

**РЕГУЛЯТОРНЫЙ РЕВМАТОИДНЫЙ ФАКТОР В КРОВИ КРЫС,
ИММУНИЗИРОВАННЫХ АУТОЛОГИЧНЫМИ ЛИМФОЦИТАМИ,
АКТИВИРОВАННЫМИ IN VITRO ГЕТЕРОЛОГИЧНЫМИ
ЛИМФОЦИТАМИ**

Кряжевских А. В. ¹,
Абишева Н. Н. ^{1, 2}

¹ ФГБУН «Удмуртский федеральный исследовательский центр Уральского
отделения Российской академии наук».

² ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет».

**RHEUMATOID REGULATORY FACTOR IN THE BLOOD OF RATS
IMMUNIZED WITH AUTOLOGOUS LYMPHOCYTES, ACTIVATED IN
VITRO BY HETEROLOGOUS LYMPHOCYTES**

Kryazhevskikh A. V. ^a,
Abisheva N. N. ^{a, b}

^a Udmurt Federal Research Center UB RAS.

^b Udmurt State University.

Резюме

Поиск подходов для решения проблем острого и хронического отторжения трансплантата, преодоления тканевой несовместимости, является одним из важных вопросов клинической трансплантологии и регенеративной медицины. Индукция толерантности к естественным и искусственным трансплантационным антигеном является желаемой целью уже не одно столетие. Недавно было показано, что антилимфоцитарные антитела к активированным лимфоцитам, названные регуляторным ревматоидным фактором (регРФ), участвуют в контроле аутореактивных лимфоцитов в норме, поддерживая естественную толерантность. Было отмечено, что относительно быстрый подъем уровня регРФ в крови (3-5 день) после иммунизации наблюдается при аутооттрансплантации. Также его раннее повышение ассоциировано с нечувствительностью животных к экспериментально вызываемым аутоиммунным заболеваниям.

Целью нашего исследования было выяснить, возможно ли индуцировать продукцию регРФ у крыс введением аутологичных лимфоцитов, активированных in vitro гетерологичным антигеном (лимфоциты мыши).

Для этого одну группу крыс иммунизировали внутривенно смешанной культурой аутологичных и гетерологичных (мышиных) лимфоцитов (СКЛ), после 5 дней совместной инкубации. Другую группу иммунизировали только лимфоцитами мыши. РегРФ в крови определяли на 3, 5, 7, 14, 21, 28 и 35 дни после иммунизации. Предполагали, что внутривенное введение крысам активированных в СКЛ аутологичных лимфоцитов крыс и лимфоцитов мышей вызовет ранний ответ регРФ на аутологичные лимфоциты и более поздний на гетерологичные лимфоциты мыши.

По средним данным титр регРФ в ответ на иммунизацию крыс мышиными лимфоцитами практически не изменялся, однако, только на 7 день отмечается значительное увеличение стандартного отклонения, что указывает на ярко выраженный индивидуальный характер реакции крыс на введение гетерологичных мышиных лимфоцитов. Иммунизация животных СКЛ вызвала двухфазный подъем регРФ в крови, на 5 и 21 дни.

Повышение регРФ на 5 день после иммунизации СКЛ свидетельствует о реакции на активированные гетерологичным антигеном аутологичные лимфоциты. Полученные результаты открывают перспективу для дальнейших исследований, направленных на разработку методов индукции приобретенной толерантности.

Ключевые слова: аутологичные лимфоциты, гетерологичные лимфоциты, смешанная культура лимфоцитов, регуляторный ревматоидный фактор, аутооттрансплантация, ксенотрансплантация.

Abstract

The search for approaches to solve the problems of acute and chronic transplant rejection, overcoming tissue incompatibility, is one of the important issues of clinical transplantology and regenerative medicine. Induction of tolerance to natural and artificial transplant antigens has been a desired goal for more than a century. It has recently been shown that anti-lymphocytic antibodies to activated lymphocytes, called regulatory rheumatoid factor (regRF), are involved in the control of autoreactive lymphocytes in normal conditions, maintaining natural tolerance. It was noted that a relatively rapid increase in the level of regRF in the blood (3-5 day) after immunization is observed during autotransplantation. Its early rise is also associated with the insensitivity of animals to experimentally induced autoimmune diseases.

The aim of our study was to find out whether it is possible to induce regRF production in rats by introducing autologous lymphocytes activated in vitro by a heterologous antigen (mouse lymphocytes).

To achieve this, one group of rats was immunized intravenously with a mixed culture of autologous and heterologous (mouse) lymphocytes (MLC), after 5 days of co-incubation. The other group was immunized only mouse lymphocytes. RegRF in the blood was determined by 3, 5, 7, 14, 21, 28 and 35 days after immunization. It was hypothesized that the intravenous injection of autologous rat lymphocytes activated in MLC and mouse lymphocytes to rats would cause an early regRF response to autologous lymphocytes and a later one to heterologous mouse lymphocytes.

According to the average data, the titer of regRF in response to mouse lymphocyte immunization of rats practically did not change, however, only on day 7 there was a significant increase in the standard deviation, which indicates an expressed individual response of rats to the introduction of heterologous mouse lymphocytes. Immunization of animals to MLC caused a two-phase increase in regRF in the blood, on days 5 and 21.

An increase in regRF on day 5 after MLC immunization indicates a reaction to autologous lymphocytes activated by a heterologous antigen. The obtained results open up the prospect for further research aimed at developing methods for inducing acquired tolerance.

Keywords: autologous lymphocytes, heterologous lymphocytes, mixed lymphocyte culture, regulatory rheumatoid factor, autotransplantation, xenotransplantation.

1 Введение

Отторжение трансплантата, вне зависимости от его природы, является одной из главных проблем, которая сдерживает развитие клинической трансплантологии. Приоритетной задачей в области трансплантологии и иммунологии остается поиск способов индукции иммунологической толерантности у реципиентов к трансплантатам. Наряду с исследованиями в области иммуносупрессивной терапии, в настоящее время разрабатываются альтернативные подходы к индукции иммунологической толерантности на основе клеточных технологий [3,10]. В некоторых экспериментальных моделях на животных удалось достигнуть толерантность к аллотрансплантатам солидных органов, но последовательное формирование толерантности у пациентов все еще остается труднодостижимой целью. Установлено, что для обеспечения острого отторжения большинства аллотрансплантатов, необходимы мощные адаптивные иммунные реакции, инициированные провоспалительными Т-клетками, активированными через прямые и непрямые пути во вторичных лимфоидных органах [6].

Изучение методов индукции приобретенной толерантности к естественным и искусственным антигенам невозможно без понимания механизмов формирования и поддержания в ходе онтогенеза естественной толерантности к собственным антигенам. В ряде экспериментов показано, что толерантность можно индуцировать длительным введением малых доз антигена или однократным введением большой дозы антигена [4,7]. Также много работ посвящено роли Treg клеткам в индукции и поддержании толерантности [9,12,13]. Вместе с тем, активно развиваются методы тканевого типирования [8] и выявления предрасполагающих донор-специфических антител [11].

Недавно открытый новый фактор регуляции аутореактивности получил название регуляторный ревматоидный фактор (regRF). Регуляторный ревматоидный фактор представляет собой популяцию антиидиотипических антител, несущих дополнительную общую специфичность к Fc фрагментам IgG которая ассоциирована с иммуносупрессивными свойствами данных антител по отношению к аутореактивным лимфоцитам. Будучи антиидиотипическими антителами, regRF ограничивает экспансию CD4⁺ Т лимфоцитов тем идиотипом, для которого он специфичен, в соответствии с принципом отрицательной обратной связи. Показано, что мишенью regRF являются только активированные CD4⁺ Т-лимфоциты [5]. Ранняя продукция regRF была ассоциирована с нечувствительностью животных к экспериментально вызванному аутоиммунным реакциям [14]. Поэтому regRF может рассматриваться как перспективная мишень для индукции приобретенной толерантности к чужеродным антигенам.

Целью нашего исследования было выяснить, можно ли индуцировать продукцию regRF у крыс введением аутологичных лимфоцитов, активированных in vitro гетерологичным антигеном (лимфоциты мыши).

Идея эксперимента заключалась в том, что, если крысам ввести аутологичные лимфоциты, активированные гетерологичными (мышинными) лимфоцитами in vitro, это вызовет относительно раннюю продукцию regRF в ходе иммунного ответа, по продукции которого можно судить о иммуносупрессии аутологичных лимфоцитов, активированных in vitro гетерологичными лимфоцитами. Тогда как введение гетерологичного антигена вызовет более поздний иммунный ответ.

2 Материалы и методы

Крысы популяции Wistar были доставлены из племенного комплекса «Рапполово» (НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ - ПЛЖ «Рапполово», Россия). Белые беспородные мыши приобретены из БУ УР «Удмуртский ветеринарно-диагностический центр» (БУ УР «УВДЦ», г. Ижевск, Россия). Эксперименты на животных проводились в соответствии с руководящими принципами ARAR, Законом Великобритании о животных (научные процедуры) 1986 года и Директивой ЕС 2010/63/ЕС об экспериментах на животных. Применяемые протокол и процедуры были этически проверены и одобрены Комитетом по биоэтике Удмуртского государственного университета (дата 18.01.2021/No 2102).

Для проведения исследования крысы популяции Wistar были поделены на две группы. Первую группу (n=6) иммунизировали внутривенно гетерологичными (мышинными) лимфоцитами. Кровь у мыши забирали в объеме 1-1,5 мл декапитацией с 3,8% цитратом натрия (ПанЭко, Россия), разводили до необходимого объема средой RPMI-1640 (ПанЭко, Россия), перемешали и нанесли на фиколл ($\rho=1,077$) (ПанЭко, Россия) в соотношении 1:2. Центрифугировали в течение 30 мин при 1500 об/мин. Лимфоциты отобрали и отмыли в среде RPMI-1640 трижды (1 раз - при 1500 об/мин в течение 10 минут, 2 и 3 раз - при 1500 об/мин в течение 7 минут). Приготовили суспензию лимфоцитов – развели клетки от каждого образца в 1 мл среды RPMI-1640. Подсчитали количество выделенных клеток в камере Горяева, с помощью красителя трипановый синий (0,2% раствор на ЗФР). Полученное количество клеток доводили до 100 мкл, иммунизировали крыс внутривенно. Проводили забор крови у крыс для получения сыворотки, в сыворотке определяли regRF. Определение титра регРФ методом агглютинации танизированных, нагруженных гомологичным IgG эритроцитов проводили по методике [1].

Вторую группу (n=6) иммунизировали аутологичными лимфоцитами, предварительно активированными in vitro гетерологичными (мышинными) лимфоцитами. Все этапы работы проводили в стерильных условиях под

ламинаром. Кровь у мыши в объеме 1-1,5 мл декапитацией, у крысы в объеме 3-5 мл методом кардиальной пункции с 3,8% цитратом натрия. Выделение лимфоцитов и подсчет клеток производили аналогично первой экспериментальной группе. В 24-луночном культуральном планшете (Corning, США) ставили смешанную культуру лимфоцитов (СКЛ), в которой содержалось по $5 \cdot 10^5$ клеток от каждого образца лимфоцитов крысы и мыши. Так, конечная концентрация клеток в одной лунке 24-луночного культурального планшета составила $1 \cdot 10^6$ клеток. Суспензия лимфоцитов была разлита на 4 лунки, следовательно, общее количество клеток в смешанной культуре от одной пары «крыса-мышь» составило $4 \cdot 10^6$. Инкубировали полученные культуры в CO₂-инкубаторе (Erppendorf, Германия), а через 5 суток от начала культивирования вводили крысам внутривенно после доведения клеток до 100 мкл. Проводили забор крови у крыс для получения сыворотки, в сыворотке определяли regRF. Оценку метаболической активности выполняли с помощью набора «Глюкоза ФКД» (Фармацевтика и Клиническая Диагностика, Россия). Определение титра регРФ проводили по методике [1].

3 Результаты и обсуждение

Измерение метаболической активности лимфоцитов по потреблению глюкозы в питательной среде после 5 дней инкубации показало, что концентрация глюкозы соответствуют норме - наблюдается небольшое ее снижение в питательной среде, в среднем на 1,57 ммоль/л, что говорит об адекватной метаболической активности лимфоцитов и является позитивным фактором жизнедеятельности клеточной культуры.

При анализе жизнеспособности клеток после 5 дней инкубации было обнаружено, что процент живых клеток от общего количества клеток составляет 34-70%.

Для проверки гипотезы о том, что толерантность можно индуцировать введением животным активированных аутологичных лимфоцитов, что, в свою очередь, должно привести к повышению уровня regRF, крысам внутривенно вводили СКЛ. Результаты измерения уровня regRF представлены на рисунке 1.

В группе 1 можно наблюдать рост титра regRF на 3-5 день после начала иммунизации, далее его уровень постепенно снижается и уже не поднимается в течение всего эксперимента. График изменения уровня regRF в группе животных, иммунизированных гетерологичными (мышинными) лимфоцитами (группа 1) (рисунок 1) очень схож с графиком изменения уровня regRF в группе животных, которым была проведена ксенотрансплантация кожи (рисунок 2). В качестве ксенотрансплантата был использован лоскут кожи мыши [2].

В группе 2 повышение уровня regRF наблюдается на 5 день от начала иммунизации (рисунок 1), второе повышение отмечается на 21 день и титр regRF не падает до конца наблюдения (35 день от начала иммунизации). Кинетика regRF в группе животных, иммунизированных аутологичными лимфоцитами, активированными in vitro гетерологичными (мышинными) лимфоцитами (группа 2) (рисунок 1) схожа с кинетикой regRF у животных, которым была проведена аутооттрансплантация кожи (рисунок 2).

Согласно гипотезе исследования regRF является фактором негативной регуляции CD4⁺ Т-лимфоцитов, и в первую очередь аутореактивных лимфоцитов. Соответственно, реакция на аутоантигены происходит быстрее, по аналогии с вторичным иммунным ответом. Тогда как на ксенотрансплантат иммунный ответ развивается позднее, что мы и ожидали получить. Поэтому, как и при трансплантации кожи, наблюдаемая нами ранняя продукция regRF при введении аутологичных лимфоцитов возможна по причине уже установленного иммунного контроля в отношении собственных антигенов.

4 Выводы

Таким образом, активированные in vitro гетерологичным антигеном аутологичные лимфоциты вызвали относительно ранний ответ regRF, что может свидетельствовать об установлении негативного регуляторного контроля.

РИСУНКИ

Рисунок 1. Уровень regRF в крови крыс после введения гетерологичных (мышинных) лимфоцитов (группа 1), после введения аутологичных лимфоцитов, активированных in vitro гетерологичными (мышинными) лимфоцитами (группа 2). На рисунке представлены средние значения $\pm$ SD. Оценивали регРФ методом агглютинации танизированных, нагруженных гомологичным IgG эритроцитов.

Figure 1. The level of regRF in the blood of rats after the introduction of heterologous (mouse) lymphocytes (group 1), after the introduction of autologous lymphocytes activated in vitro by heterologous (mouse) lymphocytes (group 2). The figure shows the average values $\pm$ SD. RegRF was assessed by the agglutination method of tanized erythrocytes loaded with homologous IgG.

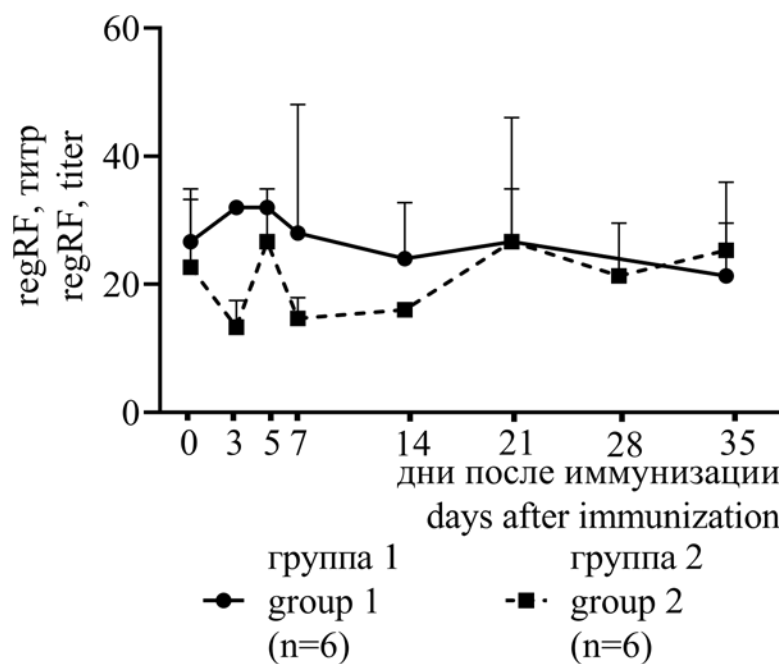
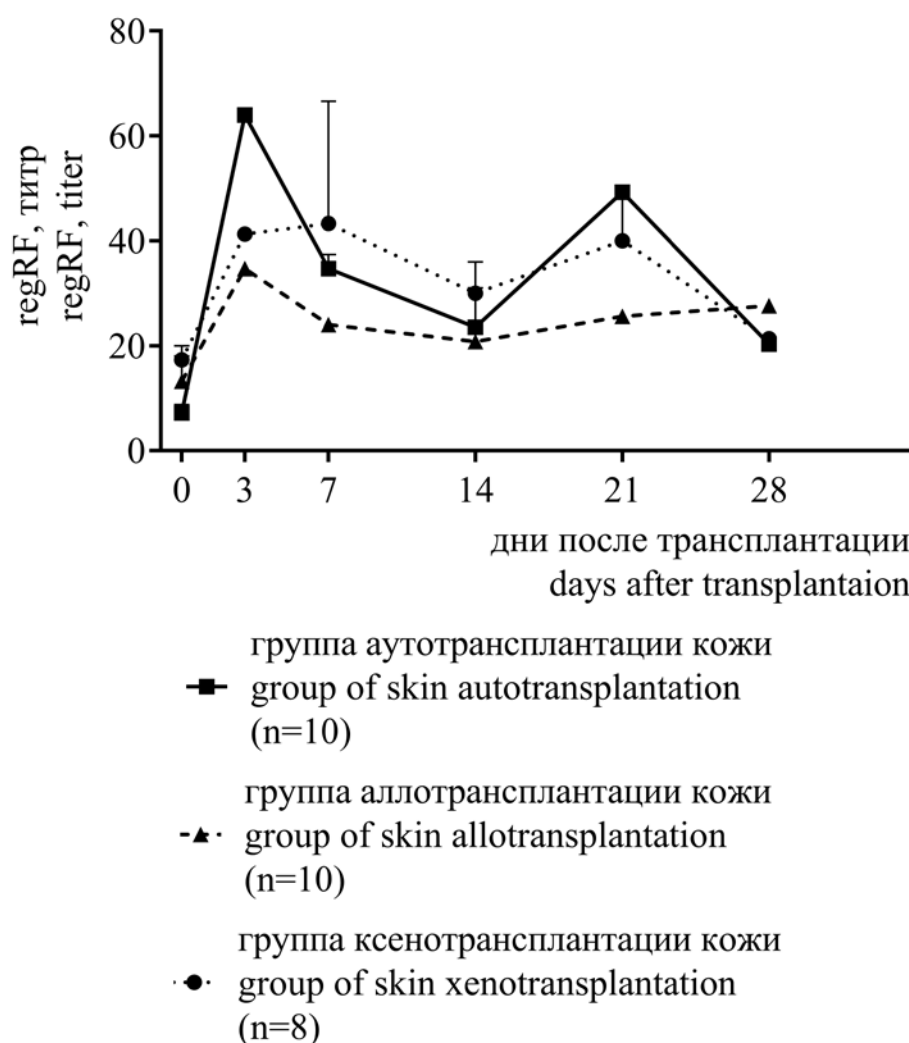


Рисунок 2. Уровень регРФ у крыс при ауто- (n=10), алло- (n=10), и ксенотрансплантации (n=8) кожи в течение 28 дней эксперимента. На рисунке представлены средние значения $\pm$ SD. Оценивали регРФ методом агглютинации танизированных, нагруженных гомологичным IgG эритроцитов.

Figure 2. The level of regRF in rats with auto- (n=10), allo- (n=10), and xenotransplantation (n=8) of skin during 28 days of the experiment. The figure shows the average values $\pm$ SD. RegRF was assessed by the agglutination method of tanned erythrocytes loaded with homologous IgG.



ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДААННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Кряжевских Анастасия Вадимовна, инженер-исследователь лаборатории биосовместимых материалов ФГБУН «Удмуртский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук»; аспирант кафедры иммунологии и клеточной биологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», г. Ижевск, Россия.

Адрес для переписки: Кряжевских Анастасия Вадимовна. ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет»;

адрес: 426034, Россия, г. Ижевск, ул. Университетская, 1;

факс: 8(3412)916426;

телефон: 8(3412)916426;

e-mail: krav526@gmail.com

Kryazhevskikh A.V., Research engineer, Laboratory of Biocompatible Materials, Udmurt Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Izhevsk, Russian Federation; Postgraduate Student, Department of Immunology and Cell Biology, Udmurt State University, Izhevsk, Russian Federation;

address: Udmurt State University 1 Universitetskaya St, Izhevsk, 426034 Russian Federation;

fax: 8(3412)916426;

telephone: 8(3412)916426;

e-mail: krav526@gmail.com

Блок 2. Информация об авторах

Абишева Надежда Николаевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биосовместимых материалов ФГБУН «Удмуртский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук»; старший научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной иммунологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет»; доцент кафедры иммунологии и клеточной биологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», г. Ижевск, Россия;

Abisheva Nadezhda N., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Biocompatible Materials, Udmurt Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Senior Research Associate, Laboratory of Molecular and Cell Immunology, Udmurt State University; Associate Professor, Department of Immunology and Cell Biology, Udmurt State University, Izhevsk, Russian Federation.

Блок 3. Метаданные статьи

РЕГУЛЯТОРНЫЙ РЕВМАТОИДНЫЙ ФАКТОР В КРОВИ КРЫС,
ИММУНИЗИРОВАННЫХ АУТОЛОГИЧНЫМИ ЛИМФОЦИТАМИ,
АКТИВИРОВАННЫМИ IN VITRO ГЕТЕРОЛОГИЧНЫМИ
ЛИМФОЦИТАМИ

RHEUMATOID REGULATORY FACTOR IN THE BLOOD OF RATS
IMMUNIZED WITH AUTOLOGOUS LYMPHOCYTES, ACTIVATED IN
VITRO BY HETEROLOGOUS LYMPHOCYTES

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

РЕГРФ В АКТИВАЦИИ IN VITRO AUTOLYM

REGRF IN ACTIVATION OF AUTOLYM IN VITRO

Ключевые слова: аутологичные лимфоциты, гетерологичные лимфоциты, смешанная культура лимфоцитов, регуляторный ревматоидный фактор, ауотрансплантация, ксенотрансплантация.

Keywords: autologous lymphocytes, heterologous lymphocytes, mixed lymphocyte culture, regulatory rheumatoid factor, autotransplantation, xenotransplantation.

Иммунологические чтения в Челябинске 2025.

Количество страниц текста – 5,

Количество таблиц – 0,

Количество рисунков – 2.

27.03.2025

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи или ее doi.
1	Бедулева Л.В., Сидоров А.Ю., Абишева Н.Н., Гильманова Л.У., Горбушина А.Н. Метод определения отдельной популяции ревматоидного фактора с иммунорегуляторными свойствами» // Российский иммунологический журнал, 2020. Т. 23, № 2. С. 187-190.	Beduleva L.M., Sidorov A.Yu., Abisheva N.N., Gilmanova L.U., Gorbushina A.N. Detection of immunoregulatory rheumatoid factor. Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology, 2020, Vol. 23, no. 2, pp. 187-190.	https://doi.org/10.46235/1028-7221-267-DOI
2	Кряжевских А.В. Регуляторный ревматоидный фактор (регрф) в крови крыс при ауто-, алло-, и ксенотрансплантации кожи // Удмуртский государственный университет, 2023. С. 54-55.	Kryazhevskikh A.V. Regulatory rheumatoid factor (regrf) in the blood of rats during auto-, allo-, and xenotransplantation of skin, Udmurtskiy gosudarstvennyy universitet = Udmurt State University, 2023, pp. 187-190	https://www.elibrary.ru/download/elibrary_59455966_38040902.pdf

3	Скворцова Е.В., Синенко С.А., Зенин В.В., Томилин А.Н. Получение регуляторных дендритных клеток из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток мыши для их использования в моделях трансплантации тканей // Гены и клетки, 2019. Т.14. С. 214-215.	Skvortsova E.V., Sinenko S.A., Zenin V.V., Tomilin A.N. Obtaining regulatory dendritic cells from induced pluripotent stem cells of mice for their use in tissue transplantation models. Geny i kletki = Genes & Cells, 2019, Vol. 14, pp. 214-215.	https://genescells.ru/2313-1829/article/view/124359
4	Andre C., Heremans J.F., Vaerman J.P., Cambiaso C.L. A mechanism for the induction of immunological tolerance by antigen feeding: antigen-antibody complexes. <i>J Exp Med</i> , 1975, Vol. 142, no. 6, pp. 1509-1519.	-	https://doi.org/10.1084/jem.142.6.1509
5	Beduleva L., Menshikov I., Stolyarova E., Fomina K., Lobanova O., Ivanov P., Terentiev A. The rheumatoid factor in idiotypic regulation of autoimmunity. <i>Int. J. Rheum. Dis.</i> , 2015, Vol. 18, pp. 408-420.	-	https://doi.org/10.1111/1756-185X.12335
6	Benichou G., Tonsho M., Tocco G., Nadazdin O., Madsen J.C. Innate immunity and resistance to tolerogenesis	-	https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00073

	in allotransplantation. Front. Immunol., 2021, Vol. 3, pp. 1-16.		
7	Bercovici N., Delon J., Cambouris C., Escriou N., Debre P., Liblau R.S. Chronic intravenous injections of antigen induce and maintain tolerance in T cell receptor-transgenic mice. Eur. J. Immunol., 1999, Vol. 29, no. 1, pp. 345-354.	-	<a href="https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199901)29:01<345::AID-IMMU345>3.0.CO;2-K">https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199901)29:01<345::AID-IMMU345>3.0.CO;2-K
8	Heeger P.S., Dinavahi R. Transplant Immunology for Non-Immunologist. Mt. Sinai. J. Med., 2012, Vol. 79, pp. 376-387.	-	https://doi.org/10.1002/msj.21314
9	Lu J., Li P., Du X., Liu Y., Zhang B., Qi F. Regulatory T cells induce transplant immune tolerance. Transpl. Immunol., 2021, Vol. 67, no. 9.	-	https://doi.org/10.1016/j.trim.2021.101411
10	Kholodenko I.V., Kholodenko R.V., Lupatov A.Yu., Yarygin K.N. Cell Therapy as a Tool for Induction of Immunological Tolerance after Liver Transplantation. Bull. Exp. Biol. Med., 2018, Vol. 165, no. 4, pp. 554-563.	-	https://link.springer.com/article/10.1007/s10517-018-4213-8
11	Martinez O.M., Rosen H. R. Basic Concepts in Transplant Immunology.	-	https://journals.lww.com/lt/citation/2005/04000/basic_concepts_in_transplant_immunology.2.aspx

	Liver Transpl., 2005, Vol. 11, no. 4, pp. 370-381.		
12	Romano M., Fanelli G., Albany C.J., Giganti G., Lombardi G. Past, Present, and Future of Regulatory T Cell Therapy in Transplantation and Autoimmunity. Front. Immunol., 2019, Vol. 10, no. 43.	-	https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00043
13	Romano M., Sim L.T., Lesley A.S., Giovanna L. Treg therapy in transplantation: a general overview. Transpl. Int., 2017, Vol. 30, no. 8, pp. 745-753.	-	https://doi.org/10.1111/tri.12909
14	Sidorov A., Beduleva L., Menshikov I., Terentiev A., Stolyarova E., Abisheva N. Fc fragments of immunoglobulin G are an inducer of regulatory rheumatoid factor and a promising therapeutic agent for rheumatic diseases. Int. J. Biol. Macromol., 2017, Vol. 95, pp. 938-945.	-	https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.081