

Оптимізація методу отримання незрілих дендритних клітин

А.М. Гольцев, Т.Г. Дубрава, К.Є. Ямпольська, Ю.О. Гаєвська, Н.М. Бабенко, М.О. Бондарович, І.Ф. Коваленко

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАНУ, Харків; e-mail: yampir@ukr.net

У роботі представлений метод виділення моноклеарів з кісткового мозку у градієнті «тразографу», який дає змогу отримати більш ніж 40 % клітин, серед яких 28 % – CD14⁺-моноцити. Підібрана мінімальна панель фенотипічних маркерів для оцінки незрілих дендритних клітин у культурі in vitro. В порівняльному аспекті продемонстровано, що більш адекватним джерелом отримання дендритних клітин є моноклеари на відміну від загальної суспензії клітин кісткового мозку. Встановлено, що диференціювання мієлоїдних попередників і моноцитів у незрілі дендритні клітини супроводжується втратою CD14-антигена, мінімізацією рівня експресії коstimуляторної молекули CD86 і появою характерного для цих клітин маркера CD11b-антигена. Результати дослідження дають змогу не тільки оцінити якісні характеристики отриманих дендритних клітин і їх толерогенну активність на моделі аутоімунних захворювань в експерименті, а також намітити перспективи створення їх запасів у низькотемпературних банках для клінічного використання.

Ключові слова: дендритні клітини; кістковий мозок; моноклеари; моноцити; коstimуляторні молекули.

ВСТУП

Дендритні клітини (ДК) є професійними антигенпрезентуючими клітинами і являють собою гетерогенну популяцію як за фенотипічними характеристиками, так і за функціональною активністю [1]. Вони добре відомі як стимулятори імунної відповіді, але не менш важлива їх роль в забезпеченні імунного гомеостазу та запобіганні розвитку аутоімунних реакцій. Підтримка периферичної толерантності ДК здійснюється індукцією анергії Т-клітин, формуванням пулу Т-регуляторних клітин з супресорною активністю і делецією аутореактивних клонів [2].

Толерогенну активність, як правило, пов'язують з незрілими ДК, які в незначній кількості експресують коstimуляторні молекули і молекули головного комплексу гістосумісності II класу (МНСII), на відміну від зрілих (імуногенних) ДК. Водночас для толерогенних ДК характерна більш

висока експресія PRRs (від англ. pathogen recognizing receptors), зокрема TLR2, TLR4, TLR6 (від англ. toll-like receptors), RLRs (від англ. retinoic-acid-inducible gen I (RIG-I) - like receptors), NLRs (від англ. nucleic-binding oligomerization domain (NOD) - like receptors), Fcγ-рецепторів, комплементу, скавенджер-рецепторів, рецепторів до фосфатидилсерину, а також наявність вираженої експресії ILT3 і ILT4 (від англ. immunoglobulin like transcript) молекул, що беруть участь в індукції толерантності [3,4]. Незрілі ДК (нДК) здатні захоплювати екзогенні антигени, але мають відносно слабку імуностимулюючу активність [5]. Показано, що Т-клітини, культивовані з ними, можуть набувати рефрактерності до алогенних антигенних стимулів, в тому числі отриманих від зрілих ДК [6]. Важливою перевагою застосування толерогенних ДК є пригнічення проліферації Т-клітин, специфічних до конкретного антигена (антигенів), чого

неможливо досягти на сьогоднішній день іншими методами імунотерапії, наприклад із застосуванням мезенхімальних стовбурових клітин [7].

Перспектива застосування ДК у клінічній практиці зумовлює необхідність відпрацювання стандартного методу їх отримання. Нині описано два найбільш поширених джерела отримання ДК *in vitro*. Перший - з мононуклеарів або моноцитів периферичної крові, другий - з гемопоетичних попередників кісткового мозку. Найчастіше в клініці ДК отримують з мононуклеарів крові, виділених у градієнті щільності Ficoll-Paque Premium, Nystopaque-1077, урографіну або верографіну [8]. Dohnal і співавт. [9] показали, що спосіб виділення мононуклеарів або моноцитів більшою мірою визначає кількість одержаних ДК, однак, статистично значущих відмінностей в їх фенотипі і функціональній активності не виявлено.

Важливим є підбір специфічних факторів диференціювання, що беруть участь у регуляції процесів генерації ДК у культурі. Ключовими цитокінами, які застосовуються *in vitro*, є гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор (ГМ-КСФ) і інтерлейкін-4 (ІЛ-4) [10]. ГМ-КСФ підтримує життєздатність і проліферацію мієлоїдних попередників, стимулює їх диференціювання в гранулоцити і макрофаги [11,12]. Найчастіше ГМ-КСФ використовують у поєднанні з ІЛ-4 з огляду на їх синергізм в індукції диференціювання нДК з моноцитів [13,14]. Разом з ними для диференціювання моноцитів у ДК використовують інші цитокіни, наприклад інтерферон- α (ІФН- α), фактор некрозу пухлини α або ІЛ-15. Було показано, що використання різного спектра ростових факторів і цитокінів для диференціювання ДК може призводити до отримання різних за фенотипом і функцією їх субпопуляцій [15]. Заміна ІЛ-4 на ІФН- α (в складі коктейлю ГМ-КСФ / ІЛ-4) призводить до швидкого збільшення експресії молекул МНСІІ, коstimуляторних молекул CD80 і CD86, а також маркерів дозрівання CD40 і CD83 [15].

Заміна середовища на таке без цитокінів на кінцевому етапі культивування, призводить до появи ознак макрофагів у нДК [12]. Існує широкий спектр протоколів їх отримання, при цьому використовуються різні концентрації ГМ-КСФ і ІЛ-4 без достатньо обґрунтованої аргументації [15]. ГМ-КСФ використовується від 80 [3] до 10 нг/мл [17]. Що стосується ІЛ-4, то він, як правило, додається до ГМ-КСФ у співвідношенні 1:4. Так, у багатьох дослідженнях були використані різні концентрації ІЛ-4, що дає змогу віддати перевагу будь-якій з них. У зв'язку з цим для вибору раціональної концентрації цього ростового фактора була здійснена оцінка його впливу на експерсію таких маркерів, як CD1a⁺, CD209⁺, CD40⁺, HLA-DR⁺, CD86⁺, CD80⁺, які свідчать про належність ДК до незрілого або зрілого пулу [16]. Автором встановлено оптимальний інтервал концентрації цього цитокіну для диференціювання ДК від 5 до 20 нг / мл, що дає змогу зменшити витрату ІЛ-4 від 3 до 5 разів. Беручи до уваги відсутність чітких, переконливих даних про оптимальні умови отримання нДК та маркери, які характеризують їх незрілий фенотип, пошук методичних підходів досі триває.

Метою роботи було у порівняльному аспекті оцінити можливість отримання незрілих ДК у культурі кісткового мозку і виділених з нього мононуклеарів та довести їх фенотипічну приналежність із застосуванням мінімального набору характерних маркерів.

МЕТОДИКА

Експерименти виконували на мишах лінії СВА/Н масою 20-24 г. Дослідження проводили відповідно до «Загальних принципів експериментів на тваринах», схвалених V Національним конгресом з біоетики (Київ, 2013) і узгоджених з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, використовуваних для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986). Всі процедури проводили в стерильних умовах.

Виділення клітин кісткового мозку. Суспензію клітин кісткового мозку отримували зі стегових кісток тварин. Кінці кісток відрізали, діафізи двічі промивали середовищем RPMI-1640 («Sigma-Aldrich», Англія) з додаванням 3 %-ї ембріональної телячої сироватки (ЕТС; «Биолот», Росія) і 2 %-го цитрату натрію (робоче середовище). Суспензію пропускати через капроновий фільтр.

Отримання моноклеарних клітин з кісткового мозку. Відправною точкою наших досліджень було виділення фракції моноклеарів з кісткового мозку мишей лінії СВА/Н з використанням розчину тразографу, аналога урографіну, який нині знято з виробництва. Використання цього реагента, разом з дорогими закордонними Ficoll-Paque Premium і Nystopaque-1077, зацікавило нас для зниження бюджетних витрат при отриманні моноклеарів. Останні виділяли за допомогою центрифугування суспензії клітин КМ у градієнті розчину тразографу-76 % («Yunik Farmasiyutikal Laboratoriz», Індія), розведеного дистильованою водою у співвідношенні 1:3. Для цього в центрифужні пробірки наливали по 1 мл тразографу, додавали по 3 мл дистильованої води і перемішували. Зверху нашаровували по 3 мл суспензії клітин кісткового мозку, центрифугували 1500 об/хв протягом 10 хв. Фракцію клітин, що знаходиться на межі розділу клітинної суспензії і розчину тразографу, переносили в чисту пробірку, ресуспендували в 3-5 мл робочого середовища з RPMI-1640 і центрифугували при 1000 об/хв упродовж 10 хв. Процедура повторювали двічі. Відмиті моноклеари ресуспендували в середовищі RPMI-1640 з 10% ЕТС-ю для подальшого культивування і отримання нДК.

Отримання незрілих дендритних клітин in vitro. Загальну суспензію кісткового мозку або МНК культивували при 37 °С в атмосфері 5 %-го CO₂ у пластикових чашках Петрі діаметром 3 см у середовищі RPMI-1640 з

додаванням 10 %-ї ембріональної телячої сироватки і 1 %-го розчину антибіотиків (100 од./мл пеніциліну, 0,1 мг/мл стрептоміцину) у концентрації 3-5·10⁶ кл/мл за методом Роров і співавт. [17] в нашій модифікації. У вихідному стані в культуральне середовище додавали мишачі рекомбінантні ГМ-КСФ («Sigma-Aldrich», Англія) - 20 нг/мл і ІЛ-4 («Sigma-Aldrich», Англія) - 5 нг/мл. Далі через 3 доби в кожен чашку додавали нову порцію свіжого культурального середовища з ГМ-КСФ і ІЛ-4. Зростання клітин на етапах культивування оцінювали за допомогою інвертованого мікроскопа (Axiovert 40C, «Zeiss», Denmark). На 7-му добу змивали неадгезовані і слабоадгезовані клітини, куди входять нДК, відмивали в 3-5 мл безбарвного розчину Хенкса, концентрували до 1·10⁷ кл/мл і використовували для цитофлуориметричного аналізу.

Імунофлуоресцентне фарбування клітин антитілами. Вміст моноцитів CD14⁺ у загальній суспензії кісткового мозку і виділеній фракції моноклеарів, і так само отриманих після культивування in vitro нДК, оцінювали на проточному цитофлуориметрі «FACS Calibur» («Becton Dickinson», США), використовуючи моноклональні протимишачі антитіла: CD14 FITC, CD11b FITC і CD86 FITC і ізотип-контролі до них («BD Biosciences», США) згідно з інструкцією виробника.

Статистична обробка результатів. Статистичний облік результатів, отриманих цитофлуориметричним аналізом, здійснювали за допомогою програми «WinMDI 2.8.» (J. Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA). Їх обробляли з використанням критерію t-Стюдента із застосуванням комп'ютерної програми MS Excel (США). Результати наведені у вигляді середнього значення ± стандартне відхилення. Відмінності вважали статистично значущими при P<0,05.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У експериментах були використані різні початкові концентрації клітин кісткового мозку

для виділення фракції моноклеарів. Як видно з табл. 1, оптимальна початкова кількість клітин кісткового мозку для отримання фракції моноклеарів, знаходиться в діапазоні $30\text{-}60 \cdot 10^6$, що дає змогу в середньому виділити їх 43 %.

У порівняльному аспекті для отримання ДК *in vitro* були прокультивовані загальна суспензія кісткового мозку і моноклеари за наявності ГМ-КСФ і ІЛ-4. Комбінація цих чинників забезпечує утворення з моноцитів переважно нДК, у яких обмежена здатність до фагоцитозу, міграції та ефективної презентації антигена. Узагальнення даних літератури [16,18,19] дало змогу модифікувати методи культивування загальної суспензії кісткового мозку і моноклеарів, виділених з нього як описано вище. Через 7 діб в їх культурах визначалися клітини морфологічно подібні до дендритних (рис.1). Вони були овальної або полігональної форми з ацентрично розташованим ядром. Розмір клітин був близько 20 мкм. У культурі моноклеарів (див. рис.1, б) більшість клітин перебували в слабоадгезованій фракції, значна їх частина втрачала контакт з підкладкою утворюючи агрегати-колонії. Ці клітини є «потенційними кандидатами» в нДК.

Дані численних досліджень і деталізація імунофенотипу різних субпопуляцій ДК, мієлоїдний шлях їх розвитку не викликає сумніву [15]. Моноцити CD14^+ є загальним попередником для макрофагів і ДК, в тому числі отриманих в експериментах *in vitro*. Оцінки відсоткового вмісту

клітин з маркером моноцитів (CD14) до культивування показала, що в загальній суспензії кісткового мозку вона була вдвічі меншою, ніж у виділеній фракції МНК (13,47 і 28,49 % відповідно, $P < 0,05$, рис.2)

За характерними фенотиповими маркерами було оцінено приналежність отриманих у процесі культивування клітин до незрілих ДК. При цьому найбільший інтерес представляла експресія молекул, безпосередньо асоційованих з їх функцією. Автори найчастіше оцінюють наявність молекул класів МНСІ і МНСІІ, а також рецепторів, відповідальних за передачу коstimуляторних сигналів при взаємодії з Т-лімфоцитами: CD40, CD80, CD86 і маркера термінального диференціювання - CD83. Високий рівень експресії цих молекул характерний для зрілих ДК, здатних ефективно стимулювати імунні реакції і, навпаки, низький їх рівень зумовлює підтримку незрілого фенотипу ДК [16].

Комбінація ГМ-КСФ і ІЛ-4 забезпечує при культивуванні *in vitro* утворення з моноцитів нДК с фенотипом MHC^{low} , $\text{CD80}^+/\text{CD86}^+$ і CD83^+ [5], проте багато авторів вказують не на відсутність експресії перелічених маркерів на нДК, а знижену їх експресію порівняно зі зрілими клітинами. Показано, що наявність на ДК інтегрінової молекули адгезії CD11b визначає незрілий фенотип останніх [16]. Крім того, авторами [20] встановлено, що $\text{CD11b}^{\text{high}}\text{MHC}^{\text{low}}$ ДК мають регуляторну активність і здатні пригнічувати проліферацію Т-клітин за рахунок секреції NO або PGE2. Таким чином, аналіз літератури дав змогу

Таблиця 1. Відсотковий вміст виділених з кісткового мозку моноклеарів у градієнті тразограф -76 %.

Кількість клітин кісткового мозку, $\times 10^6$	Вміст моноклеарів	
	Абсолютний вміст, $\times 10^6$	Відносна кількість, %
18,00	3,96	22,00
26,00	6,68	25,70
33,00	15,6	47,00
45,30	18,33	40,46
60,00	25,00	41,67

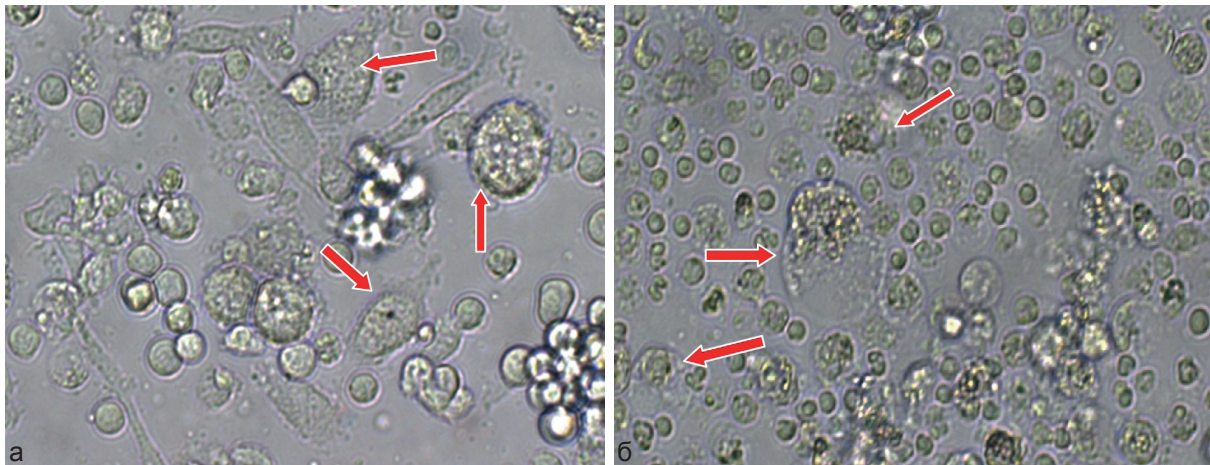


Рис.1 Отримання дендритних клітин на 7-му добу культивування кісткового мозку (а) і мононуклеарів (б). Збільшення у 600 разів

вибрати мінімальну панель моноклональних антитіл: CD14, CD11b, CD86 для визначення приналежності отриманих у культурі клітин до нДК.

Так, у 7-добових культурах кісткового мозку і МНК відзначалося зниження кіль-

кості $CD14^+$ клітин порівняно з їх вмістом до культивування в 2,4 і 7,0 раза відповідно. Утворення нДК супроводжувалося також низьким рівнем експресії костимуляторних молекули CD86 і високим - CD11b-антигена (рис.2, 3).

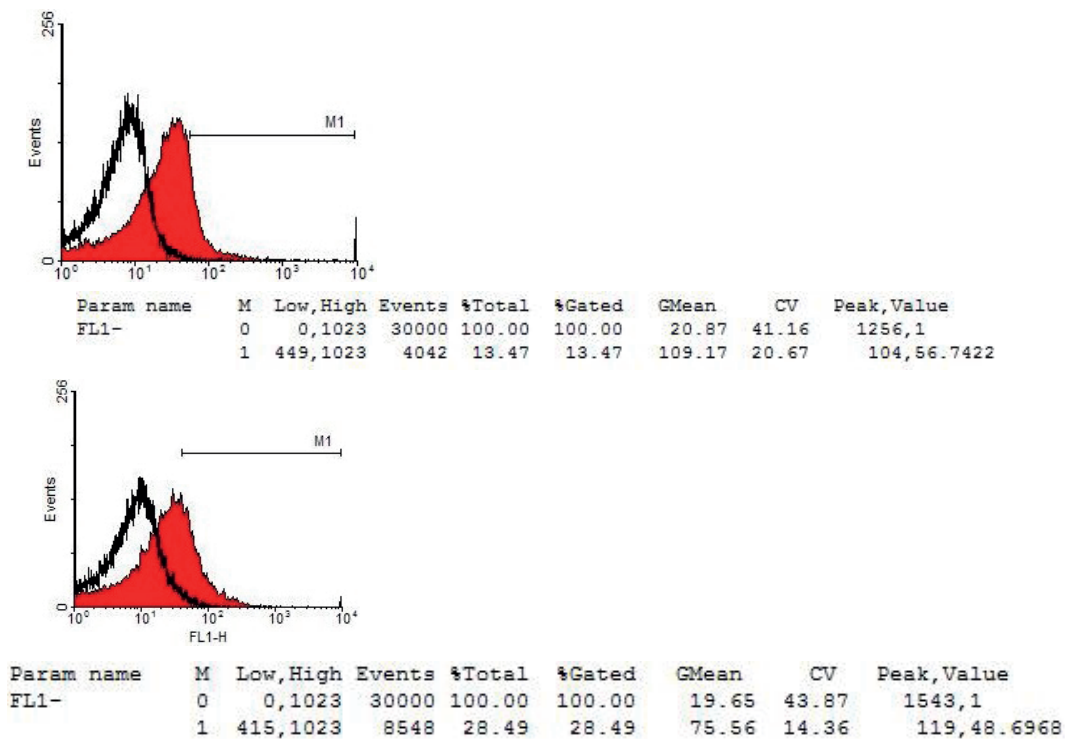


Рис.2. Гістограми, що демонструють вміст $CD14^+$ - клітин у загальній суспензії кісткового мозку (а) і у виділеній фракції мононуклеарів (б) до культивування

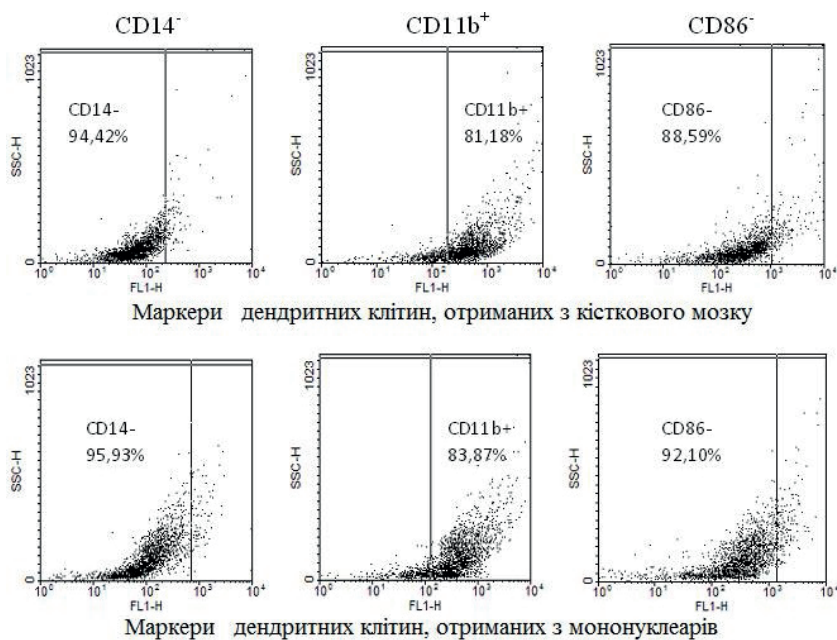


Рис.3. Фенотипові маркери клітин, отриманих після 7 діб культивування кісткового мозку і мононуклеарів

Судячи з експресії фенотипічних маркерів, характерних для нДК, цілісний кістковий мозок також може бути джерелом отримання цих клітин разом з мононуклеарами, хоча і поступається за вмістом CD14⁺-клітин. Так, у суспензії кісткового мозку перед культивуванням вміст моноцитів (CD14⁺-клітин) становив 13,47 %, а у виділеній фракції мононуклеарів був вдвічі більше (табл.2). Отримані з моноцитів у процесі диференціювання нДК мали високу схоронність (90-95 %) по прорідію йодиду, проте, кількість отрима-

них ДК відрізнялася. Вміст нДК у культурі цільного кісткового мозку й мононуклеарів становив відповідно 50 і 100 % від початкової кількості посаджених на пластик клітин.

Таким чином, показано, що у градієнті тразографу з $3-6 \cdot 10^7$ клітин кісткового мозку можливе виділення більш ніж 40 % мононуклеарів. У порівняльному аспекті продемонстровано можливість отримання ДК в культурі кісткового мозку і виділених з нього мононуклеарів, проте в меншій кількості. Обрана мінімальна панель фенотипічних

Таблиця 2. Показники, що характеризують отримані в культурі *in vitro* незрілі дендритні клітини.

Об'єкт дослідження	Початкова кількість посадже них на чашку клітин, $\times 10^6$	Вміст CD14 ⁺ -клітин на початковому етапі культивування		Кількість отриманих на 7-му добу незрілих дендритних клітин		
		Абсолютний вміст, $\times 10^6$	%	Збереження, %	Абсолютний вміст, $\times 10^6$	Відсоток від посаджених на чашку
Кістковий мозок	9,20 \pm 0,64	1,24 \pm 0,10	13,47	90	4,62 \pm 0,94	50,00
Мононуклеари	9,16 \pm 1,23	2,61 \pm 1,35*	28,49*	95	9,20 \pm 1,32*	100,00*

* P < 0,05 порівняно зі значеннями у кістковому мозку

маркерів, що дозволяє довести їх приналежність до незрілих ДК. Диференціація мієлоїдних попередників і моноцитів в незрілі ДК супроводжувалася втратою CD14-антигена, низьким рівнем експресії коstimуляторної молекули CD86 і високим - маркерної для цих клітин молекули CD11b. Результати дослідження дають можливість оцінити якісні характеристики отриманих у культурі нДК і їх толерогенну активність на моделі аутоімунних захворювань в експерименті, а так само намітити перспективи створення запасів ДК у низькотемпературних банках.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co authors of the article.

А.Н. Гольцев, Т.Г. Дубрава., Е.Е. Ямпольская, Ю.А. Гасевская, Н.Н. Бабенко, Н.А. Бондарович, И.Ф. Коваленко

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ НЕЗРЕЛЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК

В работе представлен метод выделения мононуклеаров из костного мозга в градиенте «тразографа», который позволяет получить более 40% клеток, среди которых 28 % составляли CD14⁺-моноциты. Подобран минимальный набор фенотипических маркеров для оценки незрелых дендритных клеток в культуре *in vitro*. В сравнительном аспекте показано, что более адекватным источником получения дендритных клеток являются мононуклеары в отличие от общей суспензии клеток костного мозга. Установлено, что дифференцирование миелоидных предшественников и моноцитов в незрелые дендритные клетки сопровождается потерей CD14-антигена, минимизацией уровня экспрессии коstimуляторной молекулы CD86 и появлением характерного для этих клеток маркера CD11b-антигена. Результаты исследования позволяют не только оценить качественные характеристики полученных дендритных клеток и их толерогенную активность на модели аутоиммунных заболеваний в эксперименте, а также наметить перспективы создания их запасов в низкотемпературных банках для клинического использования.

Ключевые слова: дендритные клетки; костный мозг; мононуклеары; моноциты; коstimуляторные молекулы.

A.N. Goltsev, T.G. Dubrava, E.E. Yampolskaya, Yu.A. Gayevskaya, N.N. Babenko, N.A. Bondarovich, I.G. Kovalenko

THE OPTIMIZATION METHOD OF ISOLATION OF IMMATURE DENDRITIC CELLS

The method of isolation of bone marrow mononuclear cells in «trasograph» gradient, enabling to obtain more than 40 % of cells, among those 28 % were CD14⁺-monocytes has been presented. The minimum set of phenotype markers to assess immature dendritic cells *in vitro* has been selected. In a comparative aspect it has been shown that the most adequate sources of obtaining of dendritic cells are mononuclear cells in contrast to total cell suspension of bone marrow. It has been found that the differentiation of myeloid progenitor cells and monocytes into immature dendritic cells was accompanied with the loss of CD14 antigen, minimization of expression rate of co-stimulatory molecule CD86 and appearance of CD11b-antigen marker, which is the feature of these cells. The results allow not only to estimate the qualitative characteristics of the obtained dendritic cells and their tolerogenic activity in the model of autoimmune diseases, but also to underline the perspectives of establishing their stocks at low temperature banks to be used in clinics.

Key words: dendritic cells; bone marrow; mononuclear cells, monocytes; co-stimulatory molecules.

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine; e-mail: yampi@ukr.net

REFERENCES

1. Alcántara-Hernández M, Leylek R, Wagar LE, Engleman EG, Tibor Keler T, Marinkovich MP et al. Phenotypic Mapping of Human Dendritic Cells Reveals Interindividual Variation and Tissue Specialization. 2017. Dec 19; 47(6):1037-50.
2. Marín E, Cuturi MC, Moreau A. Tolerogenic Dendritic Cells in Solid Organ Transplantation: Where Do We Stand? Front Immunol. 2018 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00274>
3. Talaev VY, Plekhanova MV, Matveichev AV. Experimental models suitable for assessing the effect of components of new vaccines being developed on the differentiation of dendritic cells. The medial. 2014; 2(12): 135-53.
4. Sennikov SV, Kulikova EV, Knauer NY, Hantakova UN. Molecular and cellular mechanisms mediated by dendritic cells involved in the induction of tolerance. Medical immunol. 2017; 19 (4): 359-74.
5. Zhou LJ, Tedder TF. Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. J Immunol. 1995;154: 3821-35.
6. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. Annu Rev. Immunol. 2003; 21:685-711.
7. Goltsev AN, Rassokha IV, Dubrava TG, Ostankova LV,

- Ostankov MV; Safonov VI, Zykhova AV. Experimental therapy of graft-versus-host disease by mesenchymal stromal cells grown on oxide nanocoatings. *Fiziol Zh.* 2016; 62 (5):1-11.
8. Boyum A. A one-stage procedure for isolation of granulocytes and lymphocytes from human blood. General sedimentation properties of white blood cells in a 1g gravity. *Scand J Clin Lab Investig.* 1968; 97:51-76.
9. Dohnal A, Gra Y, Witt V, Eichstill C, Wagner D, Ul-Haq S et al. *J Cell Mol Med.* 2009; 13:125-35.
10. Schmid MA, Kingston D, Boddupalli S, Manz MG. Instructive cytokine signals in dendritic cell lineage commitment. *Immunol Rev.* 2010 Mar; 234(1):32-44.
11. Yoo S, Ha S-J. Generation of tolerogenic dendritic cells and their therapeutic applications. *Immune Netw.* 2016;16:52-60. doi:10.4110/in.2016. 16.1.52
12. Romani N, Reider D, Heuer M, Ebner S, Kämpgen E, Eibl B, Niederwieser D, Schuler G. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods.* 1996 Sep 27;196 (2):137-51.
13. Justin A, Babita A. IL-4 is more effective than IL-13 for in vitro differentiation of dendritic cells from peripheral blood mononuclear cells. *Int Immunol.* 2005;1:312-9.
14. Hettihewa LM. Prolonged expression of MHC class I - peptide expression in bone marrow derived retrovirus transfected matured dendritic cells by continuous centrifugation in the presence of IL-4. *Indian J Med Res.* 2011; 34(5): 672-8.
15. Nazarkina Zh.K., Laktionov P.P. Obtaining dendritic cells for immunotherapy of cancers. *Biomedical chem.* 2015; 61 (1): 30-40.
16. Nekhaeva TL Optimization of technology and start-up of obtaining antitumor vaccines based on autologous dendritic cells: dis. ... Candidate of Medical Sciences, FGBU «Research Institute of Oncology. N.N. Petrova «of the Ministry of Health of Russia, St. Petersburg, 2014. [Russian].
17. Popov I, Li Mu, Zheng X, Zhang X, Ichim TE et al. Preventing autoimmune arthritis using antigen-specific immature dendritic cells: a novel tolerogenic vaccine. *Arthritis Res Ther.* 2006; 8(5):R141.
18. Madaan A, Verma R, Singh AT, Jain SK, Jaggi M. A stepwise procedure for isolation of murine bone marrow and generation of dendritic cells. *J Biol Methods.* 2014;1(1):e1.doi: 10.14440/jbm.2014.12
19. Yang J, Yang Y, Ren Y, Xie R, Zou H, Fan H A Mouse Model of Adoptive Immunotherapeutic Targeting of Autoimmune Arthritis Using Allo-Tolerogenic Dendritic Cells. *PLoS ONE* 2013; 8(10): e77729. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077729>
20. Liu J, Cao X. Regulatory dendritic cells in autoimmunity: a comprehensive review. *J. Autoimmun.* 2015; 63: 1-12.

*Матеріал надійшов
до редакції 13.06.2018*