УДК 618.39-018.82-053:612.017.1:57.083.324
doi: 10.22494/cot.v7i1.94

Імунокоригуюча дія фетальних нервових клітин мишей при розвитку хвороби «трансплантат проти хазяїна»

Гольцев А. М., Бабенко Н. М., Гаєвська Ю. О., Дубрава Т. Г., Луценко О. Д., Бондарович М. О.

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України, Харків, Україна

e-mail: cryopato@gmail.com

РЕЗЮМЕ

Дотепер невирішеною залишається проблема лікування гострої та хронічної хвороби «трансплантат проти хазяїна» (ХТПХ) при застосуванні гістонесумісного кісткового мозку (КМ). Важливу роль у контролі розвитку ХТПХ відіграє Т-регуляторна ланка імунітету.

***МЕТА РОБОТИ**: оцінка імунокоригуючого впливу нативних і кріоконсервованих фетальних нервових клітин (ФНК) на Т-регуляторну ланку імунітету тварин-реципієнтів з ХТПХ.*

***МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.** Гостру ХТПХ індукували шляхом введення летально опроміненим мишам гістонесумісного КМ. На 14-у добу після індукції ХТПХ та введення нативних або кріоконсервованих ФНК мишей у тварин визначали індекс селезінки, вміст Т-регуляторних FOXP3⁺ клітин та кількість транскриптів гена foxp3 у CD4⁺-фракції спленоцитів.*

***РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.** У реципієнтів гістонесумісного КМ встановлено зменшення вмісту Т-регуляторних клітин та рівня експресії гена foxp3 в популяції спленоцитів відносно сингенного контролю. Введення нативних або кріоконсервованих ФНК тваринам з ХТПХ викликало збільшення вмісту Т-регуляторних клітин. Кріоконсервовані ФНК більшою мірою, ніж нативні, підвищували як відносний вміст Т-регуляторних клітин, так і рівень експресії гена foxp3 в клітинах селезінки, що характеризувалось більшим значенням показника кількості реципієнтів, що вижили до 16-ї доби спостереження.*

***ВИСНОВКИ.** Введення ФНК реципієнтам з ХТПХ стимулює Т-регуляторну ланку імунітету, яка є ключовою при розвитку імунного конфлікту. Це підтверджує можливість використання ФНК як терапевтичного імунокоригуючого засобу.*

***КЛЮЧОВІ СЛОВА**: фетальні нервові клітини; хвороба «трансплантат проти хазяїна»; Т-регуляторні FOXP3⁺ клітини; ген foxp3*

Серйозним недоліком трансплантації гістонесумісного кісткового мозку (КМ) в клінічних умовах є розвиток у реципієнта гострої або хронічної форми хвороби «трансплантат проти хазяїна» (ХТПХ) [1, 2]. У теперішній час для запобігання або мінімізації розвитку ХТПХ використовуються різноманітні методичні підходи, що спрямовані на підготовку реципієнта або обробку кісткового мозку з метою видалення Т-лімфоцитів, які відповідають за розвиток патології. До них відносяться: обробка КМ моноклональними антитілами (МАТ) до Т-лімфоцитів у присутності комплементу, кон'югація анти-Т-клітинних МАТ з імунотоксинами, елютріація, аглютинація Т-клітин лектином сої, імуноадсорбція тощо [3]. Найбільш м'яка процедура очищення – імуномагнітна сепарація, при якій зберігається життєздатність клітин КМ з одночасним видаленням більшості Т-лімфоцитів [4]. Однак елімінація Т-лімфоцитів із КМ призводить до погіршення приживлення мієлотрансплантата, втрати здатності реалізації реакції «трансплантат проти лейкемії», розвитку інфекційних ускладнень і, як наслідок, підвищення смертності хворих [5].

Одним з альтернативних підходів до зміни компонентного складу кісткового мозку і мінімізації тяжкості перебігу ХТПХ є використання певних режимів його кріоконсервування [6]. У даному випадку зменшення проявів реакції «трансплантат проти хазяїна» у відповідь на введення гістонесумісного КМ відбувається за рахунок селективної елімінації з мієлотрансплантату цитокін-продукуючих акцесорно-регуляторних клітин моноцитарно-фагоцитарної системи, що входять до адгезивної фракції КМ. Видалення адгезивних клітин КМ супроводжувалося зниженням активності Thy-1.2-позитивних Т-лімфоцитів, що мають відношення до розвитку ХТПХ [7]. Регуляція ефекторних донорських Т-клітин може здійснюватися не тільки антигенпрезен-

туючими клітинами реципієнта, а й клітинами строми мієлотрансплантата, до яких можна віднести мезенхімальні стромальні клітини (МСК). Відомо, що ці клітини володіють вираженими імуносупресивними властивостями при введенні реципієнтам з ХТПХ [8, 9]. На думку авторів цих робіт, МСК запобігають розвитку ХТПХ шляхом безпосередньої або опосередкованої індукції регуляторних Т-клітин (Treg) з наївних $CD4^+$-клітин *in vivo*. Разом з цим триває подальший пошук способів зменшення імунореактивності гістонесумісного КМ.

Відомо, що ХТПХ є системною патологією, при якій в організмі реципієнта порушуються координаційні взаємодії імунної системи з іншими системами [2, 10, 11]. Найбільша роль у розвитку реакції відторгнення належить антигенам головного комплексу гістосумісності MHC, відмінності за якими викликають Т-клітинну імунну відповідь. При гострій експериментальній ХТПХ основною мішенню донорських Т-лімфоцитів є клітини, що експресують молекули MHC-II (клітини Лангерганса в шкірі, дендритні і епітеліальні клітини в тимусі та ін.) [11]. Принципово важливими є результати, що свідчать про розвиток у пацієнтів з трансплантацією гістонесумісного КМ так званого супутнього імунодефіциту, який маніфестує виникненням ускладнень з боку як периферичної, так і центральної нервової систем [10, 12].

Відомо, що фетальні нервові клітини (ФНК) належать до таких препаратів, які здатні заміщати втрачені нейрони при травмі або при розвитку нейродегенеративних захворювань [13, 14]. ФНК володіють вираженим імунотропним потенціалом та імунокоригуючою активністю [15, 16]. Треба підкреслити, що один з векторів імуносупресивної активності ФНК, зокрема дендритних клітин головного мозку, клітин мікро- та макроглії, реалізується шляхом секреції ферменту індоламін-2,3-діоксигенази (IDO). Цей ключовий фермент кінуренінового шляху обумовлює метаболізм надлишків триптофану до активних метаболітів, таких як кінуренін, кінуренінова кислота, 3-гідроксікінуренін, 3-гідроксіантранілова, піколінова та хінолінова кислоти [17]. Нестача триптофану пригнічує проліферацію ефекторних Т-клітин і призводить до зупинки їх клітинного циклу, діючи кількома шляхами: шляхом активації GCN2-кінази або інгібіції mTOR [18, 19]. Крім того, катаболіти IDO, зокрема кінуренін, є потужними активаторами аріл-гідрокарбонового рецептора (AhR), за допомогою якого відбувається індукція апоптозу імунних клітин [20].

Інший аспект імунорегуляторної дії IDO полягає у стимуляції диференціювання наївних $CD4^+$-клітин у Treg. Зокрема, кінуренін та його похідні в комбінації з TGF-ß сприяють активації гена *foxp3*, діючи через AhR, що обумовлює формування субпопуляції Treg [21]. Показано, що кінуреніновий шлях деградації триптофану найбільш притаманний макрофагам і мікрогліальним клітинам [22] і частково – астроцитам [23].

Інтерферон-γ (IFN-γ) є найбільш потужним індуктором IDO [24]. У присутності IFN-γ астроцити, клітини мікроглії і нейрони фетального мозку мишей *in vitro* здатні до експресії IDO в кількості, достатній для детекції [25]. Встановлено, що окрім IFN-γ можливістю активувати експресію гена *ido* у ФНК мишей 11-12 доби гестації володіє і такий значний стрес-індукуючий фактор, як кріоконсервування. Встановлено, що у кріоконсервованих ФНК рівень експресії гена *ido* підвищувався, а наступне культивування *in vitro* у присутності IFN-γ ще більше сприяло активації клітин-продуцентів *ido* [16]. Це дозволяє розглядати ФНК як терапевтичний засіб з імунокоригуючими властивостями при введенні разом з КМ для лікування ХТПХ.

В багатьох роботах показана аггравація проявів клінічних симптомів ХТПХ на тлі зниження кількості Treg [26, 27], супресорна дія яких обумовлена функціонуванням транскрипційного фактору FOXP3, що контролюється геном *foxp3*. Тобто зниження як рівня експресії гена *foxp3* в Treg, так і їхньої кількості у реципієнтів з ХТПХ є молекулярними біомаркерами розвитку патології.

На підставі вищенаведеного, **МЕТОЮ ДОСЛІДЖЕННЯ** було встановлення імунокоригуючого впливу нативних і кріоконсервованих фетальних нервових клітин мишей на Т-регуляторну ланку імунітету реципієнтів з ХТПХ.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Експерименти виконані на самицях мишей ліній СВА/Н і мишей-гібридів першого покоління $(CBA/HxC57Bl/6)F_1$ 20-тижневого віку масою 24-26 г. Дослідження проводилися згідно з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних і інших наукових цілей» (European convention, Strasburg, 1986) та схваленими I Національним конгресом України з біоетики (Київ, 2004). Тварин виводили з експерименту під ефірним наркозом шляхом цервікальної дислокації на 14-у добу після індукції ХТПХ.

Отримання клітинних суспензій. Пахові лімфовузли та кістковий мозок (КМ) отримували у мишей лінії СВА/Н. Лімфовузли дезінтегрували в гомогенізаторі Потера у середовищі 199 (*ПанЭко*, Росія) з додаванням 10 % ембріональної телячої сироватки (*HyClone*, США) і 2 % цитрату натрію (*Sigma-Aldrich*, США) (робоче середовище 1). Кістковий мозок вимивали зі стегнових кісток робочим середовищем 1. Отримані суспензії пропускали через нейлонові фільтри (*Falkon*, США) з діаметром пор 100 мкм.

Суспензію ФНК отримували з мозку плодів мишей лінії СВА/Н 12-ї доби гестації. Термін вагітності тварин розраховували від дня появи вагінальної пробки. Вилучені плоди мишей тричі відмивали розчином Хенксу (*ПанЭко*, Росія). Фрагменти головного мозку, які були звільнені від оболонок, дезінтегрували у 3 мл середовища DMEM/F12 (*Serva*, Німеччина), що містив 20 % ембріональної телячої сироватки (*HyClone*, США), шляхом пропускання через голки діаметру, що зменшувався. Час від моменту вилучення плодів до приготування клітинної суспензії не перевищував однієї години.

Кріоконсервування ФНК здійснювали у робочому середовищі 2, що містило DMEM/F12 (*Serva*, Німеччина), 0,6 мг % глюкози (*Галичфарм*, Україна), 10 % ембріональної телячої сироватки (*HyClone*, США), 0,2 од/мл інсуліну (*Berlin-Chemie*, Німеччина) з додаванням 10 % диметилсульфоксиду (*Arterium*, Україна) як кріопротектора. Режим заморожування передбачав охолодження зразків зі швидкістю 1 °С/хв до -80 °С з наступним зануренням у рідкий азот [16]. Розморожування ФНК здійснювали на водяній бані при 37 °С впродовж 50-60 с до зникнення твердої фази. Відмивання суспензії ФНК від залишків кріопротектора проводили шляхом додавання однакового об'єму робочого середовища 2 та наступного центрифугування при 300 xg. Суспензія клітин ФНК, що не піддавалася процедурі заморожування-відігрівання, далі в тексті буде називатися нативною.

Прекультивування нативних і кріоконсервованих ФНК проводили в середовищі DMEM/ F12 (*Serva,* Німеччина) з додаванням 15 % ембріональної телячої сироватки в чашках Петрі з покриттям BioCoat (*BD Pharmingen*, США), що містило ламінін та фібронектин, при 37 °С протягом 48 год. З метою стимуляції експресії гена *ido* в культуру ФНК через 24 год додавали IFN-γ (*Sigma-Aldrich,* США) у концентрації 100 од/мл. Через 24 год нативні і кріоконсервовані ФНК вводили внутрішньовенно як імуномодулюючий засіб попередньо опроміненим реципієнтам в момент індукції патології.

ІНДУКЦІЯ ГОСТРОЇ ХТПХ

Гостру ХТПХ індукували у мишей $(CBA/HxC57Bl)F_1$, які були опромінені на установці РУМ-17 (*Мосрентген*, Росія) у дозі 8,5 Гр [27]. Умови опромінення: потужність дози – 0,38 Гр/хв; напруга – 220 кВ; сила струму – 10 мА; фільтри – 0,5 мм Cu + 1 мм Al; фокусно-дорзальна відстань – 50 см. Через годину після опромінення тваринам внутрішньовенно вводили $5 \cdot 10^6$ клітин/мишу сингенного або гістонесумісного КМ лінії СВА/Н разом із клітинами пахових лімфовузлів цієї ж лінії в співвідношенні 3:1 відповідно. З огляду на той факт, що в КМ людини частка лімфоцитів становить приблизно 30 %, а у мишей – значно менше, ми додавали до КМ сингенні клітини лімфовузлів у відповідній кількості [28].

Експериментальні тварини були поділені на наступні групи, (n = 10):

1 – інтактні миші (СВА/НхС57Bl)F_1;

2 – опромінені миші (СВА/НхС57Bl)F_1, яким вводили фізіологічний розчин;

3 – опромінені миші (СВА/НхС57Bl)F_1, яким було введено сингенний (СВА/НхС57Bl)F_1 кістковий мозок в дозі 3,5•10^6 /мишу з клітинами лімфовузлів (СВА/НхС57Bl)F_1 1,5•10^6 клітин/мишу;

4 – опромінені миші (СВА/НхС57Bl)F_1, яким було введено гістонесумісний СВА/Н кістковий мозок в дозі 3,5•10^6 клітин/мишу з клітинами лімфовузлів СВА/Н 1,5•10^6 клітин/мишу;

5 – опромінені миші (СВА/НхС57Bl)F_1, яким було введено гістонесумісний СВА/Н кістковий мозок в дозі 3,5•10^6 клітин/мишу з клітинами лімфовузлів СВА/Н 1,5•10^6 клітин/мишу та нативні ФНК СВА/Н 5•10^5 клітин/мишу;

6 – опромінені миші (СВА/НхС57Bl)F_1, яким було введено гістонесумісний СВА/Н кістковий мозок в дозі 3,5•10^6 клітин/мишу та клітини лімфовузлів СВА/Н 1,5•10^6 клітин/мишу та кріоконсервовані ФНК СВА/Н 5•10^5 клітин/мишу.

Об'єм фізіологічного розчину та суспензій клітин, що вводили внутрішньовенно, складав 0,2 мл/мишу.

ОЦІНКА ІНТЕНСИВНОСТІ РОЗВИТКУ ХТПХ

Кількість мишей-реципієнтів, що вижили після індукції ХТПХ та лікування, підраховували до 16-ї доби. На 14-у добу після індукції ХТПХ у тварин всіх дослідних груп визначали індекс селезінки, вміст Т-регуляторних клітин (Treg) та кількість транскриптів гена *foxp3* у виділених $CD4^+$-фракціях спленоцитів.

Індекс селезінки розраховували як співвідношення маси органа до маси тіла тварин, помножене на 100. Індекс селезінки інтактних тварин приймали за 1, якщо в дослідних групах він був більше 1,3 – це вказувало на розвиток ХТПХ [27, 28].

Для отримання суспензії спленоцитів селезінку мишей усіх експериментальних груп гомогенізували в робочому середовищі 1 та обробляли лізуючим буфером BD Pharmlyse™ (*BD Pharmingen*, США) згідно інструкції-виробника з метою видалення еритроцитів. Після цього клітини селезінки двічі відмивали фосфатно-сольовим буфером (*Biowest*, Франція) шляхом центрифугування при 300 xg.

Відносну кількість Treg ($Foxp3^+$) клітин в селезінці тварин усіх дослідних груп визначали на проточному цитофлуориметрі FACS Calibur (*Becton Dickinson*, США), використовуючи фікоеритрин-кон'юговані антимишачі моноклональні антитіла FOXP3 (*BD Pharmingen*, США) за протоколом фірми-виробника. Ізотип-відповідні антитіла (BD *Pharmingen*, США) були використані як негативний контроль. Для мінімізації помилок у пробах аналізували 10 тис. подій. Дані цитофлуориметрії аналізували за допомогою програми WinMDi 2.8.(*Joseph Trotter, Scripps Institute,* La Jolla, США).

Виділення фракції $CD4^+$ клітин селезінки здійснювали методом імуномагнітного сортування за допомогою anti-mouse CD4 Magnetic Particles-DM (*BD IMag™,* США) на магнітному сортері BD IMagnet (*BD IMag™*, США) за протоколом фірми-виробника.

ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ТРАНСКРИПТІВ ГЕНА *FOXP3* У ФРАКЦІЇ $CD4^+$ КЛІТИН СЕЛЕЗІНКИ

Виділення РНК. Загальну РНК виділяли з 1•10^5 клітин за допомогою набору Diatom RNA Prep 100 (*Сінтол,* Росія) згідно з інструкцією фірми-виробника. Для очищення препаратів РНК від домішок ДНК використовували фермент ДНКазу (*Сінтол*, Росія). Зразки інкубували з ДНКазою (активність 2 од/мкл) при 37 °С протягом 30 хв. Інактивацію ДНКази здійснювали шляхом витримки реакційної суміші при 75 °С протягом 10 хв.

Проведення реакції зворотної транскрипції. Для синтезу першого ланцюга ДНК на РНК-матриці використовували набір реагентів Реверта L, що містить комплект random-олігонуклеотидів і ревертази (*ЦНДІЕ*, Росія), відповідно до інструкції фірми-виробника (*Сінтол*, Росія). Проби поміщали в термостат і інкубували при температурі 37 °С протягом 30 хв. Після завершення реакції пробірки нагрівали до 92 °С для інактивації ревертази та інкубували 3-5 хв.

Проведення ПЛР. В мультиплексній ПЛР використовували дві пари праймерів (**табл. 1**): гена *foxp3* (NCBI Reference Sequence: NM_054039.2) і housekeeping гена *β-actin* (NCBI Reference Sequence: NM_007393.3), які були сконструйовані на основі бази даних на сайті GenBank Національного центру біотехнологічної інформації (*NCBI BLAST*, США) і синтезовані в АТЗТ «Медбіосервіс» (Україна).

Ампліфікацію кДНК здійснювали методом ПЛР за допомогою набору реагентів GenePakTM PCR Core (*Лабораторія Ізоген*, Росія), який містить інгібовану для «гарячого старту» Taq ДНК полімеразу (1 u), дезоксінуклеозидтрифосфати (200 мкМ) і хлорид магнію (2,5 mM) та оптимізовану буферну систему для проведення стандартної ПЛР. Використовуючи набори обох праймерів, проводили спільну «крокову» ПЛР [29], при якій відбувався синтез фрагментів, специфічних для кожної мішені. Кількість циклів для кожного гена була підібрана в попередніх експериментах шляхом додавання праймерів на різних циклах в ПЛР, що дозволило уникнути конкуренції між ПЛР кожного гена, втрати експоненційної ампліфікації і зниження рівня синтезованих продуктів. В результаті для гена *foxp3* було встановлено 40 циклів, для *β-actin* – 20 циклів. Ампліфікацію здійснювали в термостаті «Терцик» (*НВФ ДНК-технологія*, Росія). Денатурацію проводили при 94 °С протягом 30 с, гібридизацію матриці з праймером при 60 °С – 30 с, елонгацію – при 72 °С 60 с. Негативним контролем була реакційна суміш без кДНК.

Детекцію продуктів ампліфікації проводили методом капілярного електрофорезу у біо-аналізаторі 2100 Bioanalyzer system (*Agilent*, США). Підготовка чіпів здійснювалася згідно з інструкцією до набору «ДНК 1000» (*Fermentas*, Литва). Продукти ПЛР вносили в лунки чіпів, автоматично реєструвалися в сформованих мікроканалах чіпа. Маркер довжини фрагментів, який було внесено в окрему лунку, був контролем.

Кількість транскриптів генів (нмоль/л) була представлена на основі поділу продуктів ампліфікації в чіпі, рівень експресії мРНК гена *foxp3* був нормований до рівня експресії мРНК *β-actin* і виражений у вигляді % [29].

Статистична обробка даних проводилася з використанням пакету програм SPSS Statistics 17.0 (*SPSS*, США) Отримані експериментальні дані представлені як середнє значення ± стандартне відхилення. Достовірність відмінностей між групами оцінювалися за методом Манна-Уїтні. Відмінності вважали статистично значущими при $p < 0,05$. Криві виживаності було побудовано за допомогою методу Каплана-Мейєра.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Підтвердженням розвитку гострої ХТПХ, індукованої введенням гістонесумісного КМ з клітинами лімфовузлів, є спленомегалія, характерною ознакою якої було збільшення індексу селезінки (**рис. 1**). У реципієнтів сингенного КМ (група 3) індекс селезінки вірогідно не відрізнявся від аналогічного показника інтактних мишей (група 1). При введенні гістонесумісного КМ (група 4) індекс селезінки зростав на 30 % порівняно з показником реципієнтів сингенного КМ (група 3), що свідчить про розвиток ХТПХ.

Однією із клінічних ознак, які характеризують тяжкість перебігу захворювання, є виживаність експериментальних тварин. Дійсно, при введенні гістонесумісного КМ встановлено статистично значуще зменшення кількості тварин, що дожили до 16-ї доби експерименту порівняно з реципієнтами групи 3 (**рис. 2**).

При оцінці імунокоригуючої дії ФНК у тварин з ХТПХ (групи 5 і 6 відповідно) було встановлено зниження індексу селезінки, причому при застосуванні кріоконсервованих клітин – до рівня показника групи 3 (**рис.1**). Введення ФНК сприяло більшим значенням показника кількості тварин, що вижили, протягом терміну спостереження

НАЗВА ГЕНА ТА НОМЕР В GENBANK	ФОРВАРДНИЙ (F) І РЕВЕРСНИЙ (R) ПРАЙМЕРИ	ДОВЖИНА ПРОДУКТУ АМПЛІФІКАЦІЇ
foxp3, Mus musculus forkhead box P3 (Foxp3) NM_054039.2	F:CCTCTCGGACCCGGCCCAAG R:CCCAGTGATGGGAAGGAACA	220 bp
β-actin, Mus musculus actin NM_007393.3	F: CACTGCCGCATCCTCTTCCT R: AGGAAGGCTGGAAAAGAGCC	113 bp

Таблиця 1. Характеристика праймерів генів: *foxp3* і housekeeping gene – *beta actin*

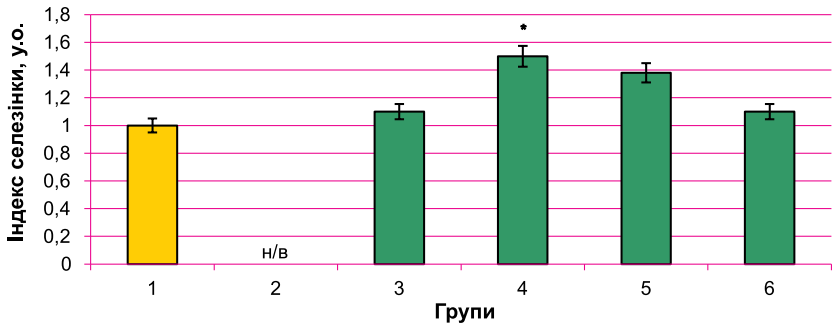


Рис. 1. Індекс селезінки експериментальних тварин.

Примітки: група 1 – інтактні миші (CBA/HxC57Bl)F1; група 2 – опромінені миші (CBA/HxC57Bl)F1 (данні не визначалися – н/в); група 3 – опромінені миші (CBA/HxC57Bl)F1, яким було введено сингенний КМ; група 4 – опромінені миші (CBA/HxC57Bl)F1, яким було введено гістонесумісний КМ; група 5 – опромінені миші (CBA/HxC57Bl)F1, яким було введено гістонесумісний КМ та нативні ФНК; група 6 – опромінені миші (CBA/HxC57Bl)F1, яким було введено гістонесумісний КМ та кріоконсервовані ФНК; n = 10.

** – відмінності статистично значущі в порівнянні з групою 3, p < 0,05.*

(**рис. 2**). Після введення як нативних, так і кріоконсервованих ФНК (групи 5 і 6) цей показник був в 1,4 і 1,6 разу відповідно більшим, ніж у групі 4.

Відомо, що розвиток ХТПХ після введення гістонесумісного КМ асоціюється з розвитком аутоімунного захворювання, тобто з появою в організмі реципієнтів «аутореактивного» клону Т-ефекторних клітин, які формуються з донорських стовбурових кровотворних клітин [2]. У експериментальних моделях ХТПХ було показано, що донорські ефекторні Т-клітини атакують різні тканини організму реципієнта, включаючи тимус, руйнують його архітектоніку, що призводить до інволюції органу і лімфопенії [30, 31]. Більш того, це обумовлює порушення центральної позитивної і негативної селекції потенційно аутореактивних ефекторних Т-клітин [32]. При цьому спостерігається зниження здатності тимусу реципієнта з ХТПХ до продукції клітин з супресорною активністю. До того ж у роботі Miura Yu і співавт. доведено, що Treг в організмі реципієнтів з ХТПХ з аплазією гемопоетичної системи після опромінення формуються саме з донорського КМ [30]. Вочевидь, що при розвитку ХТПХ потрібна корекція Т-регуляторної ланки імунітету.

Як було продемонстровано вище, введення реципієнтам сингенного КМ (група 3) не викликало розвитку ХТПХ (**рис. 1**). В селезінці тварин цієї групи не відзначено статистично значущого зниження вмісту FOXP3-клітин в порівнянні з групою 1 (**рис. 3**).

Групою Chen X. та співавт. було встановлено зниження вмісту $CD4^+FOXP3^+$ клітин у селезінках мишей з гострою ХТПХ, яку ініціювали подібним до нашого способом [33]. У клінічному дослідженні пацієнтів з посиленням ознак гострої ХТПХ після алогенної трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин було підтверджено факт зниження вмісту Treг $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ в периферичній крові [34]. Це узгоджується з отриманими нами даними про зниження вмісту $FOXP3^+$-клітин в 3,8 разу у тварин з ХТПХ (група 4) в порівнянні з групою 3.

Введення нативних або кріоконсервованих ФНК (група 5 і 6) тваринам з ХТПХ викликало збільшення вмісту Treг в порівнянні з тваринами з розвитком даної патології (група 4) (**рис. 3**). При цьому стимулюючий ефект дії кріоконсервованих ФНК (група 6) щодо $FOXP3^+$- клітин був в 1,34 разу більшим в порівнянні з ефектом після введення нативних ФНК (група 5). Це свідчить про більшу здатність кріоконсервованого фетального матеріалу проявляти імунокоригуючий ефект щодо Treг, що підтверджується результатами виживаності тварин до 16-ї доби у групі 6 (**рис. 2**).

Здатність кріоконсервування виступати в ролі фактора, що регулює функціональний стан клітин, була відзначена у наших попередніх дослідженнях. Було встановлено, що після певних режимів кріоконсервування в клітинах фетальної печінки 18-ї доби гестації відбувалось суттєве підвищення рівня експресії гена *ido* у порівнянні з нативними клітинами цього терміну гестації, що надавало їм більш

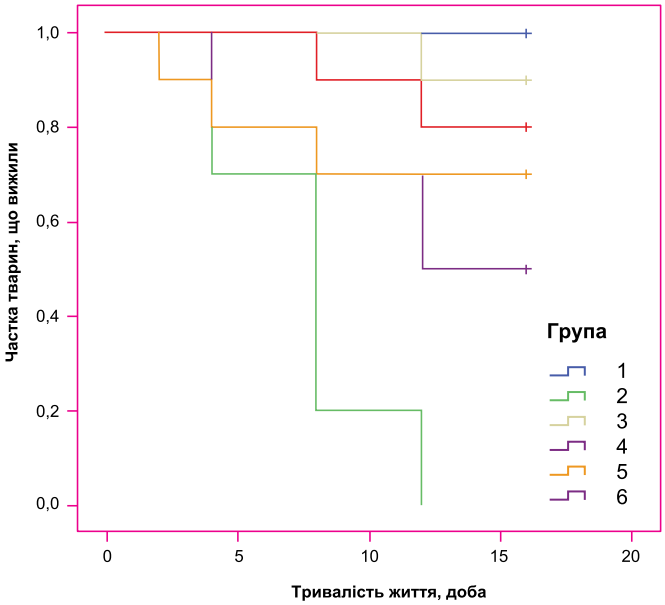
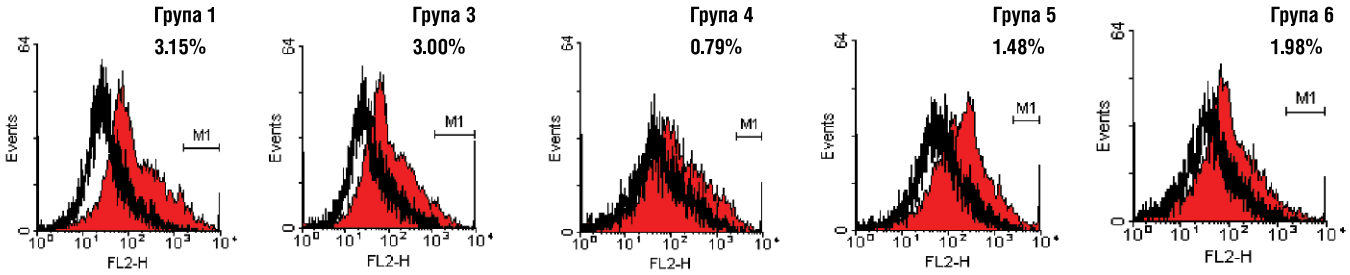


Рис. 2. Кількість експериментальних тварин, що вижили до 16-ї доби.

Примітки: група 1 – інтактні миші (CBA/HxC57Bl)F1; група 2 – опромінені миші (CBA/HxC57Bl)F1 (данні не визначалися – н/в); група 3 – опромінені миші (CBA/HxC57Bl)F1, яким було введено сингенний КМ; група 4 – опромінені миші (CBA/HxC57Bl)F1, яким було введено гістонесумісний КМ; група 5 – опромінені миші (CBA/HxC57Bl)F1, яким було введено гістонесумісний КМ та нативні ФНК; група 6 – опромінені миші (CBA/HxC57Bl)F1, яким було введено гістонесумісний КМ та кріоконсервовані ФНК; n = 10.



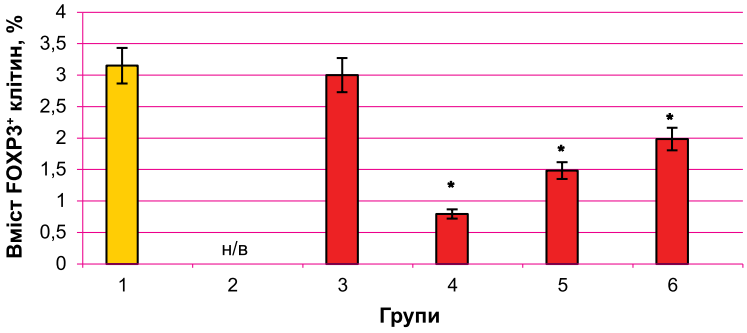


Рис. 3. Гістограми визначення відносного вмісту FOXP3⁺ клітин в селезінці експериментальних тварин методом проточної цитометрії.

Примітка: група 1 – інтактні миші (CBA/HxC57Bl)F₁; група 2 – опромінені миші (CBA/HxC57Bl)F₁ (данні не визначалися – н/в); група 3 – опромінені миші (CBA/HxC57Bl)F1, яким було введено сингенний КМ; група 4 – опромінені миші (CBA/HxC57Bl)F1, яким було введено гістонесумісний КМ; група 5 – опромінені миші (CBA/HxC57Bl)F1, яким було введено гістонесумісний КМ та нативні ФНК; група 6 – опромінені миші (CBA/HxC57Bl)F1, яким було введено гістонесумісний КМ та кріоконсервовані ФНК.

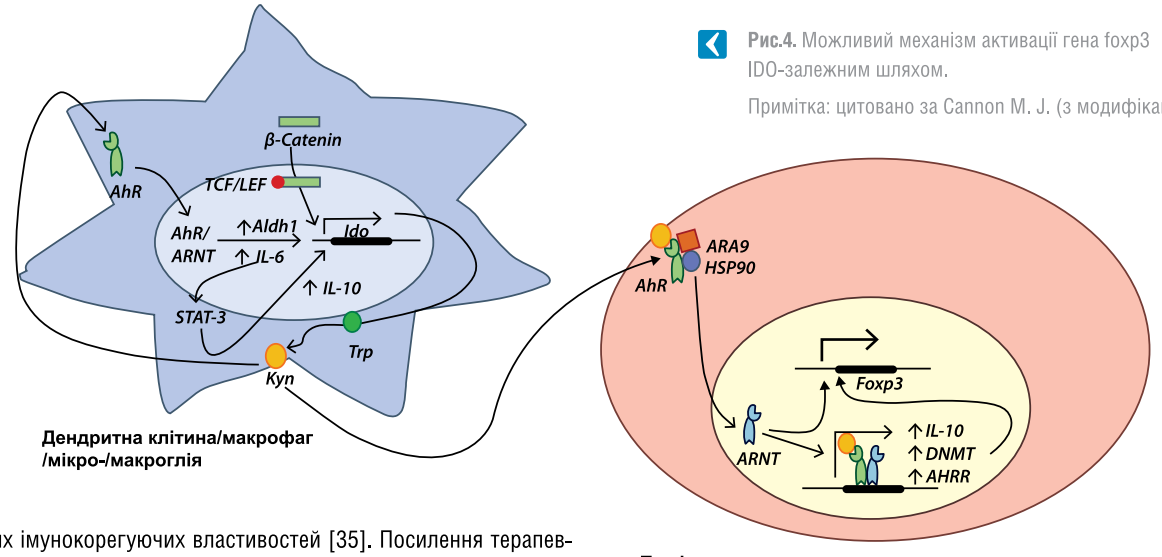


Рис.4. Можливий механізм активації гена foxp3 IDO-залежним шляхом.

Примітка: цитовано за Cannon M. J. (з модифікацією авторів).

виражених імунокорегуючих властивостей [35]. Посилення терапевтичного потенціалу клітин фетальної печінки після кріоконсервування було підтверджено в умовах розвитку локальної ХТПХ, де введення цих клітин обумовлювало підвищення рівня експресії гена *tgf-β* у регіональних лімфовузлах реципієнтів [36].

Meijerink M. та співавт. встановили, що кріоконсервовані моноцити і незрілі дендритні клітини мають спотворену здатність до продукції цитокінів. Зокрема, після кріоконсервування незрілих дендритних клітин здатність до продукції ними протизапального цитокіну IL-10 збільшувалася в 3,6 рази [37].

Подібний вплив факторів низькотемпературного консервування, а саме стимуляція експресії гена *ido* і продукції протизапальних медіаторів (трансформуючий фактор росту β та IL-10) був виявлений і на ФНК [16, 38]. Використання обраного режиму кріоконсервування сприяло перерозподілу субпопуляційного складу ФНК у бік гліальних клітин, які під впливом одного з найбільш потужних медіаторів запалення – IFN-γ здатні до підвищення рівня експресії гена і напрацювання ферменту IDO [16]. Дія цього ферменту може сприяти підвищенню експресії транскрипційного фактора FOXP3 в наївних CD4⁺-клітинах і диференціюванню Treг [21]. Оскільки у ФНК 12 доби гестації, які вводяться для терапії ХТПХ, крім мікро-, макроглії – потенційних продуцентів IDO, присутні ще і дендритні клітини [39], не виключена їхня участь в диференціюванні FOXP3⁺ Treг в організмі реципієнта.

Функціювання Treг знаходиться під пильним контролем *foxp3* гена, що відповідає за синтез фактора транскрипції FOXP3. Зв'язуючись з промотором ДНК, FOXP3 діє як репресор транскрипції, виступаючи антагоністом іншого транскрипційного фактора – ядерного фактора активованих Т-лімфоцитів (nuclear factor of activated T-lymphocytes, NFAT). Під впливом FOXP3 відбувається трансформація CD4⁺-клітин в функційно повноцінні Treг шляхом пригнічення транскрипції генів прозапальних цитокінів, що регулюються NFAT [40].

Генерація FOXP3⁺ Treг відбувається на периферії і може контролюватися дендритними клітинами за допомогою кількох механізмів, у тому числі IDO-залежним шляхом [41]. Зокрема, кінуренін, що продукується IDO, зв'язується з аріл-гідрокарбоновим рецептором – AhR (**рис. 4**), який є цитозольним фактором транскрипції і зазвичай знаходиться у цитоплазмі Т-клітин в неактивному стані, що забезпечується його асоціацією з шапероном HSP90 [42]. Зв'язування кінуреніна з AhR призводить до дисоціації комплексу AhR-HSP90 і транслокації

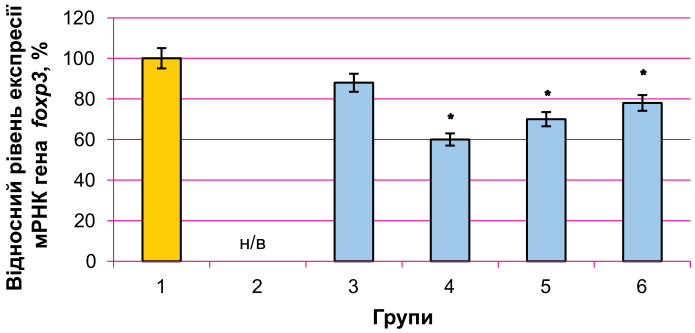


Рис. 5. Відносний рівень експресії мРНК гена *foxp3* в CD4⁺ фракції клітин селезінки експериментальних тварин.

Примітки: група 1 – інтактні миші (CBA/HxC57Bl)F_1; група 2 – опромінені миші (CBA/HxC57Bl)F_1 (данні не визначалися – н/в); група 3 – опромінені миші (CBA/HxC57Bl)F_1, яким було введено сингенний КМ; група 4 – опромінені миші (CBA/HxC57Bl)F_1, яким було введено гістонесумісний КМ; група 5 – опромінені миші (CBA/HxC57Bl)F_1, яким було введено гістонесумісний КМ та нативні ФНК; група 6 – опромінені миші (CBA/HxC57Bl)F_1, яким було введено гістонесумісний КМ та кріоконсервовані ФНК; (n = 10).

** – відмінності статистично значущі в порівнянні з групою 3, p < 0,05.*

AhR з кінуреніном в ядро, подальшої димеризації з ядерним білком-транслокатором (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator, ARNT). Цей комплекс кінуренін-AhR-ARNT завдяки конформаційним перебудовам зв'язується з промоутерною ділянкою низки генів, а саме: ДНК-метилтрансферази (DNMT), яка деметилює Foxp3 промоутер, дозволяючи напрацювання білка Foxp3; гена, що регулює продукцію IL-10; а також тих генів, які забезпечують напрацювання самого AhR, здійснюючи його саморегуляцію. Є всі передумови вважати, що саме таким чином можуть реалізувати свою активність і інші клітини-продуценти IDO, а саме макрофаги, клітини мікро- і макроглії як складові гетерогенної популяції фетального мозку (**рис. 4**).

З огляду на вищезазначене, був оцінений рівень експресії гена *foxp3* у CD4⁺ фракції клітин селезінки тварин з ХТПХ до та після введення ФНК. Встановлено, що рівень експресії гена *foxp3* при розвитку ХТПХ (група 4) був значно нижчим у порівнянні з групами 1 і 3 (**рис. 5**). Це підтверджує загальновідомий постулат, що дана хвороба розвивається на тлі зниження експресії гена *foxp3* саме в Treg клітинах (група 4). Результатом цього є жорстка форма прояву імунного конфлікту, що і обумовлює максимальну загибель тварин даної групи (**рис. 2**). Отримані результати узгоджуються з даними Miura Yu. та ін. щодо негативної кореляції між рівнем експресії гена *Foxp3* в мононуклеарах периферичної крові та тяжкістю клінічного перебігу ХТПХ у людини [30].

Після введення нативних або кріоконсервованих ФНК реципієнтам з ХТПХ (групи 5 і 6) в CD4⁺ клітинах селезінки було встановлено не тільки підвищення вмісту FOXP3⁺ клітин (**рис. 2**), але і рівня експресії в них *foxp3* гена (**рис. 5**). Кріоконсервовані ФНК (група 6) володіли більшою імуномодулюючою активністю щодо цих показників у тварин з ХТПХ (група 4). Це проявлялось більшим показником кількості тварин, що вижили протягом 16 діб після введення ФНК, причому кріоконсервовані ФНК (група 6) мали в цьому випадку перевагу над застосуванням нативного матеріалу (група 5) (**рис. 2**).

Отримані результати суперечать даним Moll G. et al. щодо зниження імуномодулюючих та регуляторних властивостей МСК кісткового мозку безпосередньо після розморожування, що призводить до їхньої менш вираженої реакції на прозапальні стимули, порушення продукції протизапальних медіаторів порівняно із нативними клітинами [43]. Автори пов'язують це з активацією під впливом кріоконсервованих МСК вродженої імунної атаки, яка називається миттєва запальна реакція, що реалізується в кровоносному руслі та мета якої – протидія приживленню і функціонуванню клітин після їх системного введення. Це може бути причиною зниження імуномодулюючих властивостей кріоконсервованих МСК.

Однак, у нашій роботі були використані кріоконсервовані ФНК, які після відігріву були попередньо прокультивовані *in vitro* у присутності IFN-γ, що дало змогу відновити їхній функціональний потенціал щодо продукції гена *ido* [16] та дозволило реалізувати імуносупресивні властивості *in vivo*.

Таким чином, проведені дослідження дозволяють розширити уявлення про патогенез розвитку ХТПХ та визначити механізми імунорегуляторної дії нативних та кріоконсервованих фетальних нервових клітин.

ВИСНОВКИ

1. ***Встановлено, що розвиток гострої ХТПХ у мишей відбувався на тлі зниження в організмі реципієнтів вмісту Treg і рівня експресії гена foxp3 у клітинах селезінки.***
2. ***Введення нативних або кріоконсервованих ФНК мишей тваринам з ХТПХ викликало збільшення вмісту Treg і рівня експресії гена foxp3.***
3. ***Продемонстровано, що кріоконсервовані фетальні нейральні клітини мишей в більшій мірі, ніж нативні, здатні до корекції імунної системи тварин з ХТПХ шляхом впливу на Т-регуляторну ланку імунітету, що сприяло більшій виживаності реципієнтів.***

Робота проведена за відомчою тематикою № 2.2.6.78 «Вивчення молекулярних механізмів регуляції клітинами фетального походження імунореактивності кісткового мозку» у рамках програми НАН України «Фундаментальні дослідження з найважливіших проблем природничих наук».

СПИСОК ЦИТОВАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. *MacDonald K. P., Hill G. R., Blazar B. R.* Chronic graft-versus-host disease: biological insights from preclinical and clinical studies. Blood. 2017. **129**, № 1. P. 13-21. DOI:10.1182/blood-2016-06-686618.
2. *Ghimire S., Weber D, Mavin E., et al.* Pathophysiology of GvHD and other HSCT-Related Major Complications. Front Immunol. 2017. № 8. P. 79. DOI:10.3389/fimmu.2017.00079.
3. *Antin J. H.* T-cell depletion in GVHD: less is more? Blood. 2011. **117**, № 23. P. 6061-6072. DOI:10.1182/blood-2011-04-348409.

4. *Michalek J., Collins R. H., Durrani H. P., et al.* Definitive separation of graft-versus-leukemia- and graft-versus-host-specific CD4+ T cells by virtue of their receptor beta loci sequences. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003. **100**, № 3. P. 1180-1184.
5. *Chang Y. J., Zhao X. Y., Huang X. J.* Strategies for Enhancing and Preserving Anti-leukemia Effects Without Aggravating Graft-Versus-Host Disease. Front Immunol. 2018. № 9. P. 3041. DOI:10.3389/fimmu.2018.03041.
6. *Goltsev A. N., Matsevitaya I. Yu., Lutsenko Ye. D., et al.* On the Modification of Immunoreactivity of Myelotransplant after Cryopreservation. Probl Cryobiol Cryomed. 2010. **20**, № 2. P. 145-152.
7. *Goltsev A. N., Babenko N. N., Dubrava T. G., et al.* Modification of the state of bone marrow hemopoietic cells after cryopreservation. Int J Refriger. 2006. **29**, № 3. P. 358-367.
8. *Le Blanc K., Davies L. C.* Mesenchymal stromal cells and the innate immune response. Immunol Lett. 2015. **168**, № 2. P. 140-146. DOI:10.1016/j.imlet.2015.05.004.
9. *Dunavin N., Dias A., Li M., McGuirk J.* Mesenchymal Stromal Cells: What Is the Mechanism in Acute Graft-Versus-Host Disease? Biomedicines. 2017. **5**, № 3. P. 39. DOI:10.3390/biomedicines5030039.
10. *Saad A. G., Alyea E. P., Wen P. Y., et al.* Graft-versus-host disease of the CNS after allogeneic bone marrow transplantation. J Clin Oncol. 2009. **27**, № 30. P. 147-9. DOI:10.1200/JCO.2009.21.7919.
11. *Schroeder M. A., Di Persio J. F.* Mouse models of graft-versus-host disease: advances and limitations. Disease Models & Mechanisms. 2011. № 4. P. 318-333. DOI:10.1242/dmm.006668.
12. *Kamble R. T., Chang C. C., Sanchez S., Carrum G.* Central nervous system graft-versus-host disease: report of two cases and literature review. Bone Marrow Transplant. 2007. **39**, № 1. P. 49-52.
13. *Xiao J., Yang R., Biswas S., et al.* Neural stem cell-based regenerative approaches for the treatment of multiple sclerosis. Mol Neurobiol. 2018. **55**, № 4. P. 3152-3171. DOI:10.1007/s12035-017-0566-7.
14. *Weston N. M., Sun D.* The potential of stem cells in treatment of traumatic brain injury. Curr Neurol Neurosci Rep. 2018. **18**, № 1. P. 1. DOI:10.1007/s11910-018-0812-z.
15. *Pluchino S., Zanotti L., Brambilla E., et al.* Immune regulatory neural stem/precursor cells protect from central nervous system autoimmunity by restraining dendritic cell function. PLoS One. 2009. **4**, № 6. P. 5959. DOI:10.1371/journal.pone.0005959.
16. *Goltsev A. N., Babenko N. N., Dubrava T. G., et al.* Cryopreservation can regulate immunomodulatory properties of fetal nerve cells. Cryobiology. 2018. **85**. P. 168.
17. Le Floc'h N., Otten W., Merlot E. Tryptophan metabolism, from nutrition to potential therapeutic applications. Amino Acids. 2011. **41**. P. 1195-1205.
18. *Munn D. H., Sharma M. D., Baban B., et al.* GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. Immunity. 2005. **22**, № 5. P. 633-642.
19. *Munn D. H., Mellor A. L.* Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses. Trends Immunol. 2013. **34**, № 3. P. 137-143. DOI:10.1016/j.it.2012.10.001.
20. *Metz R., Rust S., Duhadaway J. B., et al.* IDO inhibits a tryptophan sufficiency signal that stimulates mTOR: A novel IDO effector pathway targeted by D-1-methyl-tryptophan. OncoImmunology. 2012. № 1. P. 1460-1468.
21. *Wu H., Gong J., Liu Y.* Indoleamine 2, 3-dioxygenase regulation of immune response (Review). Mol Med Rep. 2018. **17**, № 4. P. 4867-4873.
22. *Guillemin G. J., Smith D. G., Smythe G. A., et al.* Expression of the kynurenine pathway enzymes in human microglia and macrophages. Adv Exp Med Biol. 2003. **527**. P. 105-112.
23. *Guillemin G. J., Kerr S. J., Smythe G. A., et al.* Kynurenine pathway metabolism in human astrocytes: a paradox for neuronal protection. J Neurochem. 2001. **78**. P. 1-13.
24. *Pemberton L. A., Kerr S. J., Smythe G., Brew B. J.* Quinolinic acid production by macrophages stimulated with IFN-gamma, TNF-alpha, and IFN-alpha. J Interferon Cytokine Res. 1997. **17**. P. 589-595.
25. *Guillemin G. J., Smythe G., Takikawa O., Brew B. J.* Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and production of quinolinic acid by human microglia, astrocytes, and neurons. Glia. 2005. **49**, № 1. P. 15-23.
26. *Ukena S. N., Grosse J., Mischak-Weissinger E., et al.* Acute but not chronic graft-versus-host disease is associated with a reduction of circulating CD4(+)CD25(high) CD127(low/-) regulatory T cells. Ann Hematol. 2011. **90**, № 2. P. 213-218. DOI:10.1007/s00277-010-1068-0.
27. *Goltsev A. N., Dubrava T. G., Gayevskaya Yu. A., et al.* Foxp3 Gene Expression Value in Regulatory T Cells in Pathogenesis of Graft-Versus-Host Disease Induced with Cryopreserved Allogenic Material. Probl Cryobiol Cryomed. 2014. **24**, № 4. P. 322-331.
28. *Шевелев А. С.* Реакция «трансплантат против хозяина» и трансплантационная болезнь. М.: Медицина, 1976. 237 с.
29. *Gottwald E., Muller O., Polten A.* Semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction with the Agilent 2100 Bioanalyzer. Electrophoresis. 2001. **22**, № 16. P. 4016-4022.
30. *Miura Yu., Thoburn C. J., Bright E. C., et al.* Association of Foxp3 regulatory gene expression with graft-versus-host disease. Blood. 2004. **104**, № 7. P. 2187-2193.
31. *Dudakov J. A., Mertelsmann A. M., O'Connor M. H., et al.* Loss of thymic innate lymphoid cells leads to impaired thymopoiesis in experimental graft-versus-host disease. Blood. 2017. **130**, № 7. P. 933-942.
32. *Krenger W., Blazar B. R., Hollander G. A.* Thymic T-cell development in allogeneic stem cell transplantation. Blood. 2011. **117**, № 25. P. 6768-6776.
33. *Chen X., Vodanovic-Jankovic S., Johnson B., et al.* Absence of T-cell control of Th1 and Th17 cells is responsible for the autoimmune-mediated pathology in chronic graft-versus-host disease. Blood. 2007. **110**. P. 3804-3813.
34. *Корсунский И. А., Румянцев А. Г., Быковская С. Н.* Роль регуляторных Т-клеток CD4+CD25+ и мезенхимальных стволовых клеток костного мозга в подавлении реакции трансплантат против хозяина. Онкогематология. 2008. № 3. С. 45-51.
35. *Гольцев А. Н., Дубрава Т. Г., Луценко Е. Д. и др.* Уровень экспрессии генов GATA-2 и IDO в клетках стволового компартмента криоконсервированной фетальной печени разных сроков гестации. Таврический медико-биологический вестник. 2012. **15**, № 3, ч. 2 (59). С. 81-83.
36. *Гольцев А. Н., Дубрава Т. Г., Луценко Е. Д. и др.* Проявление иммунокорригирующего эффекта криоконсервированных клеток фетальной печени разных сроков гестации в условиях развития экспериментальной модели реакции «трансплантат против хозяина». Гены и клетки. 2010. **5**, № 3. С. 82-86.
37. *Meijerink M., Ulluwishewa D., Anderson R. C., et al.* Cryopreservation of monocytes or differentiated immature DCs leads to an altered cytokine response to TLR agonists and microbial stimulation. J Immunol Methods. 2011. **373**, № 1-2. P. 136-142.
38. *Goltsev A. N., Porozhan Ie. A., Babenco N. N., et al.* Cryopreservation of fetal neural cells causes change of their *ido* gene expression. Abstract book of Annual Scientific Conference of SLTB. 2014, 8-10 October, London, UK p. 66.
39. *Prinz M., Priller J.* Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. Nature reviews neuroscience. 2014. **15**. P. 300-312.
40. *Torgerson T. R., Genin A., Chen C., et al.* FOXP3 inhibits activation-induced NFAT2 expression in T cells thereby limiting effector cytokine expression. J Immunol. 2009. **183**, № 2. P. 907-915. DOI:10.4049/jimmunol.0800216.

41. *Kushwah R., Hu J.* Role of dendritic cells in the induction of regulatory T cells. Cell Biosci. 2011. **1**, № 1. P. 20. DOI:10.1186/2045-3701-1-20.
42. *Cannon M. J., Ghosh D., Gujj S.* Signaling Circuits and Regulation of Immune Suppression by Ovarian Tumor-Associated Macrophages. Vaccines (Basel). 2015. **3**, № 2. P. 448-466.
43. *Moll G., Alm J. J., Davies L. C., et al.* Do cryopreserved mesenchymal stromal cells display impaired immunomodulatory and therapeutic properties? Stem Cells. 2014. **32**, № 9. P. 2430-2442.

СТАТТЯ НА САЙТІ
TRANSPLANTOLOGY.ORG

Автори підтверджують відсутність можливих конфліктів інтересів.

Надійшла до редакції 20.02.2019 р.
Прийнята до друку 31.05.2019 р.