорка.

3) Разделяне в две 15 ml епруветки (по 2 ml във всяка), след което центрофугиране на 1200 оборота за 5 min и отливане.

4) Изолираните от всеки пациент ПКМК бяха преброени в камера на Burker и разделени в две ямки на 6-ямкова плака по 1 x 10^6 клетки на ямка.

5) Към едната ямка беше добавена 3 ml АТ-МСК среда, а към контролната – DMEM/F12 (PAN Biotech) + 10%FBS.

6) Плаката се поставя в CO_2 инкубатор за 60 часа при температура 37° C и 5%CO_2.

7) След изтичане на инкубационния период клетките се пипетират заедно с техните супернатанти.

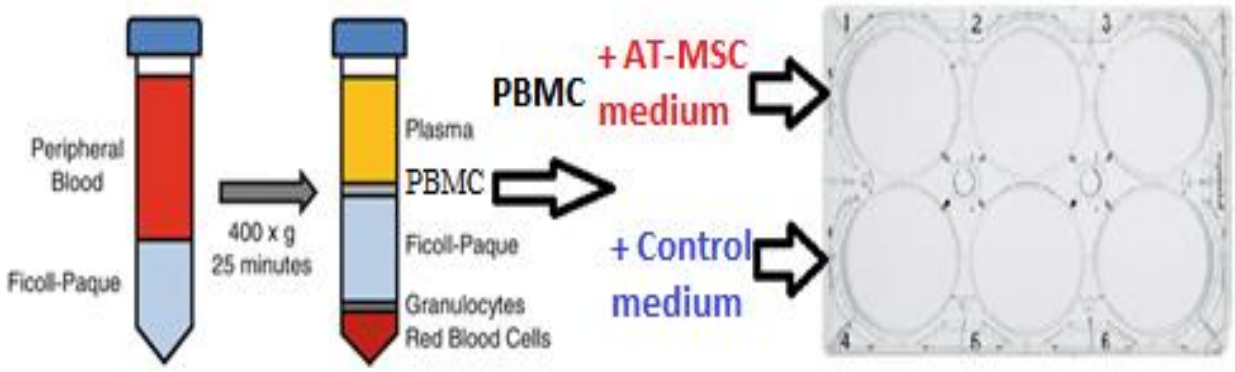
8) Клетките и техните супернатанти се отливат в две епруветки: съответно епруветка, съдържаща ПКМК и техните културелни среди след култивиране с кондиционирани среди на АТ-МСК, и друга епруветка, съдържаща ПКМК и техните културелни среди след култивиране с DMEM/F12+10%FBS.

9) Центрофугиране на 1200 оборота за 5 min.

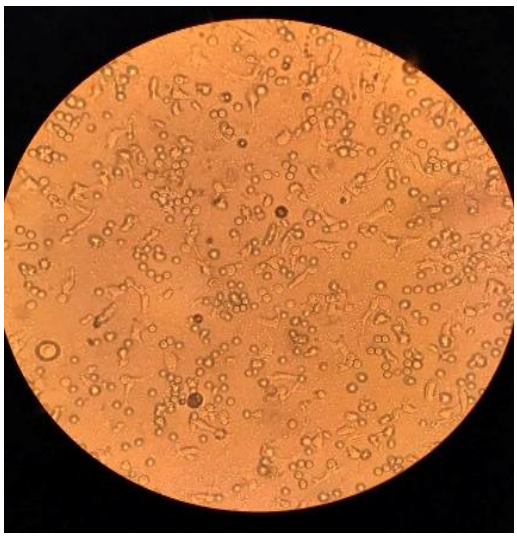
10) Отливане и запазване на културелните среди (замразяване при t -80°C).

11) Измиване на клетките с по 2 ml Cell Wash и ценруфугиране на 1200 оборота за 5 min.

12) Отливане и ресуспендиране с 500 µl Wash.



***Фигура 5а**. Схема на култиваниране върху плака. PBMC-ПКМК; AT-MSC medium- среди от АТ-МСК; control medium- Контролни среди*



***Фигура 5б**. Микрофотография на култивираните ПКМК (увеличение x40)*

4.4. Флоуцитометрично изследване на T17 и Tregs хелперни субпопулации след култивирането им с кондиционирани среди на АТ-МСК

4.4.1. Определяне на процент на Th17 хелперни лимфоцити след култивирането им с кондиционирани среди на АТ-МСК

С цел да се изследва ефектът на разтворимите фактори, налични в кондиционираните среди на АТ-МСК, беше определен флоуцитометрично процентът на Th17 хелперните лимфоцити в клетъчните култури на ПКМК.

- **Материал за изследване**

Периферни мононуклеарни клетки, получени от включените в изследването пациенти с РА.

- **Изисквания на преданалитичния етап**

Изолираните и култивирани ПКМК при условията, описани в т. 3.3.2, трябва да бъдат маркирани с флоурохром белязани антитела в рамките на 30 min от отделянето им от културелните среди.

- **Аналитичен принцип**

Към клетъчната суспензия бяха добавени флоурохром-белязани антитела, разпознаващи различни повърхностни молекули, след което клетките бяха подготвени за поточна цитометрия и пробите бяха отчетени на флоуцитометър FacsCalibur (BD, USA). Бяха използвани антитела, маркирани със съответните флуорохроми – FITC, PE, PerCP, APC, като флоуресценцията, предизвикана при възбуждането на FITC, беше отчетена в канал FL-1, PE в FL-2, PerCP в FL-3 и APC в FL-4. Съответните компенсанции поради припокриване (спектрален overlap) на спектрите на емитираната светлина на различните флуорохроми бяха въведение при калибрация на флоуцитометъра.

- **Използвана апаратура и други технически средства**

1) Флоуцитометър FACSCalibur (BD, USA)
2) Нискооборотна центрофуга (Haereus)

3) Вортекс миксер Vortex V1 (Boeco, Germany)

4) Полистиренови тест-епруветки 12 x 7.5 mm (BD Falcon, USA)

5) Автоматични вариабилни пипети и мултипипетор.

- **Необходими реактиви и консумативи**

1) Mouse anti-Human CD3 (FITC-маркирано), Cat: 556619, LOT 2240666, BD Pharmingen, USA;

2) Mouse anti-Human CD4 (PerCP-маркирано), Cat: 347324, LOT 43969, BD Pharmingen, USA;

3) Mouse anti-Human CD161 (PE-маркирано) Cat: 556081, LOT: 6336962, BD Pharmingen, USA;

4) Mouse anti-Human CD196 (CCR6) (AlexaFluor647-маркирано) Cat: 556619, LOT: 5139987, BD Pharmingen, USA;

5) BD FACS CellWash, REF 349202 BD Pharmingen, USA;

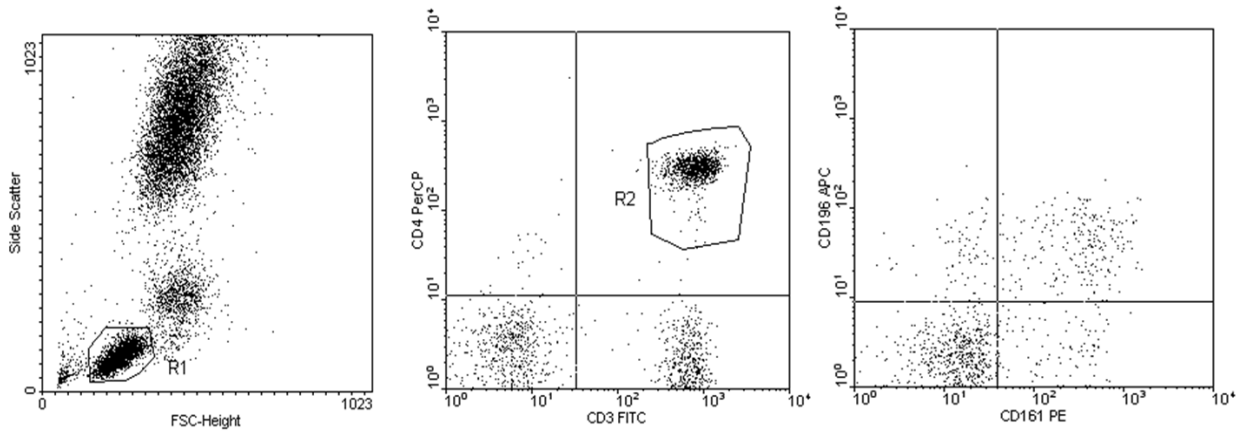
6) CellFix фиксиращ разтвор pH 7.4, REF: 340181, LOT: 1103401018.

- **Изпълнение на метода**

1) Във флоуцитометрична епруветка се накапват по 20 µl от всяко от четирите антитела CD3 (FITC), CD4 (PerCP), CD161 PE, CD196 (CCR6) Alexa Fluor647 заедно със 100 µl клетъчна суспензия. Инкубиране на тъмно за 30 min на стайна температура.

2) Миене с по 2 ml Wash разтвор, центрофугиране на 1200 оборота за 5 min, отливане и вортексиране.

- **Добавяне на 200 µl фиксиращ разтвор**
- **Отчитане на флоуцитометър**
- **Отчитане на резултатите** – резултатите са отчетени на FACSCalibur флоуцитометър, като се преброяват 20 000 събития в R2. За последващ анализ се използва софтуерна програма BD Cell Quest (фиг. 6).
- **Калибрация** – апаратът флоуцитометър е калибриран фабрично, но всеки ден при работа се препоръчва проверка на тази калибровка и чувствителност, както и евентуална настройка на фотомножителите чрез използването на набора CaliBRITE и програмата AutoCOMP, FACSComp.



***Фигура 6**. Фенотипно определяне на Th17 лимфоцити субпопулации. На фигурата е представен флоуцитометричния подход при опрелянето на процента Th17 лимфоцити. Първоначално се гейтира върху лимфоцитния облак, определен по физични параметри (ляв панел, R1). Вторият гейт се поставя върху $CD3^+CD4^+$ клетките (среден панел, R2). Т-хелперните клетки, които двойно експресират на повърхността си CD161 и CD196 (десен панел, горен десен квадрант), бяха определени като Th17 лимфоцити Показаният флоуцитометричен подход беше използван при определянето на Th17 за всички опитни постановки*

4.4.2. Флоуцитометрично определяне на процент на Tregs след култивирането им с кондиционирани среди на АТ-МСК

За изследване на имуносупресивното действие на средите от АТ-МСК от централно значение беше сравнението в динамиката на популацията на регулаторните Treg лимфоцити.

- **Материал за изследване**: периферни мононуклеарни клетки, получени от включените в изследването пациенти с РА.
- **Необходими реактиви и консумативи.**

1) Mouse anti-Human CD4 (PerCP-маркирано), Cat: 347324, LOT 43969, BD Pharmingen, USA;

2) Mouse anti-Human CD25 (FITC-маркирано) Cat: 345796, LOT: 5139987, BD Pharmingen, USA;

3) Mouse anti-Human FoxP3 (PE-маркирано) Cat: 556619, LOT: 5139987, BD Pharmingen, USA;

4) Mouse anti-Human PD-L1 (APC- маркиран) Cat:563741, LOT: 7096630, BD Pharmingen, USA;

5) Human FoxP3 Buffer A (10x), Cat: 51-9005451, LOT: 6356789, BD Pharmingen, USA;

6) Human FoxP3 Buffer B (50x), Cat: 50-9005450, LOT: 7153902, BD Pharmingen, USA;

7) BD FACS CELL WASH, REF 349202 BD Pharmingen, USA;

8) CellFix фиксиращ разтвор pH 7.4,REF:340181, LOT: 1103401018.

- **Изпълнение на метода**

1) В епруветка се накапват по 20 µl CD4 (PerCP) и 20 µl CD25 (FITC), 20 µl PD-L1 (APC) заедно със 100 µl от клетъчната суспензия. Инкубиране на тъмно за 30 min на стайна температура.

2) Миене с по 2 ml Wash разтвор, центрофугиране на 1200 оборота за 5 min, отливане и вортексиране.

3) Буфер А (1:10): за 2 епруветки: 4.5ml dH2O + 500 µl буфер А. Към всяка епруветка се добавят по 2 ml от приготвения буфер А. Оставащият буфер А се използва на по-късен етап. Ресуспендиране с пипета. Инкубиране на тъмно за 20 min на стайна температура.

4) Центрофугиране на 1600 оборота 5 min. Отливане, ресуспендиране.

5) Миене с по 2 ml Wash разтвор. Центрофугиране на 1600 оборота за 5 min. Отливане. Ресуспендиране с пипета.

6) Буфер В (1:50): за 2 епруветки – 20µl буфер В в 800 µl буфер А. От работния разтвор на буфер В във всяка епруветка се добавя по 0.5 ml. Ресуспендиране с пипета. Инкубиране на тъмно за 30 min на стайна температура.

7) Ресуспендиране с пипета. Добавяне на 2 ml Wash разтвор. Центрофугиране на 1600 оборота 5 min. Отливане. Ресуспендиране с пипета.

8) Миене с по 2 ml Wash разтвор. Центрофугиране на 1600 оборота за 5 min. Отливане. Ресуспендиране с пипета на остатъчната течност на дъното на епруветката.

9) Добавяне на 20 µl анти-FoxP3 антитяло. Инкубиране на тъмно за 30 min на стайна температура.

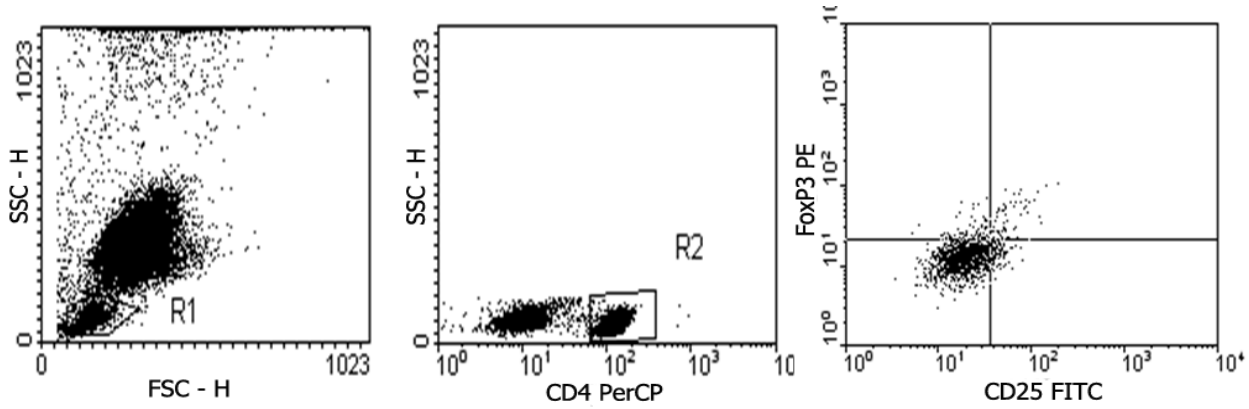
10) Ресуспендиране с пипета. Добавяне на 2 ml Wash разтвор. Центрофугиране на 1600 оборота за 5 min. Отливане. Ресуспендиране с пипета.

11) Миене с по 2 ml Wash разтвор. Центрофугиране на 1600 оборота за 5 min. Отливане. Ресуспендиране с пипета.

12) Добавяне на 200 µl фиксиращ разтвор.

13) Отчитане на флоуцитометър.

- **Отчитане на резултатите** – резултатите са отчетени на флоуцитометър FACSCalibur, като се преброяват 10 000 $CD4^+$ лимфоцити. За последващ анализ се използва софтуерна програма BD Cell Quest (фиг. 7).



***Фигура 7**. Фенотипно определяне на $CD4^+CD25^{+/-}FoxP3^+$ Т-лимфоцити. Първоначално се гейтира върху лимфоцитния облак, определен по физични параметри (R1, ляв панел). Вторият гейт се поставя върху $CD4^+$ клетките (R2, среден панел). Десният плот е гейтиран по логичен гейт, направен чрез комбинация между гейт едно и гейт две. Наблюдават се (десен панел) две субпопулации $CD4^+FoxP3^+$ клетки, като се счита, че класическите Tregs са с висока експресия на CD25 и FoxP3 (десен панел, горен десен квадрант). Беше определен и процентът на $CD4^+FoxP3^+$ клетки с ниска/липсваща експресия на повърхностния маркер $CD25^{low/-}$ (десен панел, горен ляв квадрант). Използваната гейтираща стратегия ни позволи също така да определим и процента на $CD4^+CD25^+FoxP3^-$ Т-лимфоцитите (десен панел, долен десен квадрант). Посочената гейтираща стратегия беше използвана при фенетипното определяне на Treg и $CD4^+CD25^+FoxP3^-$ Т-лимфоцитите при всички опитни постановки с ПКМК от 17 пациенти с РА.*

***Забележка**: Беше отчетен и процентът на PD-L1 положителни Tregs, като флоуцитометричният подход не е отразен.*

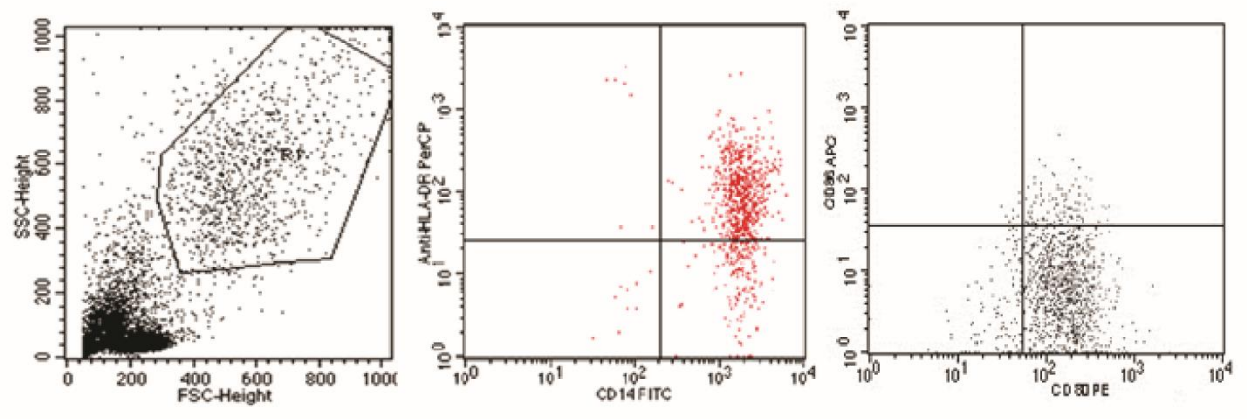
4.5. Флоуцитометрично определяне на процента моноцитни клетки след култивирането им с кондиционирани среди на АТ-МСК

Централно място в изследването на имуносупресивното действие на разтворимите фактори на АТ-МСК беше посветено и на изследването на динамиката на моноцитните клетки в културите на човешки ПКМК култивирани със среди от АТ-МСК.

- **Материал за изследване:** *(виж т.3.3.3.1)*
- **Изисквания на преданалитичния етап** *(виж т.3.3.3.1)*
- **Необходими реактиви и консумативи:**

1) Mouse anti-Human CD14 (FITC), Cat: 347493, LOT 80219, BD Pharmingen, USA;
2) Mouse anti-Human HLA-DR (PerCP), Cat:347402, LOT 2165883, BD Pharmingen, USA;
3) Mouse anti-Human CD80 (PE), Cat: 557277, LOT 7096733, BD Pharmingen, USA;
4) Mouse anti-Human CD86 (APC), Cat: 555660, LOT 7075585, BD Pharmingen, USA;

- **Изпълнение на метода** *(виж. т. 3.3.3.1)*



Фигура 8. *Фенотипно определяне на моноцитни клетки. Моноцитни клетки бяха гейтирани по физични характеристики (R1, ляв панел), след което бяха определени процентът $CD14^+$ моноцити (среден панел, горен и долен десен квадрант) и процентът HLA-DR експресиращи $CD14^+$ моноцити (среден панел, горен десен квадрант). Беше установен процентът $CD80^+CD86^+$ двойноекспресиращи моноцити като процент от всички клетки, избрани в R1 (десен панел).*

Забележка: *Беше определена и средната плътност (mean fluorescent intensity MFI) на експресията на описаните повърхностни молекули (подходът не е показан)*

4.6. Определяне на процент на Т-лимфоцити и моноцитни клетки в етап на ранна и късна апоптоза

Определянето на процента клетки (лимфоцити и моноцитни) в ранна и късна апоптоза е от голямо значение за оценка на влиянието на секреторните фактори в средата на АТ-МСК.

- **Материал за изследване** *(виж т. 3.3.3.1)*
- **Изисквания на преданалитичния етап** *(виж т. 3.3.3.1)*
- **Аналитичен принцип**

Оцветяването с FITC-конюгиран Анексин V, заедно с багрилото пропидиев йодид (PI), позволява да се идентифицират клетките, които се считат за жизнеспособни (FITC-конюгиран Annexin V и PI отрицателни), клетките в ранна апоптоза (PI отрицателен, FITC-конюгиран Annexin V положителни) и клетките, които са в късна апоптоза или вече са мъртви, са двойноположителни за FITC-конюгиран Annexin V и PI.

- **Необходими реактиви и консумативи**

FITC Annexin V Apoptosis Detection KitI (BD Pharmingen, USA):

1) Mouse anti-Human Annexin V (FITC), Cat: 556420, LOT: 556547, BD Pharmingen, USA;

2) Propidium Iodide Staining Solution, Cat: 51-6621, LOT: 7306525, BD Pharmingen, USA;

3) 10 x Annexin V Binding Buffer, Cat: 51-66121E, LOT: 73268723, BD Pharmingen, USA.

- **Работна процедура**

1) Промиване на клетъчните култури (контрола и проба) с 2 ml Cell Wash.

2) Центрофугиране на 1200 оборота за 10 min.

3) Центрофугиране 2 пъти на 1200 оборота за 5 min със студен Cell wash (4-8°C). Отливане и изхвърляне на супернатанта.

4) Приготвяне на Binding Buffer (10x). За 2 епруветки 100 µl Binding Buffer към 900 µl dH_2O.

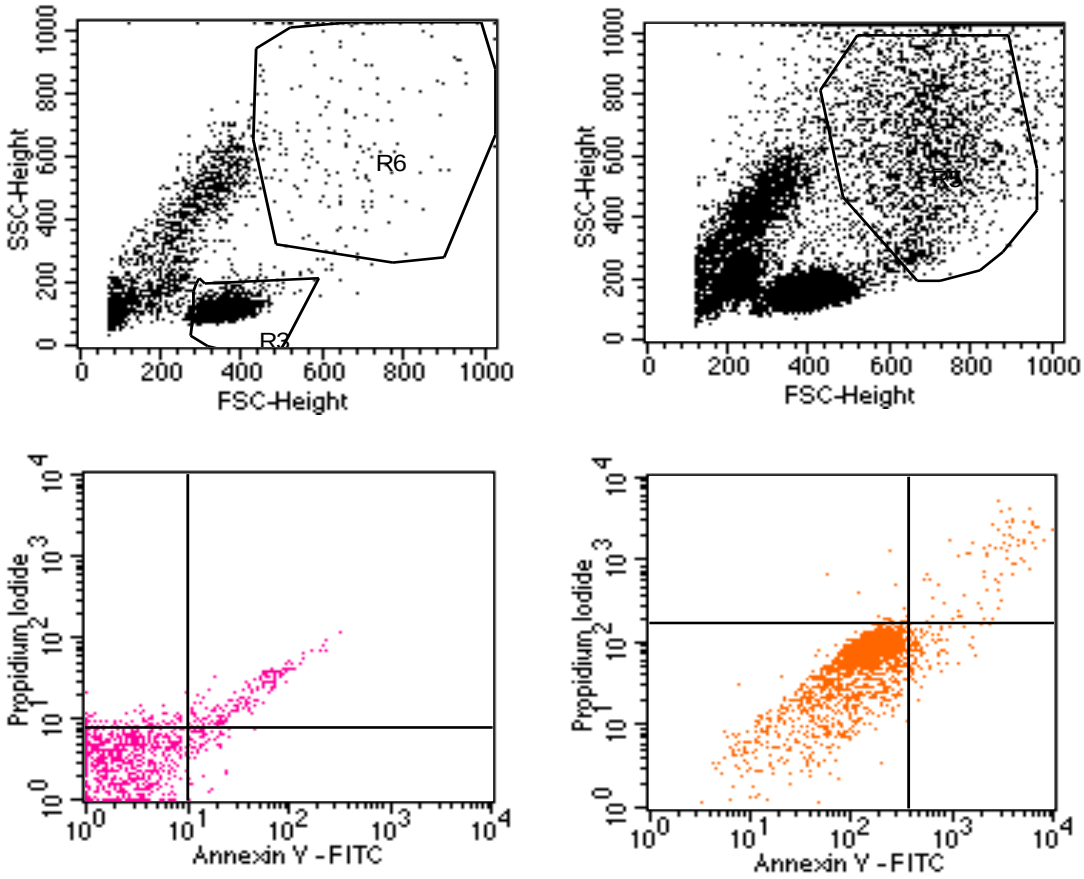
5) Накапване по 5 µl Annexin V (FITC) и 5 µl PI в 2 флоуцитометрични епруветки (контрола и проба).

6) Пробата и контролата се разреждат в 100 µl Binding Buffer и се добавят към антителата

7) Инкубация 15 min.

8) Добавяне на 400 µl Binding Buffer към всяка епруветка.

9) Отчитане в рамките на 1 h.



Фигура 9. *Фенотипно определяне на процент Т-лимфоцити и моноцитни клетки в ранна и късна апоптоза. Първоначално беше гейтирано върху лимфоцитния облак (R3, горен ляв панел) въз основа на физичните характеристики на клетките, след което беше определен процентът на Annexin V-FITC и PI положителни Т-лимфоцити (долен ляв панел). Клетките в етапи на ранна апоптоза бяха положителни за оцветяване с Annexin V-FITC и отрицателни за PI (долен ляв панел, долен десен квадрант), а тези в стадий на късна апоптоза бяха двойноположителни (долен ляв панел, горен десен квадрант). Същият флоуцитометричен подход беше приложен и при определянето на моноцитни клетки в ранна и късна апоптоза, с тази разлика, че първоначално беше гейтирано върху моноцитния облак, определен по физични параметри (горен десен панел)*

4.7. Имуноензимни методи за определяне на нивата на TGF-β, IL-10, TNF-α, IFN-γ, IL-4, L-6, IL-17, IL-21, IL-23, sVEGF-A, PGE_2, IDO, CCL2, CCL5 и IL-8 в кондиционирани среди от АТ-МСК и TGF-β, IL-10, TNF-α, IFN-γ, IL-4, L-6, IL-17, IL-21, IL-23, sVEGF-A, PGE_2, IDO и CCL2 в среди, получени след клетъчно култивиране на ПКМК в кондиционирани среди от АТ-МСК

- **Материал за изследване**

1) Кондиционирани среди от АТ-МСК;

2) Среди, получени след клетъчно култивиране на ПКМК, добити от пациенти с ревматоиден артрит, в кондиционирани среди от АТ-МСК

- **Използвани реактиви:**

1) TGF-β Human TGF-β1 ELISA Kit, Cat No: 650.010.096 (Diaclone, France);

2) IL-10 Human IL-10 ELISA KIT, Cat. No: 950.060.096 (Diaclone, France);

3) TNF-α Human TNF-α ELISA Kit, Cat No: DY210-05 (RnDSystems, Minneapolis. USA);

4) IFN-γ Human IFN-γ ELISA Kit, CatNo: 950.000.096 (Diaclone, France);

5) IL-4 Human IL-4 ELISA Kit, CatNo: 851.510.001 (Diaclone, France);

6) IL-6 Human IL-6 ELISA KIT, Cat. No: 950.030.096 (Diaclone, France);

7) IL-17 Human IL-17A ELISA KIT, Cat. No:850.940.096 (Diaclone, France);

8) IL-21 Human IL-21 Platinum ELISA, Cat. No: BMS2043 (Bender MedSystems GmBH, Viena, Austria);

9) IL-23 Human IL-23 ELISA Kit, CatNo: 850.920.096 (Diaclone, France);

10) PGE_2 Prostaglandin E2 High Sensitivity ELISA Kit, Cat No: ab133055; (Abcam, UK);

11) sVEGF-A Human sVEGF-A ELISA Kit, Cat. No: 650.080.096 (Diaclone, France);

12) IDO Human Indoleamine 2,3-dioxygenase, Cat No: DY6030-05 (RnDSystems, Minneapolis, USA);

13) CCL2 Human MCP-1 ELISA Kit, Cat. No: 873.030.096 (Diaclone, France);

14) CCL5 Anti-Human RANTES Azide Free Kit, Cat. No: 857.610.000 (Diaclone, France);

15) IL-8 Human IL-8 ELISA Kit, Cat. No: 950.050.096 (Diaclone, France);

- **Използвана апаратура**: ELISA reader: Microplate Photometer MPP-96 (Biosan, USA);

- **Принцип на метода**

Използваните в дисертацията китове са твърдофазови „сандвич" ELISA за *in vitro* количествено определяне на цитокини в биологични материали. При този метод гнездата на съответната микротитърна плака са натоварени с високоспецифични антитела срещу търсения цитокин. След добавяне на изследваната проба се извършва свързване на разтворимия фактор към фиксираните върху гнездата на плаката антитела. След това се добавя биотинилирано антитяло, което също се свързва специфично с антигена. Като детекционна система се използва конюгат: horse-radish peroxidase (HRP) със стрептавидин, който се свързва с биотина. С добавяне на субстрата тетраметилбензидин (TMB) протича ензимна реакция с образуване на цветен продукт. Ензимната реакция се стопира с H_2SO_4, след което се извършва спектрофотометрично отчитане. Интензитетът на цветния продукт е в зависимост от количеството антиген в биологичната проба. Построява се крива според калибраторите на всеки кит и по нея се определя количеството на търсения фактор в тестваните проби.

- **Изпълнение на метода**

За всеки един от изследваните показатели използвахме работен протокол съобразно инструкциите на производителя, приложени в китовете. Всички китове бяха съхранявани при условията, указани от производителите и използвани преди изтичане на срока им на годност. Преди анализиране на TGF-β1,

той беше активиран до имунореактивната му форма чрез ацидифициране и неутрализация. Оптичната плътност (OD) беше отчетена при дължина на вълната 450 nm с корекция за синия цвят на 650 nm с помощта на елайза рийдер (Microplate Photometer MPP-96, Biosan, USA). Минималната откриваемост, посочена в упътването от фирмите производители, е представена в таблица 5.

Таблица 5. Изследвани разтворими фактори и минимален детектируем праг според указанията на фирмата производител

Изследван разтворим фактор:	**Минимален детектируем праг:**
TGF-β1	8.6 pg/ml
IL-10	0.1 pg/ml
TNF-α	0.2 pg/ml
IFN-γ	5.0 pg/ml
IL-4	0.5 pg/ml
IL-6	2 pg/ml
IL-17A	2.3 pg/ml
IL-21	20 pg/ml
IL-23	20 pg/ml
sVEGF-A	7.9 pg/ml
PGE_2	8.26 pg/ml
IDO	200 pg/ml
CCL2	5.8 pg/ml
CCL5	25 pg/ml
IL-8	25 pg/ml

- **Изчисление и валидация**

Индивидуалните стойности на всеки един от анализираните цитокини бяха изчислени след построяване на стандартна крива с помощта на стандарти с позната концентрация. Отчетените резултати бяха анализирани с Mean%CV функцията в програма за статистическа обработка GraphPad Prism 6. За определяне на математически модел, изобразяващ най-точно зависимостта между

OD и концентрацията на изследвания цитокин, бяха използвани линеен, експоненциалиен, логистичен, четирипараметричен и петпараметричен логистичен модел, освен ако конкретен модел не беше изрично зададен от производителя. В случаите, когато конкретен модел не беше указан, критерии за избор на най-подходящия модел беше стойността на коефицента на корелация (R^2). За проби с OD, по-малка от най-малкия стандарт, беше позволена екстраполация, използвайки построеното регресионно уравнение, като стойности, помалки от минималния откриваем праг, бяха съобщавани със стойността на минималния детектабилен праг, проби с OD, по-високо от най-големия калибратор, бяха разредени и повторно анализирани.

4.8. Статистически методи за обработка на получените резултати

Необходими консумативи – програма за биостатистическа обработка на данни: IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. (Armonk, USA), STATISTICA 64 (Statasoft), GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, USA).

4.8.1. Дескриптивна статистика

Използвахме методите на дескриптивната статистика за описание на демографската и клиничната характеристика на пациентите, както и за представяне на данните от изследваните имунологични параметри с показателите на централната тенденция.

4.8.2. Тест за определяне нормалността на разпределението (Shapiro-Wilk)

Извършихме проверка за нормалност на разпределението на променливите посредством теста на Shapiro-Wilk. Типът разпределение определи дали да бъдат използвани параметрични или непараметрични тестове за сравнение на извадки.

4.8.3. Тестове за свързани извадки (T-тест на Student и Wilcoxon matched rank test, Multivariate Hotteling`s T squared)

Съобразно типа на разпределението при сравняване на изследваните клетъчни субпопулации и нивата на изследваните цитокини, продуцирани от култивираните ПКМК от пациенти с ревматоиден артрит, проведохме параметричен или непараметричен тест за свързани извадки.

4.8.4. Факторен анализ (Principal component Analysis) и Partial Least Squares Analysis

Факторният анализ е статистическа техника (**unsupervised technique**) за анализ на *корелациите* между няколко променливи с цел да се намали техният брой до по-малко количество базови променливи, наречени **фактори (главни компоненти),** и да се намери корелацията между първоначалните променливи и новите базови променливи (фактори). **Partial Least squares (PLS) анализът** е статистическа техника, която подобно на факторния анализ има за цел да преобразува данните от многоизмерното пространство в двуизмерен модел, като за целта ги „прожектира" върху нови променливи, наречени **latent variables.** Разликата е, че прожекцията на променливите върху новите променливи (**latent variables)** е ориентирано насочена (supervised technique) към постигане на най-доброто възможно разделение между изследваните групи. За целите на настоящия дисертационен труд PLS анализ беше използван, за да се визулизира в двуизмерното пространство разликата в цитокиновите профили на ПКМК след клетъчно култивиране.

4.8.5. Метод на опорните вектори (Support VectorMachines)

Методът на опорните вектори (SVM, Support Vector Machines) представя експерименталните постановки като точки в n-мерно пространство. Примерите се проектират в пространството по такъв начин, че да бъдат линейно разделими. При работа с два класа се търси начин да се начертае линия, разделяща

данните от двата класа, наречена разделителна хиперравнина. Тази хиперравнина трябва да се избере по такъв начин, че да се намира възможно най-далеч от примерите и на двата класа.

4.8.6. Дървета за регресия и класификация (CART Decision Trees)

С цел да се изследва важността на цитокините, т.е. на кои цитокини в най-голяма степен се дължи разликата между АТ-МСК култивирани с контролни среди спрямо тези АТ-МСК култивирани със среди от АТ-МСК, използвахме алгоритъм CART (дървета за класификация и регресия). Методът подрежда цитокините по важност от 1 до 0, в зависимост от относителната им важност в класификационния алгоритъм.

4.8.7. Клъстерен анализ

Изследваните променливи бяха групирани в клъстери въз основа на корелационния коефицент на Spearman**.**

5. РЕЗУЛТАТИ

5.1. Обобщение на демографските, клиничните и имунологичните характеристики на изследваните пациенти

Съобразно зададените критерии, от 70 изследвани болни с РА, 17 бяха определени като подходящи и бяха последователно включени в експерименталните постановки. Таблица 6 представя обобщените демографски и лабораторни показатели на включените в изследването пациенти.

Таблица 6. Демографски, клинични, лабораторни и имунологични показатели на 17-те пациенти с РА, включени в опитните постановки на настоящия дисерационен труд

Характеристики	РА (n = 17)
Възраст (години)	54 ± 10*
Пол	
Мъже n (%)	1 (6)
Жени n (%)	16 (94)
Продължителност на заболяването (години)	6 (1-11)**
Продължителност на сутрешната скованост (min)	30 (10-90)**
VAS (mm)	70 (45-85)**
CRP (mg/l)	23 ± 15*
DAS28-CRP	5.3 ± 1.2*
Пациенти, положителни за антитела срещу CCP n (%)	15 (88.2)
Концентрация на антителата срещу CCP(UI/ml)	360 ± 260*
Пациенти, положителни за антитела срещу MCV n (%)	14 (87)
Концентрация на антителата срещу MCV (UI/ml)	432±283*
Пациенти, положителни за IgM RF n (%)	12 (70.6)
Концентрация на IgM RF (IU/ml)	214 ± 54*
Пациенти, положителни за IgG RF n (%)	11(65)
Концентрация на IgG RF (IU/ml)	150±46*
Пациенти, положителни за IgA RF n (%)	10 (58)
Концентрация на IgA RF (IU/ml)	126 ± 45*
Пациенти, положителни за АНА (титър ≥160) n (%)	14 (82)
Пациенти с АНА в титър ≥320 n (%)	6 (35)
Пациенти с АНА в титър ≥1:1280 n (%)	4 (24)
Най-често срещани типове имунофлуоресцентно светене***	
AC-1 n (%)	9 (64%)
AC-4 n (%)	9 (64%)

** Данните са представение посредством Mean ± SD. **Данните са представени посредством Median (IQR)*** Типове имунофлуоресцентно светене съгласно номенклатурата на ICAP (International Consensus of ANA Patterns): AC-1 – хомогенен, AC-4 -фино петнист.*

В Таблица 7 са показани индивидуалните стойности на изследваните имунологични параметри при всички участници в проучването.

Таблица 7. Индивидуални стойности на имунологичните показатели на пациентите с РА

Пациенти	DAS 28	MCV	CCP	RF IgM	IgG	IgA	IIF титър	Тип светене по ICAP
1	5,9	474,30	374,86	435,8	99,9	437,2	1:320	AC-1+AC-16
2	8,22	600	723,52	>500	>500	>500	1:160	AC-1
3	4,03	467,3	462,92	>500	122	69,2	1:160	AC-4+AC-18
4	5,25	31,40	3,74	2,6	39,6	4	1:80	AC-4+AC-16
5	5,82	1000	609,52	52,2	32,6	13,2	1:1280	AC-1 +AC-4
6	5,15	8	115,75	394,7	404,6	>500	1:160	AC-1+AC-4
7	3,91	969,5	562,94	33,7	16,8	3,3	1:80	AC-4+AC-16
8	5,43	>1000	153,58	16,7	10,5	12,3	1:160	AC-16+ AC-18
9	3,79	446,7	357,7	0,9	7,8	6	1:160	AC-1
10	4,73	79,8	357,87	>500	>500	39,0	1:80	AC-1
11	5,77	283,6	38,54	29,7	17,5	5,0	>1:1280	AC-1
12	5,09	14,1	357,18	>500	>500	273,5	1:160	AC-4
13	7,16	>1000	570,04	443,2	176,4	230,8	1:160	AC-4
14	6,4	269,38	715,54	64,2	28,7	19,7	1:320	AC-4
15	3,8	30	46,34	7,0	7,8	8,4	1:160	AC-4
16	5,31	18,6	1,59	0,2	5,3	5,4	1:1280	AC-1+AC-4
17	4,32	1000	594,74	172,7	95,6	20,1	1:1280	AC-1+AC-4

5.2. Секреция на цитокини, хемокини и други разтворими молекули от АТ-МСК

За целите на настоящия дисертационен труд кондиционирани среди от АТ-МСК, изолирани от 17 здрави донори, бяха изследвани посредством имуноензимен метод – enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) за наличието на различни цитокини, хемокини и други разтворими молекули с добре проучено действие върху имунокомпетентните клетки: TGF-β, IL-10, TNF-α, IFN-γ, IL-4, IL-6, IL-17, IL-21, IL-23, sVEGF-A, PGE_2, IDO, CCL2, CCL5 и IL-8. От тях TGF-β, IL-10, TNF-α, IFN-γ, IL-4, IL-23, IDO не бяха открити в детектируеми количества в кондиционираните среди от АТ-МСК. IL-6, IL-21, sVEGF-A, PGE_2, CCL2, CCL5 и IL-8 установихме в сравнително висока концентрация, докато IL-17 беше наличен, но присъстваше в ниска концентрация. Описаните

цитокини бяха налични във всички 17 проби от супернатанти на АТ-МСК. Данните са представени в обобщен вид в таблица 8.

Таблица 8. Цитокиновата секреция на АТ-МСК

Цитокини, хемокини и разтворими молекули	**pg/ml***
L-6	250 (210 - 290)
IL-8	550 (100 - 1000)
IL-17A	2 (2.1 - 2.9)
IL-21	50 (40 - 60)
CCL2 (MCP-1)	950 (790 - 1110)
CCL5 (RANTES)	> 1000**
sVEGF-A	3069 (2499 - 3639)
PGE_2	249 (200 - 298)

**Данните са представени посредством стойността на медианата, минимална и максимална стойност*

5.3. Клетъчно култивиране на периферни мононуклеарни клетки, получени от пациенти с ревматоиден артрит с кондиционирани среди от АТ-МСК

В контекста на периферните мононуклеарни клетки избрахме да изследваме броя на Т-хелперните лимфоцитни популации и този на моноцитните клетки, определени като процентно съотношение. За моноцитните клетки изследвахме и плътността на експресия на търсения маркер, определена като mean fluorescence intensity (MFI). Изборът на опитна постановка за клетъчно култивиране на периферни мононуклеарни клетки беше продиктуван от желанието ни да изучим паракринното действие на АТ-МСК, следвайки максимално подобие с физиологичен модел на взаимодействие. Тъй като култивирането на периферни мононуклеарни клетки запазва комуникацията и взаимодействията между субпопулациите на различните имунокомпетентни клетки и е най-близко до т.нар. „физиологичен модел", счетохме, че избраната опитна постановка

е подходяща за нашите цели. ПКМК от 17 пациенти бяха култивирани със 17 среди на АТ-МСК и в сравнителен план с контролни среди за клетъчно култивиране. За оценка на промяната в изследваните променливи използвахме методи за свързани извадки: тест на Student за данните с параметрично разпределение и екзактен тест на Wilcoxon за данните с непараметрично разпределение. Нивото на значимост беше зададено при $\alpha = 0.05$. Освен статистическата значимост, важен аспект при оценяване на резултатите, получени вследствие на култивирането със среди от АТ-МСК, беше и оценката на фактическата значимост, тоест на прекия биологичен ефект. Начин да бъде измерена фактическа значимост е големината на ефекта (d). Големината на ефекта може да бъде класифицирана съгласно предложената от Cohen класификация (*Cohen, 1988*) според стойностите на коефицента "d". Големината на ефекта може да бъде много по-голяма от типичната ($d > 1$), голяма или по-голяма от типичната ($d > 0.80$), средна или типична ($d > 0.5$) и малка или нищожна ($d < 0.2$) (*Cohen, 1988*).

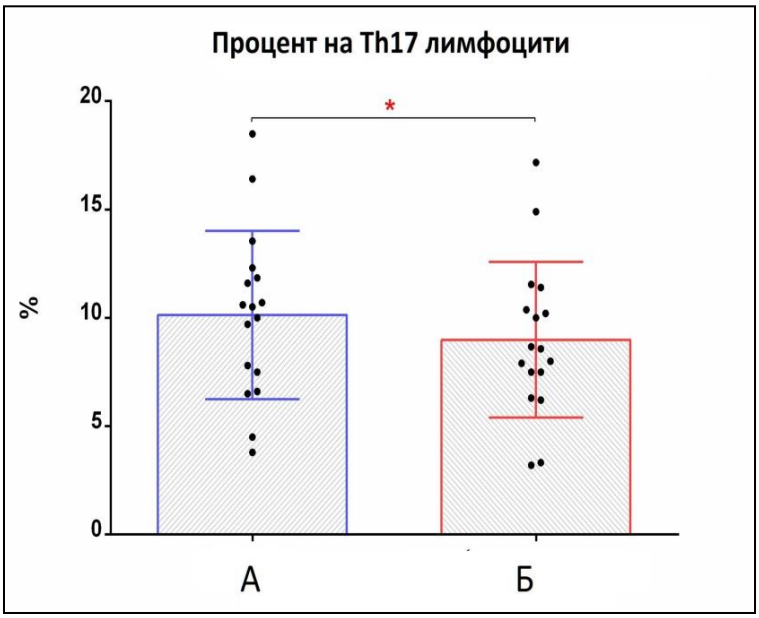
5.4. Влияние на кондиционираните среди от АТ-МСК върху Th17 хелперните лимфоцити

Една от целите на настоящия дисертационен труд беше да установим ефекта на разтворимите фактори, секретирани от АТ-МСК, върху пула от Th17 хелперните лимфоцити. Подходът, който избрахме за определяне на субпопулацията на Th17, беше базиран на добре описан и възприет в литературата подход за определяне на тази субпопулация. Флуоцитометрично беше изследвана повърхностната експресия на фенотипни маркери, характерни за Th17 хелперните лимфоцити, а именно CD3, CD4, CD161 и CD169.

При култивирането на ПКМК с кондиционирани среди от АТ-МСК, процентът на Th17 хелперните лимфоцити беше намален спрямо ПКМК, култивирани с контролни среди. Намалението беше статистически значимо ($p = 0.02$, тест на Student), а големината на ефекта беше по-голяма от типичната съгласно предложената от Cohen интепретация (*Cohen, 1988*). Разпределението на променливата не се различаваше сигнификантно от нормалното Гаус-Лапласово

разпределение (тест на Shapiro-Wilk, $p = 0.80$), затова избрахме да представим данните посредством средната стойност и средното квадратично отклонение от средната стойност. Процентът Th17 в културите на ПКМК, култивирани в контролна среда, беше средно 10.13 ± 3.88%, а в културите на ПКМК, култивирани всреди на АТ-МСК, беше средно 8.98 ± 3.58% (фиг. 10).

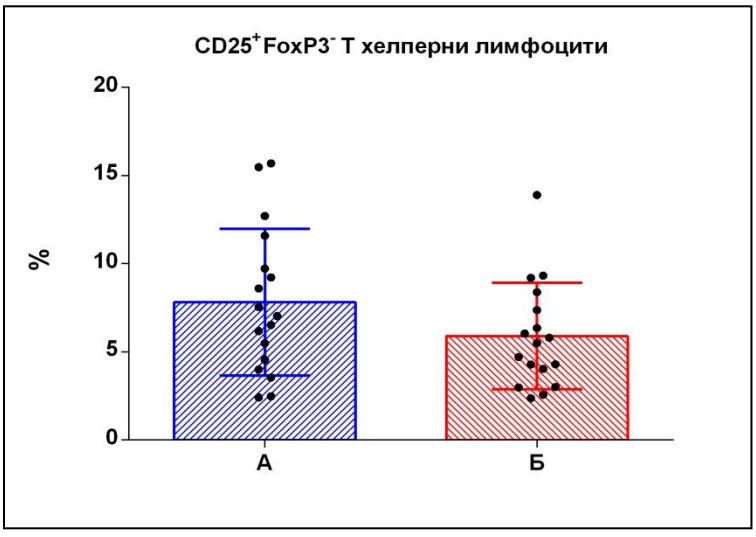
Обратна тенденция с по-висок процент беше наблюдавана в клетъчните култури на само 3-ма пациенти. Интерес представлява фактът, че двама от тези 3-ма пациенти бяха с ранен РА, с давност по-малка от 1 година, като обобщаващата прилика между тях е липсата на адекватно терапевтично повлияване и клинично подобрение от провежданата терапия с метотрексат и орален глюкокортикостероид.



***Фигура 10**. Разлика в процента на Th17 хелперните лимфоцити между ПКМК от пациенти с РА, култивирани в контролни среди за клетъчно култивиране (А) и среди от АТ-МСК (Б). Данните са представени чрез средна аритметична стойност ± средно квадратично отклонение и са обобщаващи за всички 17 експериментални постановки, проведени с ПКМК, добити от 17 пациенти с РА. *$p < 0.05$*

5.5. Влияние на кондиционираните среди от АТ-МСК върху $CD4^+CD25^+FoxP3^-$ ефекторни лимфоцити (Teff)

Беше отчетена и промяната в процента на $CD25^+FoxP3^-$ Т-хелперни клетки в клетъчните култури на ПКМК под действието на разтворими фактори в средите на АТ-МСК. В случая повърхностната експресия на CD25 върху FoxP3 отрицателните Т-лимфоцити беше интерпретирана като активационен маркер (високоафинитетна рецепторна субединица на IL-2 рецептора), характерен за активираните ефекторни CD4+ хелперни лимфоцити. Процентът на $CD25^+FoxP3^-$ Т-хелперните лимфоцити в културите на ПКМК, култивирани с кондиционирани среди от АТ-МСК, беше статистически значимо по-малък от този в ПКМК, култивирани с контролни среди (5.9 ± 3 % vs. 7.81 ± 4.15 %, $p = 0.001$, тест на Student). Големината на ефекта и тук беше по-значителна от типичната. Разпределението на променливата не се различаваше сигнификантно от нормалното разпределение ($p = 0.280$ *и* $p = 0.084$, тест на Shapiro-Wilk), затова и тук избрахме да представим данните посредством средната стойност и средното квадратично отклонение от средната стойност (фиг. 11). Тенденция за по-висок процент на $CD25^+FoxP3^-$ Т-хелперните клетки под действието на средите от стволови клетки беше наблюдавана при култивиране на ПКМК само при един пациент.



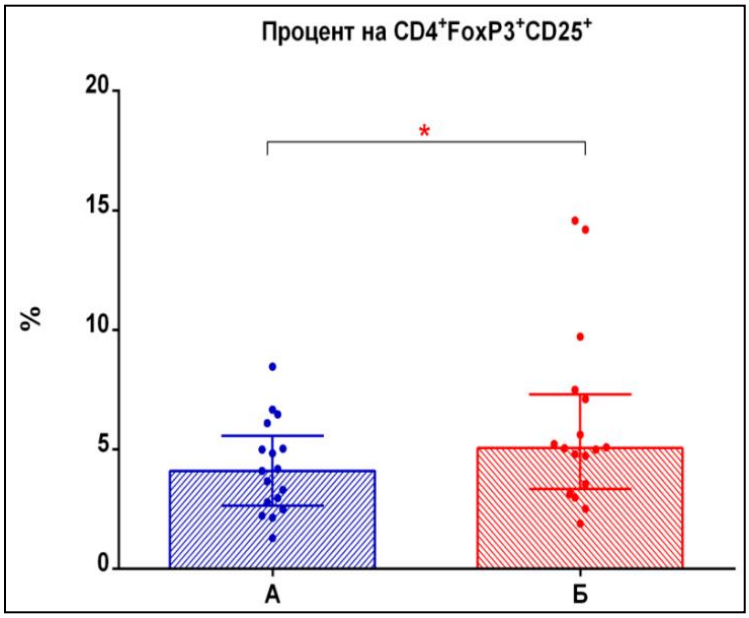
Фигура 11*. Разлика в процента на $CD4^+CD25^+FoxP3^-$ Т-хелперните лимфоцити между ПКМК от пациенти с РА, култивирани с контролни среди за клетъчно култивиране (А) и среди от АТ-МСК (Б). Данните са представени чрез средна аритметична стойност ± средно квадратично отклонение и са обобщаващи за всички 17 експериментални постановки, проведени с ПКМК, добити от 17 пациенти с РА. *$p < 0.05$*

5.6. Промени в пула на Tregs лимфоцити под действието на среди от АТ-МСК

Основна задача, залегнала в целите на настоящия дисертационен труд, беше да проучим механизмите на имуносупресия, осъществявани от АТ-МСК, посредством секретирани разтворими фактори, върху клетки на пациенти с РА. За целите на настоящия труд проследихме промените, настъпващи в пула на „класическите“ $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Tregs, а също така и на $CD4^+CD25^{-/low}FoxP3^+$ лимфоцити с предполагаема имунорегулаторна функция.

5.6.1. Влияние на кондиционирани среди от АТ-МСК върху субпопулацията на $CD4^+CD25^+FoxP3^+$

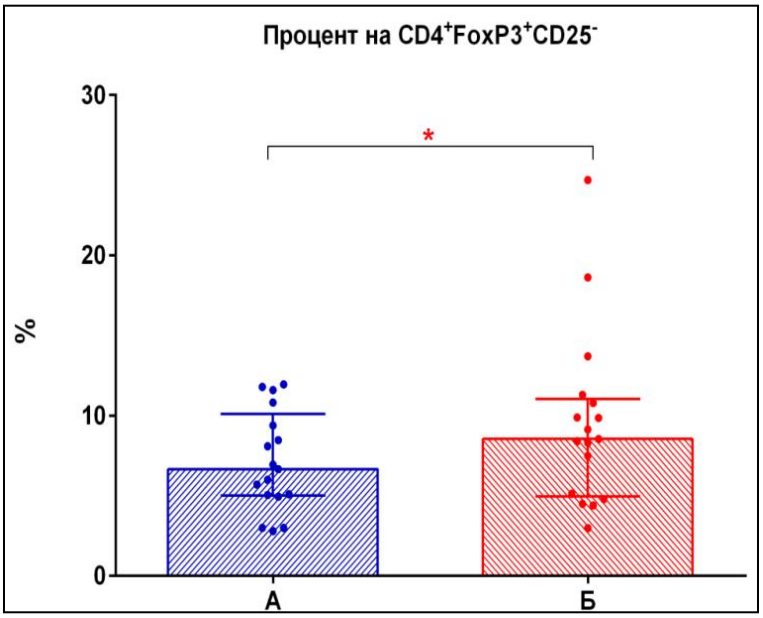
Сравнението на ефекта на разтворимите фактори, продуцирани от АТ-МСК, с контролните среди за клетъчно култивиране върху ПКМК от пациенти с РА показа статистически сигнификантно повишение на процента на $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ ($6.0 \pm 3.7\%$ vs. $4.22 \pm 2\%$, $p = 0.001$) в клетъчните култури, култивирани със среди от АТ-МСК (фиг. 12). Големината на ефекта беше определена като по-голяма от типичната. Структурата на данните показа, че при 16 пациенти процентът на $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ се повишаваше под действието на кондиционираните от АТ-МСК, докато при един промяната беше в посока намаляване.



Фигура 12. *Разлика в процента на „класическите“ Tregs ($CD4^+CD25^+FoxP3^+$) в култури на ПКМК, настъпваща под действието на секреторните молекули от АТ-МСК. Данните са представени чрез Mean ± SD и са обобщаващи за всички 17 експериментални постановки, проведени с ПКМК, добити от 17 различни пациенти с РА, съответно култивирани с контролни среди (А) и кондиционирани среди от АТ-МСК (Б).* $*p < 0.05$

5.6.2. Влияние на кондиционираните среди от АТ-МСК върху субпопулацията на $CD4^+$ $CD25^-FoxP3^+$

Паралелно отчетохме и промяната в процента на $CD4^+FoxP3^+$ Tregs, характеризиращи се с ниска експресия на повърхностния маркер CD25. Намерихме статистически сигнификантно по-висок процент на $CD4^+CD25^{-/low}FoxP3^+$ в клетъчните култури на ПКМК, култивирани с кондиционирани среди от АТ-МСК, спрямо тези с контролни среди за клетъчно култивиране ($9.56 \pm 5.4\%$ vs. $7.13 \pm 3.12\%$, $p = 0.004$) (фиг. 13). Големината на ефекта беше по-голяма от типичната. Тази зависимост беше наблюдавана при 16 независими експеримента, а само в един случай нямаше промяна в процентните стойности.

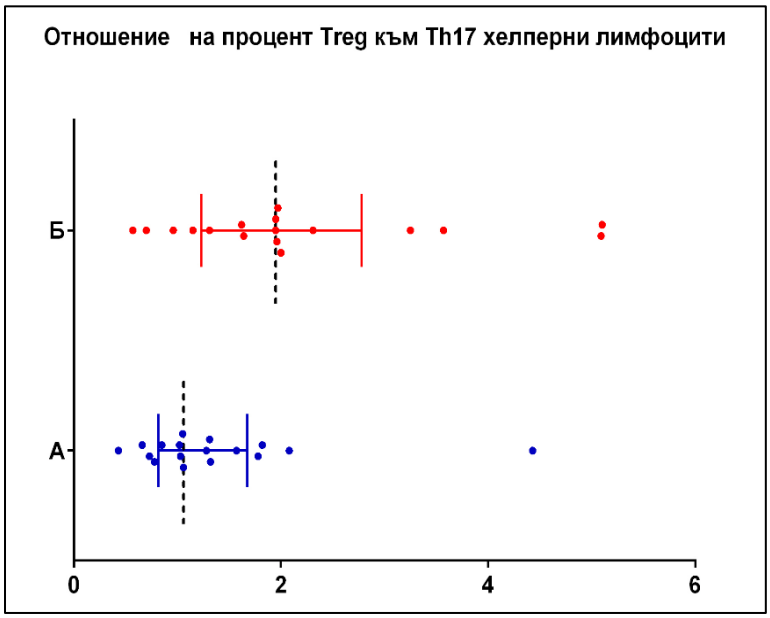


Фигура 13. *Разликата в процента на $CD4^+CD25^-FoxP3^+$ в култури на ПКМК, настъпваща под действието на секреторните молекули от АТ-МСК. Данните са представени чрез Median [IQR] и са обобщаващи за всички 17 независими опитни постановки, проведени с ПКМК, добити от 17 различни пациенти с РА, съответно култивирани с контролни среди (А) и кондиционирани среди от АТ-МСК (Б). *p < 0.05*

5.7. Промяна на процентното съотношение между субпопулациите на Tregs и Th17 хелперните лимфоцити под действие на секреторни фактори в средите от АТ-МСК

С цел да онагледим по-добре промените в пула на Tregs и Th17, изчислихме и процентното съотношението на Tregs към Th17 хелперни лимфоцити за всяка една независима опитна постановка. Нашите резултати ясно показаха

статистически сигнификантно по-високо съотношение на Tregs/Th17 при клетъчните култури, подложени на паракринното действие на секреторните фактори, продуцирани от АТ-МСК, спрямо контролните среди, median [IQR] (1.95 [1.23–2.78] vs. 1.06 [0.81–1.67], *p = 0.002*) (фиг. 14). Поради неправилното разпределение, хипотезата беше проверена с непараметричния рангов тест на Wilcoxon.



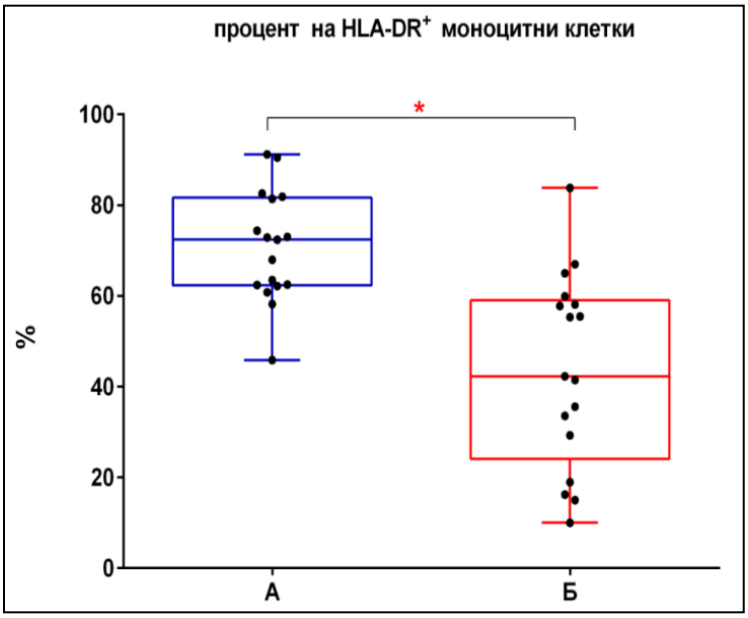
Фигура 14. *Процентно съотношение на CD4⁺FoxP3⁺ Treg към Th17 между ПКМК от пациенти с РА, култивирани с контролни среди за клетъчно култивиране (А) и среди от АТ-МСК (Б). Поради неправилното разпределение, данните са представени чрез Median (IQR). Изчислено е съотношението Tregs/Th17 в клетъчните култури от всички независими 17 опитни постановки, проведени с ПКМК, добити от 17 пациенти с РА. *p < 0.05. Абсцисата отразява съотношението между процента на Tregs към процента на Th17 за всяка една опитна постановка, докато ординатата показва условията на култивиране*

5.8. Ефект на секреторни фактори от АТ-МСК върху експресията на HLA-DR върху моноцитни клетки

Съществен фокус в експерименталната част на настоящия дисертационен труд представлява и изследването на фенотипните промени, настъпващи в пула на моноцитните клетки под въздействието на сектреторните фактори, съдържащи се в кондиционираните среди на АТ-МСК. В нашите изследвания оценихме влиянието върху моноцитните клетки в култури на ПКМК, добити от пациенти с РА. За

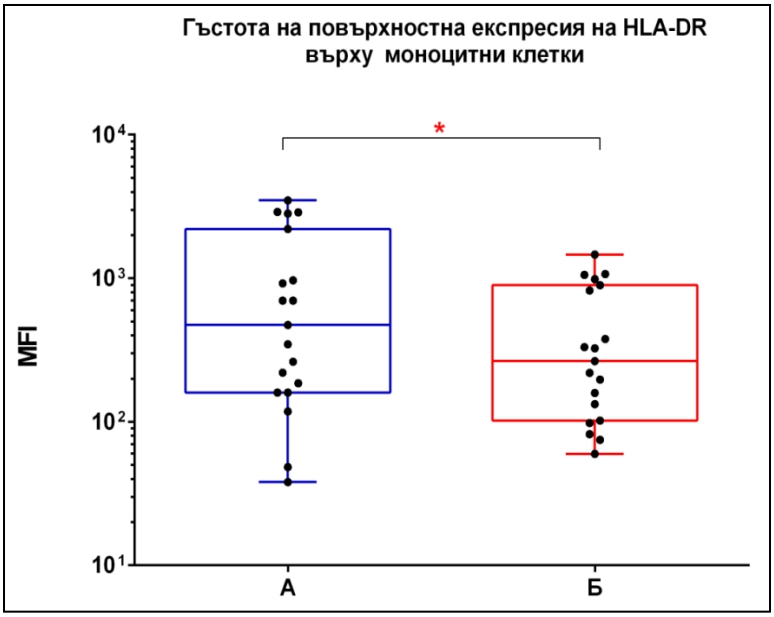
целта моноцитните клетки бяха изследвани флоуцитометричното за повърхностна експресия на маркерите CD14, HLA-DR, CD80 и CD86, като беше определен процентът клетки, експресиращи съответните маркери, а също така беше измерена средната плътност на експресия на всеки маркер (MFI).

На фигура 15 е изобразена разликата в процента на HLA-DR положителни моноцитни клетки в култури на ПКМК от пациенти с РА, култивирани с контролни среди за клетъчно култивиране (А) и среди от АТ-МСК (Б) при всички 17 експериментални постановки.



***Фиура 15**. Разлика в процента на HLA-DR положителни моноцитни клетки в култури на ПКМК от пациенти с РА, култивирани с контролни среди за клетъчно култивиране (А) и среди от АТ-МСК (Б). Данните са представени чрез Median (IQR) и са обобщаващи за всички 17 експериментални постановки, проведени с ПКМК, добити от 17 различни пациента с РА. *p < 0.05*

На фигура 16 е представена разликата в плътността на експресията на HLA-DR върху моноцитни клетки в култури на ПКМК от пациенти с РА, култивирани с контролни среди за клетъчно култивиране (А) и среди от АТ-МСК (Б) при всички 17 експериментални постановки.

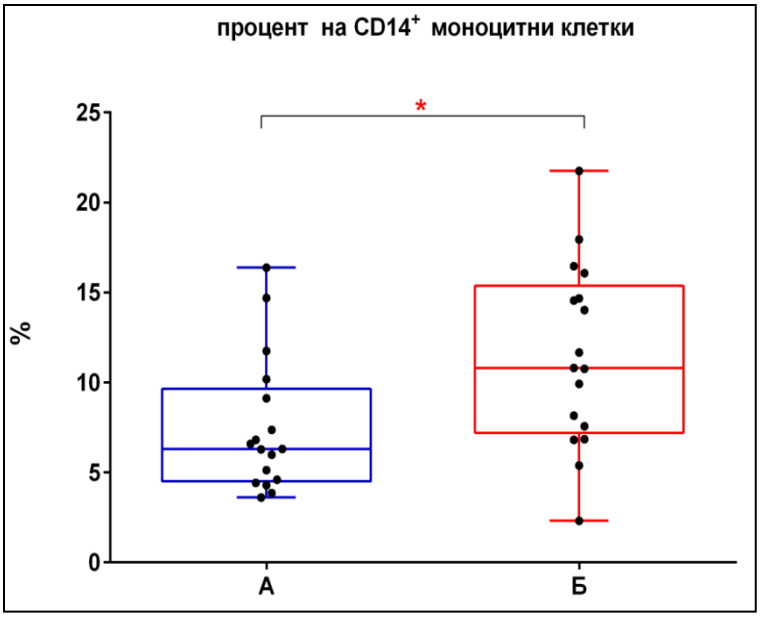


***Фигура 16**. Разлика в плътността на експресията на HLA-DR върху моноцитни клетки в култури на ПКМК от пациенти с РА, култивирани с контролни среди за клетъчно култивиране (А) и среди от АТ-МСК (Б). Данните са представени чрез Median (IQR) и са обобщаващи за всички 17 експериментални постановки, проведени с ПКМК, добити от 17 различни пациента с РА. *$p < 0.05$*

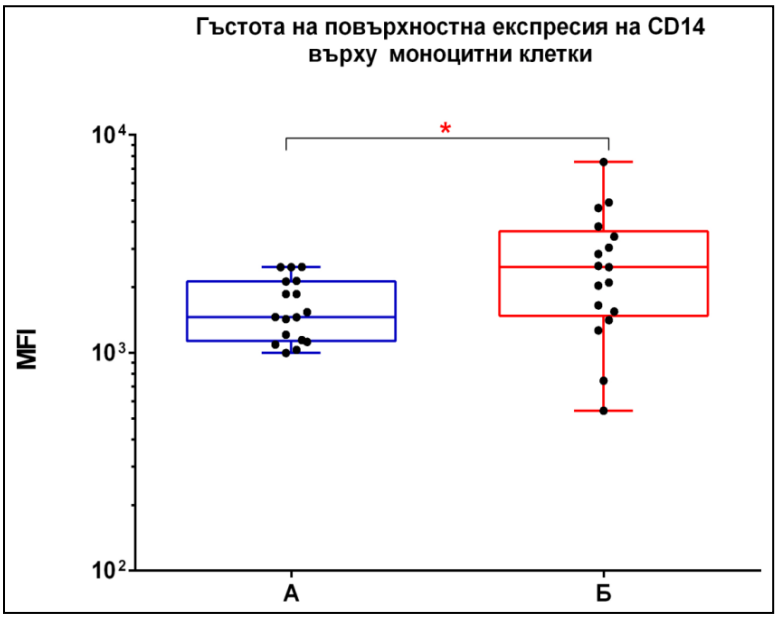
5.9. Влияние върху $CD14^+$ моноцитните клетки при култивиране с кондиционирани среди от АТ-МСК

В условията на култивиране със среди на АТ-МСК беше наблюдавана чувствителна промяна в експресията на CD14 повърхностния маркер. Под действие на средите от АТ-МСК, сигнификантно беше увеличен процентът на CD14 експресиращите моноцитни клетки в пула на ПКМК от пациенти с РА спрямо ПКМК, обработени с контролни среди, median [IQR] (11.7 % [7.6 - 16.5] vs. 6.6% [4.6 - 11.8], $p = 0.011$), (фиг. 17).

Също така беше наблюдавано статистически сигнификантно повишение в плътността на повърхностната експресия на CD14 под въздействие на разтворими фактори, продуцирани от АТ-МСК, median [IQR] (2702 [1548 – 3418] vs. 1540 [1146 – 2140], $p = 0.004$) (фиг. 18). Големината на ефекта и тук беше по-голяма от типичната (d = 0.81).



***Фиура 17**. Разлика в процента CD14$^+$ моноцитни клетки в култури на ПКМК от пациенти с РА, култивирани с контролни среди за клетъчно култивиране (А) и среди от АТ-МСК (Б). Данните са представени чрез Median (IQR) и са обобщаващи за всички 17 експериментални постановки, проведени с ПКМК, добити от 17 различни пациенти с РА. *p < 0.05.*



***Фигура 18**. Разликата в плътността на експресията на CD14 върху моноцитни клетки в култури на ПКМК от пациенти с РА, култивирани с контролни среди за клетъчно култивиране (А) и среди от АТ-МСК (Б). Данните са представени чрез Median (IQR) и са обобщаващи за всички 17 експериментални постановки, проведени с ПКМК, добити от 17 различни пациенти с РА. *p < 0.05*

5.10. Ефект на АТ-МСК върху експресията на костимулаторния комплекс B7 (CD80/CD86)

Промените, настъпващи в повърхностната експресия на маркерите CD80 и CD86 поотделно, както и коекспресията им в рамките на костимулаторния комплекс B7 върху моноцитни клетки, под действието на средите от АТ-МСК, бяха несигнификантни, като тенденцията беше за намаляване. Поради броя на опитните постановки (N = 17) и измерената стандартизирана разлика, статистическата сила (Бележи се: 1-β; означава вероятност за отхвърляне на нулевата хипотеза;) на използваните за проверка на хипотезите тестове беше ниска (1-β < 40%). Хипотезата, получените от нас резултати за липса на промяна на експресията на B7 да е фалшивоотрицателна (грешка от II род, бележи се с β) при 17 независими експеримента, не може да бъде отхвърлена с нужното ниво на доверителна сигурност, защото възможността за грешка беше изчислена на повече от 60% (β > 60%, често прието в литература е β < 20%). Това ограничение може да бъде преодоляно единствено чрез увеличаване на броя на експерименталните постановки.

5.11. Влияние на кондиционираните среди от АТ-МСК върху процесите на апоптоза на Т-хелперите и моноцитните клетки

Нашите резултати показаха липса на сигнификантна разлика в процента на моноцитните клетки и Т-хелперите, намиращи се в състояние на ранна и късна апоптоза в 60-часовите клетъчни култури на ПКМК, култивирани с контролни среди и среди от АТ-МСК. Отново недостатък е относително малкият брой опитни постановки и произтичащата от това ниска статистическа сила (грешка от II род).

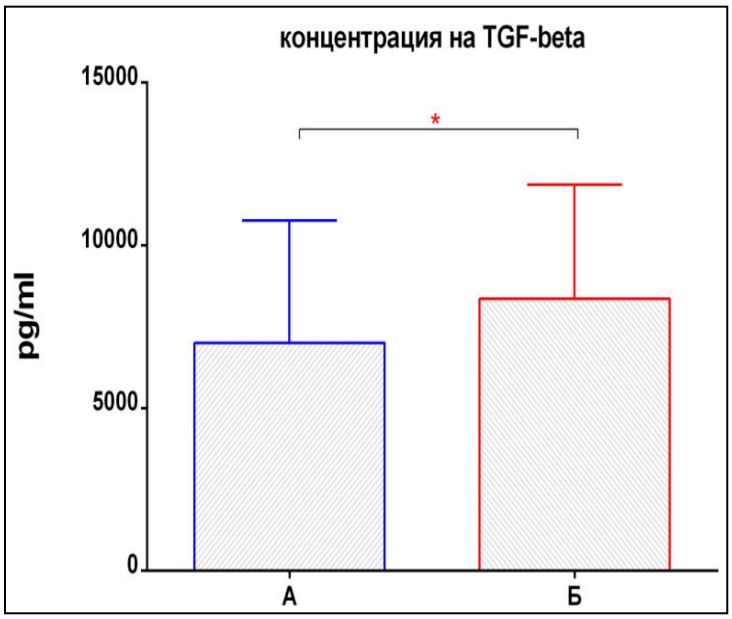
5.12. Влияние на среда от АТ-МСК върху цитокиновата секреция от имунни клетки, изолирани от пациенти с ревматоиден артрит

Определянето на фенотипните изменения в пула на изследваните Т-хелперни и моноцитни популации, намиращи се под влияние на секреторни фактори от АТ-МСК, беше концептуално обвързано и с изследване на промяната

в нивата на секреция на цитокини, заемащи централно място в осъществяването и организирането на имунен отговор. В настоящата дисертация беше заложено изследването на общо 10 цитокина и разтворими фактори: TGF-β, IL-10, TNF-α, IFN-γ, IL-4, IL-6, IL-17, IL-21, IL-23, sVEGF-A, PGE_2, IDO и CCL2.

5.12.1. Въздействие на разтворимите медиатори, секретирани от АТ-МСК, върху секрецията на TGF-β

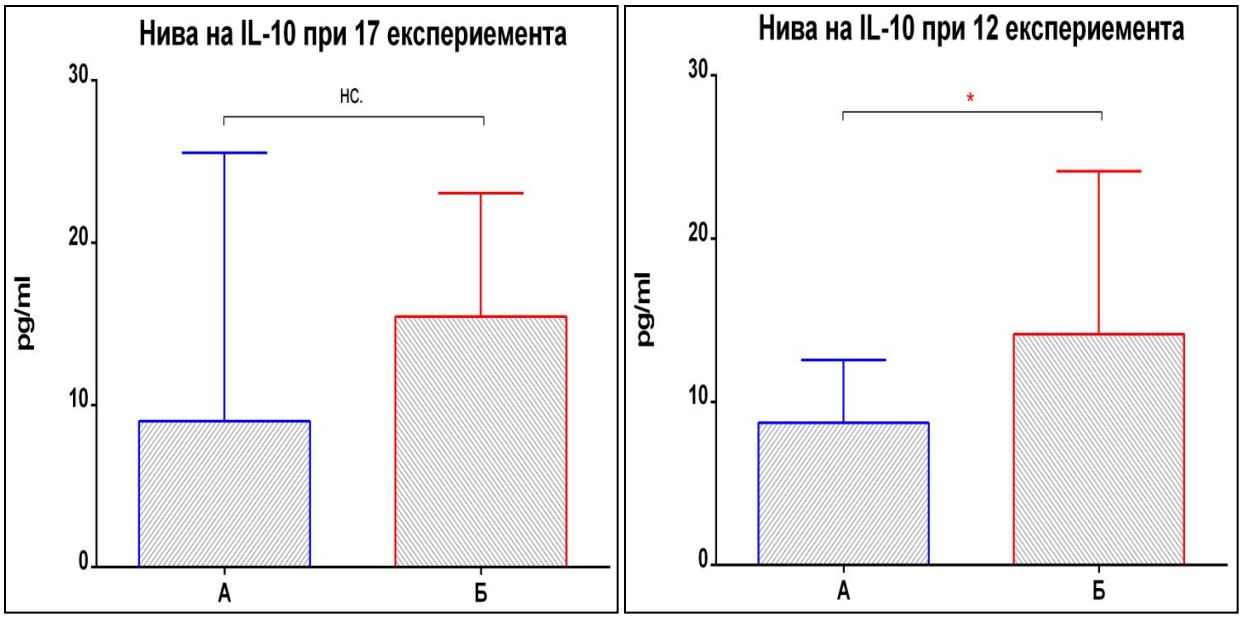
В условията на култивиране със среди на АТ-МСК, беше отчетена чувствителна промяна в нивата на TGF-β. Под действие на средите от АТ-МСК върху ПКМК от пациенти с РА, концентрацията на TGF-β беше увеличена сигнификантно (*p = 0.013*), като нивата на TGF-β в културите на ПКМК, култивирани с контролните среди, бяха median (IQR) 6227 pg/ml; (1681–10.148), а със средите от АТ-МСК – 8318.2 pg/ml (6327–11.686). Големината на ефекта по отношение промяната в продукцията на TGF-β беше определена като "по-голяма от типичната" съгласно класификацията на Cohen. Разпределението на променливите се различаваше от параметричното, поради което хипотезите бяха проверени с непараметричния тест на Wilcoxon и данните бяха представени посредством медианната им стойност и интерквартилния обхват (фиг. 19).



***Фигура 19**. Разлика в секрецията на TGF-β в култури на ПКМК от пациенти с РА, култивирани с контролни среди за клетъчно култивиране (А) и среди от АТ-МСК (Б). Данните са представени чрез Median (IQR) и са обобщаващи за всички 17 експериментални постановки, проведени с ПКМК, добити от 17 различни пациенти с РА. *p < 0.05*

5.12.2. Влияние на АТ-МСК върху продукцията на IL-10

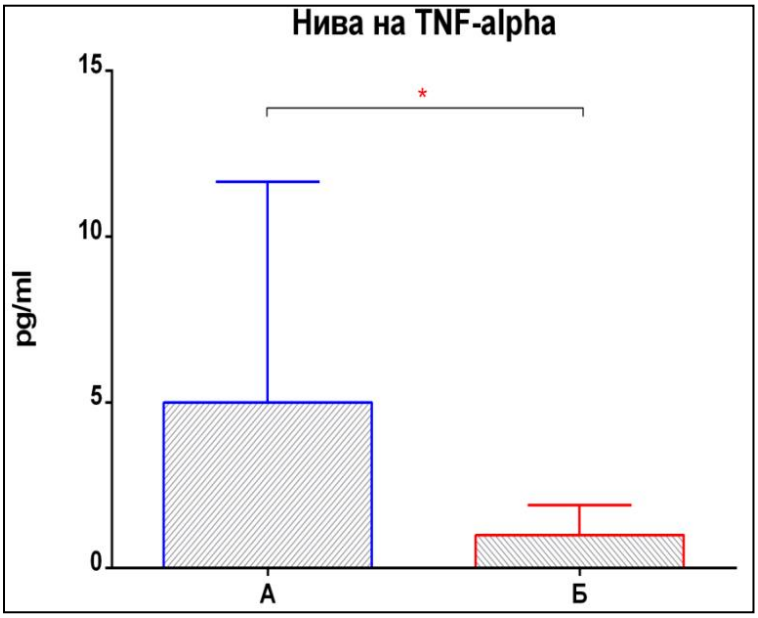
Промените, настъпващи в секрецията на цитокина IL-10 под действието на средите от АТ-МСК, бяха статистически несигнификантни, като тенденцията беше за увеличение, median [IQR] (13.67 pg/ml [3.3 - 23.07] vs. 7.91 pg/ml [2.93 - 20.17], $p = 0.554$ (фиг. 20). Когато бяха изключени пациентите, които трудно се повлияваха от приложената терапия, се откри статистически сигнификантна тенденция за повишаване нивата на IL-10 в културите на ПКМК от 12 пациенти под действие на секреторните молекули, произведени от АТ-МСК в сравнение с клетките, култивирани в контролна среда. Тази промяна беше в конкордантност с повишаването на стойностите на TGF-β и процента Tregs при същата група пациенти. Съответните стойности, представени като median (IQR), бяха 13.92 pg/ml (6.3-22.27) vs. 5.91 pg/ml (1.84-11.75), $p = 0.020$ (фиг. 21). Разпределението на стойностите на IL-10 в двете групи се различаваше от нормалното, поради което бяха представени чрез медианната им стойност и съответния интерквартилен обхват. Хипотезите бяха проверени посредством непараметричния рангов метод на Wilcoxon.



***Фигура 20 и фигура 21**. Разлика в секрецията на IL-10 в култури на ПКМК от пациенти с РА, култивирани с контролни среди за клетъчно култивиране (А) и среди от АТ-МСК (Б). Данните са представени чрез Median (IQR). Фиг. 20 е обобщаваща за всички 17 експериментални постановки, проведени с ПКМК, добити от 17 различни пациенти с РА. Фиг. 21 представя резултатите от 12 опитни постановки след изключването на клетъчните култури добити от болни с неадекватен терапевтичен отговор и персистираща болестна активност, *$p < 0.05$*

5.12.3. Влияние на секреторните медиатори, секретирани от АТ-МСК, върху нивата на TNF-α

Обобщението от опитните постановки за всички 17 пациенти с РА показа статистически сигнификантно по-ниски нива на секреция на TNF-α в културите на ПКМК, култивирани със среди на АТ-МСК спрямо контролните среди – median [IQR] (1 pg/ml [0.7 - 1.9] vs. 5 pg/ml [1.75 - 11.65], $p = 0.001$) (фиг. 22). Големината на ефекта беше много по-голяма от "типичната" съгласно класификацията на Cohen. Разпределението на стойностите на TNF-α в двете групи се различаваше от нормалното, поради което бяха представени чрез медианната си стойност и съответния интерквартилен обхват. Хипотезите бяха проверени посредством непараметричния рангов метод на Wilcoxon.



***Фигура 22**. Разлика в продукцията на TNF-α в култури на ПКМК от пациенти с РА, култивирани с контролни среди за клетъчно култивиране (А) и среди от АТ-МСК (Б). Данните са представени чрез Median (IQR). Фиг. 22 е обобщаваща за всички 17 експериментални постановки, проведени с ПКМК, добити от 17 различни пациенти с РА, *p < 0.05*

5.12.4. Влияние на разтворимите фактори, продуцирани от АТ-МСК, върху IL-6

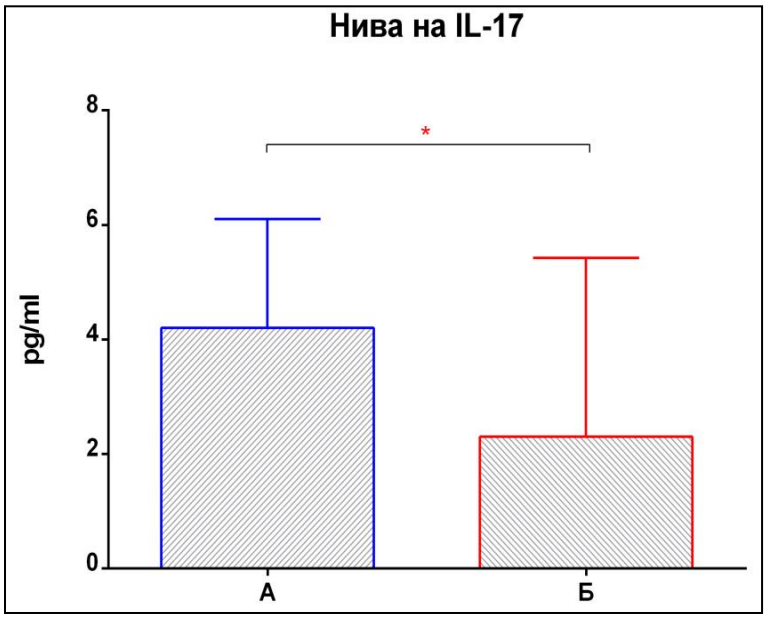
В условията на култивиране на ПКМК със среди от АТ-МСК бяха наблюдавани сигнификантно по-високи нива на IL-6 спрямо конролните среди. От друга страна, IL-6 бе открит в относително високи концентрации в средите от АТ-МСК, което предизвиква „маскиращ" ефект върху продуцирания от ПКМК IL-6. Въз основа на това влиянието на разтворимите фактори от АТ-МСК върху продукцията

на IL-6 в нашите опитни постановки не би могло да се оцени директно посредством имуноензимен метод. Същите съображения бяха взети под внимание и при оценката на ефекта върху динамиката на хемокина CCL2 (MCP-1), който също беше открит в относително висока концентрация в кондиционираните среди от АТ-МСК.

5.12.5. Ефекти на разтворимите фактори, секретирани от АТ-МСК, върху секрецията на IL-17 от ПКМК на пациенти с РА

Обобщението от всички опитни постановки за всички 17 пациенти с РА показа статистически сигнификантно по-ниски нива на секреция на IL-17 в културите на ПКМК, култивирани със среди на АТ-МСК спрямо култивираните с контролните среди, Median (IQR) (2.3 pg/ml (0.75-5.42) vs. 4.2 pg/ml (3.1-6.1), p = 0.017). Намалените цитокинови нива на IL-17 бяха конкордантни на наблюдаваните промени в пула на Th17 хелперните лимфоцити. Големината на ефекта беше определена като много по-голяма от типичната. Данните имаха непараметричнно разпределение, поради което беше използван непараметричният тест на Wilcoxon за свързани извадки.

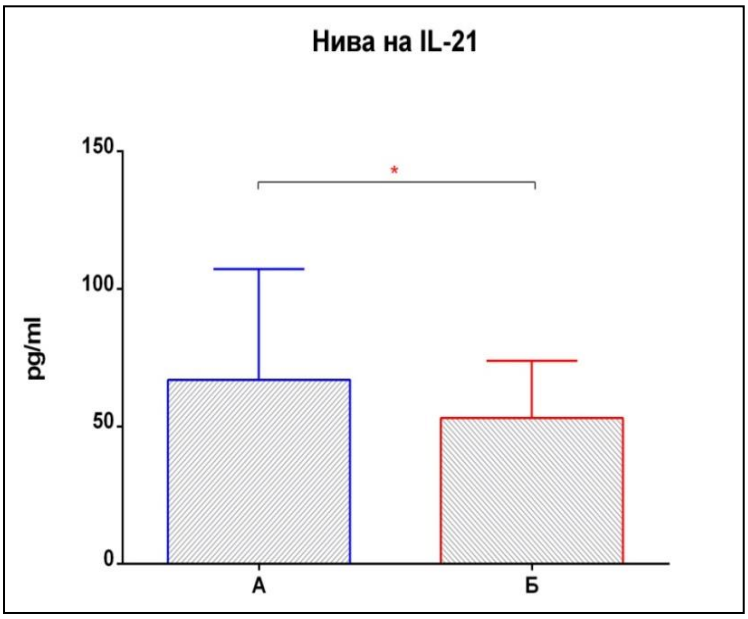
На фиг. 23 е представена разликата в нивата на IL-17 в култури на ПКМК от пациенти с РА, култивирани с контролни среди за клетъчно култивиране (А) и среди от АТ-МСК (Б).



***Фигура 23**. Разлика в нивата на IL-17 в култури на ПКМК от пациенти с РА, култивирани с контролни среди за клетъчно култивиране (А) и среди от АТ-МСК (Б). Данните са представени чрез Median (IQR). Фиг. 23 е обобщаваща за всички 17 експериментални постановки, проведени с ПКМК, добити от 17 различни пациенти с РА, *p < 0.05*

5.12.6. Влияние на разтворимите фактори, секретирани от АТ-МСК, върху нивата на IL-21 от ПКМК на пациенти с РА

В условията на кокултивиране със среди на АТ-МСК беше описана чувствителна промяна в нивата на IL-21. Под действие на средите от АТ-МСК върху ПКМК от пациенти с РА, сигнификантно беше намалена концентрацията на IL-21, като нивата на този цитокин в културите на ПКМК, култивирани с контролните среди бяха median (IQR) 66.9 pg/ml (40.6-107.2), докато при култивиране със средите от АТ-МСК бяха 53 pg/ml (22-73), $p = 0.022$ (фиг. 24). Намалените нива на IL-21 добре кореспондираха с промените, настъпващи в процента на Th17 хелперните лимфоцити. Големината на ефекта беше определена като по-голяма от типичната. Хипотезата беше проверена с непараметричния тест на Wilcoxon.

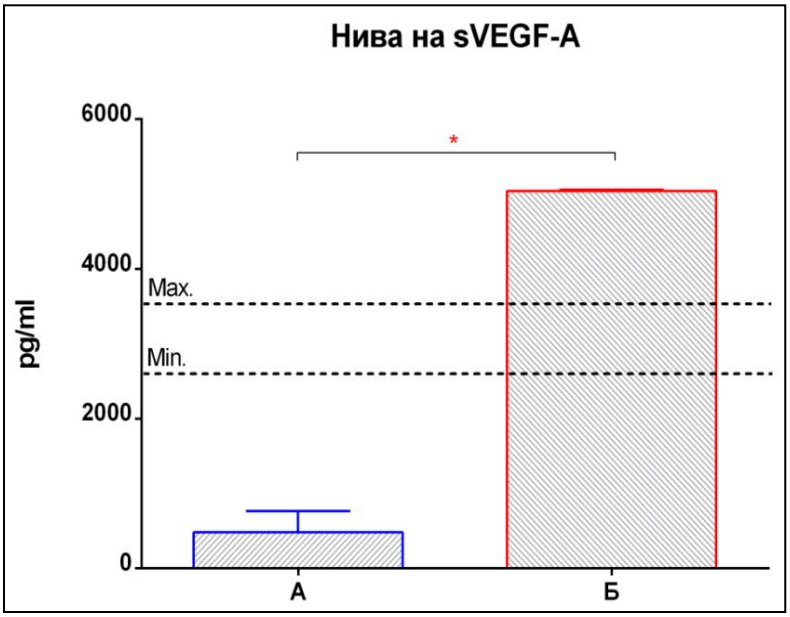


***Фигура 24**. Разлика в нивата на IL-21 в култури на ПКМК от пациенти с РА, култивирани с контролни среди за клетъчно култивиране (А) и среди от АТ-МСК (Б). Фиг. 24 е обобщаваща за всички 17 експериментални постановки, проведени с ПКМК, добити от 17 различни пациенти с РА. Данните са представени чрез Median (IQR), *p < 0.05*

5.12.7. Разлики в секрецията на разтворим sVEGF-A

Нивата на sVEGF-A в култури на ПКМК от пациенти с РА, култивирани с кондиционирани среди от АТ-МСК бяха сигификантно по-високи спрямо нивата му в ПКМК, култивирани с контролни среди, median [IQR] (5012 pg/ml [2516-

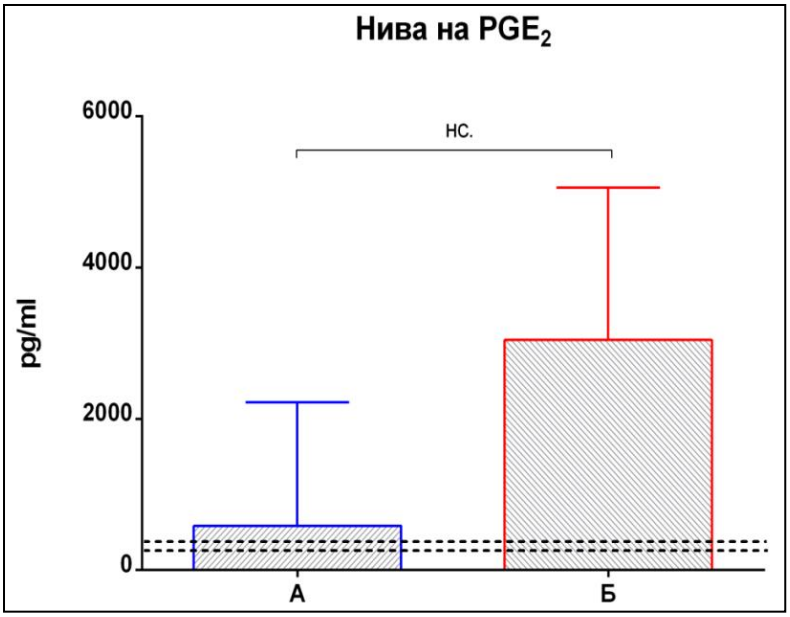
5054] vs. 561 pg/ml [288-699], *p = 0.001* **(**фиг. 25). Въпреки че sVEGF-A беше открит в средите от АТ-МСК във висока концентрация – median (IQR) 3069 pg/ml (2499-3639), смятаме, че интерпретацията на резултатите от култивирането е коректна, поради факта че концентрацията при култивирането надвишаваше средно с 1000 pg/ml съдържащия се в средите от АТ-МСК sVEGF-A.



Фигура 25*. Разлика в нивата на sVEGF в култури на ПКМК от пациенти с РА, култивирани с контролни среди за клетъчно култивиране (А) и среди от АТ-МСК (Б). Прекъснатите линии изобразяват обхвата на концентрацията на sVEGF в средите на АТ-МСК. Данните са представени чрез медианна стойност и интерквартилен обхват. Фиг 25. е обобщаваща за всички 17 експериментални постановки, проведени с ПКМК, добити от 17 различни пациенти с РА, *p < 0.05*

5.12.8. Ефекти на АТ-МСК върху продукцията на PGE_2

Промените, настъпващи в концентрацията на разтворимия фактор простагландин E_2 (PGE_2) под паракринното влияние на АТ-МСК, представляваха особен интерес. PGE_2 беше открит в среди от АТ-МСК, median (IQR) 249 pg/ml (200-298). Концентрацията на PGE_2 в културите на ПКМК от пациенти с РА и култивирани с контролни среди и кондиционирани среди от АТ-МСК бяха съответно 587 pg/ml (89.83-2222) и 3043.13 pg/ml (46.22-5060), *p = 0.064*, което би могло да се приеме за тенденция към сигнификантност (фиг. 26).



***Фиура 26**. Разлика в нивата на PGE_2 в култури на ПКМК от пациенти с РА, култивирани с контролни среди за клетъчно култивиране (А) и среди от АТ-МСК (Б). Данните са представени чрез медианна стойност, минимална и максимална стойност. Представена е и концентрацията на PGE_2 в средите на АТ-МСК. Прекъснатите линии изобразяват минималната и максималната стойност на концентрацията на PGE_2. Фиг. 26 е обобщаваща за всички 17 експериментални постановки, проведени с ПКМК, добити от 17 различни пациенти с РА, *p < 0.05*

5.12.9. Влияние на разтворимите фактори, продуцирани от АТ-МСК, върху IFN-γ, IL-4, IL-23 и IDO

Измерените от нас нива на секреторен IFN-γ, IL-4, IL-23 и IDO в културите на ПКМК от всички 17 опитни постановки бяха под минималния откриваем праг на използваните търговски китове (60 pg/ml), поради което не можахме да отчетем влиянието на разтворимите фактори, съдържащи се в средите на АТ-МСК, върху продукцията на IFN-γ, IL-4, IL-23 и IDO от мононуклеарните клетки, съдържащите се в културите от ПКМК.

5.12.10. Влияние на разтворимите фактори, продуцирани от АТ-МСК, върху CCL2

Същите (*виж т. 5.12.4*) съображения бяха взети под внимание и при оценката на ефекта върху динамиката на хемокина CCL2, който също беше открит в относително висока концентрация в кондиционираните среди от АТ-МСК.

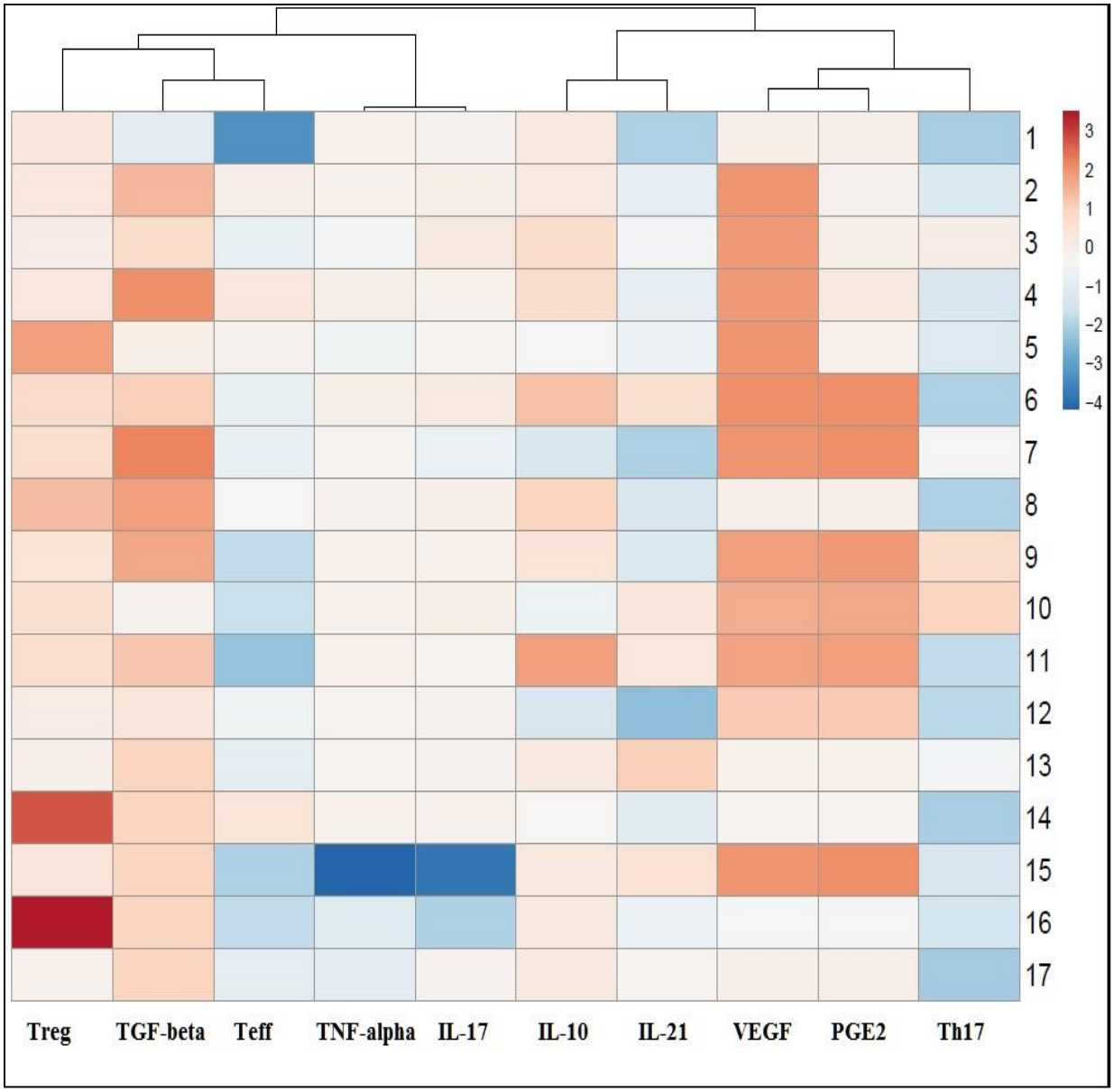
5.13. Обобщение на получените резултати чрез мултивариатни статистически анализи

5.13.1 Обобщение посредством Heatmap

Подходящ визуализиращ подход, чрез който да представим данните за промяната на изследваните цитокини и флоуцитометрични показатели за всички опитни постановки с ПКМК от 17 пациенти с ревматоиден артрит, беше heatmap графиката (фиг. 27).

Всеки ред представя експерименталните данни за една опитна постановка с ПКМК от един пациент с РА, колоните показват изследваните показатели. Посредством цветова скала е показана промяната или стандартизираната разлика, изразена като Z score за всеки един конкретен показател. Цветовата скала представя стойности на Z score от – 4 до 3. От графиката се вижда хомогенното намаление в нивата на TNF-α, IL-17A, и увеличението на процента на Treg и TGF-β под действието на разтворимите фактори, продуцирани от АТ-МСК. Добре се визуализира и намаленият процент на Teff и Th17 хелперните лимфоцити.

Дендрограмата в горната част на графиката представя резултата от клъстерен анализ, изследващ сходството между изследваните променливи. Клъстерният анализ е проведен по метода на Ward, а като мярка за сходство е използван коефицентът на корелация на Spearman. Променливите могат да бъдат групирани в 2 клъстера, състоящи се от 2 подклъстера, съответно TGF-β, Teff и Tregs, които формират собствен подклъстер, а IL-17и TNF-α формират отделен подклъстер. Въз основа на сходството помежду си sVEGF-A, PGE2 и Th17 могат да бъдат групирани в отделен клъстер, както и IL-10 и IL-21.

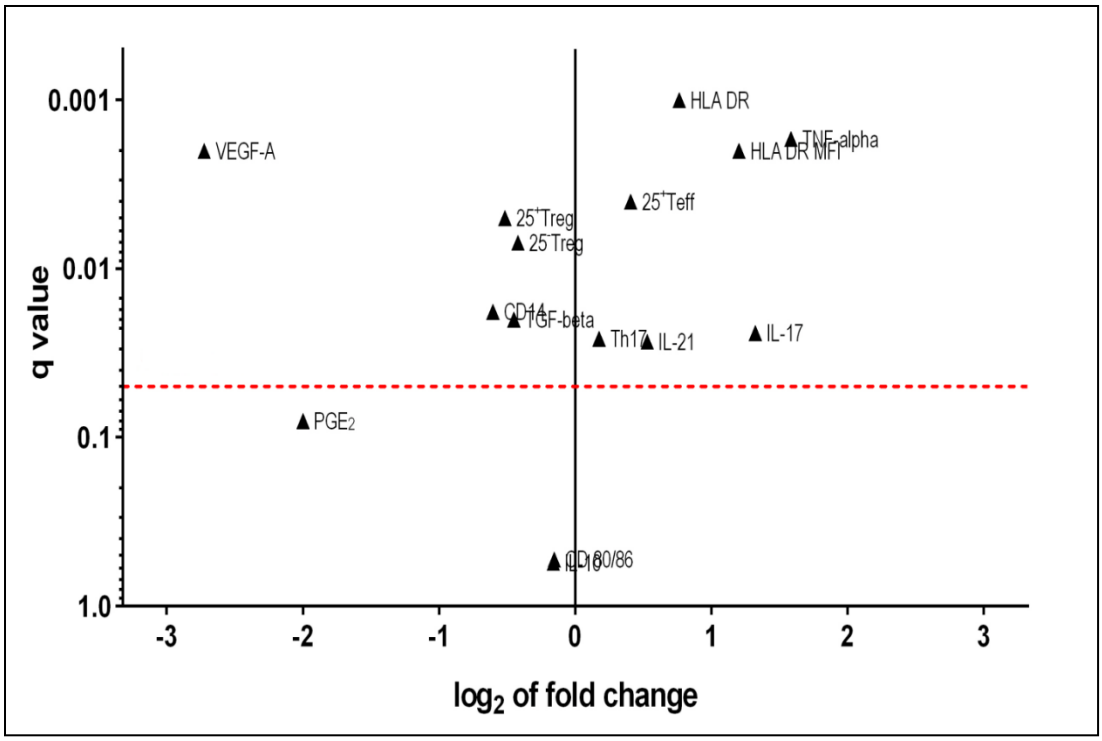


***Фигура 27**. Heatmap, обобщаващ данните по отношение на промените в изследваните показатели при всички 17 опитни постановки*

5.13.2. Корекция при проверка на множество хипотези

В рамките на експерименталната работа по настоящия дисертационен труд бяха проверени 17 хипотези (N) и бяха въведени корекции в съответствие с метода на Benjamini-Hochberg. Коригираните стойности на p бяха означени

с “q” и за сигнификантни бяха приети стойности на $q < 0.05$ (червената пунктирана линия на фиг. 28). След тази корекция промените на PGE_2, IL-10 и B7 комплекса станаха несигнификантни.



***Фиура 28**. Резултати от 17 изследвани променливи при култивиране на ПКМК от пациенти с РА с контролни среди и кондиционирани среди от АТ-МСК, въведена е корекция за множество тествания*

На фигура 28 в обобщен вид са представени резултатите от разликите в 17 различни променливи между ПКМК от пациенти с РА, получени при култивирането с контролни среди и среди от АТ-МСК. На абсцисата е изобразена големината на промяната (fold change) в логаритмична скала. Променливите, които намаляваха вследствие на култивирането със среди от АТ-МСК, имаха положителни стойности върху X оста, а тези, които се увеличаваха, имаха отрицателни стойности. На оста Y (ординатата) бяха изобразени коригираните стойности на p (q) съгласно метода на Benjamini-Hochberg. Статистически значимите промени се разполагаха по ординатната ос апикално спрямо пунктираната линия.

При култивиране с АТ-МСК беше регистрирано най-силно понижение в стойностите на HLA- DR, HLA- DR MFI, TNF-α, IL-17A, а най-голямо беше

повишението в нивата на sVEGF-A (средно около 3 пъти). Процентното увеличение на $CD25^-$и $CD25^+$ Tregs, $CD14^+$ моноцитни клетки и нивата на TGF-β беше около два пъти. Промените в PGE2, B7 комплекса (CD80/CD86) и IL-10 се разполагаха под пунктираните стойности, поради което бяха приети за несигнификантни.

5.13.3. Факторен анализ между нивата на изследваните цитокини в културите на ПКМК от пациенти с РА

Ефектът на разтворимите фактори, продуцирани от АТ-МСК върху цитокиновата секреция на имунокомпетентните клетки, съдържащи се в културите на ПКМК (моноцитни клетки, Т-хелпери, NK клетки и В-лимфоцити), беше оценен посредством едномерни сравнения в цитокиновата продукция на всеки отделен цитокин. От друга страна, сигналните трансдукциони пътища, както и ефектите на различните ефекторни цитокини, са взаимосвързани и корелират помежду си.

С цел да изследваме и обобщим взаимоотношенията/корелациите между промените на цитокините в условията на въздействие на разтворими медиатори от АТ-МСК, проведохме факторен анализ на цитокините в културите на ПКМК, култивирани с контролни среди и с кондиционирани среди от АТ-МСК. Факторният анализ е техника за мултивариантен анализ, базирана на идеята за намаляване на броя на променливите с цел улесняване на визуализацията и разбирането на структурата на данните. Този анализ води до създаване на нови променливи, наречени фактори, които същевременно отразяват максимално добре вариациите (дисперсия) в изследваните цитокини и запазват структурата на данните, тоест създадените от анализа фактори са обобщаващи за повече от една взаимнокорелиращи цитокинови променливи, освен това взаимната корелация между факторите е 0 (ортогонални). Мярка за това колко добре всеки фактор обобщава данните е процентът от общата дисперсия (Eigenvalue) на всички цитокини, която всеки фактор представя. По правило фактори с Eigenvalue < 1 не обобщават добре данните и са критерий за изключването им при представяне на данните от анализа.

Преди провеждането на анализа всички променливи бяха стандартизирани. Докладването на резултатите от анализа беше коректно, тъй като мярката за адекватност на извадката (Kaiser-Meyer-Olkin Measure of Sampling Adequacy) беше 0.6, а тестът на Bartlett за сферичност (*Bartlett, 1954*) беше статистически значим ($p < 0.05$) (*Kaiser, 1974*). Съгласно проведения анализ, вариацията в данните на 7-те изследвани цитокина можеха да бъдат коректно представени посредством три фактора, които имаха собствена стойност (Eigenvalue) > 1, като те заедно обясняваха 78% от дисперсията в цитокиновите променливи (табл. 9).

Таблица 9. Стойности на Eigenvalue, проценти от общата дисперсия в цитокиновите променливи, обяснявани от 3-те фактора

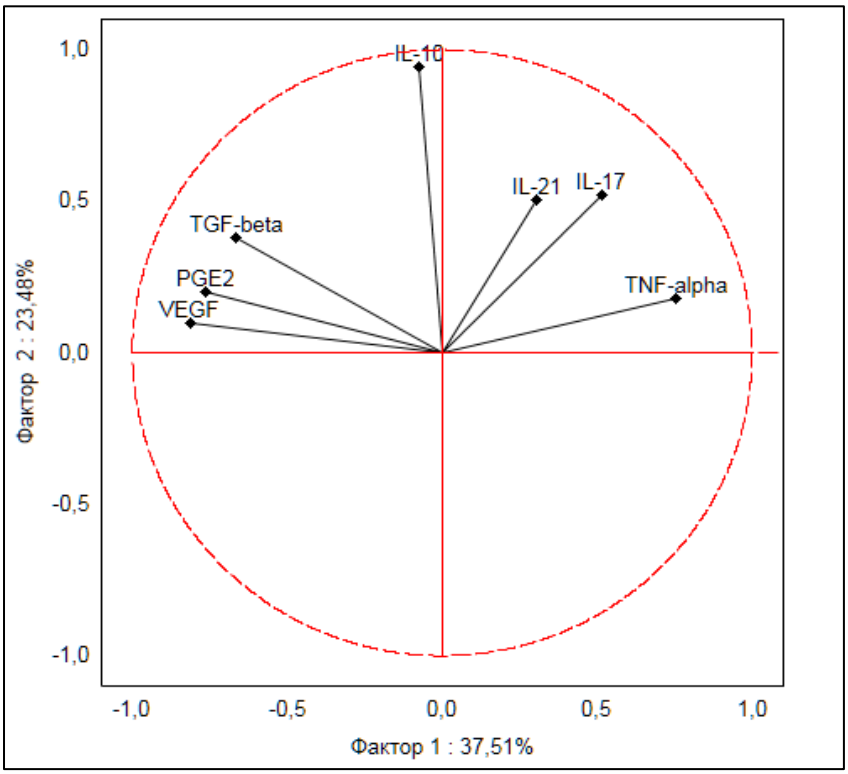
	Eigenvalue	**% от общата дисперсията**	**% кумулативна дисперсия**
Фактор 1	2.63	37.51	37.51
Фактор 2	1.64	23.48	61
Фактор 3	1.25	17.79	78.89

Влиянието на цитокините върху факторите (факторното тегло) е представено във вид на корелационна зависимост на таблица 10.

Таблица 10. Корелационна зависимост (факторно тегло) между променливите и принципалните компоненти (фактори)

	Фактор 1	**Фактор 2**	**Фактор 3**
IL-17A	0.51	0.52	0.52
TNF-α	0.76	0.18	0.20
IL-21	0.31	0.50	-0.67
sVEGF-A	-0.81	0.10	0.32
PGE_2	-0.76	0.20	0.35
IL-10	-0.01	0.94	0.12
TGF-β	-0.67	0.38	-0.49

Силна положителна корелация съществуваше между TNF-α и IL-17, от една страна, и фактор 1 – от друга. Силна отрицателна корелация беше установена между фактор 1 и sVEGF-A, PGE_2 и TGF-β. IL-10 корелираше най-силно с фактор 2. По-слаба корелация определихме между фактор 2 с IL-17, IL-21 и TGF-β1 (табл. 10).



Фигура 29. *Корелация между изследваните цитокини в културите на ПКМК от пациенти с РА. Представени са проекциите на изследваните променливи върху фактор 1 и фактор 2*

Корелационните зависимости между изследваните цитокини и фактори 1 и 2, описани в табл. 10, са представени графично на фигура 29. Разстоянието от центъра на графиката до всяка променлива, означено с черните еквидистантни линии, показва корелацията на всяка променлива с факторите (фиг. 29). Еквидистантните линии на променливите TGF-β, sVEGF-Аи PGE_2, IL-17A, IL-21 и TNF-α са с еднаква дължина и приблизително еднаква ориентация, което показва силната положителна корелация между TGF-β, sVEGF-A и PGE_2 и между IL-17A, IL-21 и TNF-α. От графиката също така може да се определи и

отрицателната корелация между групите на TGF-β, sVEGF-A и PGE_2, от една страна, и IL-17A, IL-21 и TNF-α – от друга.

В допълнение, корелационната зависимост беше оценена и с теста на Spearman: между TGF-β и PGE_2 ($R = 0.50$, $p < 0.05$); sVEGF-A и PGE2 ($R = 0.76$, $p < 0.05$); между IL-17 и TNF-α ($R = 0.63$, $p < 0.05$), между IL-21 и TNF-α също беше наблюдавана положителна корелация ($R = 0.776$, $p < 0.001$). В допълнение, положителна корелация посредством теста на Spearman беше намерена между TNF-α и IL-10 ($R = 0.45$, $p < 0.05$), и отрицателна корелация между TNF-α и TGF-β ($R = -0.43$, $p < 0.05$).

5.13.4. Многофакторни методи за анализ. Метод на опорните вектори. Дървета за класификация и регресия

За да оценим биологичния ефект или колко различни бяха цитокиновите профили на ПКМК, култивирани със среди от АТ-МСК, спрямо тези, култивирани с контролните среди, и с цел по-добра визуализация, приложихме следните методи, принадлежащи към групата на машинното обучение: *дървета за класификация и регресия* (CART Decision Trees), *метод на опорните вектори* (Support Vector Machines) и PLS – *дискриминантен анализ* (Partial least squares).

На първо място, параметричният тест на Hotteling (Multivariate paired Hotteling's T-Squared**)** за сравнение на две свързани многовариантни разпределения би могъл да покаже наличието на сигнификантна разлика между културите на ПКМК, култивирани с контролни среди, спрямо тези, култивирани със среди от АТ-МСК, въз основа на стойностите на всички измерени цитокини (*За да бъде приложен параметричният тест на Hotteling, всички променливи бяха трансформирани до нормално разпределение*.) Неговата стойност беше сигнификантна, $p < 0.05$, т. е. показа статистическа значима разлика.

Един от възможните подходи, чрез който бихме могли да измерим колко силно две групи се различават по множеството променливи, които ги описват, е да сравним колко точно алгоритъмът за класификация може да класифицира

опитните постановки като “култивирани с АТ-МСК” или “контролни среди” въз основа на отделните цитокинови профили. Ако две групи имат много различни цитокинови стойности, тогава пробите от всяка група ще бъдат лесно класифицирани или определени в правилната група. И обратно, ако цитокиновите профили на две групи са много сходни (или идентични, т. е. няма промяна под въздействието на АТ-МСК), алгоритъмът за класификация ще може да класифицира правилно само малка част от пробите (или изобщо никакви) (*Azizeh et al., 2018*).

5.13.5. Метод на опорните вектори (SVM)

За целта първо използвахме класификационен алгоритъм, базиран на метода на опорните вектори (Support Vector Machines, SVM). Проведеният от нас SVM анализ използва гусова радиална базисна функция ($\gamma = 0{,}143$) като функция на ядрото и беше приложено кръстосано валидиране ($V = 4$). Независимите променливи бяха: IL-17A, TNF-α, IL-21, sVEGF-A, PGE_2, IL-10, TGF-β. Бяха определени 8 опорни вектора – 3 за класификацията на опитните постановки с контролни среди и 5 за класификацията на опитните постановки, култивирани с АТ-МСК. Точността на класификацията беше 100% в тренировъчната, 100% в тестовата и 100% в цялата група, което е индиректна мярка за различията в цитокиновата секреция, настъпваща под въздействие на АТ-МСК.

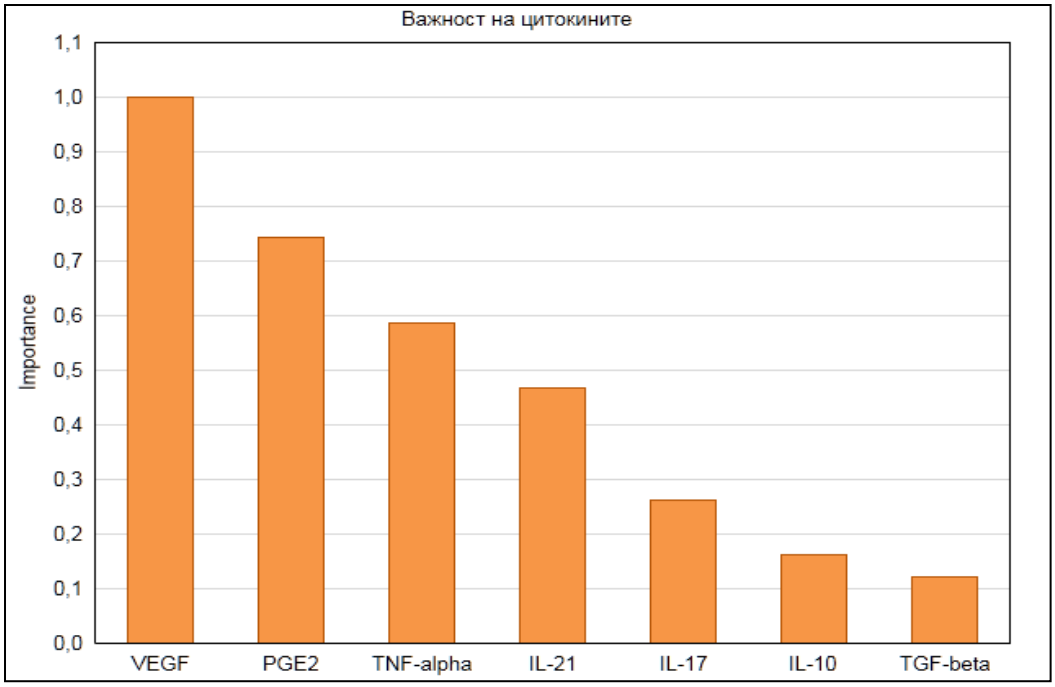
5.13.6. Дървета за класификация и регресия (CART)

Създадохме и CART алгоритъм за класификация и регресия, като използвахме “iTrees“ функцията в програма за статистическа обработка и data maining STATISTICA 64 (StataSoft). Критерий при избор на най-оптимална стойност на разделяща променлива беше минимизирането на Gini-индексът. Изборът на алгоритъм с цел най-точен предиктивен модел беше направен посредством кросвалидация ($v = 4$). В случая, използвайки предсказаните вероятности, проведохме анализ на ROC крива (receiver operator characteristic) и докладвахме стойностите от площта под кривата (ROC AUC), като мярка за успешността на класифициращия алгоритъм. В случая площта под кривата (ROC

AUC) беше 1.0, $p = 0.04$, което отново е в подкрепа на сигнификантната разлика в цитокиновите профили между двете групи.

Анализът позволи да се изследва важността на цитокините, т.е кои цитокини имат най-голяма тежест за разграничаване на двата цитокинови профила.

Тук „важност“ (Importance) е релативна величина и представя средното тегло на всяка променлива, като приема стойност от 1 до 0 (фиг. 30). Променливата с най-голяма важност приема стойност 1, а всички останали променливи приемат стойност < 1 в зависимост от относителната им важност спрямо най-важната променлива.



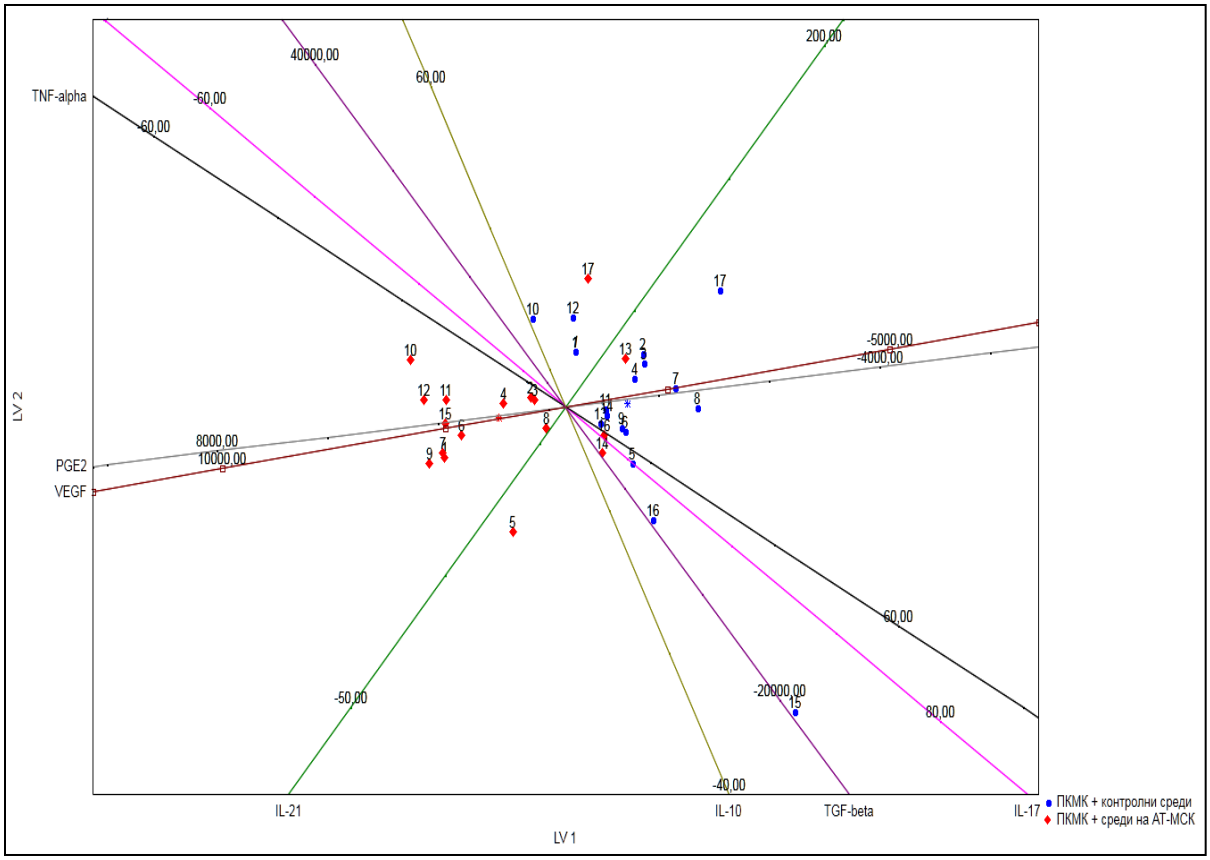
***Фигура 30**. Важността на отделните цитокини, представени като релативна стойност, по отношение на разграничаването на цитокиновите профили на ПКМК, култивирани с контролни среди и среди от АТ-МСК*

5.13.7. PLS – Дискриминантен анализ

Изборът ни на визуализираща техника за представяне на сигнификантните различия в цитокиновите нива, получени вследствие на култивиране на ПКМК от 17 пациенти с РА с контролни и кондиционирани среди от АТ-МСК,

се спря върху стандартизиран биплот, представящ резултатите от проведен Partial Least squares (PLS) анализ за класификация. Алгоритъмът търси най-добрия начин за проектиране на данните в по-ниско измерение, така че да идентифицира най-доброто линейно разделяне между групите. С цел намиране на най-добро разделение между двете групи, PLS-DA създава нови латентни променливи (LV1 и LV2), върху които да се проектира всеки цитокинов профил. Подобно на факторния анализ, латентните фактори LV1 и LV2 обобщават част от вариацията в изследваните цитокини, но подборът и проекцията на цитокиновите променливи върху LV е преднамерен, ориентиран към постигане на най-добро линейно разделение между двете групи цитокинови профили. Ако проекциите на двете групи се припокриват в голяма степен, това предполага, че разпределението на стойностите на цитокините е доста сходно; ако те не се припокриват, това означава, че характеристиките на цитокиновите профили са различни между групите. Тоест това е подходяща визуализираща техника при изтъкване на разликата в цитокиновата секреция под действие на среди от АТ-МСК въз основа на всички изследвани секреторни молекули. Фигура 31 представя стандартизирания биплот. Той демонстрира проекциите на двете групи цитокинови профили, изобразени посредством червени ромбове (културите на ПКМК, култивирани със среди от АТ-МСК) и сини точки (културите на ПКМК, култивирани с контролни среди) върху новите променливи (LV1 и LV2), както и ориентацията и корелацията на цитокиновите променливи спрямо LV1 и LV2 (цветните линии).

Стандартизираният биплот, изобразен на фигура 31, демонстрира наличието на добро линейно разделение и минимално припокриване между двете групи цитокинови профили. Този визуализиращ подход е в подкрепа на сигнификантната разлика между цитокиновите профили на ПКМК, култивирани с контролни среди и среди от АТ-МСК, доказана с теста на Hotteling ($p < 0.05$), и на способността на класифициращия алгоритъм да ги разграничи (ROC AUC = 1.0).



Фигура 31. *Стандартизиран биплот, представящ цитокиновите профили от 34 клетъчни култури от 17 експериментални постановки с ПКМК от 17 пациенти. С цифра е означен съответният пациент с РА, донор на ПКМК*

6. ОБСЪЖДАНЕ

6.1. Характеристика на пациентите

Подборът на подходящите за включване в нашето изследване пациенти с РА беше извършен съгласно заложените от нас *apriori* критерии за включване и изключване. Поради лимитирания брой опитни постановки, оформянето на хомогенна група от болни, от които да бъдат добити периферни кръвни мононуклеарни клетки, беше изключително важно. Включващите критерии бяха така формулирани, че групата от болни с РА да бъдат едновременно с умерена/висока болестна активност (DAS28 > 3.2) и да бъдат на перорална терапия с метотрексат и/или ниска дневна доза непревишаваща 10 mg преднизолон или преднизолонов еквивалент, като пациенти, лекувани с биологични БПАРЛ и таргетни синтетични БПАРЛ, не бяха включени. Така че участниците в изследването бяха със сходна болестна активност и същевременно бяха подложени на стандартно терапевтично въздействие. Дизайнът на проучването беше изцяло съобразен с конкретните хипотези, които искахме да проверим, и тезата, че по-високите дози орален кортикостероид и/или метотрексат биха могли да окажат значимо влияние върху таргетните за нашето проучване имунни клетки и цитокиновата секреция на периферните кръвни мононуклеарни клетки.

6.2. Имунологични параметри на изследваните пациенти

При охарактеризиране на болните всички бяха изследвани за високоспецифични за РА антитела каквито са насочените срещу CCP и MCV, също и за ревматоиден фактор от класовете IgM, IgG, IgA. Направената имунологична диагностика по отношение на РА специфичните антитела би могла да бъде определена като пълен и задълбочен имунологичен панел. Не бяха открити корелационни зависимости между активността на заболяването и концентрацията на

изследваните автоантитела. Най-голям брой болни – 15 (88%), бяха положителни за антитела срещу CCP, следвани от 14 (82%) за MCV, 12(71%) за RF-IgM, 11(65%) за RF-IgG и 10 (58%) за RF-IgA. Намерената честота на изследваните автоантитела в голяма степен кореспондира на описаната в литературата. По литературни данни автоантителата, насочени към CCP, се намират средно в 86% от болните с РА, когато са определени с ELISA китове трето поколение, докато анти-MCV се установяват в 39% до 78.9% от болните (*Bonifacio, 2019*). Само един пациент беше отрицателен едновременно за антитела срещу MCV и CCP, тоест 94% от болните с РА бяха положителни за антитела срещу цитрулинирани протеини.

Около 40-60% от пациентите с РА могат да са положителни за АНА (*Harmon, 1985*), поради което въпреки ниската им специфичност за РА към имунологичната характеристика добавихме и изследване на антинуклеарни антитела по отношение на титър и специфичен образ спрямо номенклатурата на ICAP. От пациентската група с РА, включени в настоящия дисертационен труд, 14 пациенти (82%) имаха АНА в титър равен или по-висок от 1:160. Антинуклеарните антитела бяха установени в по-висок процент при болните с РА, включени в проучването, в сравнение със съобщаваната в литературата честота. Възможно обясниение за този резултат е, че нашите пациентите с РА са с умерена до висока болестна активност, тоест болестната активност може да корелира с имунологичната активност и производството на автоантитела срещу нуклеарни антигени. При справката направена в литературата не успяхме да намерим проучвания за подобна корелация на АНА при пациенти с РА с умерена и висока активност.

Коментар заслужава и типът имунофлоуресцентно светене, който беше наблюдаван при определяне титъра на АНА чрез индиректна имунофлоуресценция (ИИФ). Най-често срещаните типове светене на серумите от РА болните с титър на АНА ≥ 1: 160 бяха АС-1 (ядрено хомогенно светене) и АС-4

(дребнопетнисто ядрено светене). Част от серумите имаха флоуресцентен образ, определен като смесен, получен при смесването на „основните" образи AC-1 и AC-4. AC-1 типът се получава при "оцветяването" на хроматина на Hep-2 клетъчната линия и по данни на ICAP най-често кореспондира на наличието на антитела срещу dsDNA, хистони и нуклеозоми. Част от познатите автоантитела, водещи до наблюдаване на тип AC-4 имунофлоуресцентно светене, са насочени срещу следните антигени: SS-A/Ro60, SS-B/La, Mi-2, TIF1γ, TIF1β, Ku. Тестването за наличието на автоантитела срещу dsDNA, хистони нуклозоми, както и SS-A/Ro60, SS-B/La и Ku, което би могло да внесе яснота по отношение на конкретните антитела, кореспондиращи на наблюдаваните типове светене, не беше предмет на настоящия дисертационен труд. Още повече че под типа светене биха могли да се „крият" голям брой все още неуточнени автоантитела.

Механизъм за появата на евентуални автоантитела срещу dsDNA, хистони и нуклеозомни структури, частично обясняващ наблюдаваното имунофлоуресцентно светене тип AC-1 в нашата група пациент, биха могли да са процесът на „епитопно разпростиране" („epitope spreading"), както и особеностите на ставното възпаление, основна роля в което имат неутрофилите и процесът на неутрофилна смърт (нетоза). При нетозата неутрофилът изхвърля ядреното си съдържимо, образувайки структури, съдържащи основно ДНК, хистони и други ядрени антигени като HMGB. Тези структури играят роля в изчистването на екстрацелуларни патогени и са наричани още екстрацелуларни капани (extracellular traps). Изхвърленото ядрено съдържимо може да претърпи вторична модификация като цитрулиниране под действие на отделените при неутрофилната смърт, а и от множеството макрофаги ензими пептидил аргинин деаминази. Фагоцитирането на тези структури води до антигенното им представяне и съответно появата на автоантитела. По литературни данни около 40% от АСРА показват висок афинитет срещу цитрулинираните H2A/H2B хистони (*Corsiero et al., 2020*). Чрез процеса на „епитопно" разпростиране могат да се

увеличат и епитопните специфичности на автоантителата разпознаващи хистони и двойноверижна ДНК.

6.3. Методологични съображения при култивиране на ПКМК от периферна венозна кръв на пациенти с РА със среди от АТ-МСК

Ревматоидният артрит е системно автоимуно заболяване и от тази гледна точка, за да оценим правилно практическата стойност на получените от нас резултати, е важно да обърнем внимание и на факта, че култивираните мононуклеарни клетки са добити от периферна венозна кръв. След активирането на наивните Т-хелперни лимфоцити и насочването им към определен профил на диференциация, те увеличават своята експресия на CD69 и потискат експресията на рецептора си за сфингозин фосфат-1 и CCR7, което в по-малка или по-голяма степен определя съдбата им. Те напускат вторичните лимфоидни органи и постъпват в циркулаторното русло, като заселването им в таргетните тъкани и органи се определя от екпсресията на хемокинови и селектинови рецептори, тясно свързани с профила на диферециация: CXCR3, CCR4 за Th1, CCR6 за Th17 и CCR9 за Th2. Активираните ефекторни лимфоцити, имащи отношение към имунопатогенезата на РА, могат да бъдат открити в периферната венозна кръв, преди да осъществят своя хоминг в местата на характерното за РА възпаление. Следователно в методологичен аспект избраната от нас опитна постановка е адекватен способ за изследване на Т-хелперни лимфоцити, имащи участие в имунопатогенезата на автоимунния процес при РА.

Избор на МСК от адипозна тъкан като източник на кондиционирани среди. Всички етапи от планирането и изпълнението на опитната постановка на настоящия дисертационен труд в концептуален план бяха ориентирани и преднамерени към добиването на резултати с потенциално най-голяма практическа полза. В концептуален план това е трасирането на бъдещия път за евентуалното практическо приложение на МСК-базирани подходи за терапия на РА. Именно поради това АТ-МСК бяха предпочетени като по-подходящи

спрямо МСК от други източници, каквито са МСК от костен мозък и/или МСК от пъпна връв. Един от основните аспекти, влизащи в съображение, беше достъпността на добиването на мастната тъкан като източник на МСК спрямо далеч по-трудните и обвързани с по-сложни етични процедури източници, като костен мозък или пъпна връв.

Изборът на кондиционирани среди от АТ-МСК също така беше основан и на резултатите от предишни проучвания на авторския колектив, показващи по-силния имуносупресивен ефект на АТ-МСК спрямо МСК от костен мозък (*Ivanova-Todorova et al., 2009*).

6.4. Цитокинова секреция на АТ-МСК

Контактът между МСК и имунокомпетентните клетки е комплексен и често двупосочен. Осъществява се чрез паракринното действие на секретирани разтворими фактори или чрез директен клетъчен контакт, като двата пътя на взаимодействие могат да се проявяват в комбинация. С цел да премахнем „двупосочния механизъм“ на взаимодействие, избрахме да изследваме отделното и независимо действие на супернантанти от АТ-МСК, като фокус на настоящата дисертация е паракринното влияние на секреторни молекули от човешки АТ-МСК върху CD4+Т лимфоцити при пациенти с РА.

Получените от нас резултати показаха, че изследваните среди от АТ-МСК съдържат в относително висока концентрация VEGF, CCL2 (MCP-1), CCL5 (RANTES), PGE2, IL-6, и IL-8. От друга страна, IL-17 беше установен в относително ниски концентрации в нашите среди от АТ-МСК и следователно това би могло да намали тежестта му при оценка на общия биологичен ефект на супернатантите. В допълнение на това, нашите резултати демонстрират, че в среди от АТ-МСК TGF-β, IL-10, TNF-α, IFN-γ, IL-4, IL-23 и IDO не се откриват, въз основа на което можем да ги изключим от интерпретацията на паракринното действие на АТ-МСК.

Съпоставката на нашите резултати за наличието и обхвата на концентрацията на разтворимите фактори в среди от АТ-МСК с наличните данни в литературата показа голяма степен на конкордантност и съвпадение. Това се отнася основно до откритите от нас високи нива на VEGF, CCL2 (MCP-1), CCL5 (RANTES), PGE2, IL-6 и IL-8. (*Kagiwada et al,. 2008; Kleiveland et al., 2008; Park et al., 2009; Kyurkchiev, 2014*). По отношение наличието на IL-10 и TGF-β в супернатанти от МСК, в световната литература няма консенсус (*Di Nicola et al. 2002; Park et al., 2009; Bernardo and Fibbe, 2013; Kyurkchiev, 2014*) В този контекст резултатите на нашия екип ни причисляват към тези изследователи, които не откриват TGF-β и IL-10. Въз основа на това нашите резултати, касаещи ефекта на средите върху таргетните популации имунокомпетентни клетки, ще бъдат съпоставяни само с проучвания на екипи, в чиито опитни постановки TGF-β и IL-10 също не присъстват в супернатанти от МСК.

При определяне нивата на IDO, ензимът IDO също не беше установен в супернатанти на АТ-МСК

Важно е да се отбележи, че МСК не проявяват конститутивно пълния си набор от имуносупресивни свойства. В литературата съществуват данни, че това си свойство МСК придобиват след подходящо активиране („праймиране”), под действието на определени проинфламаторни цитокини като IFN-γ, IL-1 и TNF-α. Подобна стимулация е необходима и за активиране на секрецията на IDO и IL-10 (*Glenn, 2014*). По този начин може да бъдат обяснени получените от нас резултати.

В таблица 11 в обобщен вид е представена съпоставка между получените от нас резултати за секретираните от МСК разтворими молекули и наличните в литературата данни на други изследователски екипи.

Таблица 11. Цитокинова продукция на АТ-МСК

Разтворими фактори, изследвани в експерименталната постановка на настоящия дисертационен труд	**Разтворими фактори, налични в средите на АТ-МСК, съгласно наличните данни в литературата**
TGF-β (-)	TGF-β (+/-)
IL-10 (-)	IL-10 (+/-)
IL-6 (+)	IL-6 (+)
VEGF (+)	VEGF (+)
PGE2 (+)	PGE_2 (+)
IDO (-)*	IDO *
IL-8 (+)	IL8 (+)
IFN-γ (-)	IFN-γ (-)
CCL2 (+)	CCL2 (+)
CCL5 (+)	CCL5 (+)
TNF-α (-)	TNF-α (-)
IL-4 (-)	IL-4 (-)
IL-17 (+/-)	IL-17 (-)
IL-21 (+)	IL-21 (липсват данни)
IL-23 (-)	IL-23 (-)
	*HLA-G5 (+)***
	*sICAM (+)***
	*sPD-L1 (+)***
	*NO (+)***
	*ADENOSINE (+)***
	*HEMEOXYGENASE (+)***
	*HEPATOCYTE GROWTH FACTOR (+)***
	*GALECTIN 1,3 (+)***
	*LIF (+)***
	*TSG-6 (+)***
	*sIL-1 ***
	*SDF-1 (+)***

*(+/-) Разнопосочни данни; * За секрецията е необходима стимулация; ** Разтворимият фактор не беше изследван в рамките на настоящото проучване*

В контекста на заложените от нас идеи и експериментални постановки някои цитокини, категорично установени като секретирани от МСК, имат своите добре известни действия върху имунокомпетентните клетки.

Например такива с директен и добре описан в световната литература потенциращ ефект върху Tregs са VEGF (*Kagiwada et al., 2008*), PGE_2 (*Hsu et al., 2013*) и двете хемокинови молекули CCL2 (*Boomsma and Geenen, 2012*) и CCL5 (*Karnoub et al., 2007*). От своя страна ефектът на IL-6 върху оста Th17/Tregs е

амбивалентен и налага едновременно мониториране и на „състоянието" на миеолоидните клетки, способни да осъществяват антигенна презентация. От една страна, ролята на IL-6 е свързана с насочване към поляризация в Th17 хелперен фенотип, чрез засилване на експресията на транскрипциония фактор RORc (*Zhao et al., 2018*). От друга страна, влиянието на IL-6 върху миелоидни клетки е свързано с увеличаване IL-10 продукцията и чувствително намаляване интензивността на експресията и броя на клетките, експресиращи костимулаторния комплекс CD80/86, както и HLA-DR.

6.5. Влияние на кондиционирани среди от АТ-МСК върху Th17 хелперните лимфоцити при пациенти с РА

Съвременното разбиране за имунопатогенезата на РА определя Th17 субпопулцията като основен организатор на проинфламаторните и деструктивните прояви, характерни за това заболяване, поради което голяма част от навлизащите в терапевтичната практика нови, по-ефективни подходи за лечение са насочени именно към неутрализиране на обвързания с Th17 цитокинов профил. Пример за внедряване на такива стратегии са моноклоналните препарати, насочени срещу IL-6, IL-17 и GM-CSF, и таргетните синтетични селективни и неселективни JAK-STAT инхибитори, целящи едновременен блокаж на сигнално-трансдукционни пътища на множество цитокинови медиатори. Основен аспект в нашата работа, трасиращ посоката на теоретичното проучване на потенциалните ползи на МСК-базираните терапевтични подходи за повлияване на болните от РА, беше проследяването на динамиката на пула от Th17, свързано както с бройни, така и с функционални изменения.

Нашите резултати показаха сигнификантно по-нисък процент на Th17 лимфоцитите в културите на ПКМК от пациенти с РА, култивирани със среди от АТ-МСК спрямо тези, култивирани с контролни среди (фиг. 10). Резултатите, получени от екипа ни, издържаха направената по-строга статистическа проверка по метода на Benjamini-Hochberg, което придава допълнителна тежест по отношение на „истинността" на наблюдаваното понижение на броя на Th17. Нашите резултати съответстваха на наличните в литературата данни за паракринното действие на среди от МСК от адипозна тъкан (*Gonzalez-Rey et*

al., 2009; Ghannam et al., 2010; Baharlou et al., 2017) при РА (*Wang et al., 2012*) и здрави контроли (*Pianta et al., 2014*), като при справка в литературата не бяха открити данни за обратния ефект или за липса на ефект. Важен аспект от направените от нас наблюдения по отношение на по-ниския процент Th17 под действие разтворимите медиатори, продуцирани от АТ-МСК, беше да „измерим" големината на фактическата значимост или на прекия биологичент ефект от имуносупресивното действие на МСК. Големината на ефекта отразява магнитуда на промяната в изследваната субопулация и „корелира" положително с евентуалната практическа полза. От тази гледна точка този показател е важна отправна точка в сравнителен план при съпоставяне на действието на АТ-МСК с други кандидати за терапевтични стратегии при ревматоиден артрит. Наблюдаваната в нашите *in vitro* постановки големина на ефекта беше определена като по-голяма от типичната (*Rice and Harris, 2005*). В проучанията на други екипи, описващи действието на МСК върху Th17 от пациенти с РА, не е съобщаван параметърът "големина на ефекта".

Съгласно проведената от нас опитна постановка, процентът на Th17 беше изследван в 3-дневни култури на човешки ПКМК. Наблюдаваните промени в компартмента на Th17 биха могли да бъдат обяснени посредством няколко основни механизъма, застъпени в литературата: 1) конверсия на Th17 в други субтипове, сред които и $CD4^+FoxP3^+$ Tregs и други имунорегулаторни фенотипове; 2) инхибиция пролиферацията на Th17; 3) потискане на Т-клетъчната пролиферация чрез индуциране на анергия или имуносупресия; 4) апоптотична смърт и „загуба" на Th17 в тридневните култури.

Последният механизъм беше отхвърлен в нашите опитни постановки, тъй като под действието на среда от АТ-МСК не открихме промяна в процента на Т-клетките в ранна и късна апоптоза, който беше много нисък – около 1% в тридневните култури на ПКМК. Липсата на проапоптотичен ефект на МСК, наблюдаван от нас, съответства напълно с наличните в литературата данни, които отричат апоптозата като процес, медииран от МСК (*Glennie et al., 2005*).

Натрупаните доказателства демонстрират, че процесите на конверсия и инхибиция в пролиферацията под действието на МСК са наравно застъпени, могат да протичат едновременно и биха могли да се дължат на действието на

многобройните разтворими фактори, секретирани от МСК, като например PGE_2, TGF-β, VEGF, HGF, NO, HLA-G5. Инхибирането на диференциацията и конверсията на Th17 лимфоцитите могат да бъдат обобщени в един общ механизъм, базиран на нестабилността на Th17 субпопулацията.

Baharlou et al. демонстрират, че средите на АТ-МСК при РА *ex vivo* потискат пролиферацията на активираните ефекторни лимфоцити, чрез инхибиране синтеза на IL-2 и увеличаване продукцията на TGF-β и IDO под действито на PGE_2 (*Baharlou et al. 2017*). В нашите опитни постановки TGF-β беше сигнификантно повишен в средите от ПКМК от действието на секреторни фактори, отделяни от АТ-МСК. PGE_2 се съдържаше както в АТ-МСК супернатантата, така и се повишаваше под нейното действие в средите на ПКМК, което е в подкрепа на описания механизъм (*Ghannam et al., 2010; Baharlou et al., 2017*). Ние установихме силна корелация между понижението на процента на Th17 и увеличаването на нивата на PGE_2. Резултати в подкрепа на потисната пролиферация съобщават и Pianta и сътрудници, като по техни данни в културите на ПКМК под влияние на АТ-МСК се наблюдава до около 56% редукция в броя $RORc^+CD161^+$Th17 лимфоцитите (*Pianta et al., 2014*). Ке и сътрудници демонстрират, че под влияние на МСК от костен мозък се наблюдава инхибиция на Т-клетъчната пролиферация чрез арест в G0/G1 фазите на дележния цикъл и влияние върху цитокиновия профил под действието на HGF, PGE_2, NO, sHLA-G5 и Galectin-3 (*Ke, 2016*).

Допълнително Ке et al. посочват ключовата роля на TNF-α за поддържане поляризацията и стабилността на Th17 хелеперния фенотип. TNF-α засилва производството на IL-17 (*Yagi et al., 2010*) и има автокринен ефект върху Th17, който е важен за пролиферацията и поддържането на характерните за Th17 епигенетични изменения, свързани с експресия на RORc. В нашите опитни постановки не сме изследвали средите от АТ-МСК за наличието на разтворим рецепторен антагонист на TNF-α, но регистрирахме сигнификантно понижение в нивата на TNF-α в средите на ПКМК под действието на разтрворими фактори от АТ-МСК, което ни дава основание да предположим, че описаният

механизъм е приложим и в нашата работа. Така, това се явява възможно обяснение за потенциален механизъм, чрез който да свържем промяната в процента на Th17 и понижението на TNF-α.

Процесът на конверсия на Th17 и поляризацията им в FoxP3$^+$ Tregs под действието на МСК е добре описан в литературата (*Tatara et al., 2011; Kay et al., 2017*,) и е свързан с потискане на RORc. Един от важните аспекти, имащи отношение към този процес е действието на IL-6 върху субпопулацията на Th17. IL-6 беше намерен от нашия екип в относително висока концентрация в средите от АТ-МСК, резултат, многократно доказван и от други екипи (*Bouffi et al., 2010*). От гледна точка на диференциацията на наивните Т-хелперни лимфоцити в посока придобиване на Th17 епигенетичен фенотип, IL-6 зависимото активиране на STAT3 е от изключително значение. Един от възможните механизми, целящ да обясни IL-6 парадокса в настоящата ситуация, е демонстриран от Liu и сътрудници през 2015 г. Те доказват, че средите от МСК водят до активиране на супресор на вътреклетъчния сигналинг – SOCS3 (Suppressor of cytokine signaling 3), който блокира активирания STAT3 и на практика повлиява върху диференциацията на Т-хелперите. Резултатът е превалиране на непрекия ефект на IL-6, свързан с продукция на IL-10 от миелоидни клетки (*Liu et al., 2015*). IL-10 от своя страна е ключов цитокин ангажиран в диференциацията на Т-хелперните субпопулации в посока iTregs.

Понижението на процента на Th17 хелперните лимфоцити под действието на среди от МСК беше придружено и от сигнификанта редукция в нивата на основните Th17- асоциирани цитокини: IL-17, IL-21 и TNF-α, като между TNF-α и IL-17 беше установена силна корелация. Изводът, който може да се направи, е, че количествените промени са придружени и с функционални изменения, свързани с потискане на "активността" на Th17 при пациенти с РА. Също така проведеният йерархичен клъстерен анализ показа най-голяма корелация между понижението на Th17 и повишението на нивата на PGE_2 в културите на периферни кръвни мононуклеарни клетки, което съвпада с наличните данни в литературата за подобно действие на PGE_2.

Освен това под действието на CCL2 се инхибират фосфорилацията на STAT3 и последващото активиране на транскрипционния фактор PAX5. Инхибицията на STAT3 в Т-хелперни лимфоцити води до инхибиране на диференциацията в посока Th17 хелперни лимфоцити (*Rafei et al., 2008).*

6.6. Влияние на кондиционирани среди от АТ-МСК върху $CD4^+CD25^+FoxP3^-$ефекторните лимфоцити (Teff) при пациенти с РА

Централно място в нашите експериментални постановки заемаше и изследването на активираните $CD4^+CD25^+$ Т-хелперни лимфоцити. CD25 е активационен маркер, експресиран от активираните Т-хелперни лимфоцити, но също така може да бъде и перманентно експресиран от $FoxP3^+$ Т-регулаторни лимфоцити. С цел да не допуснем припокриване между популациите, отчетохме ефекта на средите от АТ-МСК върху $CD4^+CD25^+$ лимфоцити, които н експресират транскрипционния фактор FoxP3. Съгласно получените от нас резултати процентът на $CD4^+CD25^+FoxP3^-$ лимфоцитите (Teff) беше сигнификантно по-нисък в рамките на 3-дневно култивиране под действието на среди от АТ-МСК. Сигнификантността на тази находка остава и след приложената корекция по метода н Benjamini-Hochberg. Големината на ефекта и тук беше по-голяма от типичната. Този резултат е в съответствие с данните на Gonzalez-Rey и сътрудници за въздействието на МСК върху Tregs при болни с РА, където също се установява понижение на Teff (*Gonzalez-Rey et al., 2009*).

Наблюдаваните промени в пула на $CD4^+CD25^+$ клетки потвърждават един от най-важните механизми, чрез който МСК потискат пролиферацията на Т-хелперните лимфоцити. Посредством модулация на експресията на повърхностния високоафинитетен рецептор за IL-2 се повлиява клоналната експанзия и пролиферация на активирани Т-хелперни лимфоцити след фазата на антиген-зависимата активация.

Секрецията на IL-2 е основният автокринен и паракринен способ за потенциране на Т-клетъчното оцеляване и пролиферация. Рецепторът за IL-2 е съставен от 3 субединици: полипептидните вериги IL-2Rα (CD25), IL-2Rβ (CD122) и IL-2Rγ (CD132). Наличието на IL-2Rγ субединицата причислява IL-

2 към групата цитокини с обща рецепторна субединица. CD122 и CD132 се комбинират и могат да формират рецепторен комплекс с нисък до среден афинитет за IL-2, но активационния сигнал, получван през него, не е достатъчен, за да стимулира пролиферацията на активираните Т-хелперни лимфоцити. Процесът на активация на наивните Т-хелперни лимфоцити посредством ангажирането на TCR и CD28 активира белтъчния комплекс mTORC1. Сигнализацията, медиирана от mTORC1, е основоположна за активиране на клетъчния цикъл и засилването на експресията на CD25. Експресията на CD25 е необходима за увеличаване на афинитета на IL-2R към IL-2 и генериране на силен положителен сигнал, водещ до фосфорилиране на STAT5 (*Rusterholz et al., 1999*). Блокирането на IL-2 с моноклонални антитела води до загуба на пролиферативна способност и липсваща диференциация (*Hardinger et al., 2012*). Способността на МСК да потискат пролиферацията на активираните Т-хелперни лимфоцити може да се реализира посредством промяна в експресията на CD25. В подкрепа на тази хипотеза са нашите данни за увеличаване процента на $CD25^{-}$Tregs под въздействието на кондиционираните среди от АТ-МСК. Ren и сътрудници допускат, че това влияние би могло да се отдаде на присъствието на NO оксид в кондиционираните среди на МСК (*Ren et al., 2008*). Блокирането на азотен оксид-синтетазата, експресирана от МСК, води до възстановяване на експресията на CD25, нивата на фосфорилиран STAT5 и съответно пролиферативния потенциал на Т-хелперните лимфоцити (*Yoo et al., 2017*). Допълнително доказателство, потвърждаващо предимството на секретирания NO пред другите разтворими фактори, секретирани от МСК, по отношение редукцията на CD25, е опитната постановка, предложена от Yo и сътрудници. При нея са използвани човешки МСК, при които е "отстранен" генът, кодиращ експресията на азотен оксид-синтетаза (*Yoo et al., 2017*) и последващият ефект е липса на промяна в експресията на CD25 и Т-клетъчната проилиферация. Пълното разшифроване на механизма на действието на NO показва, че присъствието му в средите на МСК увеличава фосфорилирането на серин/треонин киназата LKB1 и АМК-активираната протеин киназа AMPKα, водещо до потискане на mTORC сигналния път (*Malik and Yuspa, 2012*) и последваща загуба на експресия на CD25. За съжаление, нашите среди от АТ-МСК не бяха изследвани за

наличие на NO, но наблюдаваният ефект върху CD25 експресията е същият, което позволява да спекулираме, че описаният механизъм може да бъде „екстраполиран" и върху нашите данни.

Друг възможен механизъм, който може да бъде приложен за обяснение на наблюдавания ефект върху $CD4^+CD25^+FoxP3^-$ ефекторните лимфоцити, е действието на TGF-β. TGF-β не беше открит в средите на АТ-МСК, но беше сигнификантно по-висок при ПКМК култивирани със среди от АТ-МСК. Аргумент в подкрепа на това е, че при проведения от нас йерархичен клъстерен анализ промяната в процента на Teff и разликата в цитокиновата секреция на TGF-β бяха групирани в един клъстер, тоест корелацията между тях бяше най-голяма. В конкретния случай корелационната зависимост е с отрицателен знак и тя може да се интерпретира по следния начин: в опитните постановки с увеличаване нивата на TGF-β, съответно намалява и процентът на активираните нерегулаторни Т-хелперни лимфоцити. Съгласно натрупаните в литературата данни, инхибиторният ефект на TGF-β е насочен едновременно към блокиране на продукцията на IL-2 и блокиране на сигнално-трансдукционните пътища, активирани под действието на IL-2 (*Belladonna et al., 2008*). Друг аспект от антипролиферативното действие на TGF-β върху Т-хелперните лимфоцити е активирането на циклин-зависимите киназни ихибитори (CKIs) p15, p21, p27 и потискането на промотори на клетъчни цикъл, като C-myc, cyclin D2, CDK2 и cyclin E (*Hannon and Beach, 1994; Wolfraim et al., 2004, Polyak et al., 1994*). TGF-β потиска Т-клетъчната пролиферация на наивните Т-хелпери по-силно отколкото на активираните Т-хелпери, което може да бъде обяснено с намалената експресия на TGF-β II рецепторната субединица (*Cottrez and Groux, 2001*).

Голяма част от активираните и търпящи клонална експанзия Т-хелперни клонове при РА са свързани със „затворения кръг" на автоимунната дисрегулация. Несъмнено най-ключови са автореактивните Т-хелперни лимфоцити, но характерен за РА е преходът от антиген-зависим към цитокин-зависим провъзпалителен отговор (*Zizzo et al., 2019*). Следователно експанзията и пролиферацията на ефекторните Т-хелперни лимфоцити, предоставят „гориво" за цитокин-зависимия провъзпалитен отговор при РА. В този контекст, МСК предоставят ключов механизъм за модулация на Т-клетъчната пролиферация.

Това е механизъм, който води до клонална анергия и конверсия на автореактивните Т-хелперни лимфоцити в клетки с регулаторен фенотип, което би означавало и намален синтез на проинфламаторни цитокини, и контрол върху активацията и началните стъпки на пролиферацията. Може да се очаква, че потискането на пролиферацията на ефекторните лимфоцити ще доведе до намален цитокинов синтез на проинфламаторни цитокини като IL-17 и TNF-α.

Нашите резултатите потвърдиха редукцията в нивата на IL-17 и TNF-α. Пониженият брой CD25 експресиращи хелпери, от друга страна, е възможен механизъм, потенциращ $CD25^{+}$Tregs, поради намалената конкуренция за наличния в средите IL-2. Това е вероятна причина за стабилизиране на FoxP3 и би могло да обясни и повишението в нивата TGF-β, който по механизъм на обратната отрицателна връзка потиска допълнително Т-клетъчната пролиферация (*Sakaguchi et al., 2006*). IL-2 е ключов цитокин за създаването и хомеостазата на Tregs. При култивиране на наивни CD4+Т-лимфоцити, които са стимулирани чрез ТКР в присъствието на TGF-β, IL-2 е от изключителна важност за „отключване" на потисната пролиферация, медиирана от TGF-β (*Chen et al., 2003*). От тази гледна точка IL-2 се явява най-важният фактор, който „изважда" анергичните iTregs от тяхното състояние и ги насочва по пътя на пролиферацията. При експерименти с неутрализиране на IL-2 се установява, че той е необходим и за TGF-β-индуцираната транскрипция на FoxP3 и обусловената от това супресорна активност (*Zheng et al., 2007*). Сигналът, генериран чрез IL-2, активира STAT5, който от своя страна свързва FoxP3 гена и действа в кооперация със STAT5 в индукцията на FoxP3 протеин (*Li and Flavell, 2008*). IL-2 също така действа в посока ограничаване на поляризацията на активираните CD4+Т лимфоцити в посока Th17 (*Xiao et al., 2008*). Като цяло би могло да се обобщи, че IL-2 е от базисно значение за оцеляването на iTregs, тяхната пролиферация и стабилност. Както при повечето ситуации, свързани с цитокини, така и тук тези процеси се осъществяват в кооперация с други цитокини, най-съществен от които е TGF-β.

Съгласно нашите резултати, намалението на Teff клетки корелира в най-висока степен с повишението на TGF-β и процента на $FoxP3^{+}$Tregs, тези промени бяха обединени в един клъстер заедно с промените, настъпващи между TNF-α и IL-17.

Установените корелационни зависимости, посредством йерархичен клъстерен анализ ни дадоха основание да предложим описания механизъм и причинно-

следствени връзки, засягащи инхибицията на Т-хелперната пролиферация, с функционалната и бройна активация на Tregs, съпроводени от намалената секреция на TNF-α, IL-17 и повишена продукция на TGF-β.

6.7. Промени в пула на Treg лимфоцити под действието на среди от АТ-МСК при пациенти с РА

Th17 и Treg клетките представляват две функционално антагонистични клетъчни популации, които въпреки своя антагонизъм споделят общи пътища на диференциация, като между тях съществува голяма степен на пластичност. При РА съществуват дисбаланс и променена динамика в двете популации, което е тясно свързано с проявите на автоимунитет, както и с прогресията на характерното ставното засягане (*Niu et al., 2011*).

Трасирането на евентуалната терапевтична полза от базираните на мезенхимни стволови клетки подходи при РА е свързано и с изучаване на ефекта им върху компартмента на Т-регулаторните клетки, експресиращи транскрипционния фактор FoxP3 (Tregs).

6.7.1. Влияние на кондиционирани среди от АТ-МСК върху субпопулацията на $CD4^+CD25^+FoxP3^+$

В концептуален план дългият път, извървян от началото на 90-те години на XX в., с идентифицирането на имуносупресивните CD25+ Т-хелперни лимфоцити до откриването на ролята на транскрипционния маркер FoxP3 в началото на XXI век, ражда модерното разбиране за ролята на $CD4^+CD25^+FoxP3^+$Tregs в процеса на имунната хомеостаза и процесите на „здраве и болест". Сега Tregs се определят като клетъчна популация, която е основен „принципал" на процесите на поддържане на периферен автотолеранс. Главната им роля е свързана с прояви на висока степен на хетерогенност и пластичност. Tregs, едновременно с експресията на своя мастър-регулатор FoxP3, могат да експресират и транскрипционите фактори GATA-3, Rorγt, T-bet, характерни за Th2, Th17, Th1 поляризираните хелперни лимфоцити. Опитите за разграничаване на същинските имунорегулаторни клетки от активираните хелперни лимфоцити водят до отграничаване на три основни популации, базирани на експресията на FoxP3, CD25 и CD45RA, а именно $CD45RA^-CD25^{high}FoxP3^{high}$ активирани или често наричани ефекторни Tregs;

$CD45RA^{+}CD25^{-}FoxP3^{+}$, определяни в литературата като неактивирани Tregs; $CD45RA^{-}CD25^{low}FoxP3^{low}$ активирани ефекторни Т-хелперни лимфоцити, транзиторно увеличаващи ескпресията на FoxP3 и CD25 след активация. Tregs са хетерогенни и по своя произход по-голямата част от циркулиращите в периферията са с директен тимусен произход nTregs, докато други са продукт на диференциация в периферните лимфни възли на наивни хелпери или активирани ефекторни лимфоцити. Тимусните Tregs са единствените $CD4^{+}$ лимфоцити, които завършват своята диференциация в тимуса и го напускат като напълно диференцирани и функционално компетентни антиген-специфични супресорни Т-клетки *(Yang et al., 2009)*. Напускайки тимуса, те се намират в активирано състояние, вследствие на антигенно праймиране по време на негативната селекция в тимуса, експресират във висока степен маркерите CD25, CTLA-4, CD45RO и CD5, с което наподобяват и паметов фенотип (*Zhao et al., 2017*).

Тимусният механизъм за оформяне репортоара на nTregs е от съществено значение за разбиране на имунопатогенезата на РА. Негативната Т-клетъчна селекция в тимуса е основна част от централния толеранс и е „вододелна фаза" по отношение на бъдещото развитие на Т-лимфоцитите. Данни от проучванията на редица изследователски екипи неднозначно демонстрират, че Т-лимфоцитите, реагиращи твърде силно по време на антигенното праймиране, претърпяват клонална делеция, проявяващите „средна" по сила активация биват насочени в диференциация към антиген-праймирани тимусни Tregs, а тези, които генерират слаб сигнал, остават в непраймирано състояние и напускат тимуса като наивни Т-лимфоцити (*Maggi et al., 2005*). Тимусните Tregs са механизъм за клонално спасяване на потенциално автореактивни Т-лимфоцити и тяхната експлоатация в контекста на по-ефективно запазване на имунологичната хомеостаза. Тяхната роля за поддържане на автотолеранса в периферията е съществена: тимусните Tregs, потенциално разпознаващи автоантигени с по-голям афинитет, реагират с продукция на имуносупресивни цитокини (TGF-β, IL-10, IL-35, adenosine, IDO, CTLA-4, PD-L1, TIGIT) и пролиферират при 10 до 100 пъти по-ниски нива на автоантигените, в сравнение с нивата, необходими за активацията на потенциално автореактивни наивни Т-хелперни лимфоцити (*Passos et al., 2017*). По този начин тимусните Tregs са изключително чувствителни към автоантигени, продуцирани в условията на възпалителни процеси и тъканна деструкция. Важността на този механизъм се потвърждава от

миши модели с делеция на тимусните $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ или при човешкия аналог: имунодефицитно състояние, известно като IPEX (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy X-linked). Дължи се на загуба на $CD4^+CD25^+$Tregs поради *FOXP3* генна мутация и се характеризира с ранна изява на автоимунитет, диабет тип 1, полиендокринопатия и ентеропатия.

Това, което е важно по отношение на ролята на Tregs и дотук описания механизъм на имунопатогенезата на РА, е, че по време на тимусната селекция не се представят антигени, продукти на вторично модифициране, свързани с цитрулиниране и карбамилиране, което ограничава репертоара на тимусните Treg и е своеобразен „пропуск" в механизма на централен толеранс. Редица автори свързват тази особеност с носителството на „споделен епитоп" и с проявата на автоагресия към собствените цитрулинирани структури при РА. Освен изброените пропуски в репертоара на тимусните Treg, съществуват и редица полиморфизми на гени, влияещи върху процеса на формиране на „индуцирани" в периферията Tregs (iTregs). Описани са полиморфни варианти на CTLA-4, IL-2 и IL-10, повлияващи основните механизми на имуносупресия от Tregs, както и полиморфизми в гена за протеинтирозин фосфатаза PTPN2, свързани с понижен праг на активация на наивните Т-хелперни лимофцити *(Ciccacci et al., 2016*). Това е довело до формирането на Tregs-ориентирани терапевтични подходи при пациентите с РА. Важността на подобен тип подходи се доказва от наличните данни в литературата, демонстриращи клиничната ефикасност на моноклоналния препарат Abatacept, насочен срещу CTLA-4, който води до изместване на равновесието между Tregs/Th17 в посока Tregs (*Reichert et al., 2020*).

Нашето проучване по недвусмислен начин показва способността на разтворимите фактори, съдържащи се в среди от АТ-МСК, да повлияват $CD4^+FoxP3^+CD25^+$ регулаторните лимфоцити в насока увеличаване на техния процент в клетъчни култури на ПКМК от пациенти с РА. Резултатите, получени от екипа ни, издържаха статистически строгата проверка, направена посредством метода на Benjamini-Hochberg. В подкрепа на „биологичната значимост" на нашите резултати е „големината на ефекта", отразяваща силата на промените в изследваната от нас популация, която беше определена като „по-голяма от типичната". Получените от нас резултати бяха в съответствие с данните от експериментални проучвания, изучаващи паракриното действие на среди от МСК върху ПКМК от здрави

донори (*Ivanova-Todorova et al., 2012*), ревматоиден артрит, лупус (*Chen et al., 2017*) и също така и *in vivo* действие на МСК-утилизиращи подходи към пациентите с РА (*Gonzalez-Ray et al., 2007*). Големината на ефекта би могла да послужи като важна отправна точка при съпоставяне на получените от нас резултати, описващи действието на АТ-МСК върху Tregs компартмента при пациентите с РА *in vitro,* с резултатите от други проучвания върху РА, а също и при други заболявания, и да намери приложение като теоретична база на Tregs-ориентираните терапевтични стратегии.

Увеличаването на процента на $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Tregs в 3-дневните култури на ПКМК бихме могли да отдадем на следните възможни механизни: 1) активиране и пролиферация на наличните в култивираните ПКМК Tregs; 2) конверсия на активираните ефекторни Т-лимфоцити, Th17 или наивни Т-хелперни лимфоцити в $CD25^+$ Tregs; 3) релативно увеличение на процентното съдържание на Tregs поради апоптична смърт на Т-хелперните лимфоцити; 4) увеличена експресия на FoxP3 като белег за ранна активация. Дискутирайки тези възможни механизми, е важно да отбележим факта, че $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ се характеризират с висок пролиферативен потенциал (*Walker, 2004*). Основни разтворими фактори, продуцирани от МСК с потенциращ $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Tregs потенциал и открити в нашите експериментални постановки, бяха sVEGF-A и PGE_2 (табл. 8).

sVEGF-A може да се охарактеризира като ендотелно-клетъчен митоген и наред с ключовата му роля в процесите на ангиогенеза и неоваскуларизация за него са характерни и редица имуносупресивни свойства. Добре установено е, че sVEGF-A има инхибиторен ефект върху NFkB и NFAT сигналните пътища и свързването на VEGF-A с VEGF-R2 може да индуцира пролиферация в пула на Tregs. Освен това взаимодействието на SVEGF-Ac Neuropilin-1, експресиран от Tregs доказано индуцира повърхностната експресия на инхибиторни молекули като PD-L1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3 и по този начин усилва имуносупресивния потенциал на Tregs (*Voron et al., 2015*). Наред с това добре известно е, че активирането посредством PLCγ-калциневрин-NFAT пътя усилва имуносупресивния потенциал и пролиферативната способност на Tregs *(Soker et al., 1998; Suzuki et al., 2009*). Ако допуснем влияние на тези механизми в проведените от нас експериментални постановки, то бихме могли да тълкуваме установеното увеличение в секрецията на

TGF-β под влияние на среди от АТ-МСК като косвен маркер за увеличаване на имуносупресивния потенциал на Tregs в нашите култури.

При нашето изследване PGE_2 беше установен в повишени нива в кондиционирана среда на АТ-МСК, като това съответства на наличните данни в литературата (*Najar et al., 2010*). PGE_2 може директно да инхибира пролиферацията на Т-хелперните лимфоцити чрез редукция на IL-2 и също така да намали нивата на TNF-α и IFN-γ (*Kim and Hematt,i 2009*). Съгласно резултатите на *Kim SH и Tanaka*, PGE_2 директно стимулира пролиферацията на Tregs. PGE_2 е също разтворим медиатор, чиято продукция се свързва с имуносупресивната функция на активираните $CD25^+$Tregs (*Whiteside and Jackson, 2013*). Основните регулаторни ефекти на PGE_2 се реализират посредством свързване с EP2 и EP4 рецептори и опосредстваното от тях сигнализиране води до повишаване на производството на IL-10 и PGE_2 (*Kim and Hematti, 2009*). От своя страна IL-10, секретиран под дейтвието на PGE2, може директно да индуцира диференциацията в посока към Treg или индиректно чрез модулация на антиген-представящите клетки. PGE2 може да действа и заедно с TGF-β и да предизвика директно препрограмирането на Th17 в Tregs (*Maggini et al., 2010*). Нашите изследвания показаха, че под действие на средите от АТ-МСК се установява сигнификантно по-висока секреция на PGE2 в културите на ПКМК, което може да бъде обяснено с амплификацията по механизма на положителната обратна връзка. Този механизъм на автокринна регулация по типа на положителна обратна връзка може да бъде потенциран допълнително и от секретирания от МСК IL-6 (*Maggini et al., 2010*).

IL-6 води до продукция на PGE_2 и възможността на средите от МСК да блокират сигнално-трансдукционото действие на IL-6 посредством активиране на SOCS3 (*Liu 2017*) може да послужат като аргумент, че комбинирането на IL-6 с други разтворими медиатори променя самостоятелното му действие в посока поляризация на наивните Т-хелперни лимфоцити към Tregs и да обясни наблюдаваното от нас изместване на Th17/Tregs равновесие в посока Tregs.

Наблюдаваните от нас бройни промени в компартмента на $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ също биха могли да се дължат до някаква степен и на разтворими медиатори, за които средите на АТ-МСК не бяха тествани от нашия екип, но по отношение на секрецията им има ясно установен консенсус. Добре описани са потенциращото действие върху Tregs на хемоксигенза, NO, HGF, Galectin-1, LIF, TSG-6, sHLA-G5,

както и механизмите на микровезикуларен транспорт (*Nasef et al., 2008; Fainardi et al., 2010; Zhang et al., 2014).*

Заслужава да бъде разгледана и алтернативната възможност, отнасяща се до клетките, експресиращи FoxP3 под въздействие на фактор или фактори, секретирани от МСК. Активираните Т-хелперни лимфоцити в началните фази на своята активация могат да увеличат експресията си на FoxP3, тоест наблюдавните от нас $FoxP3^{+}CD25^{+}$ лимфоцити биха могли всъщност да са активирани ефекторни клетки, а не същински Tregs. Това твърдение е в противоречие с увеличената секреция на супресивните TGF-β, PGE_2 и sVEGF-A, от една страна, и намаления процент Th17 с изместено Th17/Tregs съотношение и кореспондиращо потистната секреция на Th17 асоциираните IL-17, IL-21 и TNF-α – от друга. Също така при нашето изследване флоуцитометричният подход беше свързан с определяне на Tregs на базата на висока експресия на FoxP3, докато транзиторно експресиращите FoxP3 ефекторни лимфоцити имат ниска експресия на FoxP3. Също така можем да се позовем и на добре описаните ефекти на АТ-МСК да индуцират iTregs в клетъчни култури от здрави донори и при миши модели (*Engela et al., 2012; Ivanova-Todorova et al., 2012).* Тези iTregs имат характерен профил на метилация в TSDR локуса на FoxP3, но наред с това проявяват ниска експресия на Helos и Nrp1 – маркери, експресирани от nTregs. В нашата постановка нямаше как да разграничим nTregs от iTregs, за да диференцираме дали пролиферацията на наличните nTregs или конверсията в iTregs е преобладаващият процес в културите на ПКМК от пациенти с РА.

6.7.2. Влияние на кондиционирани среди от АТ-МСК върху субпопулацията на $CD4^{+}CD25^{-}FoxP3^{+}$

Някои автори предполагат асоциация на тази все още недобре изучена субпопулация на потенциално имуносупресивни лимфоцити с автоимунните заболявания (*Ferreira et al., 2017*). В тази връзка $CD4^{+}CD25^{-}FoxP3^{+}$ бяха избрани и като обект в нашето проучване на имуносупресивното действие на АТ-МСК.

Първите наблюдения, свидетелстващи за увеличен процент на популацията на $CD4^{+}CD25^{-}FoxP3^{+}$ в периферна кръв, са направени при пациенти със

системен лупус (*Zhang et al., 2008, Yang et al., 2009, Suen et al., 2009*), а впоследствие и при пациенти с множествена склероза (*Franson et al., 2010*) и РА (*De Paz et al., 2012*). В контекста на системния лупус, увеличеният брой $CD4^+CD25^-FoxP3^+$ корелира с болестната активност (*Koller, 2004*), а съгласно друго проучване броят им корелира с титъра на антителата срещу двойноверижна ДНК (*Zhang et al., 2008*). Въз основа на тези наблюдения в научната общност съществува становището, че $CD4^+CD25^-FoxP3^+$ могат да са ангажирани пряко в имунопатогенезата на заболяването. $CD4^+CD25^-FoxP3^+$ клетките са с понижена способност за имуносупресия при болни със СЛЕ според Walker и сътр. (*Walker, 2009)*. При пациенти с РА de Paz и сътр. установяват значимо завишен брой на CD4+$CD25^-FoxP3^+$ клетъчната популация и наличие на негативна корелация с DAS-28 и други параметри на болестната активност (*De Paz et al., 2012*). Въпреки наличните наблюдения няма установен консенсус и категорична яснота по отношение природата на $CD4^+CD25^-FoxP3^+$, имуносупресивната им функция и тяхното взаимоотношение с „класическите“ $CD4^+CD25^+FoxP3^+$. Поради противоречивите и оскъдни резултати, някои автори ги описват като „мистериозна“ популация.

Сравняването на процента на $CD4^+CD25^-FoxP3^+$ популацията в ПКМК, култивирани с кондиционирани среди на АТ-МСК спрямо тези, култивирани с контролни среди, показа по недвусмислен начин сигнифаканто повишение на процента на тази популация с ниска до липсваща експресия на CD25. В нашите експериментални постановки повишението на $CD4^+CD25^-FoxP3^+$ корелираше в голяма степен с увеличаването на “класическите” $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Tregs. Големината на ефекта, наблюдван за $CD4^+CD25^-FoxP3^+$, и коригираната сигнификантност “q value” бяха сходни с тези при промяната в „класическите” Tregs (фиг. 28). Въпреки недвусмисленото сходство в динамиката на пула от $CD4^+CD25^-FoxP3^+$ с тази при $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Tregs под паракринното влияние на средите от АТ-МСК, получените от нас резултати продължават да носят повече въпроси, отколкото отговори. Предложените в научната литература и отчасти разнопосочни концепции относно природата на $CD4^+CD25^-FoxP3^+$ Tregs биха могли да бъдат систематизирани в следните твърдения:

1. $CD4^+CD25^{low/-}FoxP3^+$ Tregs са междинна клетъчна популация, транзиторно появяваща се при конверсията на $CD25^-$ наивни Т-хелперни лимфоцити в „класически” CD25 силно експресиращи Tregs. В контекста на тази хипотеза,

появата на повърхностна експресия на CD25 не е ранен маркер за Т-клетъчна активация, защото клетките не са праймирани с антиген и активирани съгласно трисигналния механизъм за Т-клетъчна активация. Това е късна изява на епигенетични промени, свързана с хипометилация на TSDR региона на FoxP3, стабилизиране на експресията на FoxP3 и придобиване на характерния за Tregs профил (*Bianchini et al., 2011*).

2. $CD4^+CD25^{low/-}FoxP3^+$ Tregs може да са пълноценни имуносупресивни Tregs, транзиторно понижили експресията си на CD25. Това може да е свързазно с блокиране на mTORC сигналния път, необходимо условие за навлизане на Tregs в G1 фазата на дележния цикъл (*Procaccini and Matarese, 2012*).

3. Загубата и намалената мембранна експресия на CD25 може да са свързани с отделените металопротеинази, чието протеолитично действие по отношение на „отрязване" на мембраноекспресираните CD25 е добре описано в литературата (*Ding et al., 2009*).

4. $CD4^+CD25^{low}FoxP3^+$ Tregs може да са пълноценни имуносупресивни клетки и да са отделен субтип на Tregs, които да са независими от действието на IL-2 *(Nakamura et al., 2007*).

5. $CD4^+CD25^{low}FoxP3^+$ Tregs са дисфункционални и не могат да осъществяват необходимата имуносупресивна функция, за да потиснат дисрегулирания имунен отговор. Появата им е свързана с поява на автоимунни състояния (*Horwitz, 2010*).

6. $CD4^+CD25^{low}FoxP3^+$ Tregs може да са краен етап от диференциацията на класическите Tregs (*Ferreira et al., 2017*).

Внимание заслужава проучването на Ferreira et al., което е едно от малкото проучвания, предоставящи детайлна и систематична експериментална информация относно природата на $CD4^+CD25^-FoxP3^+$ в сравнителен план с класическите $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ (*Ferreira et al., 2017*). Авторите демонстрират, че $CD4^+CD25^{low/-}FoxP3^+$ имат същата степен на деметилация в TSDR региона, като специфичната за произхождащите от тимуса $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$ Tregs, както и същата експресия на транскрипционния фактор HELIOS. Следователно, $CD4^+CD25^{low}FoxP3^+$ не са транзиторно експресиращи FoxP3 активирани Т-хелпери, а са същински регулаторни клетки, близки до профила на nTregs. Също така те установяват, че броят на $CD25^{low}FoxP3^+$ силно корелира с този на $CD25^{high}FoxP3^+$ Tregs, наблюдение, близко до откритата от нас корелация между двете клетъчни субпопулации. Най-силно

броят на $CD25^{low}FoxP3^{+}$, според Ferreira и сътрудници, корелира с делящите се $Ki\text{-}67^{+}$ $CD4^{+}CD25^{high}FoxP3^{+}$ Tregs. Освен това процентът на $CD45RA^{-}$ и $PD\text{-}1^{+}$ популациите е по-висок в компартмента на $CD4^{+}CD25^{low}FoxP3^{+}$ спрямо $CD25^{high}FoxP3^{+}$ Tregs. На базата на това те изказват съждението, че $CD4^{+}CD25^{low}FoxP3^{+}$ биха могли да са краен етап в диференциацията на $CD25^{high}FoxP3^{+}$nTregs. По отношение на тяхната имуносупресивна функция $CD4^{+}CD25^{low}FoxP3^{+}$ секретират сигнификантно повече IFN-γ и имат по-ниска експресия на $FoxP3^{+}$, CTLA-4 и TIGIT спрямо класическите $CD25^{high}FoxP3^{+}$ Tregs. Ако екстраполираме откритата от Ferreira и сътрудници взаимовръзка между пролифериращите $CD25^{high}FoxP3^{+}$ Tregs и експанзията на $CD4^{+}CD25^{low}FoxP3^{+}$, то бихме могли да обясним донякъде получените от нас наблюдения за силна корелация в процентното увеличаване на двете клетъчни популаци с установените разтворими фактори в среди от АТ-МСК с доказаното пролиферативно въздействие върху Tregs. Тоест към процеса на индуциране на iTregs може да прибавим и пролиферацията на наличните в средите nTregs и iTregs, стимулирани от АТ-МСК.

В заключение, на базата на увеличения брой Т-регулаторни популации и характерните им цитокини, редукцията на Th17 и Teff и техните характерни цитокини под влияние на среди от МСК, както и липсата на увеличаване на процеса на апоптозата за Т-хелперните клетки, можем да изкажем твърдението, че под взаимно допълващото се действие на разтворимите медиатори, налични в средите от МСК, се осъществява пълноценен процес на „инфекциозен толеранс", при който проинфламаторен Т-хелперен фенотип се „замества" с толерогенен такъв, без да настъпва ексцесивна апоптотична смърт. Това е в подкрепа на препрограмирането на взаимно свързаната мрежа от имунокомпетентни клетки на базата на пластичност между функционално антагонистично поляризираните Th17 и Treg лимфоцитни субпопулации.

6.8. Ефект на секреторни фактори от АТ-МСК върху експресията на HLA-DR върху моноцитни клетки при пациенти с РА

Освен директното инхибиторно действие на редица от откритите от други автори, както и описани от нашия колектив (*Rozenberg et al., 2016*; *Vasilev et al., 2019*,) секреторни фактори, МСК могат да осъществяват инхибиторен ефект върху Т-хелперните лимфоцити и по индиректен начин, модулирайки функцията

на клетките от миелоидния ред. Такива са клетките със способност за фагоцитоза и антигенно представяне като кръвните моноцитни клетки, поляризираните макрофаги и дендритните клетки. Поради тази причина изследването на бройните и функционалните промени, настъпващи в пула на Th17 и Tregs, беше обвързано и с мониториране на основни параметри на миелоидните клетки, ангажирани в механизма на антигенно представяне, а именно експресията на HLA-DR и костимулаторния комплекс B7, формиран от CD80 и CD86. Някои опити за класификация на разтворимите фактори, продуцирани от АТ-МСК, са довели до условното им разделяне на разтворими медиатори, влияещи директно върху ефекторните Т-лимфоцити, каквито са IDO, NO, sPD-L1, Galectin-1, TGF-β, и такива, действащи в посока индуциране на моноцити/макрофаги с толерогенен фенотип: IL-6, PGE_2, HGF, IL1-RA.

Моноцитните клетки играят важна роля в имунопатогенезата на РА, служейки като източник на зрели АПК. В присъствие на проинфламаторни цитокини те се диференцират в зрели дендритни клетки (ДК), в М1 поляризирани макрофаги (често определяни като възпалителни), характеризиращи се с висока степен на експресия на HLA-DR, както и в остеокласти, играещи основна роля в костното ремоделиране (*Jakubzick et al., 2017*). Зрелите ДК се считат за главните двигатели на диференциацията и поляризацията на $CD4^+$ Т-хелперните субпопулации, но наред с това са натрупани доказателства, че моноцитите/макрофагите, съставлявайки най-разпространения клетъчен тип в ревматоидния синовиум, също могат да играят централна роля в този процес.

МСК от различни източници доказано могат да насочват поляризацията на моноцитите и макрофагите в посока регулаторен, толерогенен фенотип и също така директно да инхибират диференциацията в макрофаги тип 1 и зрели дендритни клетки (*Deng et al., 2016, Zheng et al., 2018).* Такъв ефект на поляризация, съгласно литераратурата, може да бъде отдаден на продуцираните от МСК IL-6, HGF и IL-1 рецепторен антагонист (*Luz-Crawford et al., 2015*). Поляризираните миелоидни клетки в посока толерогенни макрофаги се характеризират с висока продукция на IL-10 и намалени нива на експресия на IL-12p70, TNF-α и IL-17. Толерогенните макрофаги могат да потискат Т-клетъчната активация и пролиферация, независмо от генерирането на $FoxP3^+$ Tregs (*Ko et al., 2015*). Супернатантите от М2 поляризирани моноцити/макрофаги от своя стана могат да индуцират

генерирането на iTregs от наивни Т-хелперни лимфоцити (*Schmidt et al., 2016*), като процесът е зависим от продуцираните от моноцитите TGF-β и CCL18 (*Chang et al., 2010, Melief et al., 2013*). В нашите опитни постановки под влияние на среди от АТ-МСК беше регистрирано увеличение в нивата на TGF-β, корелиращо най-силно с увеличените Tregs. Един от източниците на TGF-β би могъл да бъде и миелоидният кръвен ред.

Получените експериментални данни демонстрираха сигнификантно понижение както в броя, така и в плътността (mean fluorescent intensity, MFI), на експресия на HLA-DR върху кръвни моницитни клетки, настъпващо под действие на разтворимите фактори, налични в нашите среди от АТ-МСК. Големината на ефекта на промяната в експресията на HLA-DR беше много по-изразена от типичната, съгласно изработена от Cohen, номенклатура. В този смисъл намаляването на експресията на HLA-DR беше един от най-силно повлияните параметри от всички наблюдавани промени в нашата експериментална постановка. Намаленията на експресията на HLA-DR както като процент експресиращи клетки, така и като плътност на ниво отделна клетка под действие на АТ-МСК, е добре описано и установено явление (*Ivanova-Todorova et al., 2009*). В нашите опитни постановки експресията на HLA-DR беше изследвана върху кръвни моноцити. Обичайно, човешките кръвни моноцити са „лоши“ антиген-представящи клетки, въпреки че те експресират HLA клас II антигени, костимулираторен комплекс B7 и различни молекули от интегриновото семейство. При провъзпалителни състояния те увеличават експресията на повърхностните си маркери, както и производството на цитокини и в съответствие с установения трисигнален модел на Т-клетъчно активиране, също могат да активират и поляризират Т-клетките (*Corthay, 2006*). От тази гледна точка ние считаме, че описаните ефекти на средите от МСК върху повърхностната експресия на HLA-DR от кръвните моноцити на пациенти с РА са изключително важни и съставляват значим и желан аспект в множеството от имуносупресивни ефекти и механизми, трасиращи пътя към терапевтичното приложение на МСК-базираните подходи.

Основните цитокини, установени във висока концентрация в средите от МСК, за които по литературни данни има добре описан механизъм, обясняващ намаляването на HLA-DR, е изолираното и/или синергично действие на IL-6,

PGE_2 и sVEGF-A (*Xing et al., 1998*; *Maggini et al., 2010*). Те бяха намерени от нашия екип в относително висока концентрация.

Съгласно трисигналния модел на Т-клетъчната активация, за активирането и впоследствие поляризирането на Т-лимфоцитите са необходими следните едновременно действащи условия: първият сигнал е разпознаване на антигена в контекста на HLA молекулата, вторият сигнал се състои от костимулаторни взаимодействия (B7/CD28) от молекули на повърхността на АПК и Т-лимфоцитите, а третият сигнал е подходящата цитокинова среда. Пречупването на автотолеранса, активацията и диференциацията на автореактивните Т-лимфоцити при автоимунните заболявания също се осъществява съгласно принципа на трисигналния модел. Намалението или липсата на един от трите сигнала не може да се компенсира посредством увеличаване на другите сигнали и най-често води до индуциране на клонална анергия, апоптоза, неглижиране (*Khatami, 2011*) или индуциране на Т-клетки с регулаторен фенотип (*Khatami, 2011*). По този начин се прекъсва активацията на потенциално автореактивните Т-хелперни лимфоцити. При РА е налице връзка между антигенното представяне на цитрулинирани собствени протеини от носителите на "споделен епитоп" с пречупването на толеранса към собствени антигени, което допълнително акцентира върху необходимостта от потискането на този основен сигнал.

Ако до този момент антигенното представане беше разглеждано в контекста на три-сигналния модел за активация на наивните Т-лимфоцити, то експресията на HLA молекули осигурява важен стимул, който наред с цитокиновата среда стимулира фазата на експанзия и клонална пролиферация на активираните Т-хелпери, а също е и „тоничен" сигнал за навлезлите в компартмента на паметовите клетки Т-лимфоцити. Следователно модулирането на екпресията на HLA молекули е способ за индуциране на фазата на ограничаване на пролифериращите ефектори, а също и начин за контрол върху паметовите Т-лимфоцити посредством потискане на антигенното дразнене. Имунната памет, насочена към нетолерогенно разпознаване на собствени антигени, е сочена от някои изследователи за една от основните пречките пред „ерадикацията" на автоимунната дисрегулация при РА. Това би могло да бъде разглеждано като допълнителен важен аспект за потенциалното терапевтично приложение на АТ-МСК-базирани подходи.

6.9. Влияние върху експресията на B7 комплекса (CD80/CD86)

Съгласно основните постулати на трисигналния модел на клетъчна активация активацията на наивните Т-хелперни лимфоцити изисква представянето на антигени в контекста на МНС молекулите да бъде придружено от допълнителен втори сигнал. Този втори сигнал е базиран на контактно-клетъчно взаимодействие между костимулаторни молекули, експресирани от антиген-представящите клетки и съответните им партньори върху Т-хелперните лимфоцити. Примери за костимулаторни молекули са B7 (CD80/CD86), CD40, CD70, OX40L и др. С най-голяма важност е експресията на B7, който се разпознава от CD28 или CTLA-4, експресирани върху повърхността на наивни Т-хелперни лимфоцити. Действието на CTLA-4 е в посока потискане на активацията на Т-хелперни лимфоцити, като същият ефект е описан и при свързването на CD28 в отсъствието на антигенна стимулация през Т-клетъчния рецептор (ТКР). Ролята на B7/CD28 взаимодействието води до провеждане на положителен активационен сигнал само в присъствието на антигенна стимулация. Сигнално-трансдукционите пътища на ТКР са обвързани с тези на CD28 и се сливат в общ сигнален път, обозначаван като сигналозома SLP76/VAV1/ITK (*Hünig, Beyersdorf and Kerkau, 2015*), като ролята на активацията на CD28 е да усилва сигнала, получен чрез стимулацията през ТКР (*Hünig, Beyersdorf and Kerkau, 2015*).

Част от механизмите, посредством които МСК осъществяват своя имуносупресивен ефект върху имунния отговор, е чрез манипулиране и потискане на експресията на B7 комплекса върху миелоидни клетки, процес, водещ до генерирането на толерогенни дендритни клетки и М2 поляризирани макрофаги, процес неизменно свързан с индуцирането на инфекциозен толеранс. Потискането на B7 върху миелоидни клетки от здрави хора е описано от редица авторски колективи (*Zhao et al., 2011*), а също и в предишни проучвания на нашия колектив при изучаване на влиянието на АТ-МСК върху дендритни клетки от здрави доброволци *(Ivanova-Todorova et al,. 2009).* Поради важността на този механизъм в нашите опитни постановки проследихме и промяната на експресията на B7 комплекса под действието на кондиционираните среди на АТ-МСК. Необходимо уточнение, целящо да разграничи нашите резултати от проучванията на други авторски

колективи, е, че експресията на B7 беше изследвана върху кръвни моноцитни клетки от пациенти с РА в условията на тридневно култивиране. При направената справка в литературата не бяха открити проучвания на други колективи, използващи същата опитна постановка. Нашите резултати не показаха наличие на статистически сигнификантни разлики в промяната както на процента моноцитни клетки, експресиращи B7, така и в средната гъстота на експресия на B7 на единично клетъчно ниво. Няколко хипотези могат да бъдат предложени с цел да обясним разликите между нашите наблюдения върху пациенти с РА и описаното в литературата действие на средите от АТ-МСК върху експресията на B7 при здрави индивиди. Една от хипотезите е липсата на ефект да бъде отдадена на действието на приложената терапия – ниска доза кортикостероид в комбинация с метотрексат, данни за подобно влияние не бяха открити при направената справка в литературата. Друго обяснение е наблюдаваният ефект да се дължи на природата на генетично детерминираните и епигенетично придобитите дисрегулации, които са характерни за патогенезата на РА. Данни в посока на тази хипотеза също не бяха открити при направената от нас справка в литературата. Тоест можем да допуснем, че може в хода на нашата експериментална дейност сме се срещнали с характерна за РА дисрегулация, останала неидентифицирана до този момент и засягаща провеждането на важен за Т-клетъчната активация допълнителен костимулаторен сигнал. От друга гледна точка, при наблюдаването на статистически несигнификантен резултат при ниво на значимост $\alpha = 5\%$ в съображение трябва да се вземе и статическата сила на използвания за проверка на хипотезите статистически тест, която в нашата експериментална постановка беше ниска ($1-\beta < 40\%$). Това означава, че полученият резултат, въпреки че няма сигнификантна разлика, не може да бъде приет като правилен с необходимото ниво на доверителна сигурност. Единственият механизъм за преодоляване на това ограничение на изследването е увеличаване броя на експерименталните постановки, с цел увеличаване на доверителната сигурност на твърдението, че култивирането ПКМК от пациенти с РА не води до промяна в експресията на B7.

6.10. Влияние върху CD14$^+$ моноцитни клетки при култивиране с кондиционирани среди от АТ-МСК при пациенти с РА

Споменато беше, че циркулиращите кръвни моноцити представляват значителен системен резервоар от миелоидни прекурсорни клетки, имащи способността да се диференцират в тъканни макрофаги, дендритни клетки и остеокласти. Процесът на диференциация е съпроводен от редица фенотипни изменения, като например намаление на повърхностната моноцитна експресия на CD14 (*Jakubzick et al., 2017*). В нашите опитни постановки открихме, че в културите на ПКМК, култивирани със среди от АТ-МСК, процентът на CD14 експресиращите моноцити, както и плътността на експресия са сигнификантно по-високи спрямо ПКМК, култивирани с контролни среди при пациентите с РА. Възможно обяснение за по-високия процент моноцити, експресиращи маркера CD14, е матурационен стоп в процеса на диференциация, настъпващ под действие на разтворимите фактори, налични в средите от МСК. Ако приложим широкоприетия принцип, че толерогенните и имуногенните АПК са съответно две функционални състояния, зависещи от степента на зрялост и диференциация, то тогава по промяната на фенотипните им маркери нашите "бивши" кръвни моноцити недвусмислено наподобяват по-малко зрели такива. Това твърдение добре кореспондира и е в съответствие с натрупаните данни в литературата, подкрепящи способността на МСК да индуцират толерогенни миелоидни клетки *(Ivanova-Todorova et al., 2009; Vacca et al., 2015*). Ролята на толерогенните миелоидни клетки по отношение на терапевтичния ефект при РА, можем да търсим в осъществяваната от тях продукция на имунорегулаторни цитокини – например IL-10, чрез който могат да променят и да насочат Т-клетъчната диференциация в посока Т-лимфоцити с имунорегулаторен фенотип, като Tregs и Tr1 (*Adorini, 2004*). При ПКМК единствен източник на sVEGF-A са миелоидните клетки. Установените и в нашите опитни постановки сигнификантно по-високи нива на sVEGF-A под влияние на фактори, секретирани от АТ-МСК, биха могли да се тълкуват в подкрепа на индукцията на толерогенни миелоидни клетки. Описани са няколко механизъма: sVEGF-A може да потиска транскрипцията на NFkβ, което води до потискане на матурацията и намаляване способността за антигенно представяне (*Voron et al.,*

2015); sVEGF-A води до продукция на IDO, разтворим фактор с доказано имуносупресивно действие (*Harmey and Bouchier-Hayes, 2002*). Обобщено, разтворимите фактори в средите от АТ-МСК стимулират продукцията на sVEGF-A, а автокринното и паракринното му действие върху моноцитите в комбинация с IL-6 и PGE2 (*Maggini et al., 2010*) формира един от механизмите, обясняващи наблюдаваните промени във фенотипните маркери.

6.11. Влияние на средата от АТ-МСК върху цитокиновата секреция от имунокомпетентни клетки, изолирани от пациенти с ревматоиден артрит

Паралелно с промените в процентното съдържание на изследваните Т-хелперни субпопулации и моноцитни клетки под действие на кондиционираните среди от АТ-МСК, ние изследвахме и разликата в концентрацията на имуносупресивните TGF-β, IL-10 и следните проинфламаторни цитокини – TNF-α, IL-6, IL-17A, IL-21 и IL-23.

В концептуален план това беше направено, за да свържем фенотипните промени, базирани на флоуцитометричното изследване, с функционалните, свързани с промяна в цитокиновата секреция. Корелационните зависимости между фенотипните промени и тези в цитокиновата секреция изследвахме посредством йерархичен клъстерен анализ с мярка за сходство с корелациония коефицент на Spearman. За изследване на корелационите зависимости между промените в цитокиновите нива беше приложен факторен анализ. Силата на корелационната зависимост между изследваните променливи беше приложена съобразно критериите, формулрани от Bradford Hill (Bradforf Hill Criteria) за изследване на причино-следствената връзка между дадени параметри (*Fedak et al., 2015*).

6.11.1. Въздействие на разтворимите медиатори, секретирани от АТ-МСК, върху секрецията на TGF-β

TGF-β може да бъде определен като ключов цитокин с двойнствено влияние върху равновесието между Th17/Tregs. Наличието на сигнификантна разлика в нивата на TGF-β в клетъчните култури на ПКМК, култивирани с кондиционирани среди от АТ-МСК спрямо контролните среди, е важна отправна

точка при интерпретацията на изместването на Th17/Tregs в посока потенциране на Tregs и намаляване процента на Teff. Демонстрирано беше сигнификантно увеличение в нивата на TGF-β, провокирано от паракринното действие на средите от АТ-МСК. Големината на ефекта на описаната промяна беше по-голяма от типичната**.** Повишението, настъпващо в нивата на TGF-β, показа силна корелация с повишението на sVEGF-A и PGE2 и отрицателна с повишението на TNF-α и IL-17 според факторния анализ и теста на Spearman (фиг. 29). Освен това, проведеният клъстерен анализ на изследваните цитокини и флоуциметрично определените променливи демонстрира, че увеличението в нивата на TGF-β корелира положително в най-голяма степен с понижението на процента на Teff и увеличението на FoxP3 положителните Tregs, поради което те бяха обединени в един клъстер. Ако приложим първия принцип от критериите на Bradford Hill, то въз основа на най-силната корелационна зависимост можем да заключим, че промяната в увеличението на нивата на TGF-β е причинно-следствена и е най-тясно свързана с намаляване на броя на Teff и увеличаване на Tregs (*Schunemann et al., 2010*). Вземайки предвид силното анти-пролиферативно действие на TGF-β, осъществяващо се посредством блокиране на циклин-зависимите кинази C-myc, cyclin D2, CDK2 и cyclin E (*Hannon and Beach, 1994)*, то нашите резултатите са в съответствие с добре описания механизъм на аферентно действие на TGF-β върху Teff. Разгадаването на причинно-следствената връзка между промените в TGF-β и Tregs е далеч по-сложно, защото Tregs са едни от основните източници на този растежен фактор, но също така TGF-β е необходим за генериране на iTregs, тоест TGF-β е един от основните разтворими медиатори в процеса на инфекциозен толеранс. Освен това TGF-β медиираната фаза на свиване на активираните ефектори влияе и върху наличността на IL-2. В този смисъл липсата на изследване на нивата на IL-2 е едно от ограниченията на настоящия дисертационен труд. TGF-β1 и IL-2 са двата цитокина, необходими за генерирането на iTregs, които действат чрез взаимна координация. TGF-β може да индуцира транскрипцията на FoxP3, посредством взаимодействие с транскрипционните фактори STAT3 и NFAT (*Josefowicz and Rudensky, 2009*), които се свързват към CNS1 енхансър и стимулират FoxP3 индукцията (*Tone et al., 2008*). TGF-β може да ограничи привличането на ДНК метилтрансфераза I във FoxP3 локуса – ензим, който потиска индукцията на FoxP3 при ТКР стимулация (*Josefowicz et al., 2009*). Също така iTregs са силно

зависими от TGF-β за разлика от nTregs и намаляват експресията си на FoxP3 при отсъствието му и обратно, могат да възстановят супресивната си активност при рестимулация в негово присъствие (*Floess et al., 2007*). Освен участието на TGFβ в образуването и поддържането на iTregs, този цитокин заема важно мястото в регулацията и контрола между iTregs и Th17 клетките. Основен момент, който определя насоката на Т-клетката по посока iTreg или Th17, е съотношението TGFβ/IL-6 (*Bettelli et al., 2006*). В отсъствие на IL-6, TGF-β едновременно индуцира синтеза както на FoxP3, така и на RORγt (основния фактор, определящ Th17 субпопулация), като FoxP3 директно взаимодейства с RORγt и потиска процеса на конверсия на наивните Т-клетки в Th17. В присъствието на IL-6 този механизъм не се осъществява и RORγt реализира трансформацията по посока Th17 (*Xu et al., 2007*). Блокирането на IL-6 сигналния път посредством активиране на SOCS3 под действието на разтворимите фактори, секретирани от АТ-МСК, може да обясни наблюдаваното изместване по посока Tregs. От казаното до тук интерес представлява влиянието на секретирания TGF-β, образуван под действие на средите от АТ-МСК, върху Teff лимфоцити. Ясни данни в тази посока демонстрират Ayoub et al., които показват, че блокирането на TGF-β посредством моноклонално антитяло прекъсва способността на МСК от човешки костен мозък да инхибират пролиферацията на човешки $CD4^+$ и $CD8^+$ лимфоцити (*Ayoub and Yang, 1996*). Тоест, нашите данни са в съгласие с описаните в литературата (*Di Nicola et al., 2002*), което ни позволява да спекулираме, че АТ-МСК ефектът върху Teff при клетки от пациенти с РА е индиректен и в голяма степен TGF-β медииран. Обобщавайки получените резултати, може да заключим, че в нашата експериментална постановка ясно се откроява имуносупресивният ефект на TGF-β, като секрецията му може да бъде индиректен паракринен механизъм от страна на АТ-МСК, свързан с увеличаване на имуносупресивния потенциал на клетъчните популации „първоизточници" на TGF-β. Такива могат да бъдат Tregs, $TGF\text{-}\beta^+Th3$, както и толерогенни моноцитни клетки.

6.11.2. Ефекти на АТ-МСК върху продукцията на IL-10

По отношение на IL-10 при всички 17 опитни постановки ние не наблюдвахме сигнификантна разлика в нивата на този цитокин. Когато от анализа

изключихме опитните постановки с клетки от пациенти, които бяха определени като болни с неадекватен терапевтичен отговор, открихме сигнификантно увеличение в концентрацията на IL-10. Важно ограничение при обсъждането на подобен тип резултати е относително малкият брой експериментални постановки. При ниво на значимост α = 5%, измерената от нас стандартна разлика в нивата на IL-10 е с ниска статистическа сила при проверка на хипотезите (β = 60%). Това означава, че полученият резултат, въпреки че няма сигнификантна разлика, не може да бъде приет като правилен, с необходимото ниво на доверителна сигурност (β < 20%). Единственият механизъм за преодоляване на това ограничение на изследването е увеличаване броя на експерименталните постановки.

6.11.3. Влияние на секреторни медиатори, секретирани от АТ-МСК, върху нивата на TNF-α, IL-6, IL-17A, IL-21

За да изследваме ефекта на разтворимите фактори, продуцирани от АТ-МСК върху Т-хелперния компартмент и в частност Th17 хелперните лимфоцити, наблюдаваните фенотипни промени в клетъчния пул и повишението в нивата на TGF-β бяха анализирани във връзка с промените в основните проинфламаторни цитокини. При подбора на цитокините, които да изследваме, се спряхме на проинфламаторни цитокини с ключово значение в етиопатогенезата на РА, като TNF-α, IL-6, IL-17A, IL-21 и IL-23. Характерно за всички тези цитокини е завишеното им серумно ниво при пациенти с РА в сравнение със здравите контроли (*Noack and Miossec, 2017*). IL-17A, IL-21, TNF-α и IL-6 са основните цитокини, продуцирани от Th17 хелперните лимфоцити (*Brockmann et al., 2017*). IL-6 в кобинация с TGF-β се смята за ключов цитокин, необходим за насочване на диференциацията на наивните Т-хелпери в посока Th17 *(Zhou et al. 2013)*, а IL-23 е важен за стабилизиране на Th17 *(Jain et al., 2016)*. Наред с това доказателство, демонстриращо важността на TNF-α, IL-6 и IL-17 по отношение на болестния процес при РА, е терапевтичната ефикасност и способността за индуциране на ремисия при приложение на новонавлезлите биологични средства, блокиращи поединично TNF-α, IL-6 и IL-17A, както и тези блокиращи селективно и неселективно JAK/STAT системата.

Блокирането на други цитокинови пътища не води до същия терапевтичен ефект, поради което TNF-α, IL-6 и IL-17 са определени от редица автори като „чувствителни точки" („vulnerable nodes") по отношение повлияването на болестната активност при РА *(Schett et al., 2013)*. Въз основа на тези факти подборът на основния проинфламаторен панел цитокини беше ориентиран към изследване на промените в TNF-α, IL-6, IL-17A, IL-21 и IL-23.

Нашите резултатите показаха сигнификантно понижение в нивата на TNF-α, IL-17 и IL-21 в културите на ПКМК под действие на разтворимите фактори, налични в кондиционираните среди от АТ-МСК. По отношение на големината на наблюдавания ефект, намалението в нивата на TNF-α и IL-17 беше определено като много по-голямо от типичното, а понижението на IL-21 беше по-голямо от типичното. От проведения тест за корелационни зависимости по метода на Spearman беше открита силна положителна корелация на TNF-α с IL-17 и с IL-21 и отрицателна корелационна зависимост на TNF-α с TGF-β. От проведения факторен анализ, еквидистантните линии на IL-17 и IL-21 бяха с приблизително еднаква дължина и ориентация върху корелациония плот, което е визуализиращ метод, представящ силната положителна корелация между тях.

IL-6 беше открит в средите на АТ-МСК в относително високи нива, поради което влиянието на разтворимите фактори от АТ-МСК върху продукцията на IL-6 в нашите опитни постановки не би могло да се оцени директно посредством имуноензимен метод. Получените от нас резултати за понижаване на TNF-α, IL-17 и IL-21 под действие на АТ-МСК съвпадат с наблюденията на други изследователи (*Zhou et al., 2011; Liu et al., 2014; Baharlou et al., 2017*). Основните източници на IL-17 и IL-21 в нашите опитни постановки могат да бъдат предимно диференцираните Th17 лимфоцити, докато TNF-α може да бъде секретиран от широк кръг имунни клетки: Th1 и Th17 от лимфоцитния компартмент, както и от миелоидни клетки. Понижението на Th17-асоциираните IL-17 и IL-21 заедно с намаляването на процента Th17 под действието на АТ-МСК е доказателство в подкрепа на тезата, че АТ-МСК водят и до функционално потискане на Th17. От гледна точка на евентуално терапевтично внедряване на подходи, базирани на МСК, потискането на функционалната ак-

тивност на Th17 и конкретно на секретираните от тях IL-17 и IL-21 е от съществено значение. IL-17 е основен стимулатор на пролиферацията на синовиални фибробластни клетки и усилва неутрофилната инфилтрация в синовиума (*Van Hamburg et al., 2010*). IL-17 също повлиява и костната резорбция чрез увеличаване на експресията на RANKL на повърхността на остеокастите (*Kotake et al., 1999*). Нивата му корелират със ставното засягане и болестната активност (*Li et al., 2005*). В-лимфоцитите имат висока степен на експресия на рецептора за IL-17 и комбинацията на IL-17 с IL-21 има силно активиращо действие върху тях. Според редица автори това е механизъм, участващ в пречупването на В-клетъчния толеранс и подпомагащ продукцията на автоантитела (*Bai et al., 2008; Hsu et al., 2008*). Синергизмът между IL-17 и TNF-α води до потенциране на действието на IL-17 по отношение деструктивното му въздействие. Също така IL-21 има добре описано въздействие върху стимулирането на секрецията на TNF-α както от синовиални, така и от хелперни лимфоцити от периферна кръв. Този механизъм може да обясни откритата от нас силна корелация между нивата на TNF-α и IL-21. IL-21 също има установено остеокластогенно действие (*Kwok et al., 2012*) и може да индуцира отделянето на металопротеинази 1 и 3 (*Lebre et al., 2016*). Всичко, описано до тук, демонстрира способността на АТ-МСК да потискат едновременно секрецията на TNF-α, IL-17 и IL-21 от имунни клетки, добити от периферна кръв. Потискането на TNF-α при РА вече е общоприета терапевтична стратегия с висока ефикасност и безопасност, но въпреки това около една трета от пациентите остават рефрактерни на този вид лечение. Значението на IL-17A, IL-21 и тяхната основна роля в патогенезата на ставното увреждане при РА повдига въпроса дали МСК-базираните стратегии, посредством влиянието им върху Th17 и Th17-асоциираните IL-17 и IL-21, биха могли да бъдат допълнителна терапевтична възможност.

6.11.4. Влияние на секреторни медиатори, секретирани от АТ-МСК, върху нивата на sVEGF-A и PGE2

Нашите изследвания показаха, че под действие на средите от АТ-МСК се установява сигнификантно по-висока секреция на PGE2 в културите на ПКМК, което може да бъде обяснено с амплификацията по механизма на положител-

ната обратна връзка. Този механизъм на автокринна регулация по типа на положителна обратна връзка може да бъде потенциран допълнително и от секретирания от МСК IL-6 (Maggini et al., 2010). IL-6, води до продукция на PGE_2 и възможността на средите от МСК да блокират сигнално-трансдукционното действие на IL-6 посредством активиране на SOCS3 (Liu, 2017). Действието на PGE_2 е описано подробно в точка 6.6.2. Влияние на кондиционирани среди от АТ-МСК върху субпопулацията на $CD4^+CD25^-FoxP3^+$.

sVEGF-A може да се охарактеризира като ендотелноклетъчен митоген и наред с ключовата му роля в процесите на ангиогенеза и неоваскуларизация за него са характерни и редица имуносупресивни свойства. При ПКМК единствен източник на sVEGF-A са миелоидните клетки и в нашите опитни постановки установихме сигнификантно по-високи нива на sVEGF-A под влияние на фактори, секретирани от АТ-МСК, които биха могли да се тълкуват в подкрепа на индукцията на толерогенни миелоидни клетки. Действието на sVEGF-A и PGE_2 са описани подробно в точка 6.6.2. Влияние на кондиционирани среди от АТ-МСК върху субпопулацията на $CD4^+CD25^-FoxP3^+$. Действието на sVEGF-A е описано подробно в точка 6.6.2. Влияние на кондиционирани среди от АТ-МСК върху субпопулацията на $CD4^+CD25^-FoxP3^+$.

6.11.5. Влияние на секреторни медиатори, секретирани от АТ-МСК върху нивата на IFN-γ, IL-4, IL-23 и IDO

Измерените от нас нива на секреторен IFN-γ, IL-4, IL-23 и IDO в културите на ПКМК от всички 17 опитни постановки бяха под минималния откриваем праг на използваните търговски китове, поради което не можахме да отчетем влиянието на разтворимите фактори, съдържащи се в средите на АТ-МСК върху продукцията на IFN-γ, IL-4, IL-23 и IDO от мононуклеарните клетки, съдържащите се в културите от ПКМК посредством имуноензимен метод.

6.11.6. Влияние на секреторни медиатори, секретирани от АТ-МСК, върху нивата на CCL2

CCL2 беше открит в средите на АТ-МСК в относително високи нива, поради което влиянието на разтворимите фактори от АТ-МСК върху продукцията на CCL2 в нашите опитни постановки не би могло да се оцени директно посредством имуноензимен метод.

6.12. Мултивариантни методи за анализ

За да оценим цялостния биологичен ефект на разтворимите фактори секретирани от АТ-МСК върху цитокиновата секреция на ПКМК при РА пациенти с умерана и висока активност, приложихме и многофакторни методи за анализ на данните. Параметричният тест на Hotteling, сравняващ дали групата показатели, касаещи действието на контролната среда, и групата показатели, касаещи средата от АТ-МСК, беше сигнификантен. Използваните два метода – SVM и CART, показаха, че двата класифициращи алгоритъма могат напълно да различат средите от ПКМК, подложени на въздействието на АТ-МСК от средите на контролните ПКМК. Доколкото ни е известно, подобен подход при анализ на цитокиновите профили на култивирани ПКМК от пациенти с РА под действието на разтворими фактори от АТ-МСК не е прилаган от други авторски колективи. От проведения CART анализ открихме, че разликата в двата вида цитокинови профили при 3-дневно култивиране в най-голяма степен се дължи на промените в нивата на sVEGF-A, PGE_2 и TNF-α. От това може да заключим, че биологичният ефект при 3-дневно култивиране беше най-силно изразен по отношение на техния синтез. Това добре кореспондира на големината на ефекта от едномерните тестове за статистическа оценка (фиг. 28), въпреки че промяната в нивата на PGE_2 показа само тенденция за сигнификантност. Обяснение за това би могло да бъде по-малката статистическа сила на използвания тест на Wilcoxon при едномерното сравнение на разликите в нивата на PGE_2.

Ако трябва да обобщим, използваните многофакторни методи за разлика от едномерните методи за статистическа оценка ни позволиха да наблюдаваме взаимосвързаността на промяната в цитокиновите нива на всички изследвани цитокини при всички 17 опитни постановки под действие на средите от АТ-МСК. Установените промени са групирани и действат паралелно в една посока – увеличаване на секрецията на цитокини и фактори с имуносупресивно действие като TGF-β, sVEGF-A, PGE_2 и потискане на проинфламаторните TNF-α, IL-17 и IL-21.

6.13. Заключение

Получените от нас резултати ясно демонстрират, че под паракринното действие на разтворимите фактори, съдържащи се в кондиционирани среди от АТ-МСК, настъпват бройни и функционални промени в клетъчните популации, изолирани от периферна кръв, при пациенти със средна и висока активност на ревматоиден артрит. Основно тези промени са свързани с редукция на процента на Th17 и активираните ефекторни Т-хелперни лимфоцити и увеличение на регулаторните FoxP3^{+}Т-хелперни клетки; потискане на експресията на HLA-DR върху кръвни моноцитни клетки, а също така и матуцарионен стоп в диференциацията им; потискане на продукцията на TNF-α, IL-17 и IL-21 и увеличаване на секрецията на TGF-β, VEGF-A и PGE_2. С помощта на обобщението на базата на мултифакторните статистически методи за анализ можем да допълним, че наблюдаваните фенотипни и функционални промени в секрецията на изследваните цитокони са взаимносвързани и групирани, като сумарният ефект от това бихме могли да определим като осъществяване на имуносупресия. Клетъчните популации и цитокинови пътища, които бяха изследвани, бяха подбрани така, че да са от централно значение в имунопатогенезата на ревматоидния артрит. Получените от нас резултати недвусмислено показват, че разтворимите фактори, съдържащи се в кондиционираните среди от АТ-МСК, успешно потискат цитокинови пътиша и клетъчни субпопулации с централно значение в патогенезата на РА. По този начин получените от нас резултати трасират един от най-важните аспекти от евентуалното внедряване на МСК като терапевтично средство, а именно способността да въздействат на дисрегулирания имунен отговор при РА едновременно на множество нива.

7. ИЗВОДИ

1. Мезенхимните стволови клетки от адипозна тъкан (АТ-МСК) секретират IL-6, sVEGF-A, PGE2, IL-8, CCL2 и CCL5, но не продуцират TGF-β и IL-10.

2. При култивиране на ПКМК от пациенти с ревматоиден артрит с кондиционирани среди от АТ-МСК настъпва увеличаване процента на CD25+FoxP3+ Tregs и също така на популацията на CD4+CD25-FoxP3+ хелперните лимфоцити.

3. Култивирането на ПКМК от пациенти с ревматоиден артрит с кондиционирани среди от АТ-МСК води до намаляване процентното съдържание на Th17 хелперните лимфоцити и CD4+CD25+FoxP3- активираните ефекторни Т-хелперни лимфоцити.

4. При култивиране на ПКМК от пациенти с ревматоиден артрит с кондиционирани среди от АТ-МСК се потиска екпресията на HLA-DR върху моноцитни клетки.

5. При култивиране на ПКМК от пациенти с ревматоиден артрит с кондиционирани среди от АТ-МСК се наблюдава увеличение на процента CD14+ моноцитни клетки.

6. Под действие на разтворимите фактори, налични в средите на АТ-МСК, промените в цитокиновите нива са групирани и действат паралелно в една посока: увеличава се секрецията на TGF-β, VEGF-A, PGE2 и се понижават нивата на TNF-α, IL-17 и IL-21 в култури на ПКМК добити от пациенти с РА.

8. ПРИНОСИ

8.1. Приноси с потвърдителен характер

1. Потвърдена беше секрецията на IL-6, sVEGF-A, PGE_2, IL-8, CCL2 и CCL5 от мезенхимни стволови клетки от адипозна тъкан (АТ-МСК).

2. По отношение на секрецията на TGF-β и IL-10, резултатите ни бяха в съгласие с резултатите на екипи, които не откриват TGF-β и IL-10 в среди на АТ-МСК.

8.2. Приноси с оригинален характер

1. Установена беше способността на разтворими фактори от АТ-МСК да потискат Th17 хелперни лимфоцити в култури на ПКМК от пациенти с активен ревматоиден артрит.

2. Установена беше способността на разтворими фактори от АТ-МСК да увеличават процента $CD25^{+}FoxP3^{+}$ Tregs и $CD4^{+}CD25^{-}FoxP3^{+}$ хелперни лимфоцити в култури на ПКМК от пациенти с активен ревматоиден артрит

3. Установена беше способността на разтворими фактори от АТ-МСК да предизвикват намаляване на повърхностната експресия на HLA-DR върху моноцитни клетки в култури на ПКМК от пациенти с активен ревматоиден артрит.

4. Установена беше способността на разтворими фактори от АТ-МСК да увеличават секрецията на TGF-β, sVEGF-A, PGE_2 и да предизвикват понижаване в нивата на TNF-α, IL-17 и IL-21 култури на ПКМК от пациенти с ревматоиден артрит със средна и висока болестна активност.

5. За пръв път бяха приложени мултивариантни методи за статистически анализ с висока доказателствена стойност на получените резултати – Метод на опорните вектори (SVM), Дървета за класификация и регресия (CART Decision Trees) и PLS-DA (Partial Least Squares Discriminant Analysis), Факторен и клъстерен анализ при анализиране на действието на среди от АТ-МСК върху клетки от болни с ревматоиден артрит.

9. ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ПРОЯВИ

- **Публикации във връзка с дисертационния труд:**

1. **Георги Василев**, Мариана Иванова, Румен Стоилов, Доброслав Кюркчиев. Мезенхимни стволови клетки в патогенезата на ревматоидния артрит. Ревматология, (Bulgaria), 2017, 25(2-3):8-19.

2. **Георги Василев**, Екатерина Красимирова, Мариана Иванова, Екатерина Иванова-Тодорова, Калина Тумангелова-Юзеир, Рада Ганчева, Румен Стоилов и Доброслав Кюркчиев. Ефекти на човешки мезенхимни стволови клетки върху моноцити от пациенти с ревматоиден артрит и прогресивна системна склероза. Ревматология, (Bulgaria), 2019, 27 (3): 44-54, https://doi:10.35465/27.3.2019.pp44-54.

3. **Georgi Vasilev**, Mariana Ivanova, Ekaterina Ivanova-Todorova, Kalina Tumangelova-Yuzeir, Ekaterina Krasimirova, Rumen Stoilov, and Dobroslav Kyurkchiev. Secretory Factors Produced By Adipose Mesenchymal Stem Cells Downregulate Th17 And Increase Treg Cells In Peripheral Blood Mononuclear Cells From Rheumatoid Arthritis Patients. Rheumatology Int, 2019, 39 (5): 819-826. https://doi:10.1007/s00296-019-04296-7 **(IF2019 – 2.2 Q2)**

- **Участия в научни форуми във връзка с дисертационния труд:**

1. **Георги Василев**, Люба Митева, Мариана Иванова, Румен Стоилов, Ирена Манолова. Системен цитокинов профил при пациенти с ревматоиден артрит. XII Национална конференция по медицинска биология, Цигов Чарк 08 – 10 септември 2017.

2. **Georgi Vasilev**, Mariana Ivanova, Ekaterina Ivanova- Todorova, Rada Gancheva, Ekaterina Krasimirova, Dobroslav Kyurkchiev. Mesenchymal Stem Cells From Adipose Tissue Secrete Factors Which Decrease Th17 And Increase Treg Percentage In Pbmcs Derived From Rheumatoid Arthritis Patients. 11th International Congress on Autoimmunity, Lisbon, Portugal, 16-20 May 2018.

3. **Георги Василев**, Миариана Иванова, Екатерина Иванова-Тодорова, Калина Тумангелова-Юзеир, Екатерина Красимирова, Румен Стоилов, Доброслав Кюркчиев. Влияние на мезенхимни стволови клетки от мастна тъкан върху Th17 И Trerg, добити от пациенти с ревматоиден артрит. Национален конгрес по ревматология, 31май-3 юни 2018, Правец.

4. **Georgi Vasilev**, Mariana Ivanova, Ekaterina Ivanova-Todorova, Kalina Tumangelova-Yuzeir, E. Krassimirova, R. Stoilov, D. Kyurkchiev. Immunosuppressive Effect of Mesenchymal Stem Cells On Monocytes Derived from Patients with Rheumatoid Arthritis. Annual European Congress of Rheumatology, EULAR 2020, Amsterdam, Netherlands, 12-16 June 2018.

5. **Georgi Vasilev**, Mariana Ivanova Goycheva, Ekaterina Ivanova-Todorova, Kalina Tumangelova-Yuzeir, Ekaterina Kurteva, Rumen Stoilov, Dobroslav Kyurkchiev. Conditioned Medium from Adipose Mesenchymal Stem Cell Exert Immunosuppressive Effect on Th17/Treg Axis in Rheumatoid Arthritis in Vitro. Annual European Congress of Rheumatology, EULAR 2019, Madrid, Spain 12-15 June 2019.

- **Участия в научни проекти по темата на дисертационния труд:**

1. ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКИ ПРОЕКТ към Медицински факултет, МУ – София, Конкурс „Млад изследовател – 2018“ 7679/22.11.2017 г. Отчетен проект, свързан с темата на дисертационния труд, от Конкурс „Млад изследовател – 2018“ на МУ – София, ДОГОВОР № Д-128/2018 г., ПРОЕКТ с вх. № 7679/21.11.18 г. на тема: “Имуномодулаторен ефект на секретирани от човешки мезенхимни стволови клетки разтворими фактори, осъществяван върху Т-хелперни лимфоцити, добити от периферна венозна кръв от пациенти с ревматоиден артрит “.

10. БИБЛИОГРАФИЯ

1. Abo- El Wafa, Hasnaa, Mohammad Mohammad, Shereen. Aziz, Ahmed Mahmoud, Mustafa Ahmed, and Abeer Ali. 2017. "Immunogenetics Of Some Connective Tissue Disorders". *Sohag Medical Journal*, 21 (3): 287-293. doi:10.21608/smj.2017.40734.
2. Adorini, Luciano. 2004. "Tolerogenic Dendritic Cells Induced By Vitamin D Receptor Ligands Enhance Regulatory T Cells Inhibiting Allograft Rejection And Autoimmune Diseases". *Kidney International* 65 (5): 1538. doi:10.1111/j.1523-1755.2004.05401.x.
3. Aggarwal, Sudeepta, and Mark F. Pittenger. 2005. "Human Mesenchymal Stem Cells Modulate Allogeneic Immune Cell Responses". *Blood* 105 (4): 1815-1822. doi:10.1182/blood-2004-04-1559.
4. Aitcheson, Carol T., Carol Peebles, Fenneke Joslin, and Eng M. Tan. 1980. "Characteristics Of Antinuclear Antibodies In Rheumatoid. Arthritis". *Arthritis & Rheumatism* 23 (5): 528-538. doi:10.1002/art.1780230503.
5. Aletaha, Daniel, Tuhina Neogi, Alan J. Silman, Julia Funovits, David T. Felson, Clifton O. Bingham, and Neal S. Birnbaum et al. 2010. "2010 Rheumatoid Arthritis Classification Criteria: An American College Of Rheumatology/European League Against Rheumatism Collaborative Initiative". *Arthritis & Rheumatism* 62 (9): 2569-2581. doi:10.1002/art.27584.
6. Alves, Simone. 2007. "Circulating Stem Cells". *Nature Reports Stem Cells*. doi:10.1038/stemcells.2007.131.
7. Annes, J. P. 2003. "Making Sense Of Latent Tgfbeta Activation". *Journal Of Cell Science* 116 (2): 217-224. doi:10.1242/jcs.00229.
8. Annunziato, Francesco, Lorenzo Cosmi, Veronica Santarlasci, Laura Maggi, Francesco Liotta, Benedetta Mazzinghi, and Eliana Parente et al. 2007. "Phenotypic And Functional Features Of Human Th17 Cells". *Journal Of Experimental Medicine* 204 (8): 1849-1861. doi:10.1084/jem.20070663.
9. Arleevskaya, Marina I., Olga A. Kravtsova, Julie Lemerle, Yves Renaudineau, and Anatoly P. Tsibulkin. 2016. "How Rheumatoid Arthritis Can Result From Provocation Of The Immune System By Microorganisms And Viruses". *Frontiers In Microbiology* 7. doi:10.3389/fmicb.2016.01296.
10. Ayoub, Ihsan A., and T. J. Yang. 1996. "Growth Regulatory Effects Of Transforming Growth Factor-Beta 1 And Interleukin-2 On IL-2 Dependent CD4+T Lymphoblastoid Cell Line". *Immunological Investigations* 25 (1-2): 129-151. doi:10.3109/08820139609059297.
11. Azizieh F, Dingle K, Raghupathy R, Johnson K, VanderPlas J, Ansari A. 2018. Multivariate analysis of cytokine profiles in pregnancy complications. American Journal of Reproductive Immunology. 79:e12818.
12. Baecher-Allan, C. 2004. "Human CD4+CD25+ Regulatory T Cells". *Seminars In Immunology* 16 (2): 89-98. doi:10.1016/j.smim.2003.12.005.
13. Baharlou, Rasoul, Abbas Ahmadi-Vasmehjani, Fatemeh Faraji, Mohammad Reza Atashzar, Mahshid Khoubyari, Salma Ahi, Saiedeh Erfanian, and Shadi-Sadat Navabi. 2017. "Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells In Rheumatoid Arthritis: Regulatory Effects On Peripheral Blood Mononuclear Cells Activation". *International Immunopharmacology* 47: 59-69. doi:10.1016/j.intimp.2017.03.016.
14. Bai, Lianhua, Donald P Lennon, Arnold I Caplan, Anne DeChant, Jordan Hecker, Janet Kranso, Anita Zaremba, and Robert H Miller. 2012. "Hepatocyte Growth Factor Mediates Mesenchymal Stem Cell–Induced Recovery In Multiple Sclerosis Models". *Nature Neuroscience* 15 (6): 862-870. doi:10.1038/nn.3109.
15. Bai, Ying, Ruolan Liu, DeRen Huang, Antonio La Cava, Yi-yuan Tang, Yoichiro Iwakura, Denise I. Campagnolo, Timothy L. Vollmer, Richard M. Ransohoff, and Fu-Dong Shi. 2008. "CCL2 Recruitment Of IL-6-Producing Cd11b+Monocytes To The Draining Lymph Nodes During The Initiation Of Th17-Dependent B Cell-Mediated Autoimmunity". *European Journal Of Immunology* 38 (7): 1877-1888. doi:10.1002/eji.200737973.
16. Baum, Rebecca, and Ellen M. Gravallese. 2013. "Impact Of Inflammation On The Osteoblast In Rheumatic Diseases". *Current Osteoporosis Reports* 12 (1): 9-16. doi:10.1007/s11914-013-0183-y.

17. Bax, Marieke, Tom W. J. Huizinga, and René E. M. Toes. 2014. "The Pathogenic Potential Of Autoreactive Antibodies In Rheumatoid Arthritis". *Seminars In Immunopathology* 36 (3): 313-325. doi:10.1007/s00281-014-0429-5.
18. Belladonna, Maria L., Claudia Volpi, Roberta Bianchi, Carmine Vacca, Ciriana Orabona, Maria T. Pallotta, and Louis Boon et al. 2008. "Cutting Edge: Autocrine TGF-B Sustains Default Tolerogenesis By IDO-Competent Dendritic Cells". *The Journal Of Immunology* 181 (8): 5194-5198. doi:10.4049/jimmunol.181.8.5194.
19. Bernardo, Maria Ester, and Willem E. Fibbe. 2013. "Mesenchymal Stromal Cells: Sensors And Switchers Of Inflammation". *Cell Stem Cell* 13 (4): 392-402. doi:10.1016/j.stem.2013.09.006.
20. Berthelot, Jean-Marie, Benoit Le Goff, and Yves Maugars. 2019. "Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells In Rheumatoid Arthritis, Spondyloarthritis, And Ankylosing Spondylitis: Problems Rather Than Solutions?". *Arthritis Research & Therapy* 21 (1). doi:10.1186/s13075-019-2014-8.
21. Bianchini, Rodolfo, Onelia Bistoni, Alessia Alunno, Maria Grazia Petrillo, Simona Ronchetti, Paolo Sportoletti, Elena Bartoloni Bocci, Giuseppe Nocentini, Roberto Gerli, and Carlo Riccardi. 2011. "CD4+Cd25lowgitr+ Cells: A Novel Human CD4+ T-Cell Population With Regulatory Activity". *European Journal Of Immunology* 41 (8): 2269-2278. doi:10.1002/eji.201040943.
22. Blachère, Nathalie E., Salina Parveen, John Fak, Mayu O. Frank, and Dana E. Orange. 2015. "Inflammatory But Not Apoptotic Death Of Granulocytes Citrullinates Fibrinogen". *Arthritis Research & Therapy* 17 (1). doi:10.1186/s13075-015-0890-0.
23. Blazquez, Rebeca, Francisco Miguel Sanchez-Margallo, Olga de la Rosa, Wilfried Dalemans, VerÃ³nica Ãlvarez, Raquel Tarazona, and Javier G. Casado. 2014. "Immunomodulatory Potential Of Human Adipose Mesenchymal Stem Cells Derived Exosomes On In Vitro Stimulated T Cells". *Frontiers In Immunology* 5. doi:10.3389/fimmu.2014.00556.
24. Bocelli-Tyndall, Chiara, Andrea Barbero, Christian Candrian, Rhodri Ceredig, Alan Tyndall, and Ivan Martin. 2006. "Human Articular Chondrocytes Suppress In Vitro Proliferation Of Anti-CD3 Activated Peripheral Blood Mononuclear Cells". *Journal Of Cellular Physiology* 209 (3): 732-734. doi:10.1002/jcp.20789.
25. Bodkhe, Rahul, Baskar Balakrishnan, and Veena Taneja. 2019. "The Role Of Microbiome In Rheumatoid Arthritis Treatment". *Therapeutic Advances In Musculoskeletal Disease* 11: 1759720X1984463. doi:10.1177/1759720x19844632.
26. Böhm, Sybille, Inessa Schwab, Anja Lux, and Falk Nimmerjahn. 2012. "The Role Of Sialic Acid As A Modulator Of The Anti-Inflammatory Activity Of Igg". *Seminars In Immunopathology* 34 (3): 443-453. doi:10.1007/s00281-012-0308-x.
27. Boniface, Katia, Kristian S. Bak-Jensen, Ying Li, Wendy M. Blumenschein, Mandy J. McGeachy, Terrill K. McClanahan, Brent S. McKenzie, Robert A. Kastelein, Daniel J. Cua, and René de Waal Malefyt. 2009. "Prostaglandin E2 Regulates Th17 Cell Differentiation And Function Through Cyclic AMP And EP2/EP4 Receptor Signaling". *The Journal Of Experimental Medicine* 206 (3): 535-548. doi:10.1084/jem.20082293.
28. Boomsma, Robert A., and David L. Geenen. 2012. "Mesenchymal Stem Cells Secrete Multiple Cytokines That Promote Angiogenesis And Have Contrasting Effects On Chemotaxis And Apoptosis". *Plos ONE* 7 (4): e35685. doi:10.1371/journal.pone.0035685.
29. Bopp, Tobias, Nina Dehzad, Sebastian Reuter, Matthias Klein, Nina Ullrich, Michael Stassen, Hansjörg Schild, Roland Buhl, Edgar Schmitt, and Christian Taube. 2009. "Inhibition Of Camp Degradation Improves Regulatory T Cell-Mediated Suppression". *The Journal Of Immunology* 182 (7): 4017-4024. doi:10.4049/jimmunol.0803310.
30. Bouffi, Carine, Claire Bony, Gabriel Courties, Christian Jorgensen, and Danièle Noël. 2010. "IL-6-Dependent PGE2 Secretion By Mesenchymal Stem Cells Inhibits Local Inflammation In Experimental Arthritis". *Plos ONE* 5 (12): e14247. doi:10.1371/journal.pone.0014247.
31. Brabletz, T, I Pfeuffer, E Schorr, F Siebelt, T Wirth, and E Serfling. 1993. "Transforming Growth Factor Beta And Cyclosporin A Inhibit The Inducible Activity Of The Interleukin-2 Gene In T Cells Through A

Noncanonical Octamer-Binding Site.". *Molecular And Cellular Biology* 13 (2): 1155-1162. doi:10.1128/mcb.13.2.1155.

32. Brennan, Fionula M., and Iain B. McInnes. 2008. "Evidence That Cytokines Play A Role In Rheumatoid Arthritis". *Journal Of Clinical Investigation* 118 (11): 3537-3545. doi:10.1172/jci36389.
33. Brockmann, Leonie, Anastasios Giannou, Nicola Gagliani, and Samuel Huber. 2017. "Regulation Of TH17 Cells And Associated Cytokines In Wound Healing, Tissue Regeneration, And Carcinogenesis". *International Journal Of Molecular Sciences* 18 (5): 1033. doi:10.3390/ijms18051033.
34. Brunel, Melanie, Florence Herr, and Antoine Durrbach. 2016. "Immunosuppressive Properties Of Mesenchymal Stem Cells". *Current Transplantation Reports* 3 (4): 348-357. doi:10.1007/s40472-016-0120-y.
35. Burska, Agata N., Laura Hunt, Marjorie Boissinot, Rocky Strollo, Brent J. Ryan, Ed Vital, Ahuva Nissim, Paul G. Winyard, Paul Emery, and Frederique Ponchel. 2014. "Autoantibodies To Posttranslational Modifications In Rheumatoid Arthritis". *Mediators Of Inflammation* 2014: 1-19. doi:10.1155/2014/492873.
36. Caplan, Arnold I. 2017. "Mesenchymal Stem Cells: Time To Change The Name!". *STEM CELLS Translational Medicine* 6 (6): 1445-1451. doi:10.1002/sctm.17-0051.
37. Carlton, Victoria E.H., Xiaolan Hu, Anand P. Chokkalingam, Steven J. Schrodi, Rhonda Brandon, Heather C. Alexander, and Monica Chang et al. 2005. "PTPN22 Genetic Variation: Evidence For Multiple Variants Associated With Rheumatoid Arthritis". *The American Journal Of Human Genetics* 77 (4): 567-581. doi:10.1086/468189.
38. Carosella, Edgardo D., Kiave-Yune HoWangYin, Benoît Favier, and Joel LeMaoult. 2008. "HLA-G–Dependent Suppressor Cells: Diverse By Nature, Function, And Significance". *Human Immunology* 69 (11): 700-707. doi:10.1016/j.humimm.2008.08.280.
39. Castro-Manrreza, Marta E., and Juan J. Montesinos. 2015. "Immunoregulation By Mesenchymal Stem Cells: Biological Aspects And Clinical Applications". *Journal Of Immunology Research* 2015: 1-20. doi:10.1155/2015/394917.
40. Castro-Manrreza, Marta E., Hector Mayani, Alberto Monroy-García, Eugenia Flores-Figueroa, Karina Chávez-Rueda, Victoria Legorreta-Haquet, Edelmiro Santiago-Osorio, and Juan José Montesinos. 2014. "Human Mesenchymal Stromal Cells From Adult And Neonatal Sources: A Comparative In Vitro Analysis Of Their Immunosuppressive Properties Against T Cells". *Stem Cells And Development* 23 (11): 1217-1232. doi:10.1089/scd.2013.0363.
41. Catrina, Anca I., Kevin D. Deane, and Jose U. Scher. 2014. "Gene, Environment, Microbiome And Mucosal Immune Tolerance In Rheumatoid Arthritis". *Rheumatology*, keu469. doi:10.1093/rheumatology/keu469.
42. Chabannes, Dominique, Marcelo Hill, Emmanuel Merieau, Julien Rossignol, Régis Brion, Jean Paul Soulillou, Ignacio Anegon, and Maria Cristina Cuturi. 2007. "A Role For Heme Oxygenase-1 In The Immunosuppressive Effect Of Adult Rat And Human Mesenchymal Stem Cells". *Blood* 110 (10): 3691-3694. doi:10.1182/blood-2007-02-075481.
43. Chabaud, Martine, Guillaume Page, and Pierre Miossec. 2001. "Enhancing Effect Of IL-1, IL-17, And TNF-A On Macrophage Inflammatory Protein-3A Production In Rheumatoid Arthritis: Regulation By Soluble Receptors And Th2 Cytokines". *The Journal Of Immunology* 167 (10): 6015-6020. doi:10.4049/jimmunol.167.10.6015.
44. Chan, Marion Man-Ying, and Andrea Rossi Moore. 2010. "Resolution Of Inflammation In Murine Autoimmune Arthritis Is Disrupted By Cyclooxygenase-2 Inhibition And Restored By Prostaglandin E2-Mediated Lipoxin A4 Production". *The Journal Of Immunology* 184 (11): 6418-6426. doi:10.4049/jimmunol.0903816.
45. Chang, Xiaotian, and Jinxiang Han. 2006. "Expression Of Peptidylarginine Deiminase Type 4 (PAD4) In Various Tumors". *Molecular Carcinogenesis* 45 (3): 183-196. doi:10.1002/mc.20169.
46. Chang, Ying, Patricia de Nadai, Imane Azzaoui, Olivier Morales, Nadira Delhem, Han Vorng, and Stanislas Tomavo et al. 2010. "The Chemokine CCL18 Generates Adaptive Regulatory T Cells From Memory CD4+

T Cells Of Healthy But Not Allergic Subjects". *The FASEB Journal* 24 (12): 5063-5072. doi:10.1096/fj.10.162560.

47. Chemin, Karine, Lars Klareskog, and Vivianne Malmström. 2016. "Is Rheumatoid Arthritis An Autoimmune Disease?". *Current Opinion In Rheumatology* 28 (2): 181-188. doi:10.1097/bor.0000000000000253.
48. Chen, Mei-Ling, Bo-Shiun Yan, Yoshio Bando, Vijay K. Kuchroo, and Howard L. Weiner. 2008. "Latency-Associated Peptide Identifies A Novel CD4+CD25+ Regulatory T Cell Subset With Tgfβ-Mediated Function And Enhanced Suppression Of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis". *The Journal Of Immunology* 180 (11): 7327-7337. doi:10.4049/jimmunol.180.11.7327.
49. Chen, WanJun, Wenwen Jin, Neil Hardegen, Ke-jian Lei, Li Li, Nancy Marinos, George McGrady, and Sharon M. Wahl. 2003. "Conversion Of Peripheral CD4+CD25− Naive T Cells To CD4+CD25+ Regulatory T Cells By TGF-B Induction Of Transcription Factor FoxP3". *Journal Of Experimental Medicine* 198 (12): 1875-1886. doi:10.1084/jem.20030152.
50. Ciccacci, C., P. Conigliaro, C. Perricone, S. Rufini, P. Triggianese, C. Politi, G. Novelli, R. Perricone, and P. Borgiani. 2016. "Polymorphisms In STAT-4, IL-10, PSORS1C1, PTPN2 And MIR146A Genes Are Associated Differently With Prognostic Factors In Italian Patients Affected By Rheumatoid Arthritis". *Clinical & Experimental Immunology* 186 (2): 157-163. doi:10.1111/cei.12831.
51. Cohen, G, L Gossec, M Dougados, A Cantagrel, P Goupille, J. Daures, N Rincheval, and B Combe. 2007. "Radiological Damage In Patients With Rheumatoid Arthritis On Sustained Remission". *Annals Of The Rheumatic Diseases* 66 (3): 358-363. doi:10.1136/ard.2006.057497.
52. Conforti, Antonella, Marco Scarsella, Nadia Starc, Ezio Giorda, Simone Biagini, Alessandra Proia, Rita Carsetti, Franco Locatelli, and Maria Ester Bernardo. 2014. "Microvescicles Derived From Mesenchymal Stromal Cells Are Not As Effective As Their Cellular Counterpart In The Ability To Modulate Immune Responses In Vitro". *Stem Cells And Development* 23 (21): 2591-2599. doi:10.1089/scd.2014.0091.
53. Corcione, Anna, Federica Benvenuto, Elisa Ferretti, Debora Giunti, Valentina Cappiello, Francesco Cazzanti, and Marco Risso et al. 2006. "Human Mesenchymal Stem Cells Modulate B-Cell Functions". *Blood* 107 (1): 367-372. doi:10.1182/blood-2005-07-2657.
54. Corsiero, Elisa, Federico Pratesi, Edoardo Prediletto, Michele Bombardieri, and Paola Migliorini. 2016. "Netosis As Source Of Autoantigens In Rheumatoid Arthritis". *Frontiers In Immunology* 7. doi:10.3389/fimmu.2016.00485.
55. Corsiero, Elisa, Michele Bombardieri, Emanuela Carlotti, Federico Pratesi, William Robinson, Paola Migliorini, and Costantino Pitzalis. 2020. "Single Cell Cloning And Recombinant Monoclonal Antibodies Generation From RA Synovial B Cells Reveal Frequent Targeting Of Citrullinated Histones Of Nets."
56. Corthay, A. 2006. "A Three-Cell Model For Activation Of Naïve T Helper Cells". *Scandinavian Journal Of Immunology* 64 (2): 93-96. doi:10.1111/j.1365-3083.2006.01782.x.
57. Cottrez, Françoise, and Hervé Groux. 2001. "Regulation Of TGF-B Response During T Cell Activation Is Modulated By IL-10". *The Journal Of Immunology* 167 (2): 773-778. doi:10.4049/jimmunol.167.2.773.
58. Cox, SW, BM Eley, M Kiili, A Asikainen, T Tervahartiala, and T Sorsa. 2006. "Collagen Degradation By Interleukin-1Beta-Stimulated Gingival Fibroblasts Is Accompanied By Release And Activation Of Multiple Matrix Metalloproteinases And Cysteine Proteinases". *Oral Diseases* 12 (1): 34-40. doi:10.1111/j.1601-0825.2005.01153.x.
59. Curotto de Lafaille, Maria A., Andreia C. Lino, Nino Kutchukhidze, and Juan J. Lafaille. 2004. "CD25− T Cells Generate CD25+FoxP3+ Regulatory T Cells By Peripheral Expansion". *The Journal Of Immunology* 173 (12): 7259-7268. doi:10.4049/jimmunol.173.12.7259.
60. da Silva Meirelles, Lindolfo, Aparecida Maria Fontes, Dimas Tadeu Covas, and Arnold I. Caplan. 2009. "Mechanisms Involved In The Therapeutic Properties Of Mesenchymal Stem Cells". *Cytokine & Growth Factor Reviews* 20 (5-6): 419-427. doi:10.1016/j.cytogfr.2009.10.002.
61. Dalal, Deepan S., Josefina Duran, Tina Brar, Rasha Alqadi, Christopher Halladay, Alisha Lakhani, and James L. Rudolph. 2019. "Efficacy And Safety Of Biological Agents In The Older Rheumatoid Arthritis Patients

Compared To Young: A Systematic Review And Meta-Analysis". *Seminars In Arthritis And Rheumatism* 48 (5): 799-807. doi:10.1016/j.semarthrit.2018.07.009.

62. Dardalhon, Valérie, Amit Awasthi, Hyoung Kwon, George Galileos, Wenda Gao, Raymond A Sobel, and Meike Mitsdoerffer et al. 2008. "IL-4 Inhibits TGF-B-Induced FoxP3+ T Cells And, Together With TGF-B, Generates IL-9+ IL-10+ FoxP3− Effector T Cells". *Nature Immunology* 9 (12): 1347-1355. doi:10.1038/ni.1677.
63. Davis, Daniel M. 2007. "Intercellular Transfer Of Cell-Surface Proteins Is Common And Can Affect Many Stages Of An Immune Response". *Nature Reviews Immunology* 7 (3): 238-243. doi:10.1038/nri2020.
64. de Aquino, Sabrina G., Shahla Abdollahi-Roodsaz, Marije I. Koenders, Fons A. J. van de Loo, Ger J. M. Pruijn, Renoud J. Marijnissen, and Birgitte Walgreen et al. 2014. "Periodontal Pathogens Directly Promote Autoimmune Experimental Arthritis By Inducing A TLR2- And IL-1–Driven Th17 Response". *The Journal Of Immunology* 192 (9): 4103-4111. doi:10.4049/jimmunol.1301970.
65. de Brito Rocha, Sara, Danielle Cristiane Baldo, and Luis Eduardo Coelho Andrade. 2019. "Clinical And Pathophysiologic Relevance Of Autoantibodies In Rheumatoid Arthritis". *Advances In Rheumatology* 59 (1). doi:10.1186/s42358-018-0042-8.
66. de Paz, Banesa, Catuxa Prado, Mercedes Alperi-López, Francisco J. Ballina-García, Javier Rodriguez-Carrio, Patricia López, and Ana Suárez. 2012. "Effects Of Glucocorticoid Treatment On CD25−FOXP3+ Population And Cytokine-Producing Cells In Rheumatoid Arthritis". *Rheumatology* 51 (7): 1198-1207. doi:10.1093/rheumatology/kes039.
67. De Bari, Cosimo, and Francesco Dell'Accio. 2007. "Mesenchymal Stem Cells In Rheumatology: A Regenerative Approach To Joint Repair". *Clinical Science* 113 (8): 339-348. doi:10.1042/cs20070126.
68. Del Fattore, Andrea, Rosa Luciano, Luisa Pascucci, Bianca Maria Goffredo, Ezio Giorda, Margherita Scapaticci, Alessandra Fierabracci, and Maurizio Muraca. 2015. "Immunoregulatory Effects Of Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles On T Lymphocytes". *Cell Transplantation* 24 (12): 2615-2627. doi:10.3727/096368915x687543.
69. DelaRosa, Olga, Wilfried Dalemans, and Eleuterio Lombardo. 2012. "Toll-Like Receptors As Modulators Of Mesenchymal Stem Cells". *Frontiers In Immunology* 3. doi:10.3389/fimmu.2012.00182.
70. Deng, Yinan, Yingcai Zhang, Linsen Ye, Tong Zhang, Jintao Cheng, Guihua Chen, Qi Zhang, and Yang Yang. 2016. "Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells Instruct Monocytes Towards An IL10-Producing Phenotype By Secreting IL6 And HGF". *Scientific Reports* 6 (1). doi:10.1038/srep37566.
71. Derynck, Rik, and Ying E. Zhang. 2003. "Smad-Dependent And Smad-Independent Pathways In TGF-B Family Signalling". *Nature* 425 (6958): 577-584. doi:10.1038/nature02006.
72. Di Nicola, Massimo, Carmelo Carlo-Stella, Michele Magni, Marco Milanesi, Paolo D. Longoni, Paola Matteucci, Salvatore Grisanti, and Alessandro M. Gianni. 2002. "Human Bone Marrow Stromal Cells Suppress T-Lymphocyte Proliferation Induced By Cellular Or Nonspecific Mitogenic Stimuli". *Blood* 99 (10): 3838-3843. doi:10.1182/blood.v99.10.3838.
73. Diarra, Danielle, Marina Stolina, Karin Polzer, Jochen Zwerina, Michael S Ominsky, Denise Dwyer, and Adelheid Korb et al. 2007. "Dickkopf-1 Is A Master Regulator Of Joint Remodeling". *Nature Medicine* 13 (2): 156-163. doi:10.1038/nm1538.
74. Ding, Y., D. Xu, G. Feng, A. Bushell, R. J. Muschel, and K. J. Wood. 2009. "Mesenchymal Stem Cells Prevent The Rejection Of Fully Allogenic Islet Grafts By The Immunosuppressive Activity Of Matrix Metalloproteinase-2 And -9". *Diabetes* 58 (8): 1797-1806. doi:10.2337/db09-0317.
75. Domeier, Phillip P., Stephanie L. Schell, and Ziaur S. M. Rahman. 2017. "Spontaneous Germinal Centers And Autoimmunity". *Autoimmunity* 50 (1): 4-18. doi:10.1080/08916934.2017.1280671.
76. Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F.C Marini, D.S. Krause, R.J. Deans, A. Keating, D.J. Prockop, and E.M. Horwitz. 2006. "Minimal Criteria For Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society For Cellular Therapy Position Statement". *Cytotherapy* 8 (4): 315-317. doi:10.1080/14653240600855905.

77. Dong, Sijun, Zilian Zhang, and Hidenari Takahara. 2007. "Estrogen-Enhanced Peptidylarginine Deiminase Type IV Gene (PADI4) Expression In MCF-7 Cells Is Mediated By Estrogen Receptor-A-Promoted Transfactors Activator Protein-1, Nuclear Factor-Y, And Sp1". *Molecular Endocrinology* 21 (7): 1617-1629. doi:10.1210/me.2006-0550.
78. Engela, Anja U., Carla C. Baan, Frank J. M. F. Dor, Willem Weimar, and Martin J. Hoogduijn. 2012. "On The Interactions Between Mesenchymal Stem Cells And Regulatory T Cells For Immunomodulation In Transplantation". *Frontiers In Immunology* 3. doi:10.3389/fimmu.2012.00126.
79. Fabricius, Dorit, Marina Neubauer, Birgit Mandel, Catharina Schütz, Andreas Viardot, Angelika Vollmer, Bernd Jahrsdörfer, and Klaus-Michael Debatin. 2009. "Prostaglandin E2 Inhibits IFN-A Secretion And Th1 Costimulation By Human Plasmacytoid Dendritic Cells Via E-Prostanoid 2 And E-Prostanoid 4 Receptor Engagement". *The Journal Of Immunology* 184 (2): 677-684. doi:10.4049/jimmunol.0902028.
80. Fainardi, Enrico, Massimiliano Castellazzi, Marina Stignani, Fabio Morandi, Gwenaëlle Sana, Rafael Gonzalez, Vito Pistoia, Olavio Roberto Baricordi, Etienne Sokal, and Josè Peña. 2010. "Emerging Topics And New Perspectives On HLA-G". *Cellular And Molecular Life Sciences* 68 (3): 433-451. doi:10.1007/s00018-010-0584-3.
81. Favaro, Enrica, Andrea Carpanetto, Cristiana Caorsi, Mirella Giovarelli, Costanza Angelini, Paolo Cavallo-Perin, Ciro Tetta, Giovanni Camussi, and Maria M. Zanone. 2015. "Human Mesenchymal Stem Cells And Derived Extracellular Vesicles Induce Regulatory Dendritic Cells In Type 1 Diabetic Patients". *Diabetologia* 59 (2): 325-333. doi:10.1007/s00125-015-3808-0.
82. Fedak, Kristen M., Autumn Bernal, Zachary A. Capshaw, and Sherilyn Gross. 2015. "Applying The Bradford Hill Criteria In The 21St Century: How Data Integration Has Changed Causal Inference In Molecular Epidemiology". *Emerging Themes In Epidemiology* 12 (1). doi:10.1186/s12982-015-0037-4.
83. Fedyk, E. R., and R. P. Phipps. 1996. "Prostaglandin E2 Receptors Of The EP2 And EP4 Subtypes Regulate Activation And Differentiation Of Mouse B Lymphocytes To Ige-Secreting Cells.". *Proceedings Of The National Academy Of Sciences* 93 (20): 10978-10983. doi:10.1073/pnas.93.20.10978.
84. Ferreira, Ricardo C., Henry Z. Simons, Whitney S. Thompson, Daniel B. Rainbow, Xin Yang, Antony J. Cutler, and Joao Oliveira et al. 2017. "Cells With Treg-Specific FOXP3 Demethylation But Low CD25 Are Prevalent In Autoimmunity". *Journal Of Autoimmunity* 84: 75-86. doi:10.1016/j.jaut.2017.07.009.
85. Ferreira, Ricardo C., Henry Z. Simons, Whitney S. Thompson, Daniel B. Rainbow, Xin Yang, Antony J. Cutler, and Joao Oliveira et al. 2020. "Cells With Treg-Specific FOXP3 Demethylation But Low CD25 Are Prevalent In Autoimmunity."
86. Firestein, Gary S., and Iain B. McInnes. 2020. "Immunopathogenesis Of Rheumatoid Arthritis."
87. Fisson, Sylvain, Guillaume Darrasse-Jèze, Elena Litvinova, Franck Septier, David Klatzmann, Roland Liblau, and Benoît L. Salomon. 2003. "Continuous Activation Of Autoreactive CD4+ CD25+ Regulatory T Cells In The Steady State". *Journal Of Experimental Medicine* 198 (5): 737-746. doi:10.1084/jem.20030686.
88. Flores-Borja, F., E. C. Jury, C. Mauri, and M. R. Ehrenstein. 2008. "Defects In CTLA-4 Are Associated With Abnormal Regulatory T Cell Function In Rheumatoid Arthritis". *Proceedings Of The National Academy Of Sciences* 105 (49): 19396-19401. doi:10.1073/pnas.0806855105.
89. Fontenot, Jason D, Jeffrey P Rasmussen, Marc A Gavin, and Alexander Y Rudensky. 2005. "A Function For Interleukin 2 In FoxP3-Expressing Regulatory T Cells". *Nature Immunology* 6 (11): 1142-1151. doi:10.1038/ni1263.
90. Fontenot, Jason D., Jeffrey P. Rasmussen, Luke M. Williams, James L. Dooley, Andrew G. Farr, and Alexander Y. Rudensky. 2005. "Regulatory T Cell Lineage Specification By The Forkhead Transcription Factor FoxP3". *Immunity* 22 (3): 329-341. doi:10.1016/j.immuni.2005.01.016.
91. Fransson, Moa, Joachim Burman, Camilla Lindqvist, Christina Atterby, Jan Fagius, and Angelica Loskog. 2010. "T Regulatory Cells Lacking CD25 Are Increased In MS During Relapse". *Autoimmunity* 43 (8): 590-597. doi:10.3109/08916930903541190.

92. Gabrilovich, Dmitry I., Suzanne Ostrand-Rosenberg, and Vincenzo Bronte. 2012. "Coordinated Regulation Of Myeloid Cells By Tumours". *Nature Reviews Immunology* 12 (4): 253-268. doi:10.1038/nri3175.
93. Gershon-Cohen, J. 1961. "Breast Cancer-Reply". *JAMA* 178 (4): 440. doi:10.1001/jama.1961.03040430076030.
94. Ghannam, Soufiane, Jérôme Pène, Gabriel Moquet-Torcy, Christian Jorgensen, and Hans Yssel. 2013. "Correction: Mesenchymal Stem Cells Inhibit Human Th17 Cell Differentiation And Function And Induce A T Regulatory Cell Phenotype". *The Journal Of Immunology* 191 (11): 5777-5777. doi:10.4049/jimmunol.1390061.
95. Ghannam, Soufiane, Jérôme Pène, Gabriel Torcy-Moquet, Christian Jorgensen, and Hans Yssel. 2010. "Mesenchymal Stem Cells Inhibit Human Th17 Cell Differentiation And Function And Induce A T Regulatory Cell Phenotype". *The Journal Of Immunology* 185 (1): 302-312. doi:10.4049/jimmunol.0902007.
96. Gieseke, Friederike, Judith Böhringer, Rita Bussolari, Massimo Dominici, Rupert Handgretinger, and Ingo Müller. 2010. "Human Multipotent Mesenchymal Stromal Cells Use Galectin-1 To Inhibit Immune Effector Cells". *Blood* 116 (19): 3770-3779. doi:10.1182/blood-2010-02-270777.
97. Giles, Jon T. 2019. "Extra-Articular Manifestations And Comorbidity In Rheumatoid Arthritis: Potential Impact Of Pre–Rheumatoid Arthritis Prevention". *Clinical Therapeutics* 41 (7): 1246-1255. doi:10.1016/j.clinthera.2019.04.018.
98. Giurea, A., B.M. Rüger, D. Hollemann, G. Yanagida, R. Kotz, and M.B. Fischer. 2006. "STRO-1+ Mesenchymal Precursor Cells Located In Synovial Surface Projections Of Patients With Osteoarthritis". *Osteoarthritis And Cartilage* 14 (9): 938-943. doi:10.1016/j.joca.2006.02.014.
99. Glenn, Justin D. 2014. "Mesenchymal Stem Cells: Emerging Mechanisms Of Immunomodulation And Therapy". *World Journal Of Stem Cells* 6 (5): 526. doi:10.4252/wjsc.v6.i5.526.
100. Glennie, Sarah, Inês Soeiro, Peter J. Dyson, Eric W.-F. Lam, and Francesco Dazzi. 2005. "Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Induce Division Arrest Anergy Of Activated T Cells". *Blood* 105 (7): 2821-2827. doi:10.1182/blood-2004-09-3696.
101. Gonzalez, Angel, Hilal Maradit Kremers, Cynthia S. Crowson, Paulo J. Nicola, John M. Davis, Terry M. Therneau, Veronique L. Roger, and Sherine E. Gabriel. 2007. "The Widening Mortality Gap Between Rheumatoid Arthritis Patients And The General Population". *Arthritis & Rheumatism* 56 (11): 3583-3587. doi:10.1002/art.22979.
102. Gonzalez-Rey, E, M A Gonzalez, N Varela, F O'Valle, P Hernandez-Cortes, L Rico, D Büscher, and M Delgado. 2009. "Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Reduce Inflammatory And T Cell Responses And Induce Regulatory T Cells In Vitro In Rheumatoid Arthritis". *Annals Of The Rheumatic Diseases* 69 (01): 241-248. doi:10.1136/ard.2008.101881.
103. Gordon, Kelly J., and Gerard C. Blobe. 2008. "Role Of Transforming Growth Factor-B Superfamily Signaling Pathways In Human Disease". *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis Of Disease* 1782 (4): 197-228. doi:10.1016/j.bbadis.2008.01.006.
104. Gravallese, Ellen M., and Nicole C. Walsh. 2011. "Repair Of Erosion In RA—Shifting The Balance To Formation". *Nature Reviews Rheumatology* 7 (11): 626-628. doi:10.1038/nrrheum.2011.133.
105. Gullick, Nicola J., Hayley G. Evans, Leigh D. Church, David M. Jayaraj, Andrew Filer, Bruce W. Kirkham, and Leonie S. Taams. 2010. "Linking Power Doppler Ultrasound To The Presence Of Th17 Cells In The Rheumatoid Arthritis Joint". *Plos ONE* 5 (9): e12516. doi:10.1371/journal.pone.0012516.
106. Gupta, Anurag Kumar, Manjunath B. Joshi, Maria Philippova, Paul Erne, Paul Hasler, Sinuhe Hahn, and Therese J. Resink. 2010. "Activated Endothelial Cells Induce Neutrophil Extracellular Traps And Are Susceptible To Netosis-Mediated Cell Death". *FEBS Letters* 584 (14): 3193-3197. doi:10.1016/j.febslet.2010.06.006.
107. Haniffa, Muzlifah A., Xiao-Nong Wang, Udo Holtick, Michelle Rae, John D. Isaacs, Anne M. Dickinson, Catharien M. U. Hilkens, and Matthew P. Collin. 2007. "Adult Human Fibroblasts Are Potent Immunoregulatory Cells And Functionally Equivalent To Mesenchymal Stem Cells". *The Journal Of Immunology* 179 (3): 1595-1604. doi:10.4049/jimmunol.179.3.1595.

108. Hannon, Gregory J., and David Beach. 1994. "Pl5ink4b Is A Potentia| Effector Of TGF-B-Induced Cell Cycle Arrest". *Nature* 371 (6494): 257-261. doi:10.1038/371257a0.
109. Hardinger, Karen L., Daniel C. Brennan, and Christina L. Klein. 2012. "Selection Of Induction Therapy In Kidney Transplantation". *Transplant International* 26 (7): 662-672. doi:10.1111/tri.12043.
110. Hardinger, Karen L., Daniel C. Brennan, and Christina L. Klein. 2012. "Selection Of Induction Therapy In Kidney Transplantation". *Transplant International* 26 (7): 662-672. doi:10.1111/tri.12043.
111. Harmey, Judith H., and David Bouchier-Hayes. 2002. "Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), A Survival Factor For Tumour Cells: Implications For Anti-Angiogenic Therapy". *Bioessays* 24 (3): 280-283. doi:10.1002/bies.10043.
112. Harmon, Catherine E. 1985. "Antinuclear Antibodies In Autoimmune Disease: Significance And Pathogenicity". *Medical Clinics Of North America* 69 (3): 547-563. doi:10.1016/s0025-7125(16)31032-x.
113. Harris, Sarah G, Josue Padilla, Laura Koumas, Denise Ray, and Richard P Phipps. 2002. "Prostaglandins As Modulators Of Immunity". *Trends In Immunology* 23 (3): 144-150. doi:10.1016/s1471-4906(01)02154-8.
114. Hatterer, Eric, Limin Shang, Pierre Simonet, Suzanne Herren, Bruno Daubeuf, Stéphanie Teixeira, and James Reilly et al. 2016. "A Specific Anti-Citrullinated Protein Antibody Profile Identifies A Group Of Rheumatoid Arthritis Patients With A Toll-Like Receptor 4-Mediated Disease". *Arthritis Research & Therapy* 18 (1). doi:10.1186/s13075-016-1128-5.
115. He, Wei, David C. Dorn, Hediye Erdjument-Bromage, Paul Tempst, Malcolm A.S. Moore, and Joan Massagué. 2006. "Hematopoiesis Controlled By Distinct Tif1γ And Smad4 Branches Of The Tgfβ Pathway". *Cell* 125 (5): 929-941. doi:10.1016/j.cell.2006.03.045.
116. Hori, S. 2003. "Control Of Regulatory T Cell Development By The Transcription Factor FoxP3". *Science* 299 (5609): 1057-1061. doi:10.1126/science.1079490.
117. Horwitz, David A. 2010. "Identity Of Mysterious CD4+CD25-FoxP3+ Cells In SLE". *Arthritis Research & Therapy* 12 (1): 101. doi:10.1186/ar2894.
118. Horwitz, E. M., P. L. Gordon, W. K. K. Koo, J. C. Marx, M. D. Neel, R. Y. McNall, L. Muul, and T. Hofmann. 2002. "Isolated Allogeneic Bone Marrow-Derived Mesenchymal Cells Engraft And Stimulate Growth In Children With Osteogenesis Imperfecta: Implications For Cell Therapy Of Bone". *Proceedings Of The National Academy Of Sciences* 99 (13): 8932-8937. doi:10.1073/pnas.132252399.
119. Hsu, M.-C., C.-C. Huang, H.-C. Chang, T.-H. Hu, and W.-C. Hung. 2008. "Overexpression Of Jab1 In Hepatocellular Carcinoma And Its Inhibition By Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Ligands In Vitro And In Vivo". *Clinical Cancer Research* 14 (13): 4045-4052. doi:10.1158/1078-0432.ccr-07-5040.
120. Hsu, Wan-Tseng, Cheng-Hsin Lin, Bor-Luen Chiang, Hsiang-Yiang Jui, Kenneth Kun-Yu Wu, and Chii-Ming Lee. 2013. "Prostaglandin E2 Potentiates Mesenchymal Stem Cell–Induced IL-10+IFN-Γ+CD4+ Regulatory T Cells To Control Transplant Arteriosclerosis". *The Journal Of Immunology* 190 (5): 2372-2380. doi:10.4049/jimmunol.1202996.
121. Huang, Bo, Jie Zhao, Zhang Lei, Shiqian Shen, Dong Li, Guan-Xin Shen, Gui-Mei Zhang, and Zuo-Hua Feng. 2008. "Mir-142-3P Restricts Camp Production In CD4+CD25− T Cells And CD4+CD25+ Treg Cells By Targeting AC9 Mrna". *EMBO Reports* 10 (2): 180-185. doi:10.1038/embor.2008.224.
122. Huang, Bo, Ping-Ying Pan, Qingsheng Li, Alice I. Sato, David E. Levy, Jonathan Bromberg, Celia M. Divino, and Shu-Hsia Chen. 2006. "Gr-1+CD115+ Immature Myeloid Suppressor Cells Mediate The Development Of Tumor-Induced T Regulatory Cells And T-Cell Anergy In Tumor-Bearing Host". *Cancer Research* 66 (2): 1123-1131. doi:10.1158/0008-5472.can-05-1299.
123. Huang, Qi-Quan, and Richard M. Pope. 2009. "The Role Of Toll-Like Receptors In Rheumatoid Arthritis". *Current Rheumatology Reports* 11 (5): 357-364. doi:10.1007/s11926-009-0051-z.
124. Huber, L. C., O. Distler, I. Tarner, R. E. Gay, S. Gay, and T. Pap. 2006. "Synovial Fibroblasts: Key Players In Rheumatoid Arthritis". *Rheumatology* 45 (6): 669-675. doi:10.1093/rheumatology/kel065.
125. Hünig, Thomas, Niklas Beyersdorf, and Thomas Kerkau. 2015. "CD28 Co-Stimulation In T-Cell Homeostasis: A Recent Perspective". *Immunotargets And Therapy*, 111. doi:10.2147/itt.s61647.

126. Ingegnoli, Francesca, Roberto Castelli, and Roberta Gualtierotti. 2013. "Rheumatoid Factors: Clinical Applications". *Disease Markers* 35: 727-734. doi:10.1155/2013/726598.
127. Itoh, Takeshi, Hidetoshi Matsuda, Masatoshi Tanioka, Kenji Kuwabara, Shigeyoshi Itohara, and Ryuji Suzuki. 2002. "The Role Of Matrix Metalloproteinase-2 And Matrix Metalloproteinase-9 In Antibody-Induced Arthritis". *The Journal Of Immunology* 169 (5): 2643-2647. doi:10.4049/jimmunol.169.5.2643.
128. Ivanova-Todorova, Ekaterina, Ivan Bochev, Milena Mourdjeva, Rumen Dimitrov, Dimitar Bukarev, Stanimir Kyurkchiev, Petar Tivchev, Iskra Altunkova, and Dobroslav Stanimirov Kyurkchiev. 2009. "Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Are More Potent Suppressors Of Dendritic Cells Differentiation Compared To Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells". *Immunology Letters* 126 (1-2): 37-42. doi:10.1016/j.imlet.2009.07.010.
129. Ivanova-Todorova, Ekaterina, Ivan Bochev, Rumen Dimitrov, Kalina Belemezova, Milena Mourdjeva, Stanimir Kyurkchiev, Plamen Kinov, Iskra Altankova, and Dobroslav Kyurkchiev. 2012. "Conditioned Medium From Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Induces CD4+FOXP3+ Cells And Increases IL-10 Secretion". *Journal Of Biomedicine And Biotechnology* 2012: 1-8. doi:10.1155/2012/295167.
130. Jacobs, Sandra A., Jef Pinxteren, Valerie D. Roobrouck, Ariane Luyckx, Wouter Van't Hof, Robert Deans, Catherine M. Verfaillie, Mark Waer, An D. Billiau, and Stefaan W. Van Gool. 2013. "Human Multipotent Adult Progenitor Cells Are Nonimmunogenic And Exert Potent Immunomodulatory Effects On Alloreactive T-Cell Responses". *Cell Transplantation* 22 (10): 1915-1928. doi:10.3727/096368912x657369.
131. Jain, Renu, Yi Chen, Yuka Kanno, Barbara Joyce-Shaikh, Golnaz Vahedi, Kiyoshi Hirahara, and Wendy M. Blumenschein et al. 2016. "Interleukin-23-Induced Transcription Factor Blimp-1 Promotes Pathogenicity Of T Helper 17 Cells". *Immunity* 44 (1): 131-142. doi:10.1016/j.immuni.2015.11.009.
132. Jakubzick, Claudia V., Gwendalyn J. Randolph, and Peter M. Henson. 2017. "Monocyte Differentiation And Antigen-Presenting Functions". *Nature Reviews Immunology* 17 (6): 349-362. doi:10.1038/nri.2017.28.
133. Jeffery, Rachel C. 2014. "Clinical Features Of Rheumatoid Arthritis". *Medicine* 42 (5): 231-236. doi:10.1016/j.mpmed.2014.02.011.
134. Jones, E, S M Churchman, A English, M H Buch, E A Horner, C H Burgoyne, and R Reece et al. 2009. "Mesenchymal Stem Cells In Rheumatoid Synovium: Enumeration And Functional Assessment In Relation To Synovial Inflammation Level". *Annals Of The Rheumatic Diseases* 69 (2): 450-457. doi:10.1136/ard.2008.106435.
135. Jones, Elena A., Aileen Crawford, Anne English, Karen Henshaw, Jenifer Mundy, Diane Corscadden, Tony Chapman, Paul Emery, Paul Hatton, and Dennis McGonagle. 2008. "Synovial Fluid Mesenchymal Stem Cells In Health And Early Osteoarthritis: Detection And Functional Evaluation At The Single-Cell Level". *Arthritis & Rheumatism* 58 (6): 1731-1740. doi:10.1002/art.23485.
136. Jones, Elena A., Anne English, Karen Henshaw, Sally E. Kinsey, Alex F. Markham, Paul Emery, and Dennis McGonagle. 2004. "Enumeration And Phenotypic Characterization Of Synovial Fluid Multipotential Mesenchymal Progenitor Cells In Inflammatory And Degenerative Arthritis". *Arthritis & Rheumatism* 50 (3): 817-827. doi:10.1002/art.20203.
137. Jónsson, T., K. Steinsson, H. Jónsson, Á. J. Geirsson, J. Thorsteinsson, and H. Valdimarsson. 1998. "Combined Elevation Of Igm And Iga Rheumatoid Factor Has High Diagnostic Specificity For Rheumatoid Arthritis". *Rheumatology International* 18 (3): 119-122. doi:10.1007/s002960050069.
138. Kagiwada, Harumi, Tetsuya Yashiki, Akira Ohshima, Mika Tadokoro, Noritoshi Nagaya, and Hajime Ohgushi. 2008. "Human Mesenchymal Stem Cells As A Stable Source Of VEGF-Producing Cells". *Journal Of Tissue Engineering And Regenerative Medicine* 2 (4): 184-189. doi:10.1002/term.79.
139. Kagiwada, Harumi, Tetsuya Yashiki, Akira Ohshima, Mika Tadokoro, Noritoshi Nagaya, and Hajime Ohgushi. 2008. "Human Mesenchymal Stem Cells As A Stable Source Of VEGF-Producing Cells". *Journal Of Tissue Engineering And Regenerative Medicine* 2 (4): 184-189. doi:10.1002/term.79.
140. Kampstra, Arieke S.B., and René E.M. Toes. 2017. "HLA Class II And Rheumatoid Arthritis: The Bumpy Road Of Revelation". *Immunogenetics* 69 (8-9): 597-603. doi:10.1007/s00251-017-0987-5.

141. Kanan, Joao H. C., and Benjamin M. Chain. 2006. "Modulation Of Dendritic Cell Differentiation And Cytokine Secretion By The Hydatid Cyst Fluid Of Echinococcus Granulosus". *Immunology* 118 (2): 271-278. doi:10.1111/j.1365-2567.2006.02375.x.
142. Karnoub, Antoine E., Ajeeta B. Dash, Annie P. Vo, Andrew Sullivan, Mary W. Brooks, George W. Bell, Andrea L. Richardson, Kornelia Polyak, Ross Tubo, and Robert A. Weinberg. 2007. "Mesenchymal Stem Cells Within Tumour Stroma Promote Breast Cancer Metastasis". *Nature* 449 (7162): 557-563. doi:10.1038/nature06188.
143. Karystinou, A., F. Dell'Accio, T. B. A. Kurth, H. Wackerhage, I. M. Khan, C. W. Archer, E. A. Jones, T. A. Mitsiadis, and C. De Bari. 2009. "Distinct Mesenchymal Progenitor Cell Subsets In The Adult Human Synovium". *Rheumatology* 48 (9): 1057-1064. doi:10.1093/rheumatology/kep192.
144. Kay, Alasdair G., Grace Long, George Tyler, Andrei Stefan, Stephen J. Broadfoot, Anna M. Piccinini, Jim Middleton, and Oksana Kehoe. 2017. "Mesenchymal Stem Cell-Conditioned Medium Reduces Disease Severity And Immune Responses In Inflammatory Arthritis". *Scientific Reports* 7 (1). doi:10.1038/s41598-017-18144-w.
145. Khan, I.M., J.C. Bishop, S. Gilbert, and C.W. Archer. 2009. "Clonal Chondroprogenitors Maintain Telomerase Activity And Sox9 Expression During Extended Monolayer Culture And Retain Chondrogenic Potential". *Osteoarthritis And Cartilage* 17 (4): 518-528. doi:10.1016/j.joca.2008.08.002.
146. Khatami, Mahin. 2011. "Unresolved Infl Ammation: Loss Of Immune And Architectural Integrity In Susceptible Target Tissues And Infl Ammatory Diseases Or Cancer". *Journal Of Cell Science & Therapy* 01 (S1). doi:10.4172/2157-7013.s1.01.
147. Kim, Jaehyup, and Peiman Hematti. 2009. "Mesenchymal Stem Cells Convert Human Macrophages To A Novel Type Of Alternatively Activated Macrophages.". *Blood* 114 (22): 3632-3632. doi:10.1182/blood.v114.22.3632.3632.
148. Klapman, Jason B., Daniel Ene-Stroescu, Michael A. Becker, and Stephen B. Hanauer. 2003. "A Lupus-Like Syndrome Associated With Infliximab Therapy". *Inflammatory Bowel Diseases* 9 (3): 176-178. doi:10.1097/00054725-200305000-00005.
149. Klareskog, Lars, Leonid Padyukov, Johnny Lorentzen, and Lars Alfredsson. 2006. "Mechanisms Of Disease: Genetic Susceptibility And Environmental Triggers In The Development Of Rheumatoid Arthritis". *Nature Clinical Practice Rheumatology* 2 (8): 425-433. doi:10.1038/ncprheum0249.
150. Kleiveland, Charlotte Ramstad, Moustapha Kassem, and Tor Lea. 2008. "Human Mesenchymal Stem Cell Proliferation Is Regulated By PGE2 Through Differential Activation Of Camp-Dependent Protein Kinase Isoforms". *Experimental Cell Research* 314 (8): 1831-1838. doi:10.1016/j.yexcr.2008.02.004.
151. Knowles, R G, and S Moncada. 1994. "Nitric Oxide Synthases In Mammals". *Biochemical Journal* 298 (2): 249-258. doi:10.1042/bj2980249.
152. Ko, Jung Hwa, Hyun Ju Lee, Hyun Jeong Jeong, Mee Kum Kim, Won Ryang Wee, Sun-ok Yoon, Hosoon Choi, Darwin J. Prockop, and Joo Youn Oh. 2015. "Mesenchymal Stem/Stromal Cells Precondition Lung Monocytes/Macrophages To Produce Tolerance Against Allo- And Autoimmunity In The Eye". *Proceedings Of The National Academy Of Sciences* 113 (1): 158-163. doi:10.1073/pnas.1522905113.
153. Koller, M. 2004. "Phenotypic And Functional Deficiencies Of Monocyte-Derived Dendritic Cells In Systemic Lupus Erythematosus (SLE) Patients". *International Immunology* 16 (11): 1595-1604. doi:10.1093/intimm/dxh160.
154. Konig, M. F., L. Abusleme, J. Reinholdt, R. J. Palmer, R. P. Teles, K. Sampson, and A. Rosen et al. 2016. "Aggregatibacter Actinomycetemcomitans-Induced Hypercitrullination Links Periodontal Infection To Autoimmunity In Rheumatoid Arthritis". *Science Translational Medicine* 8 (369): 369ra176-369ra176. doi:10.1126/scitranslmed.aaj1921.
155. Kopen, G. C., D. J. Prockop, and D. G. Phinney. 1999. "Marrow Stromal Cells Migrate Throughout Forebrain And Cerebellum, And They Differentiate Into Astrocytes After Injection Into Neonatal Mouse Brains". *Proceedings Of The National Academy Of Sciences* 96 (19): 10711-10716. doi:10.1073/pnas.96.19.10711.

156. Kotake, Shigeru, Nobuyuki Udagawa, Naoyuki Takahashi, Kenichiro Matsuzaki, Kanami Itoh, Shigeru Ishiyama, and Seiji Saito et al. 1999. "IL-17 In Synovial Fluids From Patients With Rheumatoid Arthritis Is A Potent Stimulator Of Osteoclastogenesis". *Journal Of Clinical Investigation* 103 (9): 1345-1352. doi:10.1172/jci5703.
157. Krampera, Mauro, Lorenzo Cosmi, Roberta Angeli, Annalisa Pasini, Francesco Liotta, Angelo Andreini, and Veronica Santarlasci et al. 2006. "Role For Interferon-Γ In The Immunomodulatory Activity Of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells". *Stem Cells* 24 (2): 386-398. doi:10.1634/stemcells.2005-0008.
158. Kuci, Z., J. Seiberth, H. Latifi-Pupovci, S. Wehner, S. Stein, M. Grez, and H. Bonig et al. 2013. "Clonal Analysis Of Multipotent Stromal Cells Derived From CD271+ Bone Marrow Mononuclear Cells: Functional Heterogeneity And Different Mechanisms Of Allosuppression". *Haematologica* 98 (10): 1609-1616. doi:10.3324/haematol.2013.092700.
159. Kurkó, Júlia, Timea Besenyei, Judit Laki, Tibor T. Glant, Katalin Mikecz, and Zoltán Szekanecz. 2013. "Genetics Of Rheumatoid Arthritis — A Comprehensive Review". *Clinical Reviews In Allergy & Immunology* 45 (2): 170-179. doi:10.1007/s12016-012-8346-7.
160. Kuroiwa, Takanori, Eizo Kakishita, Teruaki Hamano, Yasuro Kataoka, Yoshifumi Seto, Nobuo Iwata, and Yasufumi Kaneda et al. 2001. "Hepatocyte Growth Factor Ameliorates Acute Graft-Versus-Host Disease And Promotes Hematopoietic Function". *Journal Of Clinical Investigation* 107 (11): 1365-1373. doi:10.1172/jci11808.
161. Kwok, Seung-Ki, Mi-La Cho, Mi-Kyung Park, Hye-Joa Oh, Jin-Sil Park, Yang-Mi Her, and Seon-Yeong Lee et al. 2012. "Interleukin-21 Promotes Osteoclastogenesis In Humans With Rheumatoid Arthritis And In Mice With Collagen-Induced Arthritis". *Arthritis & Rheumatism* 64 (3): 740-751. doi:10.1002/art.33390.
162. Kyurkchiev, Dobroslav. 2014. "Secretion Of Immunoregulatory Cytokines By Mesenchymal Stem Cells". *World Journal Of Stem Cells* 6 (5): 552. doi:10.4252/wjsc.v6.i5.552.
163. Laouar, Yasmina, Fayyaz S Sutterwala, Leonid Gorelik, and Richard A Flavell. 2005. "Transforming Growth Factor-B Controls T Helper Type 1 Cell Development Through Regulation Of Natural Killer Cell Interferon-Γ". *Nature Immunology* 6 (6): 600-607. doi:10.1038/ni1197.
164. Lappas, Courtney M., Jayson M. Rieger, and Joel Linden. 2005. "A2A Adenosine Receptor Induction Inhibits IFN-Γ Production In Murine CD4+ T Cells". *The Journal Of Immunology* 174 (2): 1073-1080. doi:10.4049/jimmunol.174.2.1073.
165. Le Tourneau, Christophe, Eric Raymond, and Sandrine Faivre. 2007. "Sunitinib: A Novel Tyrosine Kinase Inhibitor. A Brief Review Of Its Therapeutic Potential In The Treatment Of Renal Carcinoma And Gastrointestinal Stromal Tumors (GIST)". *Therapeutics And Clinical Risk Management* 3 (2): 341-348. doi:10.2147/tcrm.2007.3.2.341.
166. Lebre, Maria C., Pedro L. Vieira, Man Wai Tang, Saïda Aarrass, Boy Helder, Thomas Newsom-Davis, Paul P. Tak, and Gavin R. Screaton. 2016. "Synovial IL-21/TNF-Producing CD4 + T Cells Induce Joint Destruction In Rheumatoid Arthritis By Inducing Matrix Metalloproteinase Production By Fibroblast-Like Synoviocytes". *Journal Of Leukocyte Biology* 101 (3): 775-783. doi:10.1189/jlb.5a0516-217rr.
167. Lee, D M, R Phillips, E M Hagan, L B Chibnik, K H Costenbader, and P H Schur. 2008. "Quantifying Anti-Cyclic Citrullinated Peptide Titres: Clinical Utility And Association With Tobacco Exposure In Patients With Rheumatoid Arthritis". *Annals Of The Rheumatic Diseases* 68 (2): 201-208. doi:10.1136/ard.2007.084509.
168. Lee, Hye-Soon, Patricia Irigoyen, Marlena Kern, Annette Lee, Franak Batliwalla, Houman Khalili, and Frederick Wolfe et al. 2007. "Interaction Between Smoking, The Shared Epitope, And Anti–Cyclic Citrullinated Peptide: A Mixed Picture In Three Large North American Rheumatoid Arthritis Cohorts". *Arthritis & Rheumatism* 56 (6): 1745-1753. doi:10.1002/art.22703.
169. Lee, Ryang Hwa, Andrey A. Pulin, Min Jeong Seo, Daniel J. Kota, Joni Ylostalo, Benjamin L. Larson, Laura Semprun-Prieto, Patrice Delafontaine, and Darwin J. Prockop. 2009. "Intravenous Hmscs Improve Myocardial Infarction In Mice Because Cells Embolized In Lung Are Activated To Secrete The Anti-Inflammatory Protein TSG-6". *Cell Stem Cell* 5 (1): 54-63. doi:10.1016/j.stem.2009.05.003.

170. Lee, Yun Kyung, Ryuta Mukasa, Robin D Hatton, and Casey T Weaver. 2009. "Developmental Plasticity Of Th17 And Treg Cells". *Current Opinion In Immunology* 21 (3): 274-280. doi:10.1016/j.coi.2009.05.021.
171. Li, Ming O., and Richard A. Flavell. 2008. "Contextual Regulation Of Inflammation: A Duet By Transforming Growth Factor-B And Interleukin-10". *Immunity* 28 (4): 468-476. doi:10.1016/j.immuni.2008.03.003.
172. Li, Ming O., Shomyseh Sanjabi, and Richard A. Flavell. 2006. "Transforming Growth Factor-B Controls Development, Homeostasis, And Tolerance Of T Cells By Regulatory T Cell-Dependent And -Independent Mechanisms". *Immunity* 25 (3): 455-471. doi:10.1016/j.immuni.2006.07.011.
173. Li, X., and S. S. Makarov. 2006. "An Essential Role Of NF- B In The "Tumor-Like" Phenotype Of Arthritic Synoviocytes". *Proceedings Of The National Academy Of Sciences* 103 (46): 17432-17437. doi:10.1073/pnas.0607939103.
174. Li, Xiaofeng, Peng Liu, Wenzhong Liu, Peter Maye, Jianghong Zhang, Yazhou Zhang, and Marja Hurley et al. 2005. "Dkk2 Has A Role In Terminal Osteoblast Differentiation And Mineralized Matrix Formation". *Nature Genetics* 37 (9): 945-952. doi:10.1038/ng1614.
175. Li, Xiaohong, Kai Yuan, Qingqing Zhu, Qingyi Lu, Haixu Jiang, Mengmeng Zhu, Guangrui Huang, and Anlong Xu. 2019. "Andrographolide Ameliorates Rheumatoid Arthritis By Regulating The Apoptosis–Netosis Balance Of Neutrophils". *International Journal Of Molecular Sciences* 20 (20): 5035. doi:10.3390/ijms20205035.
176. Li, Yin-Ping, Sophie Paczesny, Evelyne Lauret, Sonia Poirault, Pierre Bordigoni, Fatiha Mekhloufi, and Olivier Hequet et al. 2008. "Human Mesenchymal Stem Cells License Adult CD34+ Hemopoietic Progenitor Cells To Differentiate Into Regulatory Dendritic Cells Through Activation Of The Notch Pathway". *The Journal Of Immunology* 180 (3): 1598-1608. doi:10.4049/jimmunol.180.3.1598.
177. Lila, Nermine, Catherine Amrein, Romain Guillemain, Patrick Chevalier, Christian Latremouille, Jean-Noël Fabiani, Jean Dausset, Edgardo D. Carosella, and Alain Carpentier. 2002. "Human Leukocyte Antigen-G Expression After Heart Transplantation Is Associated With A Reduced Incidence Of Rejection". *Circulation* 105 (16): 1949-1954. doi:10.1161/01.cir.0000015075.89984.46.
178. Ling, W., J. Zhang, Z. Yuan, G. Ren, L. Zhang, X. Chen, A. B. Rabson, A. I. Roberts, Y. Wang, and Y. Shi. 2014. "Mesenchymal Stem Cells Use IDO To Regulate Immunity In Tumor Microenvironment". *Cancer Research* 74 (5): 1576-1587. doi:10.1158/0008-5472.can-13-1656.
179. Liu, Liu, Guangfeng Zhao, Hongye Fan, Xiaoyin Zhao, Pengfei Li, Zhiqun Wang, Yali Hu, and Yayi Hou. 2014. "Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Th1-Induced Pre-Eclampsia-Like Symptoms In Mice Via The Suppression Of TNF-A Expression". *Plos ONE* 9 (2): e88036. doi:10.1371/journal.pone.0088036.
180. Liu, Rui, Xia Li, Zhuoya Zhang, Min Zhou, Yue Sun, Dinglei Su, and Xuebing Feng et al. 2015. "Allogeneic Mesenchymal Stem Cells Inhibited T Follicular Helper Cell Generation In Rheumatoid Arthritis". *Scientific Reports* 5 (1). doi:10.1038/srep12777.
181. Liu, Xingxia, Shaoda Ren, Xuebin Qu, Chaozhuo Ge, Kai Cheng, and Robert Chun Hua Zhao. 2015. "Mesenchymal Stem Cells Inhibit Th17 Cells Differentiation Via IFN-Γ-Mediated SOCS3 Activation". *Immunologic Research* 61 (3): 219-229. doi:10.1007/s12026-014-8612-2.
182. Liu, Yi, Zhilin Yin, Run Zhang, Ke Yan, Lei Chen, Fanfan Chen, Weiyi Huang, Bingke Lv, Chengmei Sun, and Xiaodan Jiang. 2014. "Mscs Inhibit Bone Marrow-Derived DC Maturation And Function Through The Release Of TSG-6". *Biochemical And Biophysical Research Communications* 450 (4): 1409-1415. doi:10.1016/j.bbrc.2014.07.001.
183. Lories, Rik J. U., Inge Derese, Cosimo de Bari, and Frank P. Luyten. 2007. "Evidence For Uncoupling Of Inflammation And Joint Remodeling In A Mouse Model Of Spondylarthritis". *Arthritis & Rheumatism* 56 (2): 489-497. doi:10.1002/art.22372.
184. Lozito, Thomas P., and Rocky S. Tuan. 2010. "Mesenchymal Stem Cells Inhibit Both Endogenous And Exogenous Mmps Via Secreted Timps". *Journal Of Cellular Physiology* 226 (2): 385-396. doi:10.1002/jcp.22344.

185. Lu, Ming-Chi, Ning-Sheng Lai, Hui-Chun Yu, Hsien-Bin Huang, Song-Chou Hsieh, and Chia-Li Yu. 2010. "Anti-Citrullinated Protein Antibodies Bind Surface-Expressed Citrullinated Grp78 On Monocyte/Macrophages And Stimulate Tumor Necrosis Factor A Production". *Arthritis & Rheumatism* 62 (5): 1213-1223. doi:10.1002/art.27386.
186. Luz-Crawford, Patricia, Farida Djouad, Karine Toupet, Claire Bony, Marcella Franquesa, Martin J. Hoogduijn, Christian Jorgensen, and Danièle Noël. 2015. "Mesenchymal Stem Cell-Derived Interleukin 1 Receptor Antagonist Promotes Macrophage Polarization And Inhibits B Cell Differentiation". *STEM CELLS* 34 (2): 483-492. doi:10.1002/stem.2254.
187. Luz-Crawford, Patricia, Monica Kurte, Javiera Bravo-Alegría, Rafael Contreras, Estefania Nova-Lamperti, Gautier Tejedor, and Danièle Noël et al. 2013. "Mesenchymal Stem Cells Generate A CD4+CD25+FoxP3+ Regulatory T Cell Population During The Differentiation Process Of Th1 And Th17 Cells". *Stem Cell Research & Therapy* 4 (3): 65. doi:10.1186/scrt216.
188. Maggi, Enrico, Lorenzo Cosmi, Francesco Liotta, Paola Romagnani, Sergio Romagnani, and Francesco Annunziato. 2005. "Thymic Regulatory T Cells". *Autoimmunity Reviews* 4 (8): 579-586. doi:10.1016/j.autrev.2005.04.010.
189. Maggini, Julian, Gerardo Mirkin, Ianina Bognanni, Josefina Holmberg, Isabel M. Piazzón, Irene Nepomnaschy, and Héctor Costa et al. 2010. "Mouse Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells Turn Activated Macrophages Into A Regulatory-Like Profile". *Plos ONE* 5 (2): e9252. doi:10.1371/journal.pone.0009252.
190. Malemud, Charles, J. 2006. "Matrix Metalloproteinases (Mmps) In Health And Disease: An Overview". *Frontiers In Bioscience* 11 (1): 1696. doi:10.2741/1915.
191. Malik, Mariam, and Stuart Yuspa. 2012. "Inos-Induced CLIC4 Nuclear Translocation Regulates Macrophage Deactivation And TGF-B Signaling". *Nitric Oxide* 27: S43. doi:10.1016/j.niox.2012.04.155.
192. Mandapathil, Magis, Benedict Hilldorfer, Miroslaw J. Szczepanski, Malgorzata Czystowska, Marta Szajnik, Jin Ren, Stephan Lang, Edwin K. Jackson, Elieser Gorelik, and Theresa L. Whiteside. 2009. "Generation And Accumulation Of Immunosuppressive Adenosine By Human CD4+Cd25highFoxP3+Regulatory T Cells". *Journal Of Biological Chemistry* 285 (10): 7176-7186. doi:10.1074/jbc.m109.047423.
193. Mann, Monica K., Katarzyna Maresz, Leah P. Shriver, Yanping Tan, and Bonnie N. Dittel. 2007. "B Cell Regulation Of CD4+CD25+ T Regulatory Cells And IL-10 Via B7 Is Essential For Recovery From Experimental Autoimmune Encephalomyelitis". *The Journal Of Immunology* 178 (6): 3447-3456. doi:10.4049/jimmunol.178.6.3447.
194. Manzo, Antonio, Michele Bombardieri, Frances Humby, and Costantino Pitzalis. 2010. "Secondary And Ectopic Lymphoid Tissue Responses In Rheumatoid Arthritis: From Inflammation To Autoimmunity And Tissue Damage/Remodeling". *Immunological Reviews* 233 (1): 267-285. doi:10.1111/j.0105-2896.2009.00861.x.
195. Marti, Luciana Cavalheiro, Lorena Pavon, Patricia Severino, Tatiana Sibov, Daiane Guilhen, and Carlos Alberto Moreira-Filho. 2014. "Vascular Endothelial Growth Factor-A Enhances Indoleamine 2,3-Dioxygenase Expression By Dendritic Cells And Subsequently Impacts Lymphocyte Proliferation". *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 109 (1): 70-79. doi:10.1590/0074-0276130252.
196. Martinsson, K., A. Johansson, A. Kastbom, and T. Skogh. 2017. "Immunoglobulin (Ig)G1 And Igg4 Anti-Cyclic Citrullinated Peptide (CCP) Associate With Shared Epitope, Whereas Igg2 Anti-CCP Associates With Smoking In Patients With Recent-Onset Rheumatoid Arthritis (The Swedish TIRA Project)". *Clinical & Experimental Immunology* 188 (1): 53-62. doi:10.1111/cei.12901.
197. Maurice, M. 1997. "Defective TCR-Mediated Signaling In Synovial T Cells In Rheumatoid Arthritis". *Immunology Letters* 56 (1-3): 322. doi:10.1016/s0165-2478(97)88138-2.
198. Mayer, Hubert, Helge Bertram, Werner Lindenmaier, Thomas Korff, Holger Weber, and Herbert Weich. 2005. "Vascular Endothelial Growth Factor (SVEGF-A) Expression In Human Mesenchymal Stem Cells: Autocrine

And Paracrine Role On Osteoblastic And Endothelial Differentiation". *Journal Of Cellular Biochemistry* 95 (4): 827-839. doi:10.1002/jcb.20462.

199. Mc Ardle, Angela, Brian Flatley, Stephen R. Pennington, and Oliver FitzGerald. 2015. "Early Biomarkers Of Joint Damage In Rheumatoid And Psoriatic Arthritis". *Arthritis Research & Therapy* 17 (1). doi:10.1186/s13075-015-0652-z.
200. McInnes, Iain B., Christopher D. Buckley, and John D. Isaacs. 2015. "Cytokines In Rheumatoid Arthritis — Shaping The Immunological Landscape". *Nature Reviews Rheumatology* 12 (1): 63-68. doi:10.1038/nrrheum.2015.171.
201. McQuibban, G. A. 2000. "Inflammation Dampened By Gelatinase A Cleavage Of Monocyte Chemoattractant Protein-3". *Science* 289 (5482): 1202-1206. doi:10.1126/science.289.5482.1202.
202. Melief, Sara M., Ellen Schrama, Martijn H. Brugman, Machteld M. Tiemessen, Martin J. Hoogduijn, Willem E. Fibbe, and Helene Roelofs. 2013. "Multipotent Stromal Cells Induce Human Regulatory T Cells Through A Novel Pathway Involving Skewing Of Monocytes Toward Anti-Inflammatory Macrophages". *STEM CELLS* 31 (9): 1980-1991. doi:10.1002/stem.1432.
203. Melief, Sara M., Jaap Jan Zwaginga, Willem E. Fibbe, and Helene Roelofs. 2013. "Adipose Tissue-Derived Multipotent Stromal Cells Have A Higher Immunomodulatory Capacity Than Their Bone Marrow-Derived Counterparts". *STEM CELLS Translational Medicine* 2 (6): 455-463. doi:10.5966/sctm.2012-0184.
204. Mitsdoerffer, M., Y. Lee, A. Jager, H.-J. Kim, T. Korn, J. K. Kolls, H. Cantor, E. Bettelli, and V. K. Kuchroo. 2010. "Proinflammatory T Helper Type 17 Cells Are Effective B-Cell Helpers". *Proceedings Of The National Academy Of Sciences* 107 (32): 14292-14297. doi:10.1073/pnas.1009234107.
205. Moeez, Sadaf, Peter John, and Attya Bhatti. 2013. "Anti-Citrullinated Protein Antibodies: Role In Pathogenesis Of RA And Potential As A Diagnostic Tool". *Rheumatology International* 33 (7): 1669-1673. doi:10.1007/s00296-012-2635-6.
206. Moreland, Larry. 2005. *Arthritis Research & Therapy* 7 (Suppl 3): S2. doi:10.1186/ar1736.
207. Mougiakakos, Dimitrios, Regina Jitschin, C. Christian Johansson, Riki Okita, Rolf Kiessling, and Katarina Le Blanc. 2011. "The Impact Of Inflammatory Licensing On Heme Oxygenase-1–Mediated Induction Of Regulatory T Cells By Human Mesenchymal Stem Cells". *Blood* 117 (18): 4826-4835. doi:10.1182/blood-2010-12-324038.
208. Murphy, Dan, Derek Mattey, and David Hutchinson. 2017. "Anti-Citrullinated Protein Antibody Positive Rheumatoid Arthritis Is Primarily Determined By Rheumatoid Factor Titre And The Shared Epitope Rather Than Smoking Per Se". *PLOS ONE* 12 (7): e0180655. doi:10.1371/journal.pone.0180655.
209. Mydel, Piotr, Zeneng Wang, Mikael Brisslert, Annelie Hellvard, Leif E. Dahlberg, Stanley L. Hazen, and Maria Bokarewa. 2010. "Carbamylation-Dependent Activation Of T Cells: A Novel Mechanism In The Pathogenesis Of Autoimmune Arthritis". *The Journal Of Immunology* 184 (12): 6882-6890. doi:10.4049/jimmunol.1000075.
210. Nadkarni, Suchita, Claudia Mauri, and Michael R. Ehrenstein. 2007. "Anti–TNF-A Therapy Induces A Distinct Regulatory T Cell Population In Patients With Rheumatoid Arthritis Via TGF-B". *Journal Of Experimental Medicine* 204 (1): 33-39. doi:10.1084/jem.20061531.
211. Nadri, Samad, Masoud Soleimani, Jafar Kiani, Amir Atashi, and Reza Izadpanah. 2008. "Multipotent Mesenchymal Stem Cells From Adult Human Eye Conjunctiva Stromal Cells". *Differentiation* 76 (3): 223-231. doi:10.1111/j.1432-0436.2007.00216.x.
212. Nagar, Meital, Jasmine Jacob-Hirsch, Helly Vernitsky, Yackov Berkun, Shomron Ben-Horin, Ninette Amariglio, Ilan Bank, Yoel Kloog, Gideon Rechavi, and Itamar Goldstein. 2010. "TNF Activates A NF-Kb–Regulated Cellular Program In Human CD45RA– Regulatory T Cells That Modulates Their Suppressive Function". *The Journal Of Immunology* 184 (7): 3570-3581. doi:10.4049/jimmunol.0902070.
213. Naiki, Yoshikazu, Kathrin S. Michelsen, Wenxuang Zhang, Shuang Chen, Terence M. Doherty, and Moshe Arditi. 2004. "Transforming Growth Factor-B Differentially Inhibits Myd88-Dependent, But Not TRAM-

And TRIF-Dependent, Lipopolysaccharide-Induced TLR4 Signaling". *Journal Of Biological Chemistry* 280 (7): 5491-5495. doi:10.1074/jbc.c400503200.

214. Najar, Mehdi, Gordana Raicevic, Hicham Id Boufker, Hussein Fayyad Kazan, Cécile De Bruyn, Nathalie Meuleman, Dominique Bron, Michel Toungouz, and Laurence Lagneaux. 2010. "Mesenchymal Stromal Cells Use PGE2 To Modulate Activation And Proliferation Of Lymphocyte Subsets: Combined Comparison Of Adipose Tissue, Wharton'S Jelly And Bone Marrow Sources". *Cellular Immunology* 264 (2): 171-179. doi:10.1016/j.cellimm.2010.06.006.
215. Nakamura, Kazuhiko, Atsushi Kitani, Ivan Fuss, Aasta Pedersen, Naohiko Harada, Hajime Nawata, and Warren Strober. 2004. "TGF-B Plays An Important Role In The Mechanism Of CD4+CD25+ Regulatory T Cell Activity In Both Humans And Mice". *The Journal Of Immunology* 172 (2): 834-842. doi:10.4049/jimmunol.172.2.834.
216. Nakamura, Shuji, Motoyuki Suzuki, Akira Sugimoto, Kazue Tsuji-Takayama, Mayuko Yamamoto, Takeshi Otani, and Toshiya Inoue et al. 2007. "IL-2-Independent Generation Of FOXP3+CD4+CD8+CD25+ Cytotoxic Regulatory T Cell Lines From Human Umbilical Cord Blood". *Experimental Hematology* 35 (2): 287-296. doi:10.1016/j.exphem.2006.10.011.
217. Nasef, Aisha, Alain Chapel, Christelle Mazurier, Sandrine Bouchet, Manuel Lopez, Noelle Mathieu, And Luc Sensebé Et Al. 2006. "Identification Of IL-10 And TGF-B Transcripts Involved In The Inhibition Of T-Lymphocyte Proliferation During Cell Contact With Human Mesenchymal Stem Cells". *Gene Expression* 13 (4): 217-226. doi:10.3727/000000006780666957.
218. Nasef, Aisha, Christelle Mazurier, Sandrine Bouchet, Sabine François, Alain Chapel, Dominique Thierry, Norbert-Claude Gorin, and Loïc Fouillard. 2008. "Leukemia Inhibitory Factor: Role In Human Mesenchymal Stem Cells Mediated Immunosuppression". *Cellular Immunology* 253 (1-2): 16-22. doi:10.1016/j.cellimm.2008.06.002.
219. Nauta, Alma J., Ellie Lurvink, Alwine B. Kruisselbrink, Roelof Willemze, and Willem E. Fibbe. 2005. "Mesenchymal Stem Cells Inhibit Generation And Function Of Both Monocyte-Derived And CD34-Derived Dendritic Cells.". *Blood* 106 (11): 593-593. doi:10.1182/blood.v106.11.593.593.
220. Niemand, Claudia, Ariane Nimmesgern, Serge Haan, Patrick Fischer, Fred Schaper, Rolf Rossaint, Peter C. Heinrich, and Gerhard Müller-Newen. 2003. "Activation Of STAT3 By IL-6 And IL-10 In Primary Human Macrophages Is Differentially Modulated By Suppressor Of Cytokine Signaling 3". *The Journal Of Immunology* 170 (6): 3263-3272. doi:10.4049/jimmunol.170.6.3263.
221. Niu, Qian, Bei Cai, Zhuo-chun Huang, Yun-ying Shi, and Lan-lan Wang. 2011. "Disturbed Th17/Treg Balance In Patients With Rheumatoid Arthritis". *Rheumatology International* 32 (9): 2731-2736. doi:10.1007/s00296-011-1984-x.
222. Noack, Mélissa, and Pierre Miossec. 2017. "Selected Cytokine Pathways In Rheumatoid Arthritis". *Seminars In Immunopathology* 39 (4): 365-383. doi:10.1007/s00281-017-0619-z.
223. O'Donoghue, Anthony J., Ye Jin, Giselle M. Knudsen, Natascha C. Perera, Dieter E. Jenne, John E. Murphy, Charles S. Craik, and Terry W. Hermiston. 2013. "Global Substrate Profiling Of Proteases In Human Neutrophil Extracellular Traps Reveals Consensus Motif Predominantly Contributed By Elastase". *Plos ONE* 8 (9): e75141. doi:10.1371/journal.pone.0075141.
224. O'Neil, Liam J., and Mariana J. Kaplan. 2019. "Neutrophils In Rheumatoid Arthritis: Breaking Immune Tolerance And Fueling Disease". *Trends In Molecular Medicine* 25 (3): 215-227. doi:10.1016/j.molmed.2018.12.008.
225. Ohm, Joyce E, and David P Carbone. 2001. "VEGF As A Mediator Of Tumor-Associated Immunodeficiency". *Immunologic Research* 23 (2-3): 263-272. doi:10.1385/ir:23:2-3:263.
226. Ozao-Choy, J., G. Ma, J. Kao, G. X. Wang, M. Meseck, M. Sung, M. Schwartz, C. M. Divino, P.-Y. Pan, and S.-H. Chen. 2009. "The Novel Role Of Tyrosine Kinase Inhibitor In The Reversal Of Immune Suppression And Modulation Of Tumor Microenvironment For Immune-Based Cancer Therapies". *Cancer Research* 69 (6): 2514-2522. doi:10.1158/0008-5472.can-08-4709.

227. Papadopoulos, Nikolaos G., Georgios Z. Tsiaousis, Aikaterini Pavlitou-Tsiontsi, Anastasia Giannakou, and Vassiliki K. Galanopoulou. 2007. "Does The Presence Of Anti-CCP Autoantibodies And Their Serum Levels Influence The Severity And Activity In Rheumatoid Arthritis Patients?". *Clinical Reviews In Allergy & Immunology* 34 (1): 11-15. doi:10.1007/s12016-007-8018-1.
228. Papadopoulou, Anastasia, Minas Yiangou, Evangelia Athanasiou, Nikolaos Zogas, Panayotis Kaloyannidis, Ioannis Batsis, Athanasios Fassas, Achilles Anagnostopoulos, and Evangelia Yannaki. 2020. "Mesenchymal Stem Cells Are Conditionally Therapeutic In Preclinical Models Of Rheumatoid Arthritis."
229. Park, Chae Woon, Keun-Soo Kim, Sohyun Bae, Hye Kyeong Son, Pyung-Keun Myung, Hyo Jeong Hong, and Hoeon Kim. 2009. "Cytokine Secretion Profiling Of Human Mesenchymal Stem Cells By Antibody Array". *International Journal Of Stem Cells* 2 (1): 59-68. doi:10.15283/ijsc.2009.2.1.59.
230. Park, Min-Jung, Jun-Seop Shin, Yong-Hee Kim, So-Hee Hong, Seung-Ha Yang, Jin-Young Shin, Su-Young Kim, Bongi Kim, Jung-Sik Kim, and Chung-Gyu Park. 2010. "Murine Mesenchymal Stem Cells Suppress T Lymphocyte Activation Through IL-2 Receptor A (CD25) Cleavage By Producing Matrix Metalloproteinases". *Stem Cell Reviews And Reports* 7 (2): 381-393. doi:10.1007/s12015-010-9203-9.
231. Parks, William C., Carole L. Wilson, and Yolanda S. López-Boado. 2004. "Matrix Metalloproteinases As Modulators Of Inflammation And Innate Immunity". *Nature Reviews Immunology* 4 (8): 617-629. doi:10.1038/nri1418.
232. Parsonage, Greg, Andrew D. Filer, Oliver Haworth, Gerard B. Nash, G. Ed Rainger, Michael Salmon, and Christopher D. Buckley. 2005. "A Stromal Address Code Defined By Fibroblasts". *Trends In Immunology* 26 (3): 150-156. doi:10.1016/j.it.2004.11.014.
233. Passos, Geraldo A., Cesar A. Speck-Hernandez, Amanda F. Assis, and Daniella A. Mendes-da-Cruz. 2017. "Update On Aire And Thymic Negative Selection". *Immunology* 153 (1): 10-20. doi:10.1111/imm.12831.
234. Patel, Shyam A., Justin R. Meyer, Steven J. Greco, Kelly E. Corcoran, Margarette Bryan, and Pranela Rameshwar. 2010. "Mesenchymal Stem Cells Protect Breast Cancer Cells Through Regulatory T Cells: Role Of Mesenchymal Stem Cell-Derived TGF-B". *The Journal Of Immunology* 184 (10): 5885-5894. doi:10.4049/jimmunol.0903143.
235. Pautz, Andrea, Julia Art, Susanne Hahn, Sebastian Nowag, Cornelia Voss, and Hartmut Kleinert. 2010. "Regulation Of The Expression Of Inducible Nitric Oxide Synthase". *Nitric Oxide* 23 (2): 75-93. doi:10.1016/j.niox.2010.04.007.
236. Perricone, Carlo, and Yehuda Shoenfeld. 2019. "The Novel Aspects On The Mosaic Of Autoimmunity". *Mosaic Of Autoimmunity*, 7-11. doi:10.1016/b978-0-12-814307-0.00002-5.
237. Pettit, Allison R., Hong Ji, Dietrich von Stechow, Ralph Müller, Steven R. Goldring, Yongwon Choi, Christophe Benoist, and Ellen M. Gravallese. 2001. "TRANCE/RANKL Knock-out Mice Are Protected From Bone Erosion In A Serum Transfer Model Of Arthritis". *The American Journal Of Pathology* 159 (5): 1689-1699. doi:10.1016/s0002-9440(10)63016-7.
238. Phillips, Carl V, and Karen J Goodman. 2004. *Epidemiologic Perspectives & Innovations* 1 (1): 3. doi:10.1186/1742-5573-1-3.
239. Pianta, Stefano, Patrizia Bonassi Signoroni, Ivan Muradore, Melissa Francis Rodrigues, Daniele Rossi, Antonietta Silini, and Ornella Parolini. 2014. "Amniotic Membrane Mesenchymal Cells-Derived Factors Skew T Cell Polarization Toward Treg And Downregulate Th1 And Th17 Cells Subsets". *Stem Cell Reviews And Reports* 11 (3): 394-407. doi:10.1007/s12015-014-9558-4.
240. Pisetsky, David S. 2017. "Antinuclear Antibody Testing — Misunderstood Or Misbegotten?". *Nature Reviews Rheumatology* 13 (8): 495-502. doi:10.1038/nrrheum.2017.74.
241. Pittenger, M. F. 1999. "Multilineage Potential Of Adult Human Mesenchymal Stem Cells". *Science* 284 (5411): 143-147. doi:10.1126/science.284.5411.143.
242. Polyak, K, J Y Kato, M J Solomon, C J Sherr, J Massague, J M Roberts, and A Koff. 1994. "P27kip1, A Cyclin-Cdk Inhibitor, Links Transforming Growth Factor-Beta And Contact Inhibition To Cell Cycle Arrest.". *Genes & Development* 8 (1): 9-22. doi:10.1101/gad.8.1.9.

243. Pope, Richard M., and Shiva Shahrara. 2012. "Possible Roles Of IL-12-Family Cytokines In Rheumatoid Arthritis". *Nature Reviews Rheumatology* 9 (4): 252-256. doi:10.1038/nrrheum.2012.170.
244. Procaccini, Claudio, and Giuseppe Matarese. 2012. "Regulatory T Cells, Mtor Kinase, And Metabolic Activity". *Cellular And Molecular Life Sciences* 69 (23): 3975-3987. doi:10.1007/s00018-012-1058-6.
245. Rafei, Moutih, Jeremy Hsieh, Simon Fortier, MengYang Li, Shala Yuan, Elena Birman, and Kathy Forner et al. 2008. "Mesenchymal Stromal Cell–Derived CCL2 Suppresses Plasma Cell Immunoglobulin Production Via STAT3 Inactivation And PAX5 Induction". *Blood* 112 (13): 4991-4998. doi:10.1182/blood-2008-07-166892.
246. Ramhorst, Rosanna E, Verónica E García, Adriana Corigliano, Gabriel A Rabinovich, and Leonardo Fainboim. 2004. "Identification Of RANTES As A Novel Immunomodulator Of The Maternal Allogeneic Response". *Clinical Immunology* 110 (1): 71-80. doi:10.1016/j.clim.2003.09.011.
247. Rao, Deepak A., Michael F. Gurish, Jennifer L. Marshall, Kamil Slowikowski, Chamith Y. Fonseka, Yanyan Liu, and Laura T. Donlin et al. 2017. "Pathologically Expanded Peripheral T Helper Cell Subset Drives B Cells In Rheumatoid Arthritis". *Nature* 542 (7639): 110-114. doi:10.1038/nature20810.
248. Redlich, Kurt, Silvia Hayer, Romeo Ricci, Jean-Pierre David, Makiyeh Tohidast-Akrad, George Kollias, Günter Steiner, Josef S. Smolen, Erwin F. Wagner, and Georg Schett. 2002. "Osteoclasts Are Essential For TNF-A–Mediated Joint Destruction". *Journal Of Clinical Investigation* 110 (10): 1419-1427. doi:10.1172/jci0215582.
249. Reichert, Cadiele Oliana, Joel da Cunha, Débora Levy, Luciana Morganti Ferreira Maselli, Sérgio Paulo Bydlowski, and Celso Spada. 2020. "Regulatory T Lymphocytes (Treg): Modulation And Clinical Application."
250. Ren, Guangwen, Liying Zhang, Xin Zhao, Guangwu Xu, Yingyu Zhang, Arthur I. Roberts, Robert Chunhua Zhao, and Yufang Shi. 2008. "Mesenchymal Stem Cell-Mediated Immunosuppression Occurs Via Concerted Action Of Chemokines And Nitric Oxide". *Cell Stem Cell* 2 (2): 141-150. doi:10.1016/j.stem.2007.11.014.
251. Rice, Marnie E., and Grant T. Harris. 2005. "Comparing Effect Sizes In Follow-Up Studies: ROC Area, Cohen's D, And R.". *Law And Human Behavior* 29 (5): 615-620. doi:10.1007/s10979-005-6832-7.
252. Romano, Barbara, Sudharshan Elangovan, Marco Erreni, Emanuela Sala, Luciana Petti, Paolo Kunderfranco, and Luca Massimino et al. 2019. "TNF-Stimulated Gene-6 Is A Key Regulator In Switching Stemness And Biological Properties Of Mesenchymal Stem Cells". *STEM CELLS* 37 (7): 973-987. doi:10.1002/stem.3010.
253. Rosado, Maria Manuela, Maria Ester Bernardo, Marco Scarsella, Antonella Conforti, Ezio Giorda, Simone Biagini, and Simona Cascioli et al. 2015. "Inhibition Of B-Cell Proliferation And Antibody Production By Mesenchymal Stromal Cells Is Mediated By T Cells". *Stem Cells And Development* 24 (1): 93-103. doi:10.1089/scd.2014.0155.
254. Rose-John, Stefan. 2012. "IL-6 Trans-Signaling Via The Soluble IL-6 Receptor: Importance For The Pro-Inflammatory Activities Of IL-6". *International Journal Of Biological Sciences* 8 (9): 1237-1247. doi:10.7150/ijbs.4989.
255. Rouas-Freiss, N., R. M.-B. Goncalves, C. Menier, J. Dausset, and E. D. Carosella. 1997. "Direct Evidence To Support The Role Of HLA-G In Protecting The Fetus From Maternal Uterine Natural Killer Cytolysis". *Proceedings Of The National Academy Of Sciences* 94 (21): 11520-11525. doi:10.1073/pnas.94.21.11520.
256. Rountree, Ryan B, Michael Schoor, Hao Chen, Melissa E Marks, Vincent Harley, Yuji Mishina, and David M Kingsley. 2004. "BMP Receptor Signaling Is Required For Postnatal Maintenance Of Articular Cartilage". *Plos Biology* 2 (11): e355. doi:10.1371/journal.pbio.0020355.
257. Rozenberg, Ayal, Ayman Rezk, Marie-Noëlle Boivin, Peter J. Darlington, Mukanthu Nyirenda, Rui Li, and Farzaneh Jalili et al. 2016. "Human Mesenchymal Stem Cells Impact Th17 And Th1 Responses Through A Prostaglandin E2 And Myeloid-Dependent Mechanism". *STEM CELLS Translational Medicine* 5 (11): 1506-1514. doi:10.5966/sctm.2015-0243.
258. Rusterholz, Corinne, Patricia Corthésy Henrioud, and Markus Nabholz. 1999. "Interleukin-2 (IL-2) Regulates The Accessibility Of The IL-2-Responsive Enhancer In The IL-2 Receptor A Gene To Transcription Factors". *Molecular And Cellular Biology* 19 (4): 2681-2689. doi:10.1128/mcb.19.4.2681.

259. Sakaguchi, Shimon, Masahiro Ono, Ruka Setoguchi, Haruhiko Yagi, Shohei Hori, Zoltan Fehervari, Jun Shimizu, Takeshi Takahashi, and Takashi Nomura. 2006. "FoxP3+CD25+CD4+ Natural Regulatory T Cells In Dominant Self-Tolerance And Autoimmune Disease". *Immunological Reviews* 212 (1): 8-27. doi:10.1111/j.0105-2896.2006.00427.x.
260. Sakaguchi, Yusuke, Ichiro Sekiya, Kazuyoshi Yagishita, and Takeshi Muneta. 2005. "Comparison Of Human Stem Cells Derived From Various Mesenchymal Tissues: Superiority Of Synovium As A Cell Source". *Arthritis & Rheumatism* 52 (8): 2521-2529. doi:10.1002/art.21212.
261. Sánchez-Abarca, Luis Ignacio, Isabel Álvarez-Laderas, María Díez Campelo, Teresa Caballero-Velázquez, Carmen Herrero, Sandra Muntión, and Cristina Calderón et al. 2013. "Uptake And Delivery Of Antigens By Mesenchymal Stromal Cells". *Cytotherapy* 15 (6): 673-678. doi:10.1016/j.jcyt.2013.01.216.
262. Sato, Kazuya, Katsutoshi Ozaki, Iekuni Oh, Akiko Meguro, Keiko Hatanaka, Tadashi Nagai, Kazuo Muroi, and Keiya Ozawa. 2006. "Nitric Oxide Plays A Critical Role In Suppression Of T-Cell Proliferation By Mesenchymal Stem Cells". *Blood* 109 (1): 228-234. doi:10.1182/blood-2006-02-002246.
263. Schall, Thomas J. 1991. "Biology Of The Rantes/Sis Cytokine Family". *Cytokine* 3 (3): 165-183. doi:10.1016/1043-4666(91)90013-4.
264. Schett, Georg, Dirk Elewaut, Iain B. McInnes, Jean-Michel Dayer, and Markus F. Neurath. 2013. "How Cytokine Networks Fuel Inflammation: Toward A Cytokine-Based Disease Taxonomy". *Nature Medicine* 19 (7): 822-824. doi:10.1038/nm.3260.
265. Schmidt, Angelika, Xing-Mei Zhang, Rubin N Joshi, Shasina Iqbal, Casper Wahlund, Susanne Gabrielsson, Robert A Harris, and Jesper Tegnér. 2016. "Human Macrophages Induce CD4+FoxP3+Regulatory T Cells Via Binding And Re-Release Of TGF-B". *Immunology & Cell Biology* 94 (8): 747-762. doi:10.1038/icb.2016.34.
266. Schunemann, H., S. Hill, G. Guyatt, E. A. Akl, and F. Ahmed. 2010. "The GRADE Approach And Bradford Hill's Criteria For Causation". *Journal Of Epidemiology & Community Health* 65 (5): 392-395. doi:10.1136/jech.2010.119933.
267. Sekiya, Ichiro, Miyoko Ojima, Shiro Suzuki, Mika Yamaga, Masafumi Horie, Hideyuki Koga, and Kunikazu Tsuji et al. 2011. "Human Mesenchymal Stem Cells In Synovial Fluid Increase In The Knee With Degenerated Cartilage And Osteoarthritis". *Journal Of Orthopaedic Research* 30 (6): 943-949. doi:10.1002/jor.22029.
268. Selmani, Zohair, Abderrahim Naji, Emilie Gaiffe, Laurent Obert, Pierre Tiberghien, Nathalie Rouas-Freiss, Edgardo D. Carosella, and Frédéric Deschaseaux. 2009. "HLA-G Is A Crucial Immunosuppressive Molecule Secreted By Adult Human Mesenchymal Stem Cells". *Transplantation* 87 (Supplement): S62-S66. doi:10.1097/tp.0b013e3181a2a4b3.
269. Selmani, Zohair, Abderrahim Naji, Ines Zidi, Benoit Favier, Emilie Gaiffe, Laurent Obert, and Christophe Borg et al. 2008. "Human Leukocyte Antigen-G5 Secretion By Human Mesenchymal Stem Cells Is Required To Suppress T Lymphocyte And Natural Killer Function And To Induce CD4+Cd25highFoxP3+Regulatory T Cells". *Stem Cells* 26 (1): 212-222. doi:10.1634/stemcells.2007-0554.
270. Sen, Malini, Mario Chamorro, Jack Reifert, Maripat Corr, and Dennis A. Carson. 2001. "Blockade Of Wnt-5A/Frizzled 5 Signaling Inhibits Rheumatoid Synoviocyte Activation". *Arthritis & Rheumatism* 44 (4): 772-781. doi:10.1002/1529-0131(200104)44:4<772::aid-anr133>3.0.co;2-l.
271. Senger, D., S. Galli, A. Dvorak, C. Perruzzi, V. Harvey, and H. Dvorak. 1983. "Tumor Cells Secrete A Vascular Permeability Factor That Promotes Accumulation Of Ascites Fluid". *Science* 219 (4587): 983-985. doi:10.1126/science.6823562.
272. Shen, Yi, Ingrid G. Winkler, Valerie Barbier, Natalie A. Sims, Jean Hendy, and Jean-Pierre Lévesque. 2010. "Tissue Inhibitor Of Metalloproteinase-3 (TIMP-3) Regulates Hematopoiesis And Bone Formation In Vivo". *Plos ONE* 5 (9): e13086. doi:10.1371/journal.pone.0013086.
273. Shi, J., R. Knevel, P. Suwannalai, M. P. van der Linden, G. M. C. Janssen, P. A. van Veelen, and N. E. W. Levarht et al. 2011. "Autoantibodies Recognizing Carbamylated Proteins Are Present In Sera Of Patients With Rheumatoid Arthritis And Predict Joint Damage". *Proceedings Of The National Academy Of Sciences* 108 (42): 17372-17377. doi:10.1073/pnas.1114465108.

274. Shi, Jing, Lotte A. van de Stadt, E. W. Nivine Levarht, Tom W. J. Huizinga, René E. M. Toes, Leendert A. Trouw, and Dirkjan van Schaardenburg. 2013. "Brief Report: Anti-Carbamylated Protein Antibodies Are Present In Arthralgia Patients And Predict The Development Of Rheumatoid Arthritis". *Arthritis & Rheumatism* 65 (4): 911-915. doi:10.1002/art.37830.
275. Shi, Jing, Peter A. van Veelen, Michael Mahler, George M.C. Janssen, Jan W. Drijfhout, Tom W.J. Huizinga, Rene E.M. Toes, and Leendert A. Trouw. 2014. "Carbamylation And Antibodies Against Carbamylated Proteins In Autoimmunity And Other Pathologies". *Autoimmunity Reviews* 13 (3): 225-230. doi:10.1016/j.autrev.2013.10.008.
276. Skalska, Urszula, and Ewa Kontny. 2015. "Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells From Infrapatellar Fat Pad Of Patients With Rheumatoid Arthritis And Osteoarthritis Have Comparable Immunomodulatory Properties". *Autoimmunity* 49 (2): 124-131. doi:10.3109/08916934.2015.1113267.
277. Smith, William L., R. Michael Garavito, and David L. DeWitt. 1996. "Prostaglandin Endoperoxide H Synthases (Cyclooxygenases)-1 And −2". *Journal Of Biological Chemistry* 271 (52): 33157-33160. doi:10.1074/jbc.271.52.33157.
278. Smolen, Josef S, Robert B M Landewé, Johannes W J Bijlsma, Gerd R Burmester, Maxime Dougados, Andreas Kerschbaumer, and Iain B McInnes et al. 2020. "EULAR Recommendations For The Management Of Rheumatoid Arthritis With Synthetic And Biological Disease-Modifying Antirheumatic Drugs: 2019 Update."
279. Soker, Shay, Seiji Takashima, Hua Quan Miao, Gera Neufeld, and Michael Klagsbrun. 1998. "Neuropilin-1 Is Expressed By Endothelial And Tumor Cells As An Isoform-Specific Receptor For Vascular Endothelial Growth Factor". *Cell* 92 (6): 735-745. doi:10.1016/s0092-8674(00)81402-6.
280. Solomon, Daniel H., Elizabeth W. Karlson, Eric B. Rimm, Carolyn C. Cannuscio, Lisa A. Mandl, JoAnn E. Manson, Meir J. Stampfer, and Gary C. Curhan. 2003. "Cardiovascular Morbidity And Mortality In Women Diagnosed With Rheumatoid Arthritis". *Circulation* 107 (9): 1303-1307. doi:10.1161/01.cir.0000054612.26458.b2.
281. Song, Y.W., and E.H. Kang. 2009. "Autoantibodies In Rheumatoid Arthritis: Rheumatoid Factors And Anticitrullinated Protein Antibodies". *QJM* 103 (3): 139-146. doi:10.1093/qjmed/hcp165.
282. Sotiropoulou, Panagiota A., Sonia A. Perez, Angelos D. Gritzapis, Constantin N. Baxevanis, and Michael Papamichail. 2006. "Interactions Between Human Mesenchymal Stem Cells And Natural Killer Cells". *Stem Cells* 24 (1): 74-85. doi:10.1634/stemcells.2004-0359.
283. Spaggiari, Grazia Maria, Heba Abdelrazik, Flavio Becchetti, and Lorenzo Moretta. 2009. "Mscs Inhibit Monocyte-Derived DC Maturation And Function By Selectively Interfering With The Generation Of Immature Dcs: Central Role Of MSC-Derived Prostaglandin E2". *Blood* 113 (26): 6576-6583. doi:10.1182/blood-2009-02-203943.
284. Stagg, John, Sandra Pommey, Nicoletta Eliopoulos, and Jacques Galipeau. 2006. "Interferon-Γ-Stimulated Marrow Stromal Cells: A New Type Of Nonhematopoietic Antigen-Presenting Cell". *Blood* 107 (6): 2570-2577. doi:10.1182/blood-2005-07-2793.
285. Strobl, Herbert, and Walter Knapp. 1999. "TGF-B Regulation Of Dendritic Cells". *Microbes And Infection* 1 (15): 1283-1290. doi:10.1016/s1286-4579(99)00256-7.
286. Suen, Jau-Ling, Hsiao-Ting Li, Yuh-Jyh Jong, Bor-Luen Chiang, and Jeng-Hsien Yen. 2009. "Altered Homeostasis Of CD4+ FoxP3+Regulatory T-Cell Subpopulations In Systemic Lupus Erythematosus". *Immunology* 127 (2): 196-205. doi:10.1111/j.1365-2567.2008.02937.x.
287. Sunderkötter, Cord, Kerstin Steinbrink, Matthias Goebeler, Ranjit Bhardwaj, and Clemens Sorg. 1994. "Macrophages And Angiogenesis". *Journal Of Leukocyte Biology* 55 (3): 410-422. doi:10.1002/jlb.55.3.410.
288. Suzuki, Hiroyuki, Hideya Onishi, Junji Wada, Akio Yamasaki, Haruo Tanaka, Kenji Nakano, Takashi Morisaki, and Mitsuo Katano. 2009. "VEGFR2 Is Selectively Expressed By FoxP3high CD4+ Treg". *European Journal Of Immunology* 40 (1): 197-203. doi:10.1002/eji.200939887.
289. Takahashi, T., Y. Kuniyasu, M. Toda, N. Sakaguchi, M. Itoh, M. Iwata, J. Shimizu, and S. Sakaguchi. 1998. "Immunologic Self-Tolerance Maintained By CD25+CD4+ Naturally Anergic And Suppressive T Cells:

Induction Of Autoimmune Disease By Breaking Their Anergic/Suppressive State.". *International Immunology* 10 (12): 1969-1980. doi:10.1093/intimm/10.12.1969.

290. Takaki, Hiromi, Kenji Ichiyama, Keiko Koga, Takatoshi Chinen, Giichi Takaesu, Yuki Sugiyama, Shigeaki Kato, Akihiko Yoshimura, and Takashi Kobayashi. 2008. "STAT6 Inhibits TGF-B-Mediated FoxP3 Induction Through Direct Binding To TheFoxP3promoter, Which Is Reverted By Retinoic Acid Receptor". *Journal Of Biological Chemistry* 283 (22): 14955-14962. doi:10.1074/jbc.m801123200.
291. Takimoto, Tomohito, Yu Wakabayashi, Takashi Sekiya, Naoko Inoue, Rimpei Morita, Kenji Ichiyama, and Reiko Takahashi et al. 2010. "Correction: Smad2 And Smad3 Are Redundantly Essential For The TGF-B–Mediated Regulation Of Regulatory T Plasticity And Th1 Development". *The Journal Of Immunology* 186 (1): 632-632. doi:10.4049/jimmunol.1090121.
292. Tanaka, Toshio. 2013. "Can IL-6 Blockade Rectify Imbalance Between Tregs And Th17 Cells?". *Immunotherapy* 5 (7): 695-697. doi:10.2217/imt.13.47.
293. Tatara, Raine, Katsutoshi Ozaki, Yuji Kikuchi, Keiko Hatanaka, Iekuni Oh, Akiko Meguro, Haruko Matsu, Kazuya Sato, and Keiya Ozawa. 2011. "Mesenchymal Stromal Cells Inhibit Th17 But Not Regulatory T-Cell Differentiation". *Cytotherapy* 13 (6): 686-694. doi:10.3109/14653249.2010.542456.
294. Taylor, A. W. 2008. "Review Of The Activation Of TGF- In Immunity". *Journal Of Leukocyte Biology* 85 (1): 29-33. doi:10.1189/jlb.0708415.
295. Terme, M., S. Pernot, E. Marcheteau, F. Sandoval, N. Benhamouda, O. Colussi, O. Dubreuil, A. F. Carpentier, E. Tartour, and J. Taieb. 2012. "VEGFA-VEGFR Pathway Blockade Inhibits Tumor-Induced Regulatory T-Cell Proliferation In Colorectal Cancer". *Cancer Research* 73 (2): 539-549. doi:10.1158/0008-5472.can-12-2325.
296. Tillack, Kati, Petra Breiden, Roland Martin, and Mireia Sospedra. 2012. "T Lymphocyte Priming By Neutrophil Extracellular Traps Links Innate And Adaptive Immune Responses". *The Journal Of Immunology* 188 (7): 3150-3159. doi:10.4049/jimmunol.1103414.
297. Tobón, Gabriel J., Pierre Youinou, and Alain Saraux. 2010. "The Environment, Geo-Epidemiology, And Autoimmune Disease: Rheumatoid Arthritis". *Journal Of Autoimmunity* 35 (1): 10-14. doi:10.1016/j.jaut.2009.12.009.
298. Toh, Myew-Ling, Gaelle Gonzales, Marije I. Koenders, Anne Tournadre, David Boyle, Erik Lubberts, Yuan Zhou, Gary S. Firestein, Wim B. van den Berg, and Pierre Miossec. 2010. "Role Of Interleukin 17 In Arthritis Chronicity Through Survival Of Synoviocytes Via Regulation Of Synoviolin Expression". *Plos ONE* 5 (10): e13416. doi:10.1371/journal.pone.0013416.
299. Tokoyoda, Koji, Takeshi Egawa, Tatsuki Sugiyama, Byung-Il Choi, and Takashi Nagasawa. 2004. "Cellular Niches Controlling B Lymphocyte Behavior Within Bone Marrow During Development". *Immunity* 20 (6): 707-718. doi:10.1016/j.immuni.2004.05.001.
300. Tone, Yukiko, Keiji Furuuchi, Yoshitsugu Kojima, Mark L Tykocinski, Mark I Greene, and Masahide Tone. 2007. "Smad3 And NFAT Cooperate To Induce FoxP3 Expression Through Its Enhancer". *Nature Immunology* 9 (2): 194-202. doi:10.1038/ni1549.
301. Torres-Torrillas, Marta, Monica Rubio, Elena Damia, Belen Cuervo, Ayla del Romero, Pau Peláez, Deborah Chicharro, Laura Miguel, and Joaquin J. Sopena. 2019. "Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells: A Promising Tool In The Treatment Of Musculoskeletal Diseases". *International Journal Of Molecular Sciences* 20 (12): 3105. doi:10.3390/ijms20123105.
302. Tree, T. I. M., J. Lawson, H. Edwards, A. Skowera, S. Arif, B. O. Roep, and M. Peakman. 2010. "Naturally Arising Human CD4 T-Cells That Recognize Islet Autoantigens And Secrete Interleukin-10 Regulate Proinflammatory T-Cell Responses Via Linked Suppression". *Diabetes* 59 (6): 1451-1460. doi:10.2337/db09-0503.
303. Uccelli, Antonio, Lorenzo Moretta, and Vito Pistoia. 2008. "Mesenchymal Stem Cells In Health And Disease". *Nature Reviews Immunology* 8 (9): 726-736. doi:10.1038/nri2395.
304. Ungerer, Christopher, Patricia Quade-Lyssy, Heinfried H. Radeke, Reinhard Henschler, Christoph Königs, Ulrike Köhl, Erhard Seifried, and Jörg Schüttrumpf. 2014. "Galectin-9 Is A Suppressor Of T And B Cells And

Predicts The Immune Modulatory Potential Of Mesenchymal Stromal Cell Preparations". *Stem Cells And Development* 23 (7): 755-766. doi:10.1089/scd.2013.0335.

305. Vacca, Paola, Elisa Montaldo, Chiara Vitale, Daniele Croxatto, Lorenzo Moretta, and Maria Cristina Mingari. 2015. "MSC And Innate Immune Cell Interactions: A Lesson From Human Decidua". *Immunology Letters* 168 (2): 170-174. doi:10.1016/j.imlet.2015.05.006.
306. van Amelsfort, Jocea M. R., Joel A. G. van Roon, Madelon Noordegraaf, Kim M. G. Jacobs, Johannes W. J. Bijlsma, Floris P. J. G. Lafeber, and Leonie S. Taams. 2007. "Proinflammatory Mediator–Induced Reversal Of CD4+,CD25+ Regulatory T Cell–Mediated Suppression In Rheumatoid Arthritis". *Arthritis & Rheumatism* 56 (3): 732-742. doi:10.1002/art.22414.
307. van der Heijde, d. m. f. m., p. l. c. m. van riel, m. a. van leeuwen, m. a. van't hof, m. h. van rijswijk, and l. b. a. van de putte. 1992. "Prognostic Factors For Radiographic Damage And Physical Disability In Early Rheumatoid Arthritis. A Prospective Follow-Up Study Of 147 Patients". *Rheumatology* 31 (8): 519-525. doi:10.1093/rheumatology/31.8.519.
308. van der Helm-van Mil, Annette H. M, Joanna Z Wesoly, and Tom W. J Huizinga. 2005. "Understanding The Genetic Contribution To Rheumatoid Arthritis". *Current Opinion In Rheumatology* 17 (3): 299-304. doi:10.1097/01.bor.0000160780.13012.be.
309. van der Woude, Diane, Jeanine J. Houwing-Duistermaat, René E. M. Toes, Tom W. J. Huizinga, Wendy Thomson, Jane Worthington, Annette H. M. van der Helm-van Mil, and René R. P. de Vries. 2009. "Quantitative Heritability Of Anti-Citrullinated Protein Antibody-Positive And Anti-Citrullinated Protein Antibody-Negative Rheumatoid Arthritis". *Arthritis & Rheumatism* 60 (4): 916-923. doi:10.1002/art.24385.
310. van Hamburg, J. P., P. S. Asmawidjaja, N. Davelaar, A. M. C. Mus, E. M. Colin, J. M. W. Hazes, R. J. E. M. Dolhain, and E. Lubberts. 2010. "Th17 Cells, But Not Th1 Cells, From Patients With Early Rheumatoid Arthritis Are Potent Inducers Of Matrix Metalloproteinases And Proinflammatory Cytokines Upon Synovial Fibroblast Interaction, Including Autocrine Interleukin-17A Production". *Arthritis & Rheumatism* 63 (1): 73-83. doi:10.1002/art.30093.
311. van Schouwenburg, Pauline A., Theo Rispens, and Gerrit Jan Wolbink. 2013. "Immunogenicity Of Anti-TNF Biologic Therapies For Rheumatoid Arthritis". *Nature Reviews Rheumatology* 9 (3): 164-172. doi:10.1038/nrrheum.2013.4.
312. van Tuyl, L. H. D., A. E. Voskuyl, M. Boers, P. Geusens, R. B. M. Landewe, B. A. C. Dijkmans, and W. F. Lems. 2010. "Baseline RANKL:OPG Ratio And Markers Of Bone And Cartilage Degradation Predict Annual Radiological Progression Over 11 Years In Rheumatoid Arthritis". *Annals Of The Rheumatic Diseases* 69 (9): 1623-1628. doi:10.1136/ard.2009.121764.
313. Vandenabeele, F., C. De Bari, M. Moreels, I. Lambrichts, F. Dell'Accio, P. L. Lippens, and F. P. Luyten. 2003. "Morphological And Immunocytochemical Characterization Of Cultured Fibroblast-Like Cells Derived From Adult Human Synovial Membrane". *Archives Of Histology And Cytology* 66 (2): 145-153. doi:10.1679/aohc.66.145.
314. Vasilev, Georgi, Mariana Ivanova, Ekaterina Ivanova-Todorova, Kalina Tumangelova-Yuzeir, Ekaterina Krasimirova, Rumen Stoilov, and Dobroslav Kyurkchiev. 2019. "Secretory Factors Produced By Adipose Mesenchymal Stem Cells Downregulate Th17 And Increase Treg Cells In Peripheral Blood Mononuclear Cells From Rheumatoid Arthritis Patients". *Rheumatology International* 39 (5): 819-826. doi:10.1007/s00296-019-04296-7.
315. Verma, Nandini, Indrajit Chaudhury, Deepak Kumar, and Rakha H. Das. 2009. "Silencing Of TNF-A Receptors Coordinately Suppresses TNF-A Expression Through NF-Kb Activation Blockade In THP-1 Macrophage". *FEBS Letters* 583 (17): 2968-2974. doi:10.1016/j.febslet.2009.08.007.
316. Vitale, Giovanni, Alessandra Dicitore, Davide Gentilini, and Francesco Cavagnini. 2010. "Immunomodulatory Effects Of VEGF: Clinical Implications Of VEGF-Targeted Therapy In Human Cancer". *Cancer Biology & Therapy* 9 (9): 694-698. doi:10.4161/cbt.9.9.11691.

317. Voron, Thibault, Orianne Colussi, Elie Marcheteau, Simon Pernot, Mevyn Nizard, Anne-Laure Pointet, and Sabrina Latreche et al. 2015. "SVEGF-AModulates Expression Of Inhibitory Checkpoints On CD8+ T Cells In Tumors". *The Journal Of Experimental Medicine* 212 (2): 139-148. doi:10.1084/jem.20140559.
318. Vossenaar, Erik R., Albert J.W. Zendman, Walther J. van Venrooij, and Ger J.M. Pruijn. 2003. "PAD, A Growing Family Of Citrullinating Enzymes: Genes, Features And Involvement In Disease". *Bioessays* 25 (11): 1106-1118. doi:10.1002/bies.10357.
319. Walker, Lucy S. K. 2004. "CD4+ CD25+ Treg: Divide And Rule?". *Immunology* 111 (2): 129-137. doi:10.1111/j.0019-2805.2003.01788.x.
320. Wang, Liming, Lihua Wang, Xiuli Cong, Guangyang Liu, Jianjun Zhou, Bin Bai, and Yang Li et al. 2013. "Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Therapy For Patients With Active Rheumatoid Arthritis: Safety And Efficacy". *Stem Cells And Development* 22 (24): 3192-3202. doi:10.1089/scd.2013.0023.
321. Wang, Qin, Xiaofeng Li, Jing Luo, Li Zhang, Lihui Ma, Zhiqin Lv, and Lijin Xue. 2012. "The Allogeneic Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Regulate The Function Of T Helper 17 Cells From Patients With Rheumatoid Arthritis In An In Vitro Co-Culture System". *BMC Musculoskeletal Disorders* 13 (1). doi:10.1186/1471-2474-13-249.
322. Warrington, Kenneth J., Seisuke Takemura, Jorg J. Goronzy, and Cornelia M. Weyand. 2001. "CD4+,CD28? T Cells In Rheumatoid Arthritis Patients Combine Features Of The Innate And Adaptive Immune Systems". *Arthritis & Rheumatism* 44 (1): 13-20. doi:10.1002/1529-0131(200101)44:1<13::aid-anr3>3.0.co;2-6.
323. Waterman, Ruth S., Suzanne L. Tomchuck, Sarah L. Henkle, and Aline M. Betancourt. 2010. "A New Mesenchymal Stem Cell (MSC) Paradigm: Polarization Into A Pro-Inflammatory MSC1 Or An Immunosuppressive MSC2 Phenotype". *Plos ONE* 5 (4): e10088. doi:10.1371/journal.pone.0010088.
324. Weber, Christian, Kim S. C. Weber, Christiane Klier, Songhai Gu, Rudolf Wank, Richard Horuk, and Peter J. Nelson. 2001. "Specialized Roles Of The Chemokine Receptors CCR1 And CCR5 In The Recruitment Of Monocytes And TH1-Like/CD45RO+T Cells". *Blood* 97 (4): 1144-1146. doi:10.1182/blood.v97.4.1144.
325. Wegner, Natalia, Robin Wait, Aneta Sroka, Sigrun Eick, Ky-Anh Nguyen, Karin Lundberg, Andrew Kinloch, Shauna Culshaw, Jan Potempa, and Patrick J. Venables. 2010. "Peptidylarginine Deiminase From Porphyromonas Gingivalis Citrullinates Human Fibrinogen And A-Enolase: Implications For Autoimmunity In Rheumatoid Arthritis". *Arthritis & Rheumatism* 62 (9): 2662-2672. doi:10.1002/art.27552.
326. Wehr, P., H. Purvis, S.-C. Law, and R. Thomas. 2019. "Dendritic Cells, T Cells And Their Interaction In Rheumatoid Arthritis". *Clinical & Experimental Immunology* 196 (1): 12-27. doi:10.1111/cei.13256.
327. Werner, Frank, Mukesh K. Jain, Mark W. Feinberg, Nicholas E. S. Sibinga, Andrea Pellacani, Philippe Wiesel, Michael T. Chin, James N. Topper, Mark A. Perrella, and Mu-En Lee. 2000. "Transforming Growth Factor-B1 Inhibition Of Macrophage Activation Is Mediated Via Smad3". *Journal Of Biological Chemistry* 275 (47): 36653-36658. doi:10.1074/jbc.m004536200.
328. Wernicke, Dirk, Claudia Schulze-Westhoff, Peter Petrow, Rolf Breuer, Josef Zacher, Steffen Gay, and Erika Gromnica-Ihle. 2002. "Stimulation Of Collagenase 3 Expression In Synovial Fibroblasts Of Patients With Rheumatoid Arthritis By Contact With A Three-Dimensional Collagen Matrix Or With Normal Cartilage When Coimplanted In NOD/SCID Mice". *Arthritis & Rheumatism* 46 (1): 64-74. doi:10.1002/1529-0131(200201)46:1<64::aid-art10069>3.0.co;2-q.
329. Weyand, C M, T G McCarthy, and J J Goronzy. 1995. "Correlation Between Disease Phenotype And Genetic Heterogeneity In Rheumatoid Arthritis.". *Journal Of Clinical Investigation* 95 (5): 2120-2126. doi:10.1172/jci117900.
330. Whiteside, Theresa L., and Edwin K. Jackson. 2013. "Adenosine And Prostaglandin E2 Production By Human Inducible Regulatory T Cells In Health And Disease". *Frontiers In Immunology* 4. doi:10.3389/fimmu.2013.00212.
331. Willemze, Annemiek, Leendert A. Trouw, René E. M. Toes, and Tom W. J. Huizinga. 2012. "The Influence Of ACPA Status And Characteristics On The Course Of RA". *Nature Reviews Rheumatology* 8 (3): 144-152. doi:10.1038/nrrheum.2011.204.

332. Wisniewski, Hans-Georg, and Jan Vilĉek. 1997. "TSG-6: An IL-1 /TNF-Inducible Protein With Anti-Inflammatory Activity". *Cytokine & Growth Factor Reviews* 8 (2): 143-156. doi:10.1016/s1359-6101(97)00008-7.
333. Wolfraim, Lawrence A., Thomas M. Walz, Zakiya James, Tania Fernandez, and John J. Letterio. 2004. "P21cip1 And P27kip1 Act In Synergy To Alter The Sensitivity Of Naive T Cells To TGF-B-Mediated G1 Arrest Through Modulation Of IL-2 Responsiveness". *The Journal Of Immunology* 173 (5): 3093-3102. doi:10.4049/jimmunol.173.5.3093.
334. Wynckel, Alain, Christine Randoux, Hervé Millart, Catherine Desroches, Philippe Gillery, Eric Canivet, and Jacques Chanard. 2000. "Kinetics Of Carbamylated Haemoglobin In Acute Renal Failure". *Nephrology Dialysis Transplantation* 15 (8): 1183-1188. doi:10.1093/ndt/15.8.1183.
335. Xiao, Hong, Shun Wang, RunSheng Miao, and WuSheng Kan. 2011. "TRAIL Is Associated With Impaired Regulation Of CD4+CD25− T Cells By Regulatory T Cells In Patients With Rheumatoid Arthritis". *Journal Of Clinical Immunology* 31 (6): 1112-1119. doi:10.1007/s10875-011-9559-x.
336. Xiao, Sheng, Hulin Jin, Sue Liu, Thomas Korn, Mohamed Oukka, Bing Lim, and Vijay Kuchroo. 2008. "F.37. Retinoic Acid Increases FoxP3+ Regulatory T Cells And Inhibits Development Of Th17 Cells By Enhancing TGF-B-Driven Smad3 Signaling And Inhibiting IL-6 And IL-23 Receptor Expression". *Clinical Immunology* 127: S55. doi:10.1016/j.clim.2008.03.149.
337. Xing, Z, J Gauldie, G Cox, H Baumann, M Jordana, X F Lei, and M K Achong. 1998. "IL-6 Is An Antiinflammatory Cytokine Required For Controlling Local Or Systemic Acute Inflammatory Responses.". *Journal Of Clinical Investigation* 101 (2): 311-320. doi:10.1172/jci1368.
338. Yagi, Hiroshi, Alejandro Soto-Gutierrez, Nalu Navarro-Alvarez, Yaakov Nahmias, Yoni Goldwasser, Yuko Kitagawa, Arno W Tilles, Ronald G Tompkins, Biju Parekkadan, and Martin L Yarmush. 2010. "Reactive Bone Marrow Stromal Cells Attenuate Systemic Inflammation Via Stnfr1". *Molecular Therapy* 18 (10): 1857-1864. doi:10.1038/mt.2010.155.
339. Yamasaki, S. 2004. "Cytokines Regulate Fibroblast-Like Synovial Cell Differentiation To Adipocyte-Like Cells". *Rheumatology* 43 (4): 448-452. doi:10.1093/rheumatology/keh092.
340. Yang, Hua-xia, Wen Zhang, Li-dan Zhao, Yang Li, Feng-chun Zhang, Fu-lin Tang, Wei He, and Xuan Zhang. 2009. "Are CD4+CD25-FoxP3+ Cells In Untreated New-Onset Lupus Patients Regulatory T Cells?". *Arthritis Research & Therapy* 11 (5): R153. doi:10.1186/ar2829.
341. Yang, Ji, Yiwei Chu, Xue Yang, Di Gao, Lubing Zhu, Xinrong Yang, Linlin Wan, and Ming Li. 2009. "Th17 And Natural Treg Cell Population Dynamics In Systemic Lupus Erythematosus". *Arthritis & Rheumatism* 60 (5): 1472-1483. doi:10.1002/art.24499.
342. Yang, Seung-Ha, Min-Jung Park, Il-Hee Yoon, Su-Young Kim, So-Hee Hong, Jin-Young Shin, Hye-Young Nam, Yong-Hee Kim, Bongi Kim, and Chung-Gyu Park. 2009. "Soluble Mediators From Mesenchymal Stem Cells Suppress T Cell Proliferation By Inducing IL-10". *Experimental And Molecular Medicine* 41 (5): 315. doi:10.3858/emm.2009.41.5.035.
343. Yarwood, Annie, Tom W. J. Huizinga, and Jane Worthington. 2014. "The Genetics Of Rheumatoid Arthritis: Risk And Protection In Different Stages Of The Evolution Of RA: Table 1". *Rheumatology* 55 (2): 199-209. doi:10.1093/rheumatology/keu323.
344. Yoo, Hyun Seung, Kyuheon Lee, Kwangmin Na, Yong Xu Zhang, Hyun-Ja Lim, TacGhee Yi, Sun U Song, and Myung-Shin Jeon. 2017. "Mesenchymal Stromal Cells Inhibit CD25 Expression Via The Mtor Pathway To Potentiate T-Cell Suppression". *Cell Death & Disease* 8 (2): e2632-e2632. doi:10.1038/cddis.2017.45.
345. Yu, L. 2002. "TGF-Beta Receptor-Activated P38 MAP Kinase Mediates Smad-Independent TGF-Beta Responses". *The EMBO Journal* 21 (14): 3749-3759. doi:10.1093/emboj/cdf366.
346. Zarjou, Abolfazl, Junghyun Kim, Amie M. Traylor, Paul W. Sanders, József Balla, Anupam Agarwal, and Lisa M. Curtis. 2011. "Paracrine Effects Of Mesenchymal Stem Cells In Cisplatin-Induced Renal Injury Require Heme Oxygenase-1". *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 300 (1): F254-F262. doi:10.1152/ajprenal.00594.2010.

347. Zhang, B, X Zhang, F L Tang, L P Zhu, Y Liu, and P E Lipsky. 2008. "Clinical Significance Of Increased CD4+CD25-FoxP3+ T Cells In Patients With New-Onset Systemic Lupus Erythematosus". *Annals Of The Rheumatic Diseases*, 67 (7): 1037-1040. doi:10.1136/ard.2007.083543.
348. Zhang, Bin, Yijun Yin, Ruenn Chai Lai, and Sai Kiang Lim. 2014. "Immunotherapeutic Potential Of Extracellular Vesicles". *Frontiers In Immunology* 5. doi:10.3389/fimmu.2014.00518.
349. Zhang, Wei, Wei Ge, Changhong Li, Shengguo You, Lianming Liao, Qin Han, Weimin Deng, and Robert C.H. Zhao. 2004. "Effects Of Mesenchymal Stem Cells On Differentiation, Maturation, And Function Of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells". *Stem Cells And Development*, 13 (3): 263-271. doi:10.1089/154732804323099190.
350. Zhao, Hai, Xuelian Liao, and Yan Kang. 2017. "Tregs: Where We Are And What Comes Next?". *Frontiers In Immunology* 8. doi:10.3389/fimmu.2017.01578.
351. Zhao, Ming, Yixin Tan, Qiao Peng, Cancan Huang, Yu Guo, Gongping Liang, and Bochen Zhu et al. 2018. "IL-6/STAT3 Pathway Induced Deficiency Of RFX1 Contributes To Th17-Dependent Autoimmune Diseases Via Epigenetic Regulation". *Nature Communications* 9 (1). doi:10.1038/s41467-018-02890-0.
352. Zhao, Zhi-Gang, Wen Xu, Li Sun, Yong You, Fang Li, Qiu-Bai Li, and Ping Zou. 2011. "Immunomodulatory Function Of Regulatory Dendritic Cells Induced By Mesenchymal Stem Cells". *Immunological Investigations* 41 (2): 183-198. doi:10.3109/08820139.2011.607877.
353. Zheng, Guoping, Ruoqiong Huang, Guanguan Qiu, Menghua Ge, Jiangmei Wang, Qiang Shu, and Jianguo Xu. 2018. "Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles: Regenerative And Immunomodulatory Effects And Potential Applications In Sepsis". *Cell And Tissue Research* 374 (1): 1-15. doi:10.1007/s00441-018-2871-5.
354. Zheng, Song Guo, Juhua Wang, Pu Wang, J. Dixon Gray, and David A. Horwitz. 2007. "IL-2 Is Essential For TGF-B To Convert Naive CD4+CD25− Cells To CD25+FoxP3+ Regulatory T Cells And For Expansion Of These Cells". *The Journal Of Immunology* 178 (4): 2018-2027. doi:10.4049/jimmunol.178.4.2018.
355. Zheng, Ye, Steven Josefowicz, Ashutosh Chaudhry, Xiao P. Peng, Katherine Forbush, and Alexander Y. Rudensky. 2010. "Role Of Conserved Non-Coding DNA Elements In The FoxP3 Gene In Regulatory T-Cell Fate". *Nature* 463 (7282): 808-812. doi:10.1038/nature08750.
356. Zhou, Bin, Jingdong Yuan, Yixuan Zhou, Maher Ghawji, Yun-Ping Deng, Austin J. Lee, and Albert J. Lee et al. 2011. "Administering Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells To Prevent And Treat Experimental Arthritis". *Clinical Immunology* 141 (3): 328-337. doi:10.1016/j.clim.2011.08.014.
357. Zhou, Changhui, Bo Yang, Yi Tian, Hongliang Jiao, Wendi Zheng, Jian Wang, and Fangxia Guan. 2011. "Immunomodulatory Effect Of Human Umbilical Cord Wharton'S Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells On Lymphocytes". *Cellular Immunology* 272 (1): 33-38. doi:10.1016/j.cellimm.2011.09.010.
358. Zhou, Li-rong, Jie ZHANG, and Yong-ai LUO. 2013. "Effects Of Type-3-Polysaccharide On Airway Inflammation And Treg/Th17 Cells In Bronchial Asthmatic Mice". *Academic Journal Of Second Military Medical University* 33 (5): 471-476. doi:10.3724/sp.j.1008.2013.00471.
359. Zizzo, Gaetano, Maria De Santis, Silvia Bosello, Barbara Tolusso, Stefano Alivernini, Giacomo De Luca, Elisa Gremese, and Gianfranco Ferraccioli. 2019. "Measuring The T-Cell Down-Regulation Of TCR-Zeta, ZAP-70 And CD28 In Arthritis Patients: An Old Tool For New Biomarkers". *European Journal of Immunology*, 49 (12): 2195-2203. doi:10.1002/eji.201847849.