



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
Институт по Микробиология „Стефан Ангелов“

Силвия Любенова Брадянова

*Функционално потискане на автореактивни T
клетки чрез антицялова терапия при миши и
хуманизиран NSG модели на Системен Лупус
Еритематосус*

Автореферат

За присъждане на образователната и научна степен
„Доктор“
направление "Биологически науки" 4.3., научна
специалност "Имунология"

Научен ръководител: Проф. д-р Андрей Иванов Чорбанов, дб

София 2024

Дисертационният труд съдържа 114 страници и е илюстриран с 42 фигури и 2 таблици. Библиографската справка включва 193 литературни източника.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на заседание на Националния семинар на Департамент по Имунология на Институт по микробиология „Стефан Ангелов”, БАН

Изследванията, включени в дисертацията са проведени в Департамент по имунология, Лаборатория по експериментална имунология, Институт по микробиология „Стефан Ангелов”, БАН

Защитата на дисертационния труд ще се състои на открито заседание пред научно жури на2024 год. от часа в залата на Институт по Микробиология „Стефан Ангелов”, БАН, ул. „Акад. Г. Бончев“, бл. 26, София.

Материалите по защитата са на разположение в кабинета на научния секретар на Институт по Микробиология „Стефан Ангелов”, БАН, ул. „Акад. Г. Бончев“, бл. 26, София, както и са публикувани съгласно ЗРАСРБ на адрес www.microbio.bas.bg

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
Институт по Микробиология „Стефан Ангелов”

Силвия Любенова Брадянова

*Функционално потискане на автореактивни Т
клетки чрез антилялова терапия при миши и
хуманизиран NSG модели на Системен Лупус
Еритематосус*

Автореферат

За присъждане на образователната и научна степен „Доктор”
направление "Биологически науки" 4.3., научна специалност
"Имунология"

Научен ръководител: Проф. д-р Андрей Иванов Чорбанов, дб

Научно Жури:
Доц. д-р Петя Димитрова
Доц. д-р Иванка Цачева
Доц. д-р Таня Димова
Проф. д-р Радостина Александрова
Проф. д-р Андрей Чорбанов

София 2024

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

TLR Toll-like receptor	Тол-лайк рецептор
miRNAs MicroRNAs	микроРНКи
IFN γ Interferon gamma	Интерферон гама
MHC Major Histocompatibility Complex	Основен комплекс за тъканна съвместимост
Ig Immunoglobulin	Имуноглобулин Г
СЛЕ	Системен лупус еритематозус
анти-SSB/La Sjogren Syndrome B	Анти-Синдром на Съогрен Б свързани антитела
анти-SSA/Ro Sjogren Syndrome Antigen	Анти-Синдром на Съогрен А свързани антитела
CD Cluster of differentiation	Клъстер на диференциация
IL Interleukin	Интерлевкин
MRL/Fas ^{lpr} Murphy Roths large/ lymphoproliferation spontaneous mutation	Murphy Roths large/спонтанна мутация на лимфопролиферация
ANX A1 Annexin	Анексин А1
FPRL formyl peptide receptors	Формил пептидни рецептори
TCR T-cell receptor	Т клетъчен рецептор
aPLs Antiphospholipid antibodies	Антифосфолипидни антитела
TNF Tumor necrosis factor	Тумор некротизиращ фактор
JAK Janus kinase	Janus киназа
pDC Plasmacytoid dendritic cells	Плазмоцитойдни дендритни клетки
BDCA2 Blood dendritic cells antigen	Антиген за кръвни дендритни клетки
ENA Extractable nuclear antigen	Екстрахируем ядрен антиген
GBM Glomerular basement membrane	Гломерулна базална мембрана
ANA Antinuclear antibody	Антинуклеарно антитяло
SCID Severe combined immunodeficiency	Тежък комбиниран имунен дефицит
NSG NOD scid gamma	
PBMC Peripheral blood mononuclear cells	Периферни кръвни мононуклеарни клетки
HSC Hematopoietic stem cell	Хематопоетични стволови клетки
FITC Fluorescein isothiocyanate	Флуоресцин изотиоцианат
PE Phycoerythrin	Фикоеритрин
APC Allophycocyanin	Алофикоцианин

ELISA Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	Ензимно-свързан имуносорбентен тест
ELISpot Enzyme-linked immunosorbent spot assay	Ензимно-свързан имуносорбентен точков анализ
PBS Phosphate-buffered saline	Фосфатно буфериран физиологичен разтвор
FCS Fetal calf serum	Фетален телешки серум
RPMI Roswell Park Memorial Institute Medium	
LPS	Липополизахарид
ConA	Конканавалин А
MTT 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl blue	3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолиев бромид; тиазолил синьо
DMSO	Диметил сулфоксид
PMA Phorbol myristate acetate	Форбол миристат ацетат
NBT-BCIP 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/nitro blue tetrazolium	5-бромо-4-хлоро-3-индолил-фосфат/нитро син тетразолил
AP alkaline phosphatase	Алкална фосфатаза
EDTA Ethylenediaminetetraacetic acid	Етилендиаминтетраоцетна киселина
RPM Revolutions Per Minute	Обороти в минута
BSA Bovine serum albumin	Говежди серумен албумин
RFU	Относителни флуоресцентни единици
ACR	Американския колеж по ревматология
aCL	Антитела срещу кардиолипин
SPF Specific-pathogen-free	Без специфични патогени
PNPP p-Nitrophenyl Phosphate, Disodium Sal	p-нитрофенил фосфат, динатриева сол
CENPB	Центромерен протеин В
SD Standard deviation	Стандартно отклонение
SGPP2 Sphingosine-1-phosphate phosphatase	Сфингозин-1-фосфат фосфатаза
S1P sphingosine-1-phosphate	Сфингозин-1-фосфат
GVHD Graft-versus-host disease	Болест на присадката срещу приемника

I. УВОД

Автоимунните заболявания включват хетерогенна група от разстройства на имунната система, които се дължат на загуба на толерантност към собствени антигени. Те могат да бъдат органоспецифични или системни. Дефекти в централния и периферния толеранс, водещи до наличието на клонове автореактивни Т и Б клетки са най-честата причина за възникване на автоимунитет. Системният лупус еритематозус е хронично автоимунно възпалително заболяване с мултисистемна патология. Клиничната картина се характеризира със синтез и циркулация на автоантитела, отлагане на имунни комплекси в редица органи, като от особено значение е натрупването им в бъбречните гломерули, и промени в цитокиновия профил на клетките на имунната система. Симптомите варират от общо неразположение, треска, летаргия и депресия до по-тежки мускулноскелетни, кожни, белодробни, бъбречни, сърдечно-съдови и такива, засягащи нервната система.

Анексин А1 (ANXA1) е член на семейство протеини, които свързват фосфолипиди в присъствието на Ca^{2+} . Той е ключов регулатор е за потискане активността на вродената имунна система. Вътреклетъчни ANX A1 участва в диференциацията, пролиферацията, поправката на клетъчната мембрана и апоптозата. Извънклетъчни ANX A 1 играе роля в някои противовъзпалителни процеси, включително регулация на миграцията на неутрофилите и фагоцитозата при макрофагите.

Съществуващите стандартни терапии, като употреба на кортикостероиди и ненасочената имуносупресия, за съжаление имат неблагоприятни странични ефекти. Невъзможността да поддържат ремисия и да се предотврати заболяването в комбинация с нарастващия брой пациенти, при които то рецидивира провокира учените да разработват специфични, насочени към патологичните пътища при развитието на СЛЕ терапии.

II. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ:

Първата цел на настоящият дисертационен труд е да се потвърди ролята на Анексин, експресиран върху Т лимфоцити за развитието на експериментални модели на СЛЕ и да се изследва имуномодулиращото действие на анти-ANX A1 антитяло в пристан-индуциран Balb/c миши модел и при спонтанно развиващи системен лупус еритематосус MRL/lpr мишки.

За осъществяване на целта на изследването бяха поставени следните задачи:

Задачи I:

1. Да се предизвикат симптоми на лупусоподобно заболяване в нормални Balb/c мишки.
2. Да се проследят нивата на повърхностна експресия на ANX A1 върху Т и В лимфоцити.
3. Да се изследва *in vitro* влиянието на анти-ANX A1 антитялото върху апоптозата на В и Т клетки и експресията на Т клетъчни активационни маркери в спленоцити.
4. Да се изследва *in vitro* действието на анти-ANX A1 антитялото върху броя плазматични клетки, синтезиращи антитела срещу двДНК и серумните нива на анти-двДНК антитела, IL10, IL4 и IFN- γ .
5. Проследят преживяемостта и симптомите на лупус вкл. нивата на протеинурия, натрупването на имунни комплекси и патологичните промени в бъбреците.

Втората цел на настоящите изследвания е да се потвърди терапевтичният потенциал на антитялото върху автореактивни човешки Т лимфоцити и появата на лупусоподобни симптоми включително отлагане на имунни комплекси в бъбреците и потискане на бъбречната дисфункция при хуманизиран модел в NOD-SCID gamma (NSG) мишки.

Задачи II:

6. Генериране на хуманизиран NSG миши модели чрез трансфер на РВМС от пациенти с лупус или здрави донори.
7. Проследяване на терапевтичния ефект на моноклоналното антитяло върху появата на симптоми при експерименталните животни.

8. Анализиране на нивата на повърхностна експресия на ANX A1 при на човешки PVMCs, влияние на моноклоналното антитяло върху експресията на Т клетъчни активационни маркери и апоптозата на лимфоцитите.

9. Изследване на ефектът на антитялото върху Т клетъчната пролиферация, апоптоза и цитокинова продукция с цел оценка на директния и индиректен ефект от това таргериране (вкл. изследване на пролиферация на Б клетки, наличието на специфични за двДНК плазмоцити и количеството на автоантитела в серум).

10. *Ин vivo* изследване на действието на анти-ANX A1 антитялото върху стойностите на протеинурията и натрупването на имунни инфилтрати в бъбреците на експерименталните животни.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ:

1. Антитела.

Използвани са широк набор от флуоресцентно-конюгирани моноклонални антитела за FACS анализите и AP-конюгирано IgG за ELISA и ELISpot.

2. Биотинилиране на анти-ANX A1 антитяло.

Анти-ANX A1 IgG1 антитяло (1.0 mg/ml) беше конюгирано с биотин, за да бъде използвано за FACS експерименти.

3. СЛЕ пациенти и здрави донори на кръв.

В настоящото проучване бяха включени шестнадесет пациенти със Системен лупус еритематозус, посетили Клиниката по ревматология, УМБАЛ Св. Иван Рилски, Катедра по вътрешни болести, Медицински университет София. Средната възраст на пациентите (двама мъже, четиринадесет жени) беше 34,1 години. Всички пациенти отговаряха на критериите за класификация на СЛЕ и са били диагностицирани със СЛЕ.

4. Изолиране на периферни мононуклеарни кръвни клетки (PBMC) и получаване на кръвни серуми.

Венозна кръв от пациенти със системен лупус и здрави донори беше получена в стерилни кръвни вакуумни епруветки (BD Vacutainer, Franklin Lakes, NJ, USA). Серумни проби от 5 ml бяха събрани от всеки доброволец с помощта на епруветки за сепариране на серум (BD Vacutainer Systems, Plymouth, UK; 5 ml) и замразени при -80 °C.

5. Мишки.

За целите на дисертацията бяха използвани осемседмични женски Balb/c мишки закупени от Harlan Farm, (Blackthorn, UK), женски MRL/lpr (MRL/MpJ-Tnfrsf6lpr/J) и NOD-scid IL2γnull (NSG) мишки бяха закупени от The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA).

6. Схема на третиране.

Групи от осемседмични женски Balb/c мишки (10 мишки в група) бяха инжектирани интраперитонеално (*i.p.*) с 0.5 ml пристан (Sigma-Aldrich chemical Co, St Louis, MO), за да бъде индуциран СЛЕ. След развитие на симптомите, експерименталните мишките при трите модела бяха третирани на всеки 6 дни *i.p.* с 200 ng/мишка анти-ANX A1 антитяло, а контролната група с еквивалентно количество PBS или контролно антитяло.

7. Проточна цитометрия (FACS).

Чрез FACS анализ бяха изследвани нивата на повърхностна експресия на ANX A1 и влиянието на терапевтичното антитяло върху експресията на Т клетъчните активационни маркери CD25/CD69.

8. Пролиферация.

За оценка на терапията върху растежа и пролиферацията на спленцити и при трите миши модела беше използван МТТ тест.

9. Апоптоза.

Апоптозата на анализираниите клетъчни популации беше проследена чрез Annexin V-FITC Kit I.

10. ELISpot метод беше използван за преброяване на специфични В клетки секретирани антитела срещу двДНК.

11. Измерване на протеинурия.

Албуминурията и при двата миши модела беше измервана на всеки две седмици с Combi-screen стрипове (Analyticon Biotechnologies, Lichenfels, Germany) и изчислена полуколичествено, както следва: (0 – липса на протеинурия; 1 – 30 до 100 mg/dl-1; 2 – 100 до 300 mg /dl-1; 3 – 300 до 500 mg/dl-1 и 4 - >500 mg/dl-1).

12. ELISA за анти-двДНК IgG антитела.

13. Антигенен микрочип за серологичен анализ.

Антигенният микрочип анализ позволи приследяване на динамиката на серумните IgG и IgM автоантитела срещу редица характерни за СЛЕ антигени.

14. Детекция на цитокини.

Нивата на IFN γ , IL10 и IL4 бяха измерени в миши серуми чрез ELISA китове (BD OptEIA™, BD Biosciences или #ab100689; #ab100697; #ab100710; Abcam) съгласно инструкциите на производителя.

15. Пречистване на РНК и количествен RT-PCR за детекция на цитокини.

16. Хистология на бъбреци и имунофлуоресценция.

По един бъбрек от всяка третирана мишка беше фиксиран в 10% формалин (Sigma-Aldrich) и включен в парафин (Sigma-Aldrich). Част от парафиновите срези бяха инкубирани със заешко FITC - конюгирано анти-мише IgG антитяло (Sigma-Aldrich) за анализ на отлаганията на имунни комплекси в бъбречните гломерули чрез флуоресцентен микроскоп (Nikon Eclipse Ti-U CLSM). Други парафинови срези бяха оцветени с хематоксилин/еозин (Sigma-Aldrich), използвайки стандартна техника на оцветяване за хистопатологично изследване.

17. Статистически анализ.

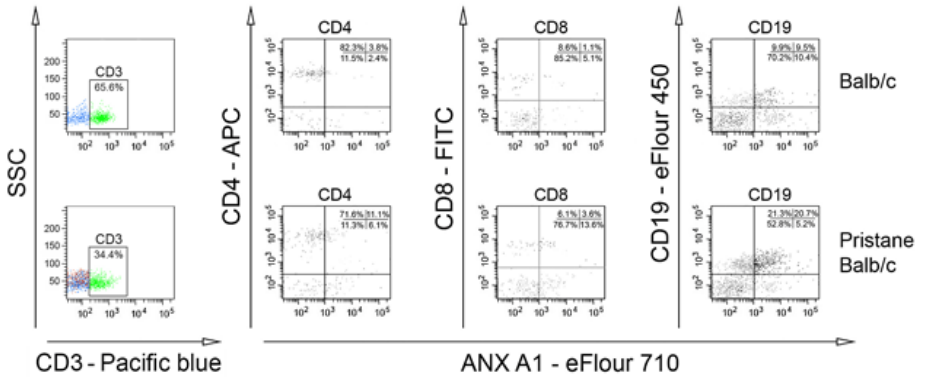
Микрочиповите тестове бяха анализирани със софтуер GenePixPro 7. Всички останали статистически анализи бяха извършени със софтуер Prism GraphPad (San Diego, CA). ANOVA тест беше използван за определяне на разликите между всеки две експериментални групи. Стойност на $p < 0.05$ се приема за статистически значима.

IV. РЕЗУЛТАТИ:

1. РЕЗУЛТАТИ първа част – миши модели.

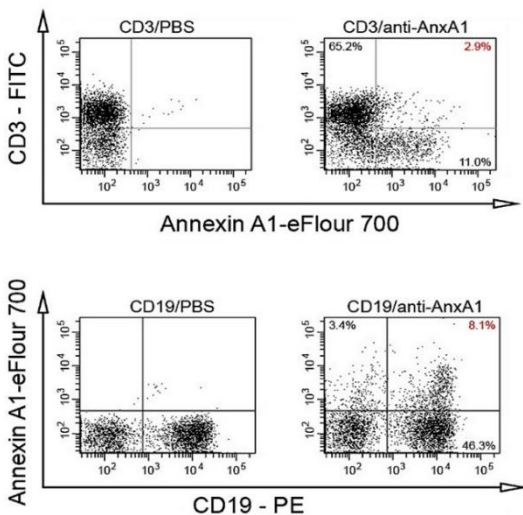
1.1. Анализ на повърхностната експресия на Анексин А1 при миши спленоцити.

Литературните данни по темата показват, че по-голямата част от ANX A1 е локализиран в цитозола, но въпреки това малка част може да бъде детектирана по клетъчната (81, 96). За да бъде изследвано разпределението на ANX A1 по повърхността на клетките бяха изолирани спленоцити от женски Balb/c мишки, инжектирани с пристан или аналогично количество PBS. Нивата на експресия на ANX A1 върху В и Т клетки бяха анализирани чрез проточна цитометрия (Фиг. 1). Установената повърхностна експресия на ANX A1 при CD19⁺ лимфоцити, получени от инжектирани с пристан мишки беше 20.7%, докато при контролните животни беше 9.5%. Резултатите показаха, че 11.1% от CD3⁺/CD4⁺ и 3.6% от CD3⁺/CD8⁺ лимфоцитите от третираните с пристан мишки експресират ANX A1 в сравнение с контролните животни, при които експресия беше доказана при 3.8% от CD3⁺/CD4⁺ и 1.1% от CD3⁺/CD8⁺ лимфоцитите.



Фиг. 1. Анализ на повърхностна експресия на ANX A1 чрез проточна цитометрия. Спленоцити от здрави Balb/c мишки и такива с пристан-индуциран СЛЕ бяха инкубирани с биотин-конюгирано анти-ANX A1 антияло, след което със Streptavidin-eFlour 710. Клетките бяха инкубирани допълнително с комбинация от анти-CD3-eFlour450/анти-CD4-APC, анти-CD3-eFlour450/анти-CD8-FITC или анти-CD19-eFlour450 антитела. Анализирани бяха десет хиляди клетки от всяка проба чрез проточен цитометър. Данните са представителни от пет експеримента.

Спленоцити от женски MRL/lpr мишки (на възраст 14 седмици) бяха изолирани и анализирани чрез FACS, за да бъде установено наличието на повърхностна експресия на ANX A1. Установено беше, че ANX A1 е експресиран при 8.1% от CD19⁺ лимфоцитите (Фиг. 2). Резултатите показват също, че 7.1% от CD3⁺/CD4⁺ и 4.9% от CD3⁺/CD8⁺ лимфоцитите експресират ANX A1 по клетъчната си повърхност.

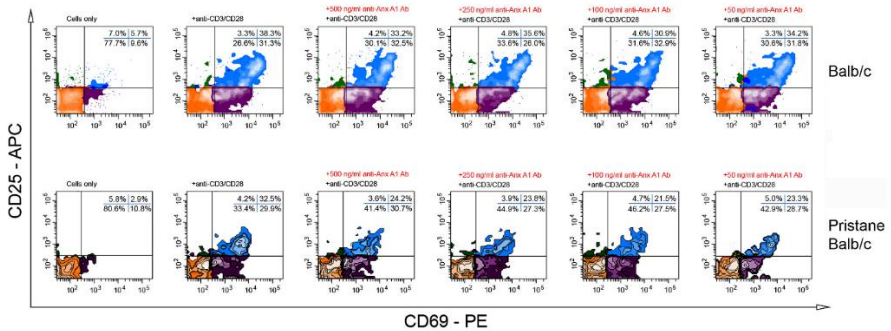


Фиг. 2. FACS анализ за откриване на повърхностна експресия на ANX A1. Спленоцити от 14 седмични MRL/lpr мишки с изявиени симптоми на лупус бяха инкубирани с бйотин-конюгиран анти-ANX A1 антитяло или изотипна контрола, последвано от Streptavidin-eFluor 710. Клетките бяха инкубирани допълнително с анти-CD19-PE, анти-CD3-eFluor450/анти-CD4-APC, или анти-CD3- eFluor450/анти-CD8-FITC антитела. Анализирани бяха десет хиляди клетки от всяка проба. Данните са представителни от поне пет експеримента.

1.2. Модулиране експресията на Т клетъчните активационни маркери чрез анти –ANX A1 антитялото.

За да изследваме ролята на ANX A1 върху активирането на Т лимфоцитите по време на прогресията на лупус, клетки от слезка от Balb/c мишки, инжектирани с пристан или само с PBS, бяха стимулирани с анти-CD3/CD28 антитела в присъствието на нарастващи концентрации на анти-ANX A1 антитялото. FACS анализите, извършени за изследване на експресията на

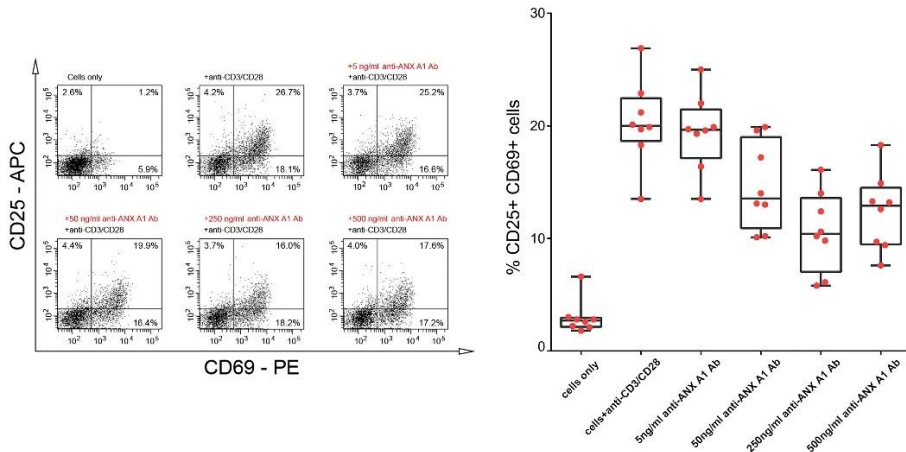
CD25/CD69 върху нестимулирани спленоцити показват по-високи нива на Т клетъчна активация при здрави Balb/c мишки в сравнение с инжектираните с пристан (Фиг. 3). Стимулирането с анти-CD3/CD28 антитела води до чувствително повишаване на експресията на CD25/CD69 активационните маркери, на 24 час от активирането, в групата животни с пристан-предизвикан СЛЕ, в сравнение с третираните с PBS Balb/c мишки. След проведена терапия с анти-ANX A1 антитяло беше наблюдавано дозозависимо намаление на CD25⁺CD69⁺ Т клетки и в двете групи, като това влияние е по-добре изразено при групата с пристан-индуциран лупус. Най-силно потискане на Т клетъчното активиране беше постигнато с концентрация на антитялото от 100 ng/ml (21.5%) в сравнение с контролната проба от активирани клетки в групата, инжектирана с пристан (32.5%).



Фиг. 3. Модулиране на експресията на Т клетъчни активационни маркери CD25/CD69 от анти-ANX A1 антитялото. Спленоцити от инжектирани с пристан или само с PBS Balb/c мишки бяха стимулирани с анти-CD3/CD28 антитела и в последствие инкубирани с различни концентрации на анти-ANX A1 антитялото (вариращи от 50 до 500 ng/ml). Клетките бяха допълнително оцветени с анти-CD3-FITC, анти-CD25-APC и анти-CD69-PE. Анализирани бяха десет хиляди клетки от всяка проба чрез проточна цитометрия. Данните са представителни от пет експеримента.

Извършени бяха FACS анализи и със спленоцити от MRL/lpr мишки, като клетките отново бяха активирани с анти-CD3/CD28 антитела, след което култивирани с нарастващи концентрации на тестваното антитяло. Третирането с анти-ANX A1 антитялото води до дозозависимо потискане на експресията на CD25/CD69 активационните маркери (Фиг. 4). Най-силно потискане на Т клетъчното активиране беше постигнато с концентрация на антитялото 250 ng/ml (16%) в сравнение с контролната проба от активирани клетки (26.7%).

Контролното антияло не повлиява маркерите за активиране на Т клетки (данните не са показани).

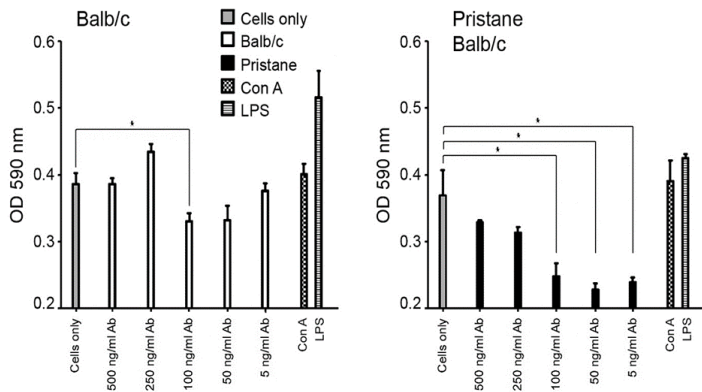


Фиг. 4. Третирането на спленоцити от MRL/lpr мишки с анти-ANX A1 антияло потиска активираните Т клетки *in vitro*. Анти-CD3/CD28 стимулирани клетки от слезка получени от MRL/lpr мишки бяха кокултивирани с различни концентрации на анти-ANX A1 антияло. Получените резултати от всички експерименти са представени графично. Резултатите са представителни от пет независими експеримента.

1.3. Инхибиране на Т-клетъчната пролиферация чрез антияло срещу Анексин А1 *in vitro*.

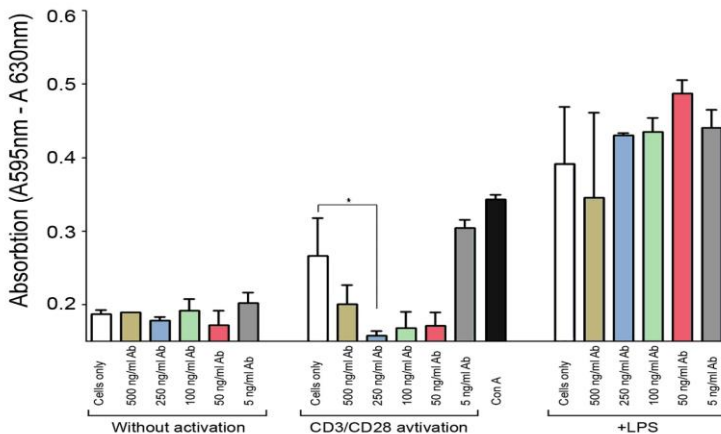
Способността на анти-ANX A1 антиялото да потиска клетъчната пролиферация беше изследвана *in vitro* чрез добавяне на различни концентрации от него към култивирани спленоцити от инжектирани с пристан или само с PBS Valb/c мишки. Клетъчната пролиферация беше оценена чрез добавяне на МТТ за последните 4 часа от 28-часов период на култивиране и измерване на абсорбцията на преобразуваното багрило. Значително дозозависимо инхибиране на клетъчната пролиферация беше наблюдавано при третираните с анти-ANX A1 антияло клетки, изолирани от животни с пристан-индуциран лупус, в сравнение със спленоцити от същите животни, култивирани само в среда (Фиг. 5, десен панел). В допълнение, инкубирането на спленоцити от контролни Valb/c мишки инжектирани с анти-ANX A1

антитялото не повлиява клетъчната пролиферация по същия начин и само концентрация на антитялото от 100 ng/ml показва значително инхибиране (Фиг. 5, ляв панел).



Фиг. 5. Анти-ANX A1 антитялото инхибира *in vitro* пролиферацията на спленоцити. Спленоцити от пристан-инжектирани животни или от здрави Balb/c мишки бяха култивирани в присъствието на различни концентрации на анти-ANX A1 антитяло. Като контролни проби бяха използвани клетки, култивирани в присъствието на ConA, LPS или само в среда. Клетъчната пролиферация беше оценена чрез добавяне на MTT и измерване на абсорбцията на преобразуваното багрило при дължина на вълната 590 nm с изваждане на фона при 620 nm. Сравнението беше извършено спрямо клетки култивирани само в среда. Резултатите бяха изразени като средна стойност \pm SD от трикратни повторения. * $p < 0.05$; ANOVA тест. Данните са представителни от шест независими експеримента.

Спленоцити от MRL/lpr мишки бяха култивирани *in vitro* с различни концентрации на тестваните антитела с или без допълнително активиране. Значително дозозависимо потискане на клетъчната пролиферация беше наблюдавано при спленоцити, предварително активирани с анти-CD3/CD28 антитела и ко-култивирани с анти-ANX A1 антитяло в сравнение с ANX A1 нетретираните клетки. Анти-ANX A1 антитялото не повлиява значимо Т клетъчната пролиферация на неактивирани Т лимфоцити, както и на LPS-стимулираните спленоцити от MRL/lpr мишки. В допълнение, инкубирането на MRL/lpr спленоцити с контролното антитяло не повлиява клетъчната пролиферация (данните не са показани) (Фиг. 6).

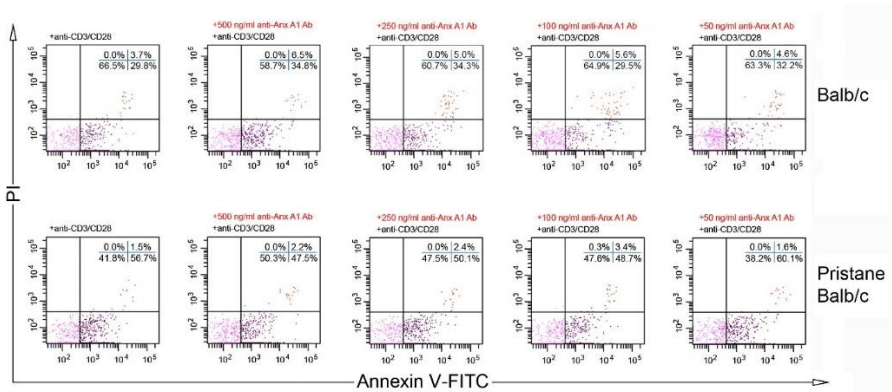


Фиг. 6. Анти-ANX A1 антиятото инхибира клетъчната пролиферация *in vitro*. Спленоцитите от MRL/lpr мишки бяха стимулирани с анти-CD3/CD28 антигела или с LPS и бяха култивирани в присъствието на различни концентрации на анти-ANX A1 антиятото. Пробите бяха сравнени спрямо нетретираните контролни клетки. Всички проби бяха утроени и средните стойности бяха използвани за анализ. Резултатите бяха изразени като средна стойност \pm SD с ANOVA тест; * $p < 0.05$). Данните са представителни от пет независими експеримента.

1.4. Влияние на анти-ANX A1 антиятото върху апоптозата на Т лимфоцитите.

Характерна особеност при животните с пристан-индуциран лупус е появата на лимфаденопатия и спленомегалия, като това уголемяване на лимфоидните органи се дължи главно на натрупването на голям брой автореактивни Т клетки. За да бъде проследен ефектът от терапията с анти-ANX A1 антиятото върху лимфоидните клетки, CD3/CD28 активирани спленоцити, получени от инжектирани с пристан или само с PBS Balb/c мишки бяха култивирани в продължение на 24 часа в присъствието на нарастващи концентрации от анти-ANX A1 антиятото. Клетките бяха допълнително промити, инкубирани с eFlou450-конюгиран анти-CD3 или анти-CD19 антигела, след което повърхностната експресия на фосфатидилсерин беше анализирана чрез проточна цитометрия с помощта на кит за визуализиране на AnnexinV/PI. Наблюдавано беше дозозависимо повишаване на процента на апоптозата (късен и ранен стадий) в популацията на селектираните CD3 клетки от третираните с PBS Balb/c мишки след инкубиране с анти-ANX A1 антиятото. Същото третиране на спленоцити от мишки, инжектирани с

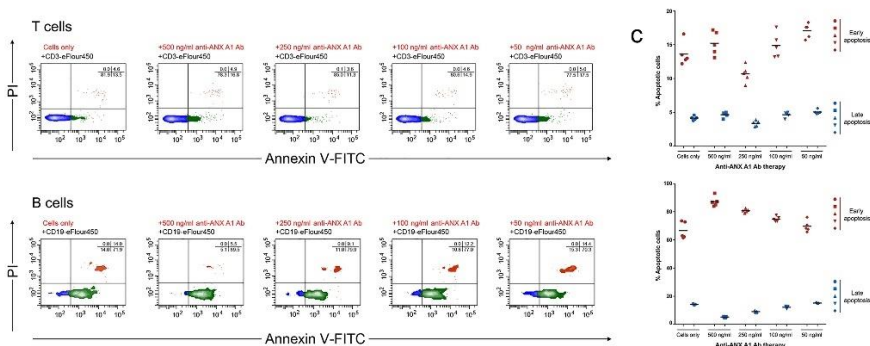
пристан, води до зависимо от дозата понижаване на процента Т клетки в ранна апоптоза в сравнение с клетки, които не са били инкубирани в присъствието на анти-ANX A1 антитяло. Освен това, след терапията беше наблюдавано умерено повишаване на броя на клетките в късна апоптоза (Фиг. 7). Такъв ефект не беше отчетен в популацията на CD19⁺ лимфоцитите (данните не са показани).



Фиг. 7. Анти-ANX A1 антитяло индуцира апоптоза в Т-клетъчната популация. Спленицити получени от здрави Balb/c мишки или такива с пристан-индуциран СЛЕ, бяха култивирани в продължение на 24 часа само в среда RPMI-1640 или в среда, съдържаща различни концентрации от анти-ANX A1 антитялото (в диапазон от 50 до 500 ng/ml). В края на култивирането, клетките бяха оцветени с Анексин V-FITC/PI и CD3⁺ клетките бяха селектирани и анализирани чрез проточна цитометрия. Данните са представителни от пет експеримента.

MRL/lpr мишките носят мутация в гена за лимфопролиферация (lpr), водеща до развитие на лимфаденопатия и спленомегалия. Животните с тази мутация, подобно на тези с пристан-индуциран СЛЕ, натрупват голям брой автореактивни Т клетки в лимфоидните органи. За да бъде проучен ефектът от терапията с анти-ANX A1 антитялото върху апоптозата, както на Т, така и на В лимфоцитите, спленцити от 8-седмични женски MRL/lpr мишки бяха култивирани в присъствието на нарастващи концентрации на анти-ANX A1 или контролното антитела за период от 24 и 48 ч. Повърхностната експресия на фосфатидилсерин върху CD3⁺ и CD19⁺ лимфоцити беше проследена чрез проточна цитометрия. Не беше открит модулиращ ефект върху апоптозата след 24 часа инкубация с тестваното анти-ANX A1 антитяло (данните не са показани). Последващите анализи показаха зависимо от концентрацията увеличение на процента на Анексин V положителни (ранна апоптоза) CD19⁺

клетки след 48 часа инкубация с анти-ANX A1 антитялото. За разлика от това, беше отчетено концентрационно-зависимо понижаване в процента на CD19⁺ клетки в късна апоптоза след 48 часова инкубация с тестваното антитяло. При същото третиране не беше отчетено влияние върху апоптозата на Т клетките (Фиг. 8). Инкубирането на спленоцити с контролното антитяло не повлиява клетъчната апоптоза (данните не са показани).

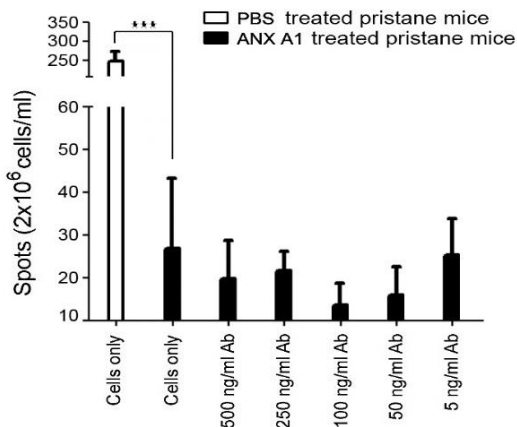


Фиг. 8. Анти-ANX A1 антитялото повлиява апоптозата на Т- и В- лимфоцити изолирани от MRL/lpr мишки. Спленоцити от MRL/lpr мишки бяха култивирани в продължение на 48 часа в пълна среда RPMI-1640 или в среда, съдържаща различни концентрации от анти-ANX A1 антитяло. Апоптозата беше анализирана чрез проточна цитометрия. Процентът на селектираните популации е показан във всеки квадрант. Показани са представителни данни от пет експеримента.

1.5. Терапията с антитяло срещу Анексин А1 намалява броя плазматични клетки, секретирани антитела срещу двДНК.

Ефектът на анти-ANX A1 антитялото върху броя на плазмоцитите, синтезиращи IgG антитела срещу двДНК беше оценен чрез ELISpot анализ. Спленоцити от пристан-инжектирани Balb/c мишки, третирани *in vivo* с анти-ANX A1 антитяло или само с PBS, бяха изолирани и култивирани в среда RPMI-1640 (с или без В и Т клетъчна стимулация) и в присъствието на нарастващи концентрации от изследваното антитяло. Спленоцити от животни с пристан-индуциран лупус и *in vivo* третирани с анти-ANX A1 антитяло показаха значително по-малък брой плазматични клетки специфични за двДНК в сравнение с PBS инжектираните лупусни животни. Броят на плазмоцитите, секретирани антитела със същата специфичност беше допълнително повлиян чрез *ex vivo* култивирани с тестваното антитяло. Най-силно намаляване в броя

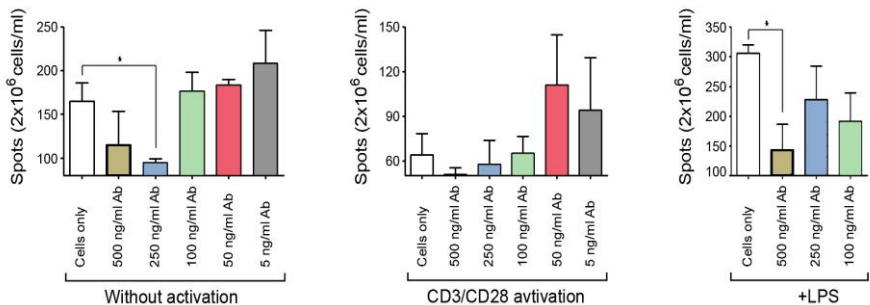
на плазмоцитите беше наблюдавано при концентрация на анти-ANX A1 антитялото от 100 ng/ml (Фиг.9).



Фиг. 9. Терапията с анти-ANX A1 антитяло намалява броя на клетките, секретирани антитела срещу двДНК. Спленоцити от инжектирани с пристан Balb/c мишки, третиран с анти-ANX A1 антитяло бяха култивирани *екс vivo* в присъствието на различни концентрации на анти-ANX A1 антитяло или само в среда. Като контроли бяха използвани спленоцити от инжектирани с пристан Balb/c мишки, третиран с PBS и култивирани само в среда. Броят на плазматичните клетки, секретирани IgG антитела срещу двДНК, беше определен с помощта на ELISpot анализ. Резултатите бяха изразени като средна стойност \pm SD от три повторения. Броят на точките в тестовите ямки беше сравнен с този на точките в контролните ямки, съдържащи спленоцити, култивирани само в среда (ANOVA тест; *** $p < 0.001$). Данните са представителни от пет експеримента.

Ефектът на анти-ANX A1 или на контролното антитяло върху броя на плазмоцитите, произвеждащи IgG антитела срещу двДНК, беше оценен и при генетично предразположени към СЛЕ MRL/lpr мишки чрез ELISpot анализ. За целта бяха използвани спленоцити от 8-седмични женски животни, които бяха съвместно култивирани с анти-ANX A1 или контролното антитяло с или без В или Т клетъчна стимулация. Култивирането на спленоцити в присъствието на 250 ng/ml от анти-ANX A1 антитялото за 4 дни без стимулация води до значително намаляване на броя плазматичните клетки, синтезиращи антитела срещу двДНК. Броят на плазмоцитите със същата специфичност беше намален и при стимулация с LPS и инкубиране с 500 ng/ml от анти-ANX A1 антитялото. Не бяха наблюдавани значителни разлики при клетки, стимулирани с анти-

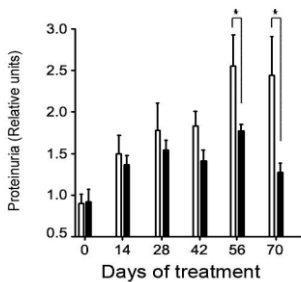
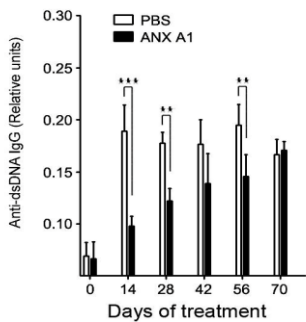
CD3/CD28 антитела (Фиг. 10), както и след култивиране с контролното антитяло (данните не са показани).



Фиг. 10. Терапията с анти-ANX A1 антитяло намалява броя на клетките, секретирани антитела срещу двДНК при MRL/lpr мишки. Спленоцити от болни женски MRL/lpr мишки бяха култивирани в присъствието на различни концентрации на анти-ANX A1 антитяло. Клетките бяха стимулирани с анти-CD3/CD28 антитела или с липополизахарид. Контролните клетки бяха култивирани само в среда. Броят на плазмочитите, специфични срещу двДНК беше оценен с помощта на ELISpot анализ. Резултатите бяха изразени като средна стойност \pm SD от три повторения. Преброените точки в тестовите ямки бяха сравнени с контролни ямки, съдържащи спленоцити, култивирани само със среда (ANOVA тест; * $p < 0.05$). Показани са представителни данни от пет експеримента.

1.6. Ефект на анти-Анексин А1 антитялото върху серумните нива на анти-двДНК IgG антитела и протеинурия при миши модели на лупус.

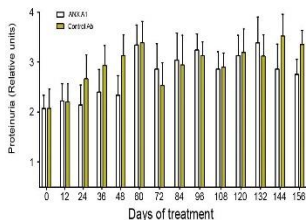
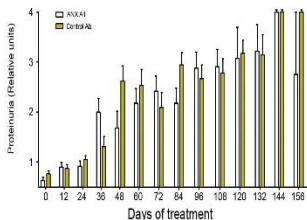
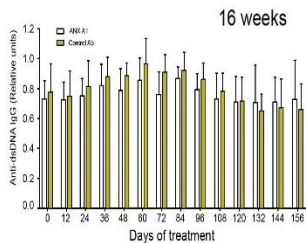
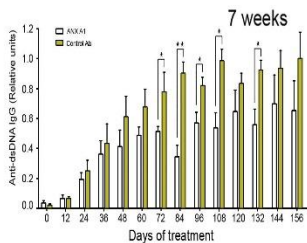
Ин vivo ефектът на анти-ANX A1 антитялото беше изследван при женски Balb/c мишки, развили лупус в следствие на инжектиране с пристан. Прилагането на анти-ANX A1 антитялото води до намаляване на нивата на анти-двДНК IgG антитела в сравнение с групата, третирана с PBS (Фиг. 11).



Фиг. 11. Третирането на Balb/c мишки с пристан-индуциран СЛЕ с анти-ANX A1 антитяло потиска появата на анти-двДНК IgG антитела и нивата на протеинурия. Групи от инжектирани с пристан Balb/c мишки (по 20 животни) бяха третираны на всеки 6 дни *i.p.* с 200 μ g анти-ANX A1 антитяло или само с PBS. Приложението на тестваното антитяло предотвратява появата на високи титри на IgG анти-двДНК антитела (горен панел) и води до намаляване на протеинурията (долен панел). Всички проби бяха в три повторения, средната стойност \pm SD, от които беше изчислена за всяка група; *p* стойностите бяха изчислени с помощта на ANOVA тест (**p* < 0.05) в сравнение с третираните с PBS контроли.

По време на лечението, беше забелязано значително повлияване на нивата на албумин в урината на болните животни сравнени спрямо контролната група.

Две групи женски MRL/lpr мишки (20 животни в група) бяха използвани за изследване на *in vivo* ефектите от терапията с анти-ANX A1 антитяло (Фиг. 12).

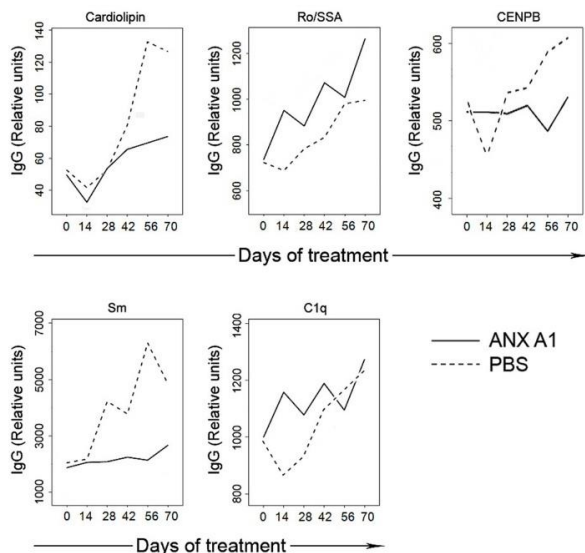


Фиг. 12. Терапията с анти-ANX A1 антитяло потиска появата на анти-двДНК IgG антитела в серумите на MRL/lpr мишки. Групи от 7- и 16-седмични MRL/lpr мишки (по 20 животни всяка) бяха имунизирани на всеки 6 дни *i.p.* с 200 ng/мишка анти-ANX A1 антитяло или с изотипно контролно антитяло. Приложението на анти-ANX A1 антитялото предотвратява появата на високи титри IgG анти-двДНК антитела при 7-седмични мишки. Всички проби бяха в трикратни повторения и средните стойности бяха използвани за анализ. Средните \pm SD стойности бяха изчислени за всяка група; P-стойностите бяха изчислени с помощта на ANOVA тест. (*P < 0.05; **P < 0.01) в сравнение с контролите, третиран с изотипно антитяло.

Експерименталните мишки бяха разделени в две възрастови групи: млади животни (на възраст 7 седмици), които все още не са развили симптоми на лупус и възрастни животни (16-седмични мишки) с вече високи нива на анти-двДНК антитела и албуминурия в началото на експеримента. Третирането на 7-седмичните MRL/lpr мишки с анти-ANX A1 антитяло предотвратява рязкото повишаване на нивата на IgG анти-двДНК антителата за разлика от групата, третирана с контролно изотипно антитяло. ELISA тестът показва значителни разлики между групите след 60 дни терапия, но не бяха наблюдавани разлики в албуминурията. Прилагането на тестваното антитяло при 16-седмичните MRL/lpr мишки повлиява незначително нивата на анти-двДНК IgG антитела и протеинурия по сходен начин.

1.7. Третирането с Анти-Анексин A1 антитяло повлиява нивата на IgG антитела срещу различни характерни за лупус автоантигени.

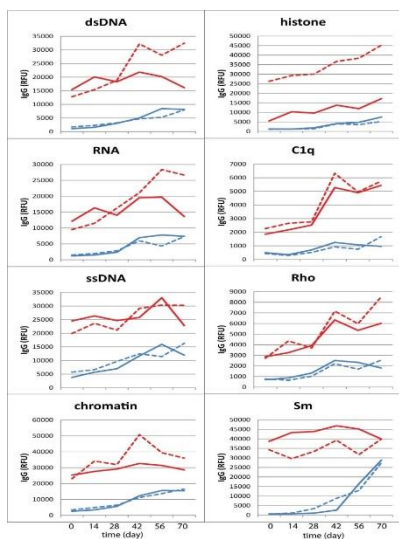
Тествана беше IgG и IgM автореактивността в серумите на експерименталните животни, използвайки микрочипове с автоантигени, характерни за СЛЕ (Фиг. 13).



Фиг. 13. Третирането на Balb/c мишки с пристан-индуцирани лупус с анти-ANX A1 антицяло потиска появата на IgG автоантитела срещу харктерни за лупус автоантигени. Коефициентът на вариация беше в диапазона 7–14% за различни антигени. Следователно стойности, показващи повече от 20% разлика, бяха считани за методологично статистически значими.

Серумите на животните от всяка експериментална група бяха събрани и допълнително анализирани чрез микрочипов анализ. Резултатите показаха значително въздействия върху нивата на специфичните IgG антителата срещу кардиолипин, центромерен протеин В (CENPB) и Sm (PHK-свързващи протеини) при мишките, третираните с анти-ANX A1 антицялото в сравнение с контролните животни, инжектирани с PBS. Ефект не беше наблюдаван при някои автоантигени като Ro/SSA (антиген на синдрома на Съогрен) и C1q. Не бяха наблюдавани и значими разлики в специфичните IgM антитела при третираните с анти-ANX A1 и контролните групи (данните не са показани).

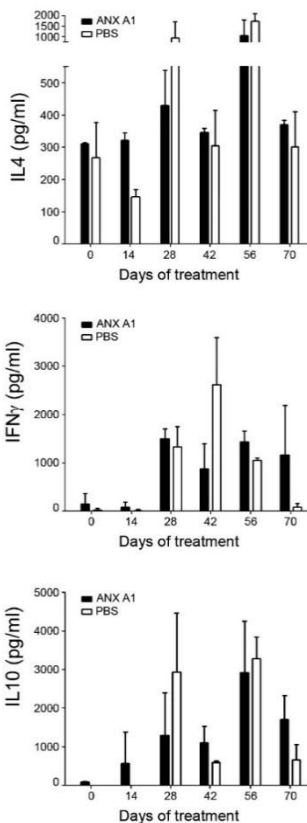
Същия подход на анализ с микрочипове беше използван и при серумите на групите от MRL/lpr миши третираните с изследваното антицяло или само с PBS (Фиг. 14).



Фиг. 14. Прилагането на анти-ANX A1 анти тяло при MRL/lpr мишки потиска появата на IgG автоантитела срещу характерни за СЛЕ автоантигени. Приложението на анти-ANX A1 анти тялото при 7 седмични (сини) и 16 седмични (червени) животни повлиява нивата на различни IgG автоантитела, измерени чрез микрочипове.

Серумите бяха събирани на всеки две седмици за първите 70 дни от терапията и пробите от всяка експериментална група бяха обединени и допълнително анализирани. Резултатите както за групите на възраст 7 седмици (синьо), така и за тези на възраст 16 седмици (червено), третирани с анти-ANX A1 анти тяло (плътна линия) са показани на Фиг. 14. При 7 седмичните животни не бяха открити значителни разлики в стойностите на IgG автоантителата при никой от тестваните антигени. За разлика от тях, при 16 седмичните животни третирани с анти-ANX A1 анти тялото беше наблюдаван значителен спад в нивата на двДНК, РНК, хистон и хроматин-специфични IgG антитела в сравнение с контролната група. Бяха установени повишени нива на автоантителата срещу Sm (РНК-свързващи протеини) антигена при групата, третирана с анти-ANX A1. Не бяха наблюдавани значими разлики в стойностите на IgG, специфични за C1q, ssDNA и Ro/SSA (антиген на синдром на Сьогрен) между третираната с анти-ANX A1 анти тялото и контролната групи. Отново не беше наблюдавано повлияване на нивата на IgM антителата срещу собствени антигени при всички експериментални групи (данните не са показани).

1.8. Измерване на цитокини.

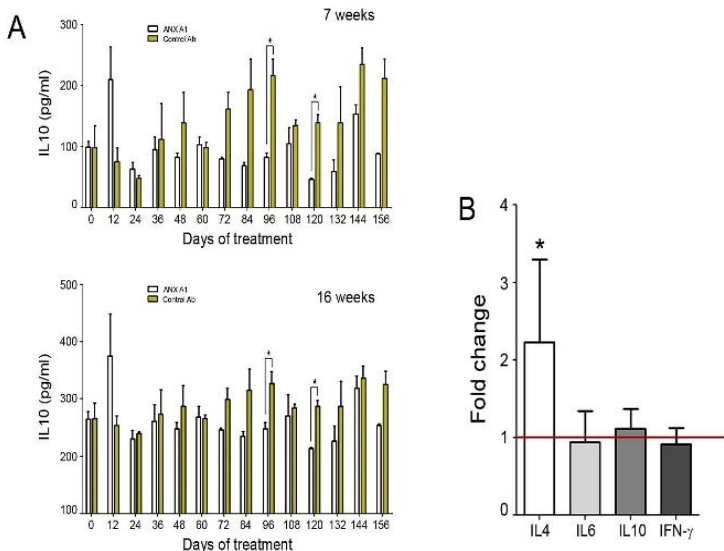


За да бъде изследван ефектът от лечението с анти-ANX A1 антитялото, серумите на мишки, инжектирани с пристан, бяха анализирани за проследяване нивата на някои цитокини с ключова роля в патогенезата на заболяването. Както беше очаквано, в даден момент при групата мишки, третирани с PBS, бяха наблюдавани по-високи серумни нива на IL10 и IFN γ в сравнение с животните, на които се прилага анти-ANX A1 терапия (Фиг. 15). Животните, при които е приложено терапевтичното антитяло показаха по-високи серумни нива на IL4 през първите 14 дни от лечението в сравнение с групата, инжектирана с PBS. Терапията с анти-ANX A1 антитялото не повлия допълнително нивата на IL4 до края на експеримента.

Фиг. 15. ELISA за определяне на серумните нива на IL10, IFN γ и IL4 в експерименталните групи. Всички проби бяха утроени и средните стойности бяха използвани за анализ. Средната стойност \pm SD от трите повторения бяха изчислени за всяка група; р стойностите бяха изчислени с помощта на ANOVA тест в сравнение с третираните с PBS контроли.

Серумните нива на ключови цитокини бяха проследени и в серумите получени от MRL/lpr мишия модел. Групите от 7- и 16-седмични MRL/lpr мишки (по 20 животни в група), третирани с контролното антитяло продуцират по-високи стойности на IL10 в сравнение с животните, инжектирани с анти-ANX A1 антитяло (Фиг. 16A). Въпреки това, приложението на терапевтичното антитяло не повлиява значително серумните нива на IFN γ и IL4 в сравнение с контролната група (данните не са показани).

За да бъде по-пълно охарактеризиран имунният отговор при генетично предразположените към автоимунитет мишки беше изследван профильт на експресия на мРНК на IL4, IL6, IL10 и IFN γ (Фиг. 16B).

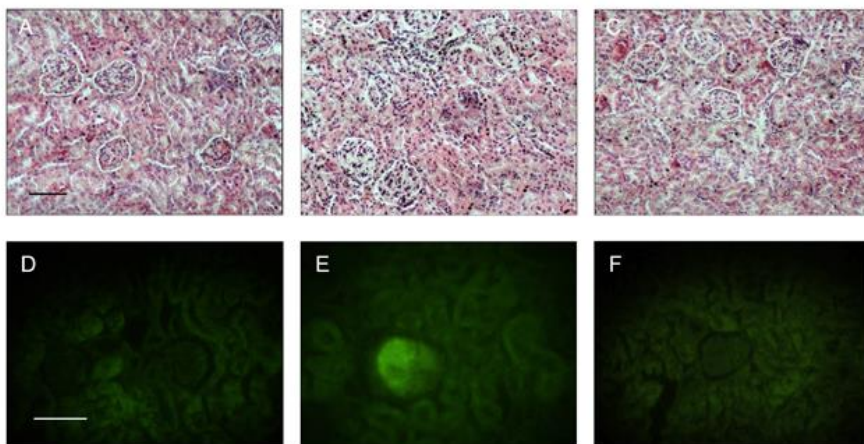


Фиг. 16. А) Прилагането на анти-ANX A1 антитяло при MRL/lpr мишки модулира производството на IL10 и IL4. Групи от 7 и 16 седмични MRL/lpr мишки (20 животни в група) бяха имунизирани на всеки 6 дни *i.p.* с 200 ng/мишка анти-ANX A1 антитяло или с изотипно контролно антитяло. Серумните нива на IL10 и в двете групи бяха измерени чрез ELISA. Всички проби бяха утроени и средните стойности бяха използвани за анализ. Б) За да бъдат оценени нивата на експресия на мРНК за IL4, IL6, IL10 и IFN γ беше проведен qRT-PCR. За целта беше изолирана мРНК от спленцити получени от 7-седмични MRL/lpr мишки, третиращи в продължение на 7 седмици с анти-ANX A1 или контролно антитяло. Графиките представят кратната промяна в нивата на експресия за съответния цитокин. Средните \pm SD стойности бяха изчислени за всяка група; P-стойностите бяха изчислени с помощта на ANOVA тест. (*P < 0.05; **P < 0.01) в сравнение с контролите, третиращи с изотипно антитяло.

За целта бяха използвани спленцити от 7-седмични животни третиращи в продължение на 7 седмици с анти-ANX A1 или изотипно антитяло. Проведеният qRT-PCR анализ показва, че животните от терапевтичната група експресират по-високи нива на IL4 мРНК в сравнение с тези, на които е прилагано контролно антитяло. Значителни разлики между групите не бяха открити по отношение на експресията на IL6, IL10 и IFN γ .

1.9. Терапията с анти-Анексин А1 антителято потиска симптомите на лупус при пристан-инжектирани мишки и при генетично предразположени към болестта животни.

В края на лечението експерименталните животни бяха жертвани и бъбреците бяха отпрепарирани за имунофлуоресцентен и хистопатологичен анализ. При всички пристан-инжектирани контролни мишки бяха установени периваскуларни инфилтрати от възпалителни клетки и повишена мезангиална пролиферация в бъбречните гломерули (Фиг. 17, горен панел).



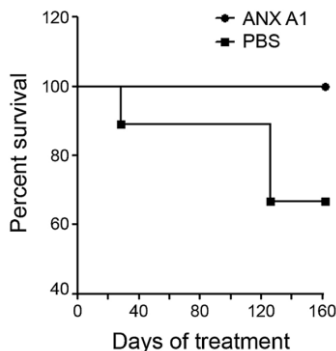
Фиг. 17. Хистологични анализи на бъбреци. Бъбречни срези, оцветени с хематоксилин/еозин от (А) от третиран с PBS здрави Balb/c мишки, (В) третиран с PBS инжектирани с пристан, болни мишки и (С) мишки, инжектирани с пристан и третиран с анти-ANX А1 антителято. Стрелката показва област на клетъчна инфилтрация. Данните са представителни за пет експеримента. Скала, 200 μm . Оригинално увеличение $\times 250$. Имунофлуоресцентен анализ на отлагане на IgG в гломерулите на (D) третиран с PBS здрави Balb/c мишки, (E) третиран с PBS болни, инжектирани пристан и (F) третиран с анти-ANX А1 антителято инжектирани пристан. Бъбречните срези от поне пет мишки бяха оцветени с FITC-белязано козе анти-мише IgG антителято. Данните са представителни за пет експеримента. Скала, 200 μm . Оригинално увеличение $\times 400$.

За разлика от тях бъбреците на мишките, третиран с анти-ANX А1 антителято имаха значителни по-добре запазена хистологична структура, въпреки наличието на интерстициален инфилтрат.

Чрез имунофлуоресценция беше проследено наличието на IgG-съдържащи имунни комплекси в бъбреците на експерименталните животни.

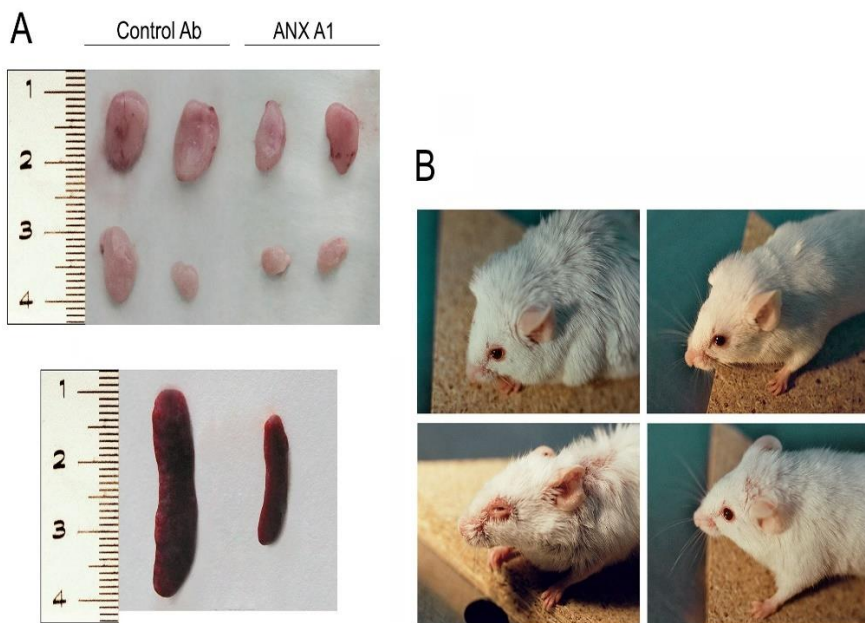
Контролната група мишки показва масивни гломерулни отлагания на IgG-съдържащи имунни комплекси, докато при животните, третирани с анти-ANX A1 антитяло такива комплекси не бяха установени (Фиг. 17, долен панел).

Прилагането на анти-ANX A1 антитялото в продължение на 160 дни при инжектирани с пристан мишки удължава преживяемостта им в сравнение с контролната група (Фиг. 18).



Фиг. 18. Криви на преживяемост на изследваните групи животни. Третирането с анти-ANX A1 антитяло удължава преживяемостта на инжектирани с пристан мишки (10 животни в група). Данните са представени като \pm SD. Стойностите на p бяха изчислени с помощта на Log-rank тест ($*p < 0.05$), в сравнение с мишки третирани с PBS.

В края на *in vivo* експериментите с MRL/lpr мишки, при всички животни в контролната групи беше наблюдавана тежка лимфаденопатия, докато при мишките, третирани с анти-ANX A1 антитялото бяха отчетени по-малки по размер периферни лимфни възли и слезки и само при 20% от третираните животни беше наблюдавана лимфаденопатия и спленомегалия (Фиг. 19A).

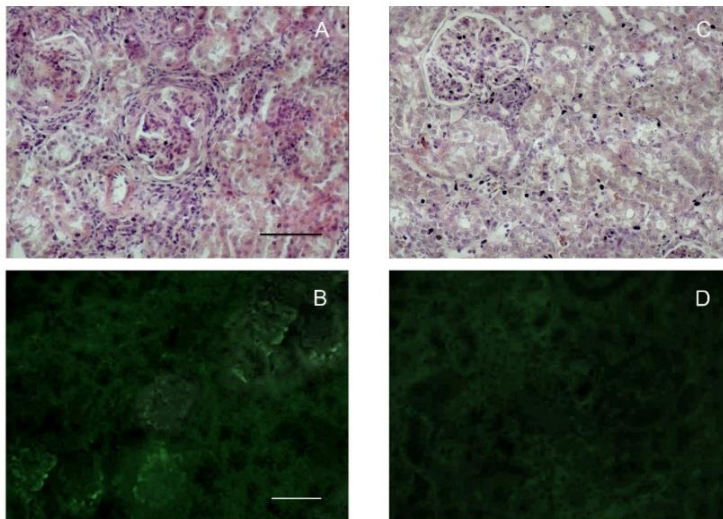


Фиг. 19. (А) Продължителното приложение на анти-ANX A1 антитялото предотвратява увеличаването на размера на лимфоидните органи при предразположени към лупус MRL/lpr мишки в края на експериментите. Слезки и лимфни възли от контролни животни, инжектирани с изотипно антитяло (вляво) и от мишки, третирани с анти-ANX A1 антитяло (вдясно) (20 животни в група) (В) Лечението също така предотвратява развитието на кожни лезии при третирани животни на възраст 7 седмици (горен панел) и 16-седмични (долен панел). Контролните MRL/lpr мишки развият тежки кожни лезии (леви панели), докато кожата на тестовите групи остава незасегната (десни панели).

Всички контролни животни в двете възрастови групи (7 и 16 седмични) развиха кожни лезии, характерни за кожната форма на заболяването по врата и главата (Фиг. 19В, леви панели). Не бяха наблюдавани такива в нито една от мишките, третирани с анти-ANX A1 антитяло (Фиг. 19В, десни панели).

Тежък гломерулонефрит и мононуклеарна клетъчна инфилтрация са типични находки при предразположени към развитие на лупус MRL/lpr мишки. При контролните животни бяха наблюдавани периваскуларни възпалителни клетъчни инфилтрати и мезангиална пролиферация в гломерулите, докато прилагането на анти-ANX A1 антитялото спомогна за значителното запазване

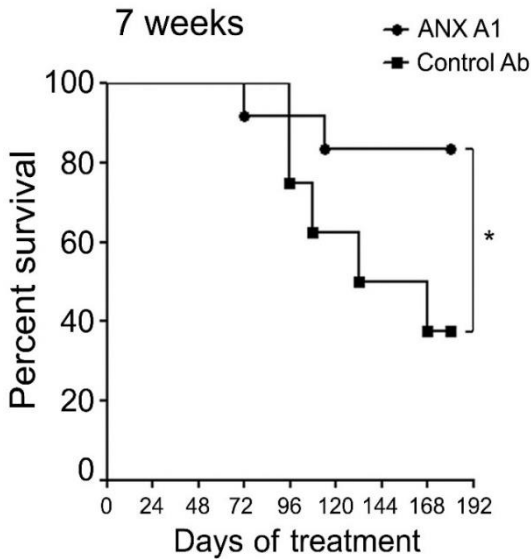
на нормалната бъбречната хистология, независимо от леката инфилтрация открита при някои от животните. (Фиг. 20, горни панели).



Фиг. 20. Хистологични анализи на бъбреци. Бъбречни срези, оцветени с хематоксилин/еозин от третиран с изотипно контролно антияло MRL/lpr мишки (A) и третиран с анти-ANX A1 антияло MRL/lpr мишки (C). Данните са представителни за пет експеримента. Оригинално увеличение x250. Имунофлуоресцентен анализ на отлагането на IgG-съдържащи комплекси в гломерулите на инжектирани с изотипно контролно антияло MRL/lpr мишки (B) и третиран с анти-ANX A1 антияло MRL/lpr мишки (D). Бъбречните срези от пет мишки бяха оцветени с FITC-белязано козе анти-мише IgG. Оригинално увеличение x400.

Имунофлуоресцентен анализ на парафиновите препарати показва масивни мезангиални отлагания от IgG-съдържащи имунни комплекси в бъбречните глумерули на контролните животни, докато при третираните с анти-ANX A1 антияло MRL/lpr мишки такива отлагания не бяха открити (Фиг. 32, долни панели).

Терапията с анти-ANX A1 антиялото в продължение на 180-дни значително удължава преживяемостта на 7-седмичните MRL/lpr мишки в сравнение с контролната група животни (Фиг. 21). Същата терапия при 16-седмични болни животни не оказва въздействие върху продължителността на живота им (данните не са показани).



Фиг. 21. Криви на преживяемост на изследваните групи животни. Третирането с анти-ANX A1 антиляло значително увеличава преживяемостта на по-младата група MRL/lpr мишки (20 животни в група). Данните са представени като средно аритметично \pm SD. P-стойностите бяха изчислени с помощта на кривите на преживяемост на Kaplan-Meier (*P < 0.05), в сравнение с мишки, третиранни с изотипно антиляло.

2. РЕЗУЛТАТИ втора част – хуманизиран миши модел.

2.1. Пациенти със системен лупус еритематозус.

Клиничните характеристики на пациентите са показани в Таблица 1.

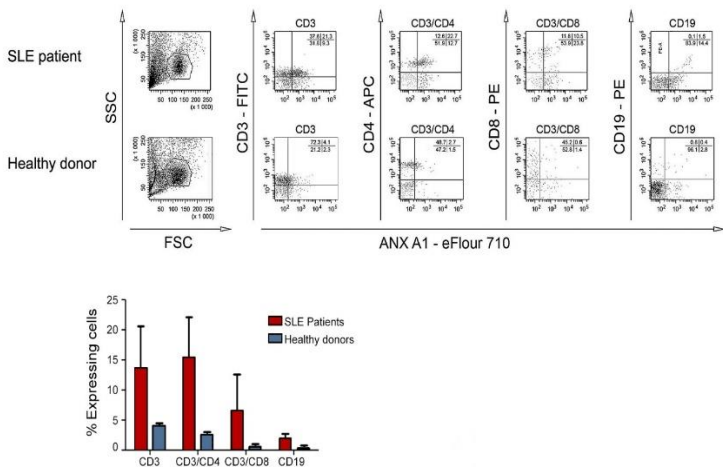
Пациент/пол	Диагноза	Автоантитела	Протеинурия
Пациент 1/ж	СЛЕ	ANA, dsDNA, aCL	-
Пациент 2/ж	СЛЕ	ANA, dsDNA, aCL, b2GPI	+
Пациент 3/ж	СЛЕ	ANA, dsDNA, aCL, b2GPI, nRNP/Sm, Sm, histones +	+
Пациент 4/ж	СЛЕ	ANA, dsDNA, Rib-P, SS-B	+
Пациент 5/ж	СЛЕ	ANA, dsDNA, Sm	+
Пациент 6/ж	СЛЕ	ANA, dsDNA, aCL	-
Пациент 7/ж	СЛЕ	ANA, dsDNA, nucleosomes	+
Пациент 8/ж	СЛЕ	ANA, dsDNA, SS-A, nucleosomes	+
Пациент 9/ж	СЛЕ	ANA, dsDNA, aCL, b2GPI	+

Пациент 10/м	СЛЕ	ANA, dsDNA	+
Пациент 11/ж	СЛЕ	ANA, dsDNA, Sm, SS-A, SS-B	-
Пациент 12/ж	СЛЕ	ANA, dsDNA, Sm, nRNP/Sm	+
Пациент 13/ж	СЛЕ	ANA, dsDNA, Sm	+
Пациент 14/ж	СЛЕ	ANA, dsDNA, nRNP/Sm, SS-A	-
Пациент 15/ж	СЛЕ	ANA, dsDNA	+
Пациент 16/м	СЛЕ	ANA, dsDNA, histones, nucleosomes	+

СЛЕ = системен лупус еритематозус; ANA = антинуклеарни автоантитела; ж = женски; м = мъжки; dsDNA = двойноверижна ДНК; aCL = анти-кардиолипиново антитяло; b2GPI = бета-2-гликопротеин I.

2.2. Човешките Т и в по-ниска степен В лимфоцити експресират ANX A1 по клетъчната си повърхност.

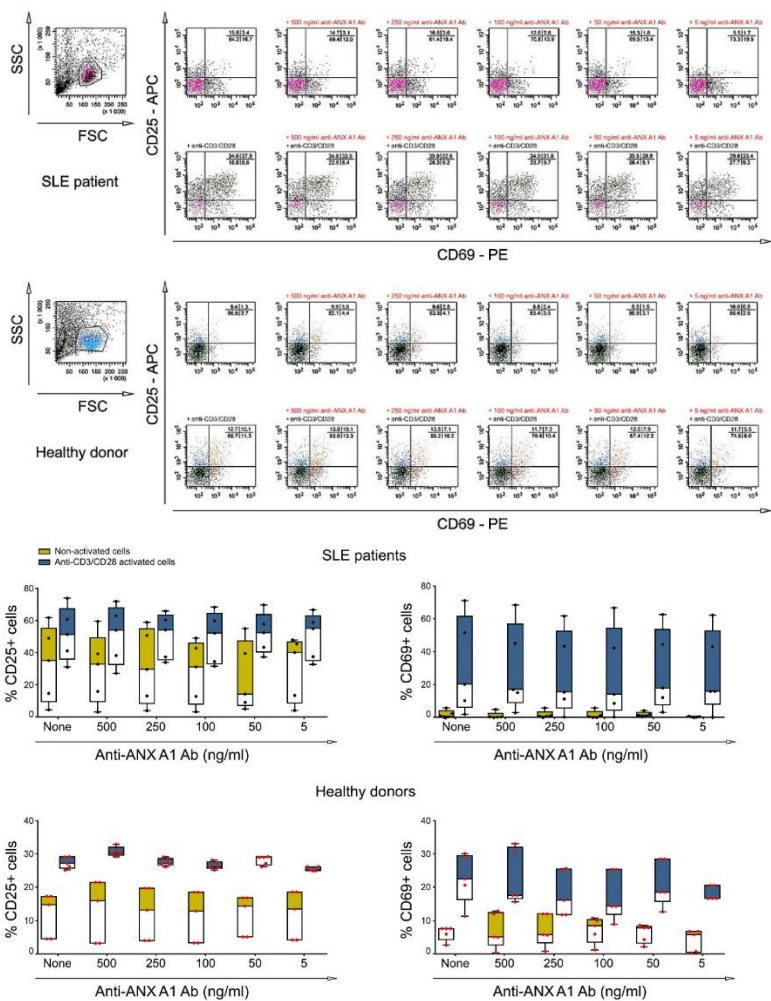
РВМС от здрави донори и пациенти с лупус, които не са активирани *in vitro* бяха анализирани чрез проточна цитометрия. Голям процент (21.3% в представителния пример) от Т клетките в кръвта на пациенти със СЛЕ експресират ANX A1 по повърхността си в сравнение със само 4.1% от Т клетките от здрави доброволци. При субпопулациите от CD4⁺ и CD8⁺ Т клетки се запазва приблизително същата значима разлика в експресията на ANX A1 между пациенти със СЛЕ и здрави донори. Човешките В клетки показаха нисък процент на експресия на ANX A1, вариращ от 1 до 3% при СЛЕ пациенти и по-малко от 1% при здрави донори (Фиг. 22). За контрола беше използвано биотинилирано антитяло, при което не бяха отчетени положителни събития.



Фиг. 22. Повърхностната експресия на Анексин А1 (ANX A1) анализирана чрез проточна цитометрия. Представителни резултати (горе) и графично представяне на всички донори (долу). Показаните данни са от пет пациенти със системен лупус еритематозус (СЛЕ) и пет здрави донора, които са представени като средна стойност \pm стандартно отклонение ($n = 5$, $*P < 0,05$).

2.3. Модулиране експресията на Т клетъчни активационни маркери чрез анти-ANX A1 антитялото.

Ефектът на анти-ANX A1 антитялото върху Т клетъчното активиране беше изследван с помощта на РВМС от здрави донори и СЛЕ пациенти, които бяха стимулирани с анти-CD3/CD28 антителя или нестимулирани предварително. Клетките бяха инкубирани в присъствието на различни концентрации на анти-ANX A1 антитялото или на контролно антитяло и експресията на активационните маркери CD25 и CD69 беше измерена чрез проточна цитометрия. Извършените FACS анализи показаха незначително намаление в процента на активираните с анти-CD3/CD28 антителя Т клетки както от здрави донори, така и от пациенти със СЛЕ (до 5% за CD69⁺) (Фиг. 23).

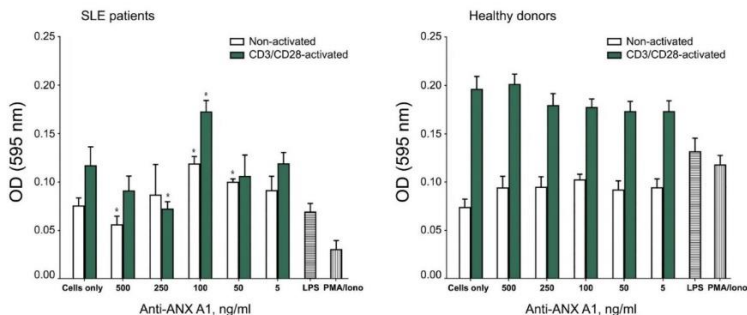


Фиг. 23. Влиянието на терапията с анти-ANX A1 антитялото върху експресията на Т клетъчните активационни маркери беше изследвано чрез проточен цитометър. Показани са представителни данни от пет експеримента (горни панели). Резултатите от всички експерименти са представени графично (долни панели). Данните от пет пациенти със СЛЕ и пет здрави донора са представени като средни стойности \pm стандартно отклонение ($n = 5$, $*P < 0,05$).

Трябва да се отбележи, че базовите нива на експресия на CD25 и CD69 бяха поне два пъти по-високи при пациенти със СЛЕ в сравнение със здравите донори. Наблюдавано беше слабо потискане на експресията на CD25 при Т клетки от пациенти със СЛЕ след инкубиране с анти-ANX A1 антители без предварително активиране със CD3/CD28, докато такава промяна не беше установена при клетките от здрави донори или след третиране с контролното антители (данните не са показани).

2.4. Влияние на анти-ANX A1 антителя върху Т клетъчната пролиферация *in vitro*.

За да бъде изследван потенциалният потискащ ефект на ANX A1 антителя върху клетъчната пролиферация, PBMC от пациенти с лупус и здрави донори бяха третирани *in vitro* с различни концентрации на анти-ANX A1 или контролно антителя с или без активиране с анти-CD3/CD28 антителя (Фиг. 24).



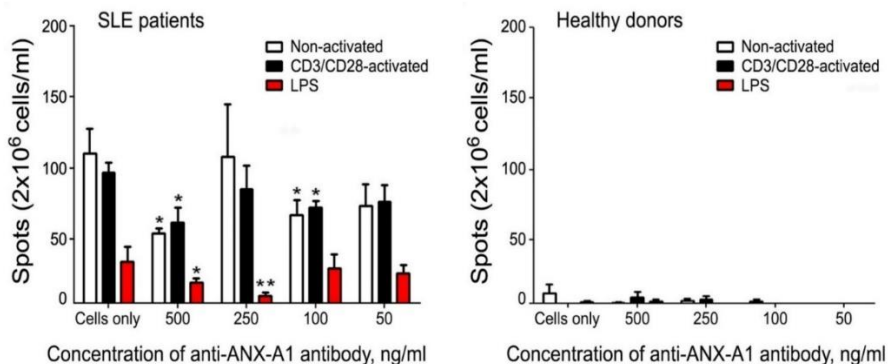
Фиг. 24. Анти-ANX A1 антителя инхибира пролиферацията на мононуклеарни клетки от периферната кръв (PBMC) *in vitro*. Анти-CD3/CD28 стимулирани или нестимулирани PBMC от пациенти със СЛЕ и здрави донори бяха култивирани в присъствието на различни концентрации на анти-ANX A1 антители. Пролиферацията им беше отчетена чрез МТТ-метод. Всички проби бяха утроени и средните стойности бяха използвани за анализ. Резултатите бяха изразени като средна стойност ± стандартно отклонение на трикратните повторения [ANOVA; *P < 0.05]. Пробите бяха сравнени с нетретирани пролифериращи клетки. Данните са представителни от четири независими експеримента.

Отчетен беше слаб инхибиторен ефект при 250 ng/ml след третиране с ANX A1 антители на предварително активирани PBMC от пациенти с лупус. Същият потискащ ефект беше постигнат с 500 ng/ml в проби без стимулация с анти-CD3/CD28 в сравнение с клетки нетретирани с анти-ANX A1 антители

(Фиг. 36, ляв панел). Анти-ANX A1 антитялото не повлиява значително Т клетъчната пролиферация на клетки от здрави донорни (Фиг. 36, десен панел). Инкубирането на PBMC от пациенти със СЛЕ или здрави донори в присъствието на различни концентрации на контролно антитяло не повлиява клетъчната им пролиферация (данните не са показани).

2.5. Влияние на анти-ANX A1 антитялото върху плазмоцити секретирани анти-двДНК IgG антитела.

Ефектът от терапията с анти-ANX A1 антитяло върху броя на произвеждащите анти-двДНК антитела плазмоцити беше оценен с помощта на ELISPOT тест (Фиг. 25).



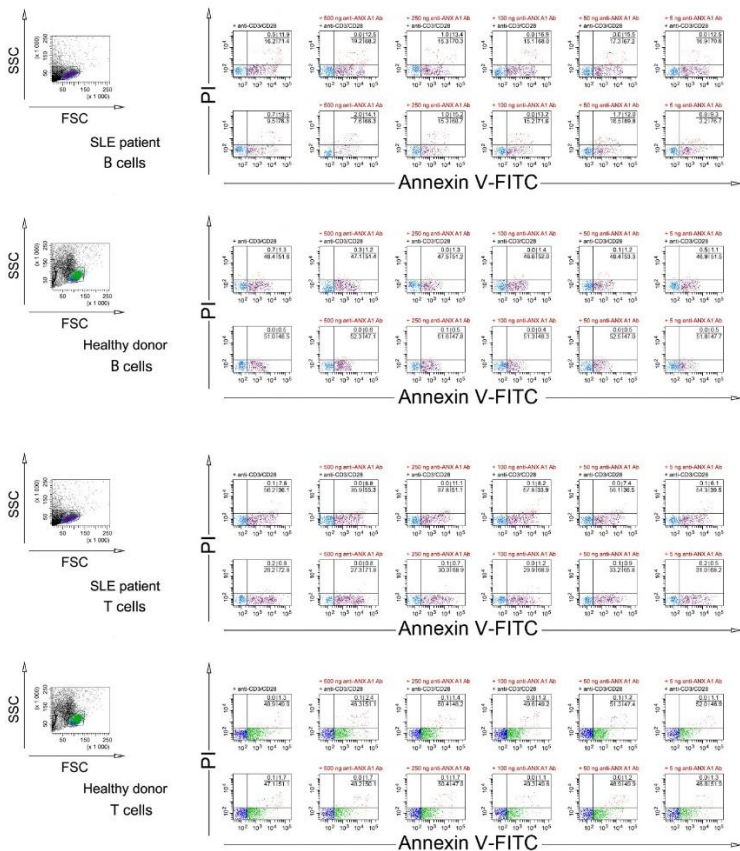
Фиг. 25. ELISPOT анализ показващ въздействието на анти-ANX A1 терапията върху броя на анти-двДНК антитяло-секретиращите плазмоцити. Инкубацията на PBMC от пациенти със СЛЕ и от здрави доброволци с различни концентрации от анти-ANX A1 антитяло потиска патологичните плазмоцити *in vitro*. Всички проби бяха утроени и средните стойности бяха използвани за анализ. Резултатите бяха изразени като средна стойност \pm стандартно отклонение на трикратните повторения [ANOVA; *P < 0.05; **P < 0.01]. Данните са представителни от четири независими експеримента. Броят на точките в тестовите ямки беше сравнен с броя на точките в контролните ямки, съдържащи клетки, култивирани само в среда.

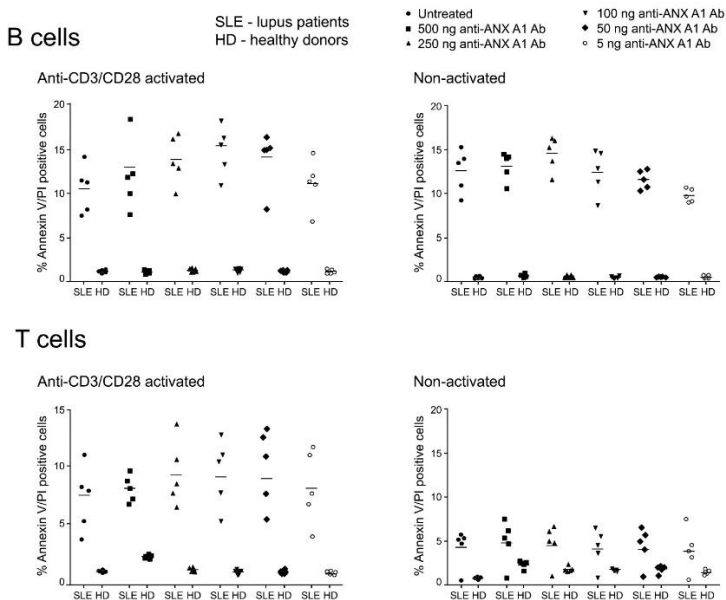
Наблюдавано беше независимо от концентрацията намаление на броя на анти-двДНК-секретиращите плазмоцити при всички тестови групи клетки (неактивирани, анти-CD3/анти-CD28 активирани и LPS стимулирани), третираны с анти-ANX A1 антитяло. Открити бяха минимални разлики след стимулиране на клетките с анти-CD3/CD28 антитела. Най-силният инхибиторен ефект беше отчетен при неактивирани клетки, инкубирани с 500

ng/ml анти-ANX A1 антитяло, както и при LPS-стимулирани PBMC, инкубирани с концентрация 250 ng/ml анти-ANX A1 антитяло (Фиг. 37, ляв панел). Не беше установено намаляване на броя плазмоцити при култивиране в присъствието на контролното антитяло (данните не са показани). Не бяха открити двДНК-специфични плазматични клетки при тестването на PBMCs изолирани от здрави донори (Фиг. 25., десен панел).

2.6. Анти-ANX A1 антитялото повишава процента на апоптотичните Т и В лимфоцити.

Влиянието на анти-ANX A1 антитялото върху апоптозата, както на Т така и на В лимфоцитите беше изследвано чрез проследяване на повърхностната експресия на фосфатидилсерин и клетъчната пропускливост. PBMC от пациенти със СЛЕ и здрави доброволци бяха култивирани в присъствието на нарастващи концентрации на анти-ANX A1 или контролно антитяло в продължение на 24 часа и беше проследена експресията на Annexin V с помощта на FACS анализ. Не беше регистриран модулиращ ефект върху апоптозата на Т клетки, които не са активирани предварително. Независимо че предварително активираните със CD3/CD28 Т клетки от пациенти със СЛЕ не показаха високи нива на апоптоза, някои концентрации на анти-ANX A1 антитялото водят до индуциране на процеса достигайки стойности, които при някои пациенти са два пъти по-високи от тези в контролна проба. Въпреки, че при човешките В клетки доказахме ниски нива на повърхностна експресия на ANX A1, проапоптотичният ефект на тестваното антитяло беше относително висок (Фиг. 26). Анти-ANX A1 антитялото не повлиява апоптозата на Т- и В клетките от здрави донори. Контролното антитяло също не оказва въздействие върху клетъчната апоптоза при всички проведени експерименти (данните не са показани).



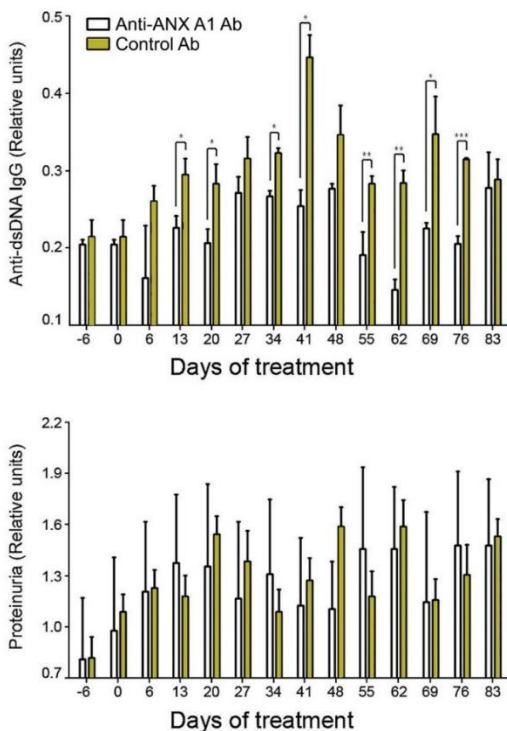


Фиг. 26. Анти-анексин А1 (ANX А1) антиятлото индуцира Т клетъчна апоптоза. Апоптозата беше анализирана чрез проточна цитометрия. Показани са представителни данни от пет експеримента (плотове – горна част на фигурата). Извлечените резултати от всички експерименти са представени графично и е показан процентът на клетките в късна апоптоза, двойно позитивни по Annexin V/PI (фигура – долна част). Всеки символ представлява отделен обект; стойностите са \pm средно стандартно отклонение от пет независими експеримента, използващи пет пациенти със СЛЕ и пет здрави донора; хоризонталните линии показват медианата.

2.7. Влияние на терапията с анти-анексин А1 антиятлото върху серумните нива на анти-двДНК IgG антитела и протенурията.

In vivo ефектът на анти-ANX А1 антиятлото беше изследван в хуманизирани женски имунодефицитни (NSG) мишки. Изолирани PBMC от пациенти със СЛЕ или здрави донори бяха използвани за хуманизиране на 40 NSG животни. Половината от тях послужиха като контролна група, третирана с изотипно антиятло, а другата половина бяха третирани с анти-ANX А1 антиятло, както е описано в раздела Материали и методи. Прилагането на анти-ANX А1 антиятло върху мишки, трансферирани с PBMC от СЛЕ пациенти води до значително намаляване на серумните нива на анти-двДНК антитела за почти целия период на лечение (Фиг. 27, горен панел). Този ефект се проявява най-

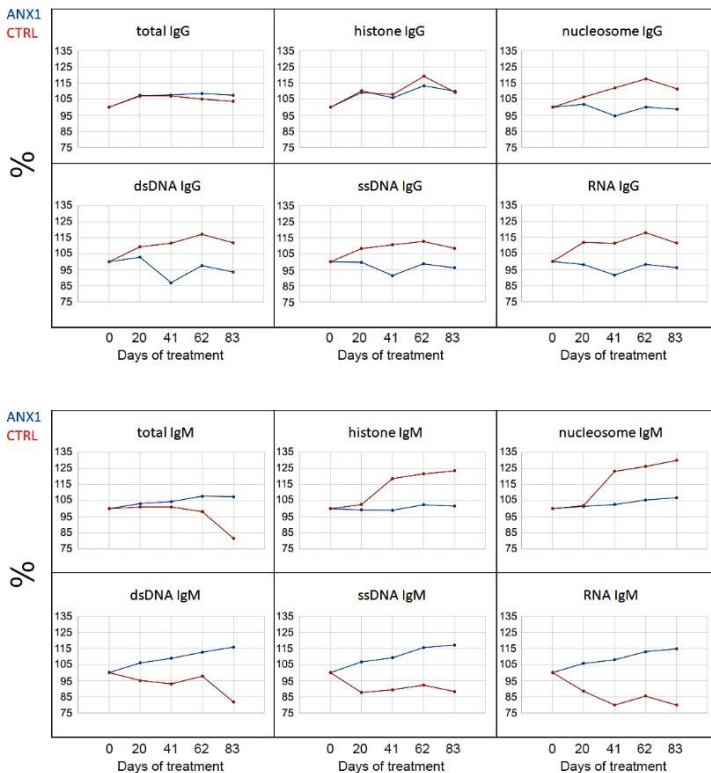
осезателно между 41-ия и 76-ия ден след хуманизиране на експерименталните животни. Анализът на протеинурията на третираните животни показва положително въздействие на лечението върху този параметър. Обобщените данни за нивата на протеинурия на всички мишки са представени на Фиг. 39 (долния панел). Въпреки, че разликата между групите е постоянна по време на лечението, периодът между 18-ти и 42-ри ден показва намаляване на нивата на протеин в урината на мишките, третирани с анти-ANX A1.



Фиг. 27. Терапията на хуманизирани имунодефицитни NSG мишки с анти-ANX A1 антияло потиска появата на двДНК специфични IgG антитела и протеинурия. Показан е представителен резултат от три независими експеримента. Всички проби бяха утроени и средните стойности бяха използвани за анализ. Средните стойности \pm стандартно отклонение бяха изчислени за всяка група; P-стойностите бяха изчислени с помощта на ANOVA тест (*P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001) в сравнение с контролни мишки, третирани с изотипно антияло.

2.8. Въздействие на терапията с анти-ANX A1 антитяло върху серумните нива на различни IgG и IgM автоантитела.

Сборни серуми от третиранни с анти-ANX A1 антитяло или инжектирани с контролно антитяло NSG мишки, хуманизирани с PBMC от пациенти с лупус, бяха тествани за различни автоантитела посредством микрочипове, включващи автоантигени, характерни за СЛЕ (Фиг. 28).



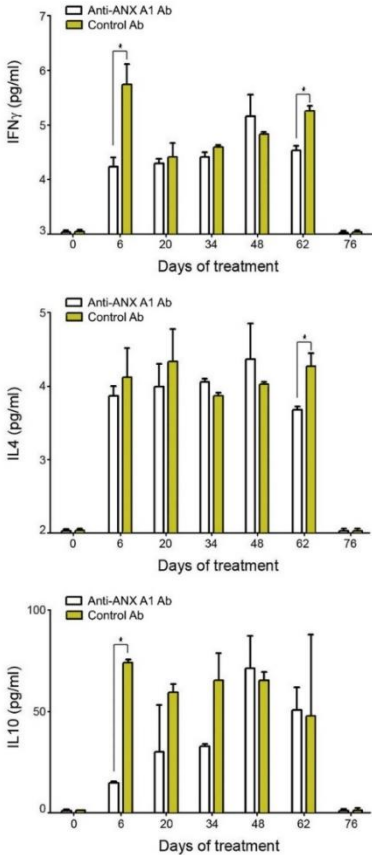
Фиг. 28. Терапията на хуманизирани имунодефицитни мишки с анти-ANX A1 антитяло потиска появата на различни характерни за лупус автоантитела. Показан е представителен резултат от три независими експеримента. Всички проби бяха утроени и средните стойности бяха използвани за анализ. Средните стойности \pm стандартно отклонение бяха изчислени за всяка група; една и съща терапия на групата повлиява различни нива на лупус-асоциирани IgG и IgM автоантитела, измерени чрез микрочипове.

Автореактивните IgG антитела срещу двДНК показват значително намалени нива в серумите на третираните мишки в сравнение с тези, третирани с контролно антитяло. Терапията води до понижаване на нивата на анти-евДНК, анти-РНК, анти-хистон и анти-нуклеозомни IgG автоантитела в сравнение с контролните животни.

Трябва да се отбележи, че нивата на анти-двДНК, анти-евДНК и анти-РНК IgM антителата, за които има сведения в няколко статии (165, 166), че е възможно да имат защитна роля при автоимунни състояния, бяха по-високи в серума на третираните животни. Отговорът на антихистонови и антинуклеозомни IgM антитела е по-силен в контролната група.

2.9. Изследване на ефекта от анти-ANX A1 терапията върху нивата на някои серумни цитокини.

Сборни серуми от хуманизирани NSG мишки бяха използвани за определяне на влиянието на анти-ANX A1 върху серумните нива на IFN γ , IL4 и IL10. Отчетено беше статистически значимо повлияване на серумния IFN γ в началото (6 ден) и в края (62 ден) на лечението при животните, хуманизирани с РВМС от пациенти със СЛЕ (Фиг. 41). При изследване на серумните нива на IL4 беше забелязано значимо повлияване единствено на 62 ден от терапията, в сравнение с контролните животни. Наблюдавано беше постепенно повишаване на нивата на IL10 с напредване на терапията с анти-ANX A1 антитялото, сравнено с постоянно-високите нива на IL10 при контролните животни, третирани с изотипно антитяло. Цитокиновата секреция при контролната група животни, хуманизирани с РВМС от здрави доброволци и третирана с анти-ANXA A1 не беше повлияна. Третирането на контролните животните с изотипно антитяло не повлия нивата на изследваните цитокини, чиито стойности бяха под откриваемите граници (данните не са показани).

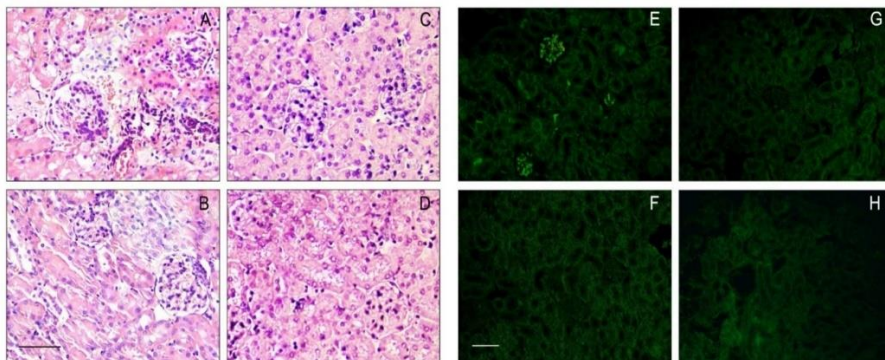


Фиг. 29. Терапията с анти-ANX A1 антитялото повлиява нивата на избрани цитокини. Серумните нива на интерлевкин IL4, IL10 и интерферон IFN γ във всички групи бяха измерени чрез ELISA тест. Показан е представителен резултат от три независими експеримента. Всички проби бяха утроени и средните стойности бяха използвани за анализ. Средните стойности \pm стандартно отклонение бяха изчислени за всяка група; P-стойностите бяха изчислени с помощта на ANOVA тест. (*P < 0,05) в сравнение с третираните с контролно антитяло групи.

2.10. Терапията с анти-ANX A1 антитяло намалява симптомите на заболяването при хуманизирани NSG мишки.

В края на *ин vivo* експериментите от всички животни бяха отпрепарирани бъбреци за хистопатологичен и имунофлуоресцентен анализ (Фиг. 30). Всички NSG мишки, инжектирани с контролно антитяло, трансферирани с PBMC от пациенти с лупус имаха масивни мезангиални гломерулни отлагания, съдържащи IgG-имунни комплекси, които бяха визуализирани чрез имунофлуоресценция на парафиновите срези. Оцветяването на бъбречни срези от същите животни показва сегментна мезангиална клетъчна хиперплазия в гломерулите, мононуклеарна инфилтрация и хистологични увреждания. В същото време, при животните третираните с анти-ANX A1 антитяло беше наблюдавана запазена бъбречната хистология с значително по-малко клетъчни инфилтрати. При NSG

мишките хуманизирани с РВМС от пациенти със СЛЕ и инжектирани с анти-ANX A1 антитяло не бяха открити отлагания на имунни комплекси. Бъбреците на имунодефицитните мишки, трансферирани с РВМС от здрави донори и инжектирани с контролно антитяло или с анти-ANX A1 антитяло бяха със запазена хистологична структура, без увреждания и отлагания на IgG-съдържащи имунни комплекси.



Фиг. 30. Хистологичен и имунофлуоресцентен анализ на бъбреци. Включени в парафин бъбречни срези оцветени с хематоксилин и еозин на животни трансферирани с РВМС от пациенти със системен лупус еритематозус (СЛЕ) и третиран с контролно антитяло (А) или с анти-ANX A1 антитяло (В) и на мишки, хуманизирани с РВМС от здрави донори и третиран с контролно антитяло (С) или с анти-ANX A1 антитяло (D). Скала, 200 μm . Показани са представителни изображения. Оригинално увеличение x400. Имунофлуоресцентен анализ на отлагане на IgG в гломерулите на мишки, трансферирани с РВМС от пациенти диагностицирани с лупус и третиран с контролно антитяло (E) или с анти-ANX A1 антитяло (F) и на мишки, хуманизирани с РВМС от здрави донори и третиран с контролно антитяло (G) или с анти-ANX A1 антитяло (H). Парафинови бъбречни срези от пет мишки на група бяха оцветени с белязано с FITC козе анти-мише IgG антитяло. Показани са представителни изображения. Скала, 200 μm . Оригинално увеличение x250.

V. ДИСКУСИЯ.

Автоимунните заболявания представляват специфична форма на възпаление, предизвикано от неконтролирано разпознаване на собствени структури, като опасни за организма, при което биват увреждани нормални клетки и тъкани. СЛЕ е полигенен автоимунен синдром, характеризира се с наличието на автореактивни Б и Т лимфоцити, чието взаимодействие води до генериране на автоантитела срещу широк спектър от автоантигени и отлагане на патологични имунни комплекси. Те формират и най-ефективния тандем, участващ в пречупването на Т/Б клетъчния толеранс към автоантигени и превключване на автоимунната каскада на възпалението. И двете клетъчни популации проявяват регулаторни и ефекторни функции, по този начин ускоряват прогресията и патогенезата на заболяването (164). Успешното нарушаване на представянето на автоантигени на Т/Б клетките, потискане на синтеза на провъзпалителни цитокини и продукцията на автоантитела би могло да подпомогне потискането на лупусните симптоми. Автореактивните Б клетки имат ключова роля в патогенезата на редица автоимунни заболявания не само като антияло-синтезиращи клетки, но и като основни автоантиген-представящи клетки, подпомагайки загубата на Т клетъчния толеранс и повлиявайки тяхната способност да синтезират цитокини (165, 166). Използваните към момента терапии насочени към Б клетките са моноклонални антитела срещу повърхностни молекули, например CD19 (167), CD20 (rituximab, ocrelizumab) (168) и CD22 (epratuzumab) (169), както и селективното елиминиране на избрани Б клетъчни подпопулации (129, 170-172).

По време на развитието на лупус се наблюдават редица аномалии, засягащи активацията и пролиферацията на лимфоцитите, промени в нивата на редица цитокини и експресията на повърхностни маркери, например, повърхностна експресия и секреция на ANX A1 от Б и Т клетките. Обикновено ANX A1 е локализиран в цитоплазмата на Б и Т лимфоцитите, при които се отчита ниска повърхностна експресия. Няколко нови проучвания съобщават за повишена експресия и високи серумни нива на ANX A1 при пациенти със СЛЕ, комбинирани с високи нива на анти-ANX A1 автоантитела, което само по себе си е парадокс и предполага неговата ролята в автоимунния процес. Някои автори предполагат, че високите серумни нива на ANX A1 са компенсаторен механизъм на свръхпроизводството на анти-ANX A1 антитела, което силно корелира с появата на специфични антитела, биомаркери за активността на заболяването, като анти-двДНК антитела (93). Обратно, без пост-транслационни модификации той не е имуногенен и високите нива на

циркулиращия протеин не могат да обяснят развитието на автоантитела срещу него.

В настоящото изследване се фокусирахме върху свръхактивирани Т клетки като основна терапевтична цел, вместо автореактивните В лимфоцити. В клетките експресират ниски нива на N-формил пептидения рецептор 2 (FPR2/ALXR), което предполага индиректното влияние на ANX A1 върху В лимфоцитите чрез потискане на Т клетките. Не можем да изключим обаче и потенциално пряко влияние (88).

Приложихме терапевтична схема с моноклоналното анти-ANX A1 антитяло в доза от 0,2 μg антитяло/мишка на всеки 6 дни, както при индуцирания пристанов Balb/c миши модел на СЛЕ, така и при генетично предразположените към лупус MRL/lpr и хуманизираните СЛЕ-NSG мишки. Наблюдавахме, че терапията намалява активността на заболяването, предпазва морфологията на бъбреците и удължава преживяемостта в сравнение с контролните групи. CD3⁺/CD4⁺, CD3⁺/CD8⁺ или CD19⁺ лимфоцити, изолирани от 14-седмични MRL/lpr мишки показват повърхностна експресия на ANX A1, което се свързва с повишените нива на протеина, наблюдавани при мишки с индуциран от пристан лупус и човешки СЛЕ (173, 174). Същите лимфоцити, изолирани от млади MRL/lpr животни, които все още не проявят симптоми на заболяването експресират много ниски нива на ANX A1 (данните не са показани).

Изследвахме и възможността на анти-ANX A1 антитялото да потиска свръхактивирани автореактивни лимфоцити и при трите миши модела. Освен това демонстрирахме, че както CD3⁺, така и CD19⁺ лимфоцити, изолирани от MRL/lpr мишки не само експресират повърхностен ANX A1 (174), но стимулирането им с анти-CD3/CD28 антитела повишава драматично експресията му и индуцира разрастването и пролиферацията на Т клетъчната популация. Както предполагаме, инкубирането на анти-CD3/CD28 стимулирани спленоцити от MRL/lpr мишки с различни концентрации на анти-ANX A1 антитялото води до значително дозозависимо намаление на CD25⁺/CD69⁺ клетки и инхибиране на Т-клетъчната пролиферация.

Т клетки изолирани от контролни Balb/c мишки инжектирани само с PBS показват по-високи нива на експресия на активационните маркери CD25 и CD69 в сравнение с инжектираните с пристан животни. Допълнително стимулиране на тези спленоцити с анти-CD3/CD28 антитела запазва разликата между групите и води до повишен брой апоптотични Т клетки в групата на здравите Balb/c мишки спрямо тези с пристан-индуциран лупус. Инкубиране, на предварително активирани спленоцити от инжектирани само с PBS животни, с нарастващи концентрации от анти-ANX A1 антитялото води до

намаляване на броя CD25⁺/CD69⁺ Т клетки, но има ограничен ефект върху клетъчната пролиферация. За разлика от здравите мишки при животните с индуциран лупус същото третиране на клетките води, както до значително дозозависимо намаляване на Т клетките, експресиращи активационни маркери, така и до значително инхибиране на пролиферацията, от което можем да предположим каква е значимостта на повишената повърхностна експресия на ANX A1 при активно развиващо се заболяване.

След *in vitro* третиране с тестваното анти тяло наблюдавахме корелация между Т клетъчната активация, инхибиране на пролиферацията и синтеза на автоантитела и при хуманизирания миши модел. По време на прогресията на СЛЕ свръхактивирани и пролифериращи автореактивни Т клетки подпомагат В клетъчни клонове, което води до генериране на плазмоцити продуциращи автоантитела срещу широк набор от автоантигени. Инкубацията на РВМС от пациенти със СЛЕ с анти-ANX A1 анти тялото намалява експресията на активационните маркери CD25⁺/CD69⁺ по повърхността на активирани Т клетки, потиска клетъчната пролиферация на плазматичните клетки синтезиращи IgG антитела срещу двДНК и индуцира апоптоза при активирани В и Т лимфоцити.

Сходните резултати, получени след приложена терапия с тестваното анти тяло и при трите миши модела, предполагат споделен механизъм на регулацията на Т клетъчната активност чрез ANX A1–FPR2 сигналния път (96). Точният механизъм на действие на ANX A1 върху вродения и адаптивния имунитет все още не е напълно изяснен. В рамките на вродената имунна система ANX A1 има многофункционална роля в контрола и разпространението на възпалението чрез негативна регулация на активността на неутрофилите, като при неговата липса се наблюдава по-продължително възпаление (93, 95). Той участва в разрастване на възпалителния процес и чрез индуциране на апоптоза в неутрофилите (90), редуциране на активацията на дендритните клетки през провъзпалителните TLR, повишаване на толерогенните клетъчни характеристики (намалена експресия CD80, CD86, главния комплекс за тъканна съвместимост (МНС) клас II и намалена секреция на TNF и IL-12). Освен това действа, като хемоатрактант за моноцити, подпомагайки изчистването на некротични остатъци и намалявайки времето, за което са представени молекули, които са потенциални стимули за автоимунна реакция (175).

По-спорни са ефектите на ANX A1 върху Т и В лимфоцитите и като цяло върху адаптивния имунитет. Основната причина за противоречивите интерпретации е ниското ниво на повърхностната му експресия от Т клетките (86, 91). Основен лимитиращ фактор за по-силен контрол на адаптивния

имунитет от ANX A1 би могла да е слабата експресия на ALXR от Т клетките и още по-слабата от Б лимфоцитите (92, 95). ANX A1 участва в няколко сигнални пътища, сред които е повишената регулация на SGPP2 (sphingosine-1-phosphate phosphatase), ензим въввлечен в деградацията на S1P (sphingosine-1-phosphate), и JAG1 (jagged 1 protein) гените, след взаимодействие ANX A1–ALXR по повърхността на човешки клетки. И двата пътя са ангажирани в зрението, диференциацията и миграцията на Т клетките от лимфоидните органи, но не и в развитието на Б клетките, което отново предполага индиректно влияние ANX A1 върху Б лимфоцитите чрез активиране на Т клетки (98, 106).

Натрупването на данни води до извода, че има по-сложна взаимовръзка между ANX A1, моноклоналното антитяло и апоптозата, отколкото про- и анти-апоптотичен ефект (176). Нормалните Balb/c мишки, третирани с анти-ANX A1 антитяло, поддържат по-висок брой Т клетки в състояние на късна апоптоза в сравнение с животните с пристане-индуциран лупус третирани със същото антитяло. Тези открития подкрепят данните за намаляване на клетъчната смърт предизвикана от активиране и Т клетъчната апоптоза открити при пациенти с активно заболяване (177). При нормални условия повишеният процент на апоптотични Т лимфоцити в състояние на ранна апоптоза при третираните с антитяло здрави Balb/c мишки предполага важноста на ANX A1 в процеса на Т клетъчна активация. Освен това зависимото от дозата намаляване на броя Т клетки в ранна апоптоза и повишаването на процента двойно негативни по анексин V/пропидиев йодид лимфоцити, след инкубация с анти-ANX A1 антитялото, свидетелства за потенциала на ANX A1 да допринася за развитие на заболяването и насочване към сигнализация през TCR при инжектираните с пристан мишки (95).

По време на прогресията на симптомите на СЛЕ, поради натрупването на голям брой автореактивни Т клетки при MRL/lpr мишките се забелязва уголемяване на лимфоидните органи. Култивиране на спленцити от предразположени към лупус мишки в присъствието на анти-ANX A1 антитяло повишава процента на експресия на фосфатидилсерин (ранна апоптоза) в рамките на селектираните CD19 клетки, в същото време беше установено зависимо от концентрацията намаление на процента клетки в състояние на късна апоптоза в същата лимфоцитна популация. След приложение на анти-ANX A1 антитяло подобно увеличение на процента В клетки в късна апоптоза се наблюдава и при РВМС изолирани от пациенти със СЛЕ (174), вероятно в резултат на намаляване на специфичната Т клетъчна активация и на стимулацията от автореактивни Т клетки. Освен това, терапия с тестваното антитяло не повлиява по дозозависим начин броя Т клетки в ранна или късна

апоптоза в рамките на селектирана CD3⁺ спленоцитна популация получена от MRL/lpr мишки.

ELISpot анализ на спленоцити, изолирани от лупусни мишки третиран с анти-ANX A1 антители показва значително намален брой плазматични клетки, продуциращи IgG антитела срещу двДНК в сравнение с контролите, инжектирани само с PBS. Освен това, при *in vitro* култивирани на спленоцитите в присъствието на нарастващи концентрации на изследваното антители, наблюдавахме дозозависимо намаление на броя диференцирани клетки, продуциращи анти-двДНК антитела. По време на *in vivo* експериментите с анти-ANX A1 антителото установихме потискане на двДНК-специфичните В клетки. Приложението на моноклоналното антители предотвратява появата на високи нива на анти-двДНК IgG антитела и протеинурия в сравнение с контролната група.

В-клетъчната лимфопения е типичен проблем в краен етап на мишия лупус. Инжектираните с пристан животни развиват лупус-подобно заболяване 5 месеца след приложението му, а последващо инжектиране на вече болните животни с PBS допълнително удължава продължителността на живота с тежък лупус, което води до намален брой В клетки на 70-ти ден (данните не са показани), произвеждайки по-малко автоантитела в крайния стадий на заболяването. Третирането на инжектирани с пристан мишки с анти-ANX A1 антители по време на развитието на болестта потиска рязкото покачване на серумните нива на анти-двДНК IgG антителата, което достига нивото на контролната група в последната точка на измерване. Многократните имунизации с терапевтичното антители може също да са намалили неговата ефективност, поради образуване на анти-идиотипни антитела. Терапията с моноклоналното антители предотвратява появата на високи нива на анти-двДНК IgG антитела и при млади (7 седмици) MRL/lpr мишки след 60 дни лечение, докато приложението му след началото на заболяването (16-седмична група) показва незначително понижение на анти-двДНК IgG антителата и нивата на протеинурия в сравнение с контролната група. Нещо повече, получихме сходни резултати *in vitro*, както използвайки спленоцити от мишки с пристан-индуциран СЛЕ, така и РВМСs, изолирани от пациенти с лупус, култивирани в присъствието на нарастваща концентрации на изследваното анти-ANX A1 антители (173, 174).

В допълнение, при инжектираните с пристан и третиран с моноклоналното антители животни се наблюдава предпазване на бъбреците от натрупване на моноклетъчни инфилтрати и отлагане на патологични имунни комплекси в гломерулите, докато тези, инжектирани с PBS имат инфилтрати от възпалителни клетки и повишена мезангиална пролиферация в гломерулите.

Благоприятен ефект от приложението на анти-ANX A1 антитялото беше отчетен и при 7-седмични MRL/lpr мишки. Третираните животни, подобно на тези с пристан-индуциран СЛЕ, са със запазена структура на бъбреците, не се натрупват моноклетъчни инфилтрати и патологични имунни комплекси, също така периферните лимфни възли и слезките не се уголемяват. За разлика от тях, при контролните животни в края на експеримента се наблюдава бъбречна патология, тежка лимфаденопатия и спленомегалия.

In vivo третирането на млади MRL/lpr мишки с неутрализиращото антитяло преди развитие на заболяването води до потискане на експанзията и диференциацията на Т лимфоцитите. Също така, задържа лимфоцитите в лимфните възли на четвърта и шеста седмица след началото на терапията, но няма значителен ефект върху броя на клетките в слезката. Например, Piras установява 50% увеличение на общия брой клетки в лимфните възли и слезки на деветия ден след третиране с ANX A1 антитяло VJ-4B6 на миши модел на индуциран ЕАЕ (178).

Открити бяха анормални IgG-съдържащи имунни комплекси и увреждане на бъбреците и при хуманизираните NSG мишки, трансферирани с РВМС от пациенти със СЛЕ. Контролните животни показаха масивни отлагания на IgG-съдържащи имунни комплекси в гломерулите, увреждане на бъбреците и мононуклеарни инфилтрати, докато групата, третирана с анти-ANX A1 антитяло има значително подобрене в хистологията на бъбреците без забележими отлагания на имунни комплекси. Не бяха наблюдавани никакви патологични симптоми, различни от тези в резултат на лупус, което предполага липсата на GVHD, както и не бяха открити симптоми на заболяване в групите мишки, трансферирани с РВМС от здрави донори и третиран с анти-ANX A1 или контролно антитяло.

Клоналната активация на автореактивни плазмоцити вероятно се регулира от различни механизми, така че не бихме могли да очакваме успешно да потиснем специфичната автореактивност към всички възможни антигени (179). Изследвайки производството на автоантитела, специфични за антигени, свързани с лупус чрез микрочипове като изключително чувствителен аналитичен метод, установихме значително намаляване на нивата на кардиолипин, CENPB и Sm-специфични IgG антитела при Balb/c мишия модел. Като цяло беше очаквано младите MRL/lpr животни без симптоми на заболяването да имат минимален брой плазмоцити, произвеждащи автоантитела, докато при 16-седмичните мишки с вече развит лупус да има значително увеличаване на техните нива. Интересно е, че при по-възрастни болни MRL/lpr мишки, прилагането на анти-ANX A1 антитяло през първите 70 дни спомага за намаляване производството на специфични автоантитела,

свързани с лупус, в сравнение с контролните животни. Микрочип анализът показва значителен спад в нивата на двДНК, РНК, хистони и хроматин-специфични IgG автоантитела. Групата на 7-седмичните животни не беше повлияна от терапията с анти-ANX A1 в началото на лечението. Резултатите до голяма степен припокриват тези, получени от хуманизирани с PBMC, изолирани от пациенти със СЛЕ NSG мишки след прилагане на анти-ANX A1 антителя (174). Използвайки както ELISA, така и измерването с микрочипове потвърдихме, че като следствие от терапията на СЛЕ-PBMC с тестваното антителя се наблюдава предотвратяването на развитието на патогенни IgG антители срещу нуклеинови киселини и потискане на производството на провъзпалителни цитокини. В допълнение, същата терапия индуцира производството на IgM автореактивни антители срещу повечето автоантигени, което предполага началото на толерогенен ефект, като следствие от дисфункция на активирането на Т клетките (180). Интересен въпрос, който остава да бъде изяснен е защо анти-хистоновите антители показват различно поведение и не се повлияват от приложението на анти-ANX A1 антителято.

Имунната система на здравите индивиди управлява сложна мрежа от цитокини, осигурявайки баланс между регулаторни и възпалителни медиатори. Много от тези биологични молекули са въввлечени в патологични механизми, свързани с развитието на СЛЕ, но генетичните полиморфизми и факторите на околната среда усложняват ролята на отделните цитокини, участващи в прогресията на заболяванията (181-184).

IFN γ е един от основните медиатори на няколко автоимунни разстройства и прилагането му ускорява прогресията на заболяването както при миши, така и при човешки лупус. Произведен от регулаторни Т клетки, той потиска автореактивните В клетки при здрави индивиди. Въпреки това, изглежда че механизмите на регулация на IFN γ не функционират при пациенти със СЛЕ и предразположени към лупус MRL/lpr мишки, тъй като се откриват значително повишени нива на цитокина, произведени от Т клетки, естествени клетки убийци и макрофаги, както и от натрупани двойно негативни CD3⁺CD4⁻CD8⁻ Т клетки (182, 184, 185). Прилагането на анти-ANX A1 антителя при MRL/lpr мишки не потиска нито серумните, нито нивата на иРНК на IFN γ , но повлиява производството на цитокини в хуманизирания СЛЕ-NSG миши модел (174, 186).

Регулаторният цитокин IL10 също играе критична роля в патогенезата на СЛЕ. Свр̀хекспресията му, установена при пациенти със СЛЕ и предразположени към лупус MRL/lpr мишки допринася за увеличаване на производството на автоантитела и прогресията на заболяването, а лечението на пациенти със СЛЕ с анти-IL10 антителя потиска симптомите на лупус (187).

Нашите резултати показват високи серумни нива на $IFN\gamma$ и $IL10$ при инжектирани с пристан, контролни PBS-третиранни мишки, докато прилагането на анти-ANX A1 антитяло при тях повлиява производството на $IL10$ и $IFN\gamma$ в някои точки на измерване (не е статистически значимо). Необичайно високи серумни нива на $IFN\gamma$ и $IL-10$ наблюдавахме и при двете възрастови групи контролни антитяло-третиранни MRL/lpr мишки. Прилагането на анти-ANX A1 антитялото потиска производството на $IL-10$ и в двете групи, но не повлиява значително нивата на $IFN\gamma$. $IL-10$ -продуциращи Tregs вероятно също са повлияни от лечението с анти-ANX A1 антитялото и намалената продукция на $IL-10$ води до потискане на нивата на анти-двДНК IgG антителя. $IL-10$ -секретиращите В-клетки (Bregs) също са предполагаеми участници в процеса на регулиране на СЛЕ (188). Няколко проучвания върху MRL/lpr миши модел обаче показват, че популацията на $IL-10$ -продуциращите В клетки е рядка *in vivo*, което може да елиминира тази кохорта от пула клетки регулиращи заболяването. Терапията не повлиява нивата на mRNA за $IFN\gamma$ и $IL10$ изолирана от спленоцитите в сравнение с контролната група. Интересно е, че прилагането на анти ANX A1 антитялото намалява нивата на тези цитокини и в хуманизиран СЛЕ-NSG миши модел.

$IL-4$ играе противоположна роля на $IFN\gamma$ и повишеното съотношение $IFN\gamma/IL-4$ води до развитие на свързана с лупус хипергамаглобулинемия, производство на автоантителя и инхибиране на производството на Th1-тип цитокини. При MRL/lpr мишки са установени намалени нива на $IL-4$, а $IL-4$ -дефицитни мишки развиват автоантителя и увреждане на бъбреците (189, 190). Установено е също, че $IL-4$ подпомага производството на анти-двДНК IgG антителя, а блокирането на $IL-4$ предотвратява развитието на лупусен нефрит, което предполага основната роля на този цитокин в патогенезата на СЛЕ (178, 183, 184). Нашите резултати получени от спленоцити, изолирани от MRL/lpr мишки, третирани с анти-ANX A1 антитяло показват, че тези клетки експресират по-високи нива на иРНК за $IL4$, отколкото контролните животни, което подкрепя твърдението, че $IL4$ може да участва във възстановяването на цитокиновия баланс и потискане на автоимунния отговор при MRL/lpr мишки.

Анексин A1 има множество функции с противоречиви ефекти, зависещи от тъканното и клетъчно разнообразие, но от особен интерес е неговата роля, като промотор на Th1 клетките и супресор на клетки с Th2 профил. Допълнителен механизъм за модулиране на адаптивния имунитет е зависимостта на активирането на Т лимфоцитите от фината настройка на количеството ANX A1, явявайки се едновременно мост и регулатор на функциите на вродения имунитет. Трите миши модела на СЛЕ използвани в настоящия дисертационен труд изследват нов подход за потискане на

сътрудничеството между автореактивните Б и Т клетки по време на прогресията на заболяването. Използвайки ниска доза моноклонално антитяло срещу ANX A1 успешно ограничихме прогресията на симптомите на заболяването и патологичното увреждане на бъбреците, като по този начин даваме представа за нов потенциален механизъм за терапия на пациенти с лупус.

VI. ИЗВОДИ

Част 1.

1. Анексин А1 се експресира както върху Т, така и върху В клетките на Balb/c мишки с пристан-индуциран лупус и генетично предразположени към автоимунитет MRL/lpr мишки.
2. Експресията на активационните маркери CD25 и CD69 при Т клетките намалява в зависимост от дозата на третиране с антиятлото.
3. Моноклоналното антиятло повишава процента на апоптичните В и Т лимфоцити.
4. Анти-ANX А1 антиятлото намалява серумните нива на антитела срещу двДНК.
5. При микро-арей анализа се наблюдава значително понижаване на специфичните IgG антитела срещу редица характерни за заболяването антигени.
6. Хистологичните препарати показват ограничаване на инфилтрати в бъбреците и запазена хистологична структура при третираните животни.
7. Третирането с анти-ANX А1 антиятлото удължава преживяемостта на експерименталните животни.

Част 2.

1. Успешно беше извършен трансфер на РВМС от пациенти с лупус или здрави донори в имунодефицитни NSG мишки, на които беше проведена терапия с моноклонално антиятло срещу ANX А1.
2. Анализите на нивата на повърхностна експресия на ANX А1 върху човешки РВМС показаха наличието му както при Т, така и при В клетките, макар и в значително по-ниска степен.
3. Моноклоналното антиятло повлия експресията на Т клетъчни активационни маркери CD25 и CD69, както и апоптозата на лимфоцитите.
4. Наблюдаван беше значителен ефект на антиятлото върху пролиферацията на клетките, както и броя на плазмоцитите, секретирани антитела срещу двДНК.
5. При терапия *in vivo* беше наблюдавано, че анти-ANX А1 антиятлото има въздействие върху стойностите на протеинурията и натрупването на имунни инфилтрати в бъбреците на експерименталните животни.

VII. ПРИНОСИ.

Приноси с фундаментално значение

- Анексин А1 се експресираща основно от Т лимфоцити, но също така и от В клетки, изолирани от мишки с индуциран или спонтанен експериментален лупус, както и от РВМС изолирани от пациенти с СЛЕ.

Приноси с научно-приложен характер

- Разработен и оптимизиран е хуманизиран модел на лупус при NSG мишки
- Установена е различна чувствителност на мишки третирани с анти тяло срещу Анексин А1 в ранна и късна фаза на развитие на спонтанен СЛЕ.
- Терапевтичният ефект на Анексин А1 при СЛЕ се дължи както на директен инхибиращ ефект върху преживяемостта, апоптозата и активирането на Т лимфоцити, така и на Т-клетъчно зависимо и независимо действие върху В лимфоцитите и продуцираните от тях автоантитела.

VIII. ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ПРОЯВИ

Публикации във връзка с дисертационния труд:

1. **Bradyanova, S, Mihaylova, N, Chipinski, P, Manassiev, Y, Herbáth, M, Kyurkchiev, D, Prechl, J, Tchorbanov, A.** Anti-ANX A1 Antibody Therapy in MRL/lpr Murine Model of Systemic Lupus Erythematosus. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, 69, 1, 2021, ISSN:16614917, DOI:<https://doi.org/10.1007/s00005-021-00624-7>, 19. SJR (Scopus):1.011, JCR-IF (Web of Science): 4.291 **Q1**
2. **Mihaylova, N, Chipinski, P, Bradyanova, S, Velikova, T, Ivanova-Todorova, E, Chausheva, S, Herbáth, M, Kalinova, D, Prechl, J, Kyurkchiev, D, Tchorbanov, A.I.** Suppression of autoreactive T and B lymphocytes by anti-annexin A1 antibody in a humanized NSG murine model of systemic lupus erythematosus. Clin Exp Immunol., 199, 3, 2020, DOI:doi: 10.1111/cei.13399. Epub 2019 Dec 4., 278-293. SJR (Scopus):1.329, JCR-IF (Web of Science): 4.33 **Q2**

Цитати

Mihaylova, N, Chipinski, P, Bradyanova, S, Velikova, T, Ivanova-Todorova, E, Chausheva, S, Herbáth, M, Kalinova, D, Prechl, J, Kyurkchiev, D, Tchorbakov, A.I. Suppression of autoreactive T and B lymphocytes by anti-annexin A1 antibody in a humanized NSG murine model of systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol.*, 199, 3, 2020, DOI:doi: 10.1111/cei.13399. Epub 2019 Dec 4., 278-293. SJR (Scopus):1.329, JCR-IF (Web of Science):4.33

Цитира се в:

1. Gautam, P., Sharma, A., Bhatnagar, A. "Global histone modification analysis reveals hypoacetylated H3 and H4 histones in B Cells from systemic lupus erythematosus patients." 2021 *Immunology Letters* 240, pp. 41-45, @2021 [Линк](#)
2. Grewal, T., Rentero, C., Enrich, C., (...), Raabe, C.A., Rescher, U. "Annexin animal models—from fundamental principles to translational research". 2021 *International Journal of Molecular Sciences* 22(7), 3439, @2021 [Линк](#)
3. Robinson, S., Thomas, R. "Potential for Antigen-Specific Tolerizing Immunotherapy in Systemic Lupus Erythematosus". 2021 *Frontiers in Immunology* 12, 654701, @2021 [Линк](#)
4. Ye, W., & Chen, Q. (2021). Potential Applications and Perspectives of Humanized Mouse Models. *Annual review of animal biosciences*, 10., @2021
5. Chen J, Liao S, Zhou H, Yang L, Guo F, Chen S, Li A, Pan Q, Yang C, Liu H, Pan Q. "Humanized Mouse Models of Systemic Lupus Erythematosus: Opportunities and Challenges". *Front. Immunol.*, ISSN 16643224, 2022, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.816956>, @2022 [Линк](#)
6. Fineschi, S., Klar, J., Gustafsson, K.A., Jonsson K, Karlsson, B., Dahl, N. "Inflammation and Interferon Signatures in Peripheral B-Lymphocytes and Sera of Individuals With Fibromyalgia". *Front. Immunol.*, ISSN = 1664-3224, 2022, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.874490>, @2022 [Линк](#)
7. Hu C, Zhen Y, Ma Z, Zhao L, Wu H, Shu C, Pang B, Yu J, Xu Y, Zhang X, Wang X, Yi H. "Polyamines from myeloid-derived suppressor cells promote Th17 polarization and disease progression". *Molecular Therapy*, ISSN 15250016, 2022, <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2022.10.013>, @2022 [Линк](#)
8. Kroemer, G., Galassi, C., Zitvogel, L. et al. Immunogenic cell stress and death. *Nat Immunol* 23, 487–500 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41590-022-01132-2>, @2022 [Линк](#)
9. Ye, W., and Chen, Q. Potential Applications and Perspectives of Humanized Mouse Models. *Annual Review of Animal Biosciences* 2022 10:1, 395-417. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-020420-033029>, @2022 [Линк](#)
10. Ye, W., Chen, Q. "Potential Applications and Perspectives of Humanized Mouse Models ". *Annual Review of Animal Biosciences*, 10:1, 395-417, 2022, DOI: 10.1146/annurev-animal-020420-033029, @2022 [Линк](#)

11. Burleson, F.G., Burleson, S.C.M., Burleson, G.R., Johnson, V.J. Immunotoxicology: The Immune System Response to Toxic Insult (Book Chapter). 2023, Hayes' Principles and Methods of Toxicology: Volume I, Seventh Edition, 1, pp. 1951-1998; ISBN 978-100087577-5, 978-103246710-8 DOI 10.1201/9781003390008-43, @2023 Линк
12. Cong Hu, Yu Zhen, Zhanchuan Ma, Li Zhao, Hao Wu, Chang Shu, Bo Pang, Jinyu Yu, Ying Xu, Xin Zhang, Xiang-yang Wang, Huanfa Yi. Polyamines from myeloid-derived suppressor cells promote Th17 polarization and disease progression. Molecular Therapy, Volume 31, Issue 2, 2023, Pages 569-584, ISSN 1525-0016, <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2022.10.013>, @2023 Линк
13. Li Y, Xu B, Zhang J, Liu X, Ganesan K, Shi G. Exploring the role of LIAS-related cuproptosis in systemic lupus erythematosus. Lupus. 2023;32(14):1598-1609. doi:10.1177/09612033231211429, @2023 Линк
14. Liu Ting, Zheng Ming, Jia Li, Wang Mingyuan, Tang Longhai, Wen Zhenke, Zhang Miaojia, Yuan Fenghong. Deficient leptin receptor signaling in T cells of human SLE. Front. Immunol., 17 March 2023 Sec. T Cell Biology Volume 14 - 2023 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1157731>, @2023 Линк
15. Xiaoying Zhou, Chunming Lyu, Xingmi Chen, Yuhan Ye, Yuanyuan Lei, Ying Liu, Tong Zhang, Yang Yang. Fufang Shengdi mixture alleviates psoriasis-like skin inflammation via promoting Annexin-A proteins expression. Journal of Ethnopharmacology, Volume 312, 2023, 116329, ISSN 0378-8741, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2023.116329>, @2023 Линк
16. Uribe, F. R., González, V. P., Kalergis, A. M., Soto, J. A., & Bohmwald, K. (2024). Understanding the Neurotrophic Virus Mechanisms and Their Potential Effect on Systemic Lupus Erythematosus Development. Brain Sciences, 14(1), 59., @2024 Линк

Участия в научни прояви във връзка с дисертационния труд:

1. Втори докторантски симпозиум “Молекулярна биология - нови хоризонти”, Април 6 – 7, 2017, София, България
2. 12th ENI EFIS EJI Summer School of Advanced Immunology, May 6 – 13, 2017, Porto Cervo, Sardinia, Italy
3. 4th Black Sea International Immunology School (BSIIS2017), October 20 – 22, 2017, Starosel, Hissar, Bulgaria
4. Дванадесета работна среща с международно електронно участие “Биологична активност на метали, синтетични съединения и природни продукти”, Ноември 27-29, 2017, София, България
5. 13th EFIS-EJI Tatra Immunology Conference, June 9 - 13, 2018, Štrbské Pleso, Vysoke Tatry, Slovakia

6. 5th European Congress of Immunology, September 2-5, 2018, Amsterdam, Netherland
7. 10th EFIS-EJI South Eastern European Immunology School (SEEIS2018), October 19 – 22, 2018, Yerevan, Armenia
8. 5th Black Sea International Immunology School (BSIIS2018), October 24 – 25, 2018, Plovdiv, Bulgaria
9. Fifth National Congress of Immunology, October 25-28, 2018, Plovdiv, Bulgaria
10. 3^{ти} Докторантски Симпозиум „Молекулярна биология - от молекулите до клетките и обратно“, Март 7 - 8, 2019, София, България
11. 8th International Workshop “Autoimmunity in 2019: The Good and the Bad News”, April 10 - 11, 2019, Pleven, Bulgaria
12. International Molecular Immunology & Immunogenetics Congress IV (MIMIC IV), April 27 – 29, 2019, Bursa, Turkey

Исползвана литература:

88. Gavins FN, Hickey MJFii. Annexin A1 and the regulation of innate and adaptive immunity. 2012;3:354.
89. Sugimoto MA, Vago JP, Teixeira MM, Sousa LPJJoir. Annexin A1 and the resolution of inflammation: modulation of neutrophil recruitment, apoptosis, and clearance. 2016;2016.
90. Vago JP, Nogueira CR, Tavares LP, Soriani FM, Lopes F, Russo RC, et al. Annexin A1 modulates natural and glucocorticoid-induced resolution of inflammation by enhancing neutrophil apoptosis. 2012;92(2):249-58.
91. Perretti M, D'acquistio FJNRI. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. 2009;9(1):62-70.
92. Yang YH, Morand E, Leech MJNRR. Annexin A1: potential for glucocorticoid sparing in RA. 2013;9(10):595-603.
93. Bruschi M, Petretto A, Vaglio A, Santucci L, Candiano G, Ghiggeri GMJJoMS. Annexin A1 and autoimmunity: from basic science to clinical applications. 2018;19(5):1348.
94. Sheikh MH, Solito E. Annexin A1: Uncovering the Many Talents of an Old Protein. 2018;19(4):1045.
95. D'Acquistio F, Merghani A, Lecona E, Rosignoli G, Raza K, Buckley CD, et al. Annexin-1 modulates T-cell activation and differentiation. 2007;109(3):1095-102.
96. D'acquistio F, Perretti M, Flower RJJbJop. Annexin-A1: a pivotal regulator of the innate and adaptive immune systems. 2008;155(2):152-69.
97. Pederzoli-Ribeil M, Maione F, Cooper D, Al-Kashi A, Dalli J, Perretti M, et al. Design and characterization of a cleavage-resistant Annexin A1 mutant to control inflammation in the microvasculature. 2010;116(20):4288-96.
98. Renshaw D, Montero-Melendez T, Dalli J, Kamal A, Brancaleone V, D'Acquistio F, et al. Downstream gene activation of the receptor ALX by the agonist annexin A1. 2010;5(9):e12771.
164. Klopfleisch RJBvr. Multiparametric and semiquantitative scoring systems for the evaluation of mouse model histopathology-a systematic review. 2013;9:1-15.
165. Grönwall C, Akhter E, Oh C, Burlingame RW, Petri M, Silverman GJJCi. IgM autoantibodies to distinct apoptosis-associated antigens correlate with protection from cardiovascular events and renal disease in patients with SLE. 2012;142(3):390-8.
166. Lobo PIJFii. Role of natural autoantibodies and natural IgM anti-leucocyte autoantibodies in health and disease. 2016;7:198.
167. Tiffin N, Adeyemo A, Okpechi IJOjord. A diverse array of genetic factors contribute to the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. 2013;8:1-8.
168. Venkatesh J, Kawabata D, Kim S, Xu X, Chinnasamy P, Paul E, et al. Selective regulation of autoreactive B cells by FcγRIIB. 2009;32(3-4):149-57.
169. Xiang Z, Cutler AJ, Brownlie RJ, Fairfax K, Lawlor KE, Severinson E, et al. FcγRIIB controls bone marrow plasma cell persistence and apoptosis. 2007;8(4):419-29.
170. Mei HE, Schmidt S, Dörner TJAR, therapy. Rationale of anti-CD19 immunotherapy: an option to target autoreactive plasma cells in autoimmunity. 2012;14:1-16.
171. Rovin BH, Furie R, Latinis K, Looney RJ, Fervenza FC, Sanchez-Guerrero J, et al. Efficacy and safety of rituximab in patients with active proliferative lupus nephritis: the Lupus Nephritis Assessment with Rituximab study. 2012;64(4):1215-26.
172. Wallace DJ, Kalunian K, Petri MA, Strand V, Houssiau FA, Pike M, et al. Efficacy and safety of epratuzumab in patients with moderate/severe active systemic lupus erythematosus: results from EMBLEM, a phase IIb, randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre study. 2014;73(1):183-90.

173. Ramos-Casals M, Sanz I, Bosch X, Stone JH, Khamashta MAJTAjom. B-cell-depleting therapy in systemic lupus erythematosus. 2012;125(4):327-36.
174. Tarasenko T, Dean JA, Bolland SJA. FcγRIIB as a modulator of autoimmune disease susceptibility. 2007;40(6):409-17.
175. Gesheva V, Kerekov N, Nikolova K, Mihaylova N, Todorov T, Nikolova M, et al. Suppression of dsDNA-specific B lymphocytes reduces disease symptoms in SCID model of mouse lupus. 2014;47(3):162-72.
176. Mihaylova N, Bradyanova S, Chipinski P, Herbáth M, Chausheva S, Kyurkchiev D, et al. Annexin A1 as a target for managing murine pristane-induced systemic lupus erythematosus. 2017;50(4):257-68.
177. Mihaylova N, Chipinski P, Bradyanova S, Velikova T, Ivanova-Todorova E, Chausheva S, et al. Suppression of autoreactive T and B lymphocytes by anti-annexin A1 antibody in a humanized NSG murine model of systemic lupus erythematosus. 2020;199(3):278-93.
178. Blume KE, Soeroes S, Keppeler H, Stevanovic S, Kretschmer D, Rautenberg M, et al. Cleavage of annexin A1 by ADAM10 during secondary necrosis generates a monocytic “find-me” signal. 2012;188(1):135-45.
179. Su Y-J, Cheng T-T, Chen C-J, Chiu W-C, Hsu C-Y, Chang W-N, et al. The association among leukocyte apoptosis, autoantibodies and disease severity in systemic lupus erythematosus. 2013;11:1-7.
180. Kyttaris VC, Juang YT, Tsokos GC. Immune cells and cytokines in systemic lupus erythematosus: an update. *Current opinion in rheumatology*. 2005;17(5):518-22.
181. Piras G. From the bench to the pipeline: testing the immunosuppressive potential of novel therapy targeting Annexin A1: Queen Mary University of London; 2014.
182. Shlomchik MJJI. Sites and stages of autoreactive B cell activation and regulation. 2008;28(1):18-28.
183. Lobo PIJI, Receptors I, Proteins B. Role of natural IgM autoantibodies (IgM-NAA) and IgM anti-leukocyte antibodies (IgM-ALA) in regulating inflammation. 2017:89-117.
184. He C, Feng P, Su H, Gu A, Yan Z, Zhu XIJCEP. Disrupted Th1/Th2 balance in patients with rheumatoid arthritis (RA). 2017;10(2):1233-42.
185. Juvet SC, Zhang LJomcb. Double negative regulatory T cells in transplantation and autoimmunity: recent progress and future directions. 2012;4(1):48-58.
186. Moudgil KD, Choubey DJJoI, Research C. Cytokines in autoimmunity: role in induction, regulation, and treatment. 2011;31(10):695-703.
187. Rojas M, Rodríguez Y, Leon KJ, Pacheco Y, Acosta-Ampudia Y, Monsalve DM, et al. Cytokines and inflammatory mediators in systemic lupus erythematosus. 2018;11:1-5.
188. Bobé P, Bonardelle D, Benihoud K, Opolon P, Chelbi-Alix MKJB. Arsenic trioxide: a promising novel therapeutic agent for lymphoproliferative and autoimmune syndromes in MRL/lpr mice. 2006;108(13):3967-75.
189. Mihaylova N, Bradyanova S, Chipinski P, Chausheva S, Kyurkchiev D, Tchobanov AIJSJoI. Monoclonal antibody therapy that targets phospholipid-binding protein delays lupus activity in MRL/lpr mice. 2020;92(3):e12915.
190. La Cava AJI. Anticytokine therapies in systemic lupus erythematosus. 2010;2(4):575-82.
191. Teichmann LL, Kashgarian M, Weaver CT, Roers A, Müller W, Shlomchik MJJTJoI. B cell-derived IL-10 does not regulate spontaneous systemic autoimmunity in MRL. Fas/lpr mice. 2012;188(2):678-85.
192. Muhammad Yusoff F, Wong KK, Mohd Redzwan N. Th1, Th2, and Th17 cytokines in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity*. 2020;53(1):8-20.
193. Yang W-C, Hwang Y-S, Chen Y-Y, Liu C-L, Shen C-N, Hong W-H, et al. Interleukin-4 supports the suppressive immune responses elicited by regulatory T cells. 2017;8:1508.

Информационни и комуникационни науки и технологии

Енергийни ресурси и енергийна ефективност

Нанонауки и нови материали и технологии

Биомедицина и качество на живот

Биоразнообразие и, биоресурси и екология

Климатични промени, рискове и природни ресурси

Астрономия, космически изследвания и технологии

Културно-историческо наследство и национална

идентичност

Човек и общество

Силвия Любенова Брадянова, 2024