

SUMMARY

EFFICIENCY OF COMPLEX IMMUNOCORRECTION AT THE PATIENTS WITH CHRONIC VIRAL HEPATITIS C, COMORBIDE WITH CHRONIC UNCALCULOSIS CHOLECYSTITIS AND HEPATIC STEATOSIS

G.M. Drannik, V.E. Driyanska, V.M. Frolov, Ya.A. Sotska, I.V. Loskutova

National Medical University (Kiev)
SG «Lugansk state medical university»

Efficiency of combination modern domestic preparations with immunoactive effect such as glutargin, laferobion and subalin in complex therapy of the patients with chronic viral hepatitis C (CVHC), combined with chronic uncalculosis cholecystitis (CUC) and hepatic steatosis (HS) was studied. For the inspected patients the presence of secondary immunodeficit was

detected, which shows up T-lymphopenia, lowering of number of circulatory in peripheral blood lymphocytes with phenotype of CD4+ (T-helpers/ inductors) and immunoregulatory index CD4/CD8, considerable diminishing of functional activity of T-cells, oppressing indexes of phagocytic activity of monocytes and dermal macrophages, accumulation of circulatory immune complexes in the blood serum, mainly due to gain in specific gravity of the most pathogenic average- and littlemoleculary fractions. Application of combination of glutargin, laferobion and subalin in complex therapy of the patients of CVHC combined with CUC and HS provided to normalisation of studied immunological indexes and assisted the acceleration of achievement of clinical-biochemical remission of chronic comorbide pathology of hepatobiliary system.

УДК 612.419.083.324:612.647.035.014.3:615.014.41

СНИЖЕНИЕ ИММУНОРЕАКТИВНОСТИ АЛЛОГЕННОГО КОСТНОГО МОЗГА КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫМИ КЛЕТКАМИ ФЕТАЛЬНОЙ ПЕЧЕНИ В УСЛОВИЯХ РАЗВИТИЯ РЕАКЦИИ «ТРАНСПЛАНТАТ ПРОТИВ ХОЗЯИНА»

ГОЛЬЦЕВ А.Н., ДУБРАВА Т.Г., ЛУЦЕНКО Е.Д., МАЦЕВИТАЯ И.Ю., ГАЕВСКАЯ Ю.А., ОСТАНКОВА Л.В., ОСТАНКОВ М.В., ГОЛЬЦЕВ К.А., ЧЕЛОМБИТЬКО О.В.

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

Существенной проблемой трансплантации гистонесовместимого костного мозга (КМ) является развитие иммунного конфликта, выражающегося реакцией трансплантат против хозяина (РТПХ), которая клинически манифестируется в виде болезни трансплантат против хозяина (БТПХ) [1, 2]. Известно, что в реализации РТПХ основная роль отводится иммунокомпетентным клеткам (ИКК) миелотрансплантата, а именно, Т-клеткам [1]. С этих позиций изучаются возможности минимизации осложнений иммунной природы при трансплантации гистонесовместимого КМ, лишённого антигенреактивных Т-лимфоцитов и их предшественников [3]. В становлении аферентного и эфферентного звеньев РТПХ кроме Т-лимфоцитов могут участвовать и другие клетки миелотрансплантата, что подтверждает значимость его компонентного состава. Ранее нами было получено экспериментальное подтверждение возможности снижения признаков БТПХ путем использования аллогенного КМ криоконсервированного в определенных режимах [4, 5], однако при этом страдал гемопозитический потенциал миелотрансплантата. Снижения иммунореактивности миелотрансплантата можно добиться дополнительным введением с ним элементов, обладающих регуляторной активностью, а именно, клеток фетальной печени (ФП). Интегральный

терапевтический потенциал ФП обусловлен присутствием широкого спектра биологически активных субстанций, продуцируемых различными клетками, включая элементы стволового компартмента: стволовые кроветворные (СКК) и мезенхимальные клетки (МСК) [6, 7].

Неоднократно отмечалось, что в многоступенчатом процессе аппликации фетальных тканей в клинической практике обязательным компонентом является их криоконсервирование, эффективность которого определяется исходным структурно-функциональным состоянием биообъекта [8]. То есть фетальный материал разных сроков гестации, имея разный исходный статус, априори имеет различную криочувствительность [9], что, в итоге, по-разному может изменять и его интегральный терапевтический потенциал. В связи с этим, целью данной работы была сравнительная оценка иммунокорректирующей активности криоконсервированных КФП разных сроков гестации в экспериментальной модели локальной реакции «трансплантат против хозяина» (лРТПХ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты выполнены на мышах линии С57В1/6J и СВА/Н 3-мес. возраста, массой 22-24 г, в соответствии с Международными принципами «Европейской конвенции о защите по-

звоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986), одобренными III Национальным конгрессом Украины по биоэтике (Киев, 2007).

Фетальную печень выделяли из эмбрионов мышей линии СВА/Н на 14-й (КФП-14) и 18-й (КФП-18) посткоитальный день (пкд), дезинтегрировали в гомогенизаторе Поттера в среде 199 с 10%-й эмбриональной телячьей сывороткой и 2%-м цитратом натрия (рабочая среда) с последующей фильтрацией через капроновый фильтр.

Криоконсервирующий раствор был приготовлен на основе рабочей среды, с добавлением 20% диметилсульфоксида (ДМСО) (v/v).

К полученной на рабочей среде суспензии КФП добавляли криоконсервирующий раствор в соотношении 1:1 при комнатной температуре (конечная концентрация криопротектора составила 10%). Экспозицию клеток в криоконсервирующем растворе проводили в течение 10 минут при той же температуре [Гольцев, 2008].

Криоконсервирование КФП осуществляли по разработанному ранее методу на установке УОП-6 производства ИПКиК НАНУ [Гольцев, 1996]. Оттаивание образцов проводили на водяной бане при температуре 40-41°C. Клетки отмывали от ДМСО однократным медленным добавлением равного объема рабочей среды с последующим центрифугированием (200g, 10 мин).

Сохранность КФП до и после криоконсервирования определяли методом суправитального окрашивания пропидий йодидом (Sigma, USA) на проточном цитофлуориметре FACS Calibur (Becton Dickinson, USA).

Патологию индуцировали у мышей линии С57Bl/6J путем подкожного введения им 2x10⁷ клеток лимфоузлов (ЛУ) мышей линии СВА/Н в объеме 0,1 мл в подушечку задней лапы [10]. Клетки ЛУ выделяли путем гомогенизации в рабочей среде и последующего фильтрования. Оценку проявления лРТПХ проводили на 5-е сутки после введения клеток ЛУ по индексу РТПХ (Инд.РТПХ), который представлял собой отношение количества клеток в опытном ЛУ к контрольному. Индекс больше 1,3 свидетельствовал о развитии лРТПХ [10].

Криоконсервированные (кКФП) и нативные (нКФП) КФП вводили мышам-реципиентам С57Bl/6J в дозе 5x10⁶ клеток/мышь однократно в хвостовую вену через сутки после инициации лРТПХ.

Количество Т-регуляторных (Treg) клеток в ЛУ реципиентов оценивали на проточном цитофлуориметре FACS Calibur (Becton Dickinson, USA) по экспрессии поверхностных мембранных маркеров с помощью панели моноклональ-

ных анти-мышинных антител: FOXP3 (PE) (abcam, Англия); CD4 (FITC) и CD25 (PE) (BD, USA). Степень экспрессии этих молекул определяли по средней интенсивности флуоресценции (СИФ). В качестве контроля использовали пробы с добавлением не иммунных меченых FITC и PE моноклональных антител того же изотипа, что и антитела против исследуемого маркера. Учет и анализ данных анализом осуществляли с помощью программы WinMDI 2.8.

Уровень экспрессии гена *tgfb* оценивали с помощью метода полимеразной цепной реакции с этапом обратной транскрипции (ОТ-ПЦР). Общую РНК выделяли с помощью набора Diatom RNA Prep 100 (Isogene Lab, Ltd, Россия) из 1x10⁵ клеток каждого образца. Полученную смесь нуклеиновых кислот обрабатывали ДНКазой I (ООО «Синтол», Россия). Реакцию ОТ ставили с использованием random-олигонуклеотидов и ревертазы (M-Mlv) (НИИЭ МЗ РФ, «Реверта L» (Россия)) при температуре 37°C в течение 30 мин с последующей инактивацией фермента при 95°C в течение 5 мин.

Праймеры к гену *tgfb* были сконструированы на основе базы данных «GenBank» (NCBI BLAST, USA): *tgfb*- NM_009367.3 (fragment length 369 n.p.) и синтезированы в АОЗТ «Медбиосервис» (Киев). Амплификацию фрагментов ДНК проводили в термостате «Терцик» ЗАО «НПФ ДНК-технология» (Россия). Денатурацию проводили при 94° С в течение 30 сек, гибридизацию матрицы с праймерами - при 60° С 30 сек, элонгацию – при 72° С 60с. Количество циклов было 40. После окончания ПЦР проводили элонгацию при 72°С в течение 5 мин.

Детекцию продуктов амплификации проводили методом капиллярного электрофореза в чип-анализаторе «Agilent 2100» (США). Подготовка чипов осуществлялась согласно инструкции набора ДНК 1000 («Fermentas», Литва). Маркер длины фрагментов, вносимый в отдельную лунку чипа, служил контролем для определения размера фрагментов ПЦР.

Сравнение количества транскриптов исследованных мишеней проводили на основе относительной количественной оценки продуктов амплификации. Кратко: готовили последовательные десятикратные разведения исходного препарата кДНК каждого исследуемого образца, вносили в реакционную смесь и проводили амплификацию. Логарифм разведения (lg) кДНК служил показателем уровня экспрессии исследуемых генов. Результаты были нормированы по отношению к показателю экспрессии гена beta actin (NM_007393.3). Отрицательным контролем была реакционная смесь без кДНК.

Полученные данные статистически обрабатывали по методу Стьюдента с применением компьютерной программы MS Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Экспериментальная лРТПХ является удобной моделью для исследования механизмов развития аутоиммунных заболеваний. Она дает возможность не только проследить особенности развития иммунного конфликта, участие различных субстратов иммунной системы, определяющих степень его выраженности [7, 10], но и выяснить механизмы реализации терапевтического эффекта применяемых препаратов.

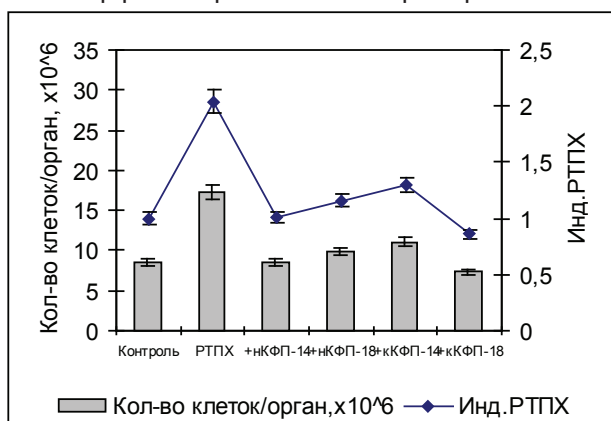


Рис. 1. Индекс РТПХ и количество клеток в региональном ЛУ животных с лРТПХ до и после применения КФП разного вида и срока гестации

Полученные результаты свидетельствуют о том, что выбранный нами метод действительно индуцировал развитие лРТПХ (рис.1). Это подтверждается Инд. РТПХ, составляющим более 2,0 усл.ед. Особая роль в поддержании естественной толерантности организма принадлежит Трег клеткам, нарушение баланса которых часто является причиной развития патологических состояний организма [1, 11]. В общем спектре Трег важное место занимают FOXP3+ и CD4⁺CD25⁺ клетки [12]. Как видно (табл.), на фоне развития лРТПХ концентрация FOXP3+ клеток снижалась более чем в три раза. При лРТПХ как концентрация FOXP3+ клеток, так и их СИФ были ниже контроля, что свидетельствует о снижении содержания в них Foxp3 белка, концентрация которого коррелирует с супрессорной активностью [12].

При оценке содержания субпопуляций Т-клеток с фенотипом CD4⁺CD25⁺ и FOXP3⁺ в ЛУ контрольной группы животных было установлено близкое их процентное содержание. Оценка СИФ общего пула CD4⁺CD25⁺ клеток по маркеру CD25 показала менее выраженную степень их свечения в сравнении с FOXP3⁺. При этом у животных с лРТПХ этот показатель также достоверно снижался в сравнении с контролем подобно СИФ FOXP3⁺ клеток.

Таблица.

Сравнительная оценка показателей, характеризующих развитие лРТПХ

Группы животных	Индекс РТПХ	FOXP3 ⁺ клетки		CD4 ⁺ CD25 ⁺ клетки		CD25 ^{hi} клетки		Уровень экспрессии гена <i>tgf-β</i> , % от контроля
		Усл.ед.	%	СИФ	%	СИФ	%	
Контроль	1,0±0,1	2,16±0,3	3774±247,7	2,61±0,2	1232,2±98,3	0,05±0,004	9342,7±364,5	100
лРТПХ	2,04±0,3*	0,65±0,04*	1790±189,5*	1,47±0,1*	755,8±72,3*	0,014±0,001*	5782,0±287,3*	39±0,3*

Примечание: * – статистически достоверные отличия от контроля (P<0,05); СИФ – средняя интенсивность флуоресценции

Концентрация CD4⁺CD25^{hi} клеток в общем пуле CD4⁺CD25⁺, которые являются истинно Трег [1, 11], в ЛУ интактных животных (контроль) составила 0,05% и была более чем в 50 раз ниже, чем CD4⁺CD25⁺ клеток и в 40 раз ниже, чем FOXP3⁺клеток (табл.). При лРТПХ содержание CD4⁺CD25^{hi} Трег снижалось почти в 4 раза. Интересно, что оценка СИФ пула CD4⁺CD25^{hi} клеток при лРТПХ показала в 7,6 и 3,2 раза выше степень их свечения в сравнении с CD4⁺CD25⁺ и FOXP3⁺ клетками соответственно.

Известно, что в формировании и реализации супрессорной функции Трег активное участие принимает трансформирующий ростовой фактор-β (TGF-β) [13]. Полученные нами результаты показали снижение в условиях развития лРТПХ уровня экспрессии гена *tgfβ* в клетках

ЛУ в 2,5 раза в сравнении с контролем, что свидетельствует о разбалансировке системы регуляции генов, ответственных за поддержание стабильного состояния иммунной толерантности организма.

В какой степени КФП обладают иммунокорректирующей активностью, и как она меняется в зависимости от их исходного состояния? Как видно из рис. 1, применение КФП в любой форме при лРТПХ приводило к снижению содержания клеток в опытном ЛУ в сравнении с не лечеными животными и, соответственно, снижению Инд. РТПХ. В наибольшей степени индекс РТПХ приближался к контрольному уровню после применения нКФП-14. Более низкой иммунокорректирующей активностью обладали нКФП-18. После применения кКФП-14 индекс РТПХ был

больше, чем после нКФП этого же срока гестации. Кримоконсервированные КФП-18 осуществляли корректирующий эффект в отношении этого показателя почти до уровня нКФП-14.

При оценке состояния иммунокомпетентных клеток с супрессорной активностью было показано, что и в этом случае прослеживалась четкая зависимость характера изменения их содержания от вида вводимого материала. Максимальное повышение содержания FOXP3⁺ клеток наблюдалось после введения нКФП-14 (рис.2а). Однако после кримоконсервирования КФП-14 снижали этот потенциал, а КФП-18 повышали его в 2 раза. СИФ FOXP3⁺ клеток всех групп леченных животных был

существенно ниже контроля. Кроме того, после введения кКФП-18 СИФ FOXP3⁺ клеток был ниже, чем после введения кКФП-14 и тем более, после введения нКФП-14. Весьма неожиданными оказались результаты оценки «индуцибельного» потенциала в отношении FOXP3⁺клеток нКФП-18. Их корректирующий эффект был минимальным судя по повышению содержания FOXP3⁺ клеток, тогда как по СИФ - имел максимальную среди всех КФП выраженность. Таким образом, по изменению содержания FOXP3⁺клеток и их СИФ, кримоконсервирование оказывало разнонаправленное действие в отношении КФП ранних и поздних сроков гестации.

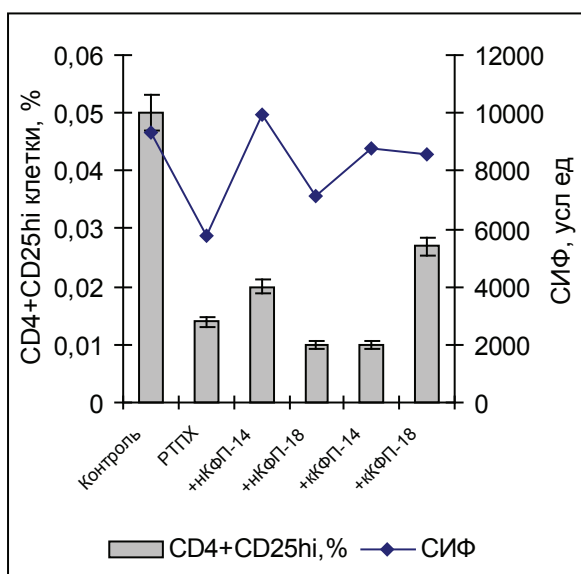
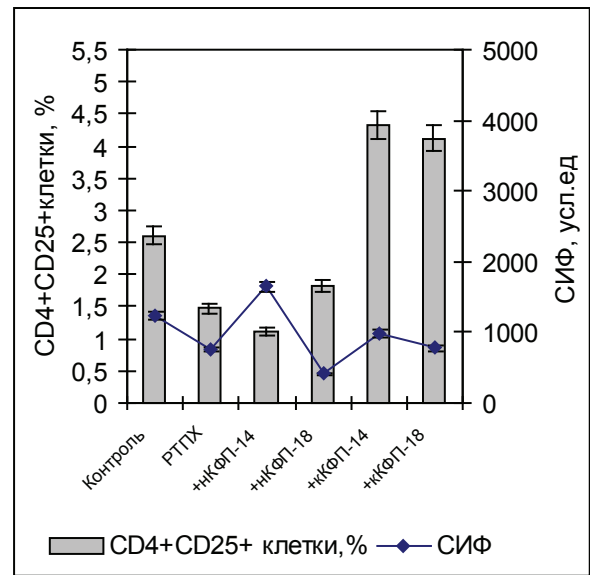
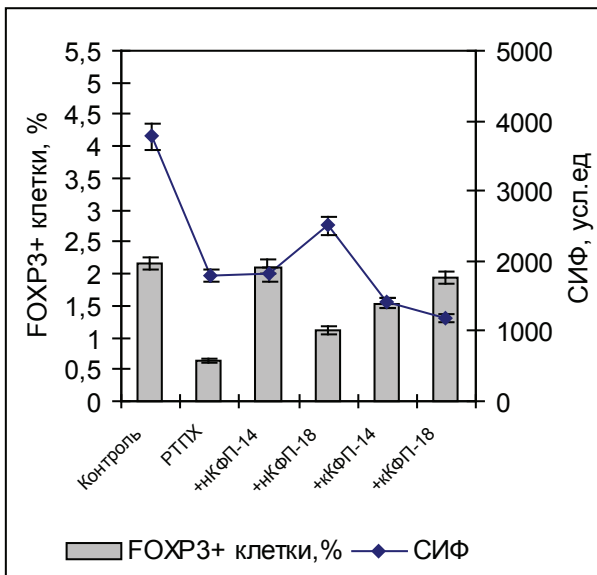


Рис.2. Содержание FOXP3⁺ клеток (а), CD4⁺CD25⁺ (б) и CD4⁺CD25^{hi} клеток (в) в региональном ЛУ животных с ЛРТПХ до и после применения КФП разного вида и срока гестации

При анализе содержания в ЛУ CD4⁺CD25⁺ Т-лимфоцитов (рис.2б) был показан превалирующий потенциал повышения их концентрации после применения кримоконсервированных КФП в сравнении с нативными вне зависимости от срока гестации. Более того, концентрация этих клеток почти в 2 раза превышала даже уровень их содержания у интактных животных. Удивительно, но введение нативных КФП-14 супрессировало формирование, а нативных КФП-18 лишь незначительно повышало содержание этих клеток по сравнению с группой животных с ЛРТПХ. СИФ этих клеток по CD25 маркеру имела разный характер изменения после применения тех или иных КФП, но ее уровень не столь существенно отличался от контроля.

При количественной оценке CD4⁺CD25^{hi} клеток в ЛУ животных после применения КФП различного вида и срока гестации показано, что профиль их содержания был подобен профилю FOXP3 клеток (рис.2 а, в), это еще раз подчеркивает принадлежность именно этих клеток к истинным Treg. Показано, что нКФП-14 стимулировали выработку CD4⁺CD25^{hi} клеток у жи-

вотных с патологией. Однако важным является то, что потенциал стимуляции криоконсервированных КФП-18 в отношении CD4⁺CD25^{hi} клеток превосходил потенциал нКФП-14. Оценка СИФ

пула CD4⁺CD25^{hi} клеток во всех группах показала высокую степень их свечения в сравнении с FOXP3⁺ и CD4⁺CD25⁺ клетками, повторяя характер изменений последних.

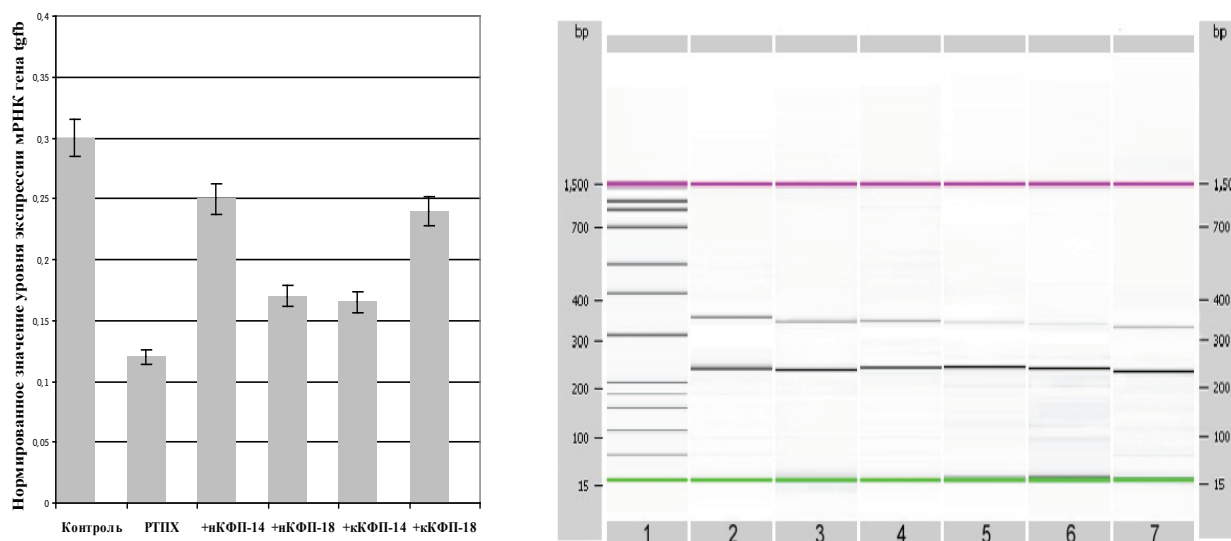


Рис.3. Уровень экспрессии мРНК гена *tgfb* в клетках лимфоузлов реципиентов с лРТПХ до и после введения КФП разного вида и срока гестации: а – нормированные значения уровня экспрессии мРНК гена *tgfb* относительно экспрессии гена *beta actin*, б – фореграмма продуктов амплификации транскриптов гена *tgfb* в клетках лимфоузлов реципиентов с лРТПХ

Примечание: на фореграмме **1** – маркер длины фрагментов; **2** – интактные животные (контроль); **3** – РТПХ без лечения; **4** – РТПХ после введения нКФП-14; **5** – РТПХ после введения нКФП-18, **6** – РТПХ после введения кКФП-14; **7** – РТПХ после введения кКФП-18. Длина фрагмента продукта амплификации гена *tgfb* – 369 п.н. **2-7** – Верхняя полоса – ампликоны *tgfb* (таргетного гена), нижняя – *beta*-актин (ген «домашнего хозяйства»);

В клетках ЛУ животных, которым вводили нКФП-14 и кКФП-18, был отмечен наибольший уровень экспрессии мРНК гена *tgfb* (рис.3а) максимально приближенный к контрольному. Фореграмма продуктов амплификации транскриптов гена *tgfb* представлена на рис.3б.

Таким образом, нативные и криоконсервированные КФП разного срока гестации, обладая выраженным терапевтическим потенциалом, могут в различной степени ингибировать иммуновоспалительный процесс.

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время фетальные препараты нашли широкое применение в клинической практике [6, 8]. Тем не менее, выяснение механизмов реализации их терапевтической активности остается серьезной и до конца не решенной проблемой. Представленные результаты показали, что КФП вне зависимости от их вида способны минимизировать степень проявления лРТПХ.

Известно, что характер влияния криоконсервирования на биообъект определяется его исходным состоянием [9, 14]. Например, криолабильность активированных клеток и находящихся в состоянии покоя имеет существенные

различия, как и кроветворных клеток стволового компартмента разных уровней дифференцировки [9, 15]. Такого рода изменения после криоконсервирования определяют и полноту терапевтического эффекта биообъектов. Например, нелетальные повреждения кроветворных предшественников криоконсервированного КМ отрицательно сказываются на скорости восстановления гемопоэза в организме реципиента [17]. С другой стороны, элиминация определенных субпопуляций клеток аллогенного КМ, наблюдаемая после криоконсервирования, может рассматриваться как позитивный момент, обуславливая минимизацию проявления его РТПХ-активности [5, 7]. Вполне реально, что и криочувствительность наиболее значимых субпопуляций КФП (СКК, МСК, гепатобластов, эпителиально-мезенхимальных транзиторных клеток и т.д.), структурно-функциональные характеристики, которых меняются по мере пролонгации сроков гестации, также различна [9, 16].

Кроме того, криоконсервирование, как стрессиндуцибельный фактор, может выступать в роли триггера изменений метаболизма и экспрессии генов различных клеток [14, 16]. Например, в фибробластах млекопитающих

криоконсервирование индуцирует экспрессию транскриптов генов, ответственных за наработку васкулярного эндотелиального ростового фактора (vascular endothelial growth factor – VEGF) и тромбоцит-продуцируемого (platelet-derived growth factor – PDGF) фактора [14]. Нами подтверждена активация гена *ido* в криоконсервированных КФП мышей 18 суток гестации [16]. Экспрессия этого гена сопровождается наработкой уникального по своему потенциалу фермента индоламин 2, 3-диоксигеназы (ИДО), способного активировать супрессорное звено иммунитета [2, 13].

Нами установлено, что криоконсервирование, модифицируя структурно-функциональные характеристики клеток КФП разных сроков гестации изменяет их терапевтический потенциал. Одним из векторов терапевтического потенциала КФП является стимуляция Treg-клеток с супрессорной активностью, которые снижают тяжесть протекания болезни «трансплантат против хозяина» (БТПХ). Исследование Treg клеток в ЛУ реципиентов с РТПХ после введения фетального материала показало, что максимальная коррекция содержания FOXP3⁺ клеток наблюдалась после введения нКФП-14 и кКФП-18. Парадоксально, но КФП-18 в нативном виде не проявляли такого эффекта (рис.2а). Бесспорно, кКФП-18 в большей степени (рис.2в), чем нКФП-14 активировали формирование и CD4⁺CD25^{hi} клеток.

Нами установлен факт различий в содержании CD4⁺CD25⁺ Т-лимфоцитов и FOXP3⁺ клеток в условиях развития ЛРТПХ и применения КФП. Во-первых, для CD4⁺CD25⁺ клеток не было обнаружено, как для FOXP3⁺, «синхронизированного» проявления корректирующего эффекта нКФП-14 и кКФП-18 (рис.2.). Кроме того, было очевидным значительное повышение концентрации CD4⁺CD25⁺ клеток после криоконсервирования КФП. Такого рода феноменология может быть обусловлена имеющимися в некоторых случаях место изменениями после криоконсервирования иммуногенных характеристик аллогенного материала [8] и возможной активации субпопуляций клеток реципиента с низким профилем экспрессии рецептора ИЛ-2 (CD4⁺CD25^{low}), которые функционально не являются Treg [11]. Несмотря на то, что содержание CD4⁺CD25⁺ клеток в ЛУ реципиентов с ЛРТПХ после введения кКФП разных сроков гестации достоверно не отличалось, по-видимому, терапевтический потенциал кКФП-18 был выше за счет большей экспрессии в них Foxp3-белка и увеличенного более чем в 2 раза содержания CD4⁺CD25^{hi} клеток.

Таким образом, криоконсервирование в одном и том же режиме в зависимости от срока гестации КФП может индуцировать либо экспрессию новых, либо ингибировать действие уже имеющихся активных начал, точкой прило-

жения которых могут быть сигнальные пути наработки FoxP3 белка и / или ИЛ-2R.

Интересными оказались данные оценки степени экспрессии гена *tgfb* (рис.3), которая в большей мере коррелировала с содержанием FOXP3⁺ и CD4⁺CD25^{hi}, а не CD4⁺CD25⁺клеток (рис.2). Как известно, TGF-β играет важную роль в развитии и реализации супрессивной функции Treg в периферическом компартменте иммунной системы [13] и представляет собой один из основных триггеров экспрессии ИЛ-2R. Эту активность TGF-β реализует в тесной кооперации с незрелыми дендритными и некоторыми другими клетками, для которых он является и аутокринным фактором [13].

ВЫВОДЫ

На экспериментальной модели реакции «трансплантат против хозяина» показан вклад криоконсервирования в терапевтический потенциал КФП разных сроков гестации. После криоконсервирования КФП-18 приобретали терапевтический потенциал нативных КФП-14, что свидетельствует об эффекте «ревитализации» КФП поздних сроков гестации, хотя по мере увеличения срока гестации иммунокорректирующая активность нативных КФП снижалась.

Показано, что лечебный эффект КФП, сопровождающийся минимизацией клинических признаков данной патологии и интенсивности развития иммуновоспалительной реакции, реализуется через коррекцию состояния Treg. Терапевтическая активность КФП коррелировала с восстановлением количественного содержания в ЛУ реципиентов с ЛРТПХ FOXP3⁺ и CD4⁺CD25^{hi} клеток, экспрессией гена *tgfb*, но не содержанием CD4⁺CD25⁺клеток и степенью их флуоресценции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hoffmann P., Edinger M. CD4+CD25+ regulatory T cells and graft-versus-host disease // *Semin Hematol.*-2006.- Vol.43, №1.-P.62-69.
2. Miura Yu. Mesenchymal stem cells for acute graft-versus-host disease / Yu. Miura, M. Kami, M. Tsubokura // *Lancet.* - 2008.-Vol.372, №9640. - P.715-716.
3. Martin P.J. Effects of in vitro depletion of T cells in HLA-identical allogeneic marrow grafts / P.J. Martin, J.A. Hansen, C.D. Buckner // *Blood.* – 1985.- Vol.66, № 3.-P.664-672.
4. Гольцев А.Н. Поиск альтернативных криоконсервированию путей модификации иммунореактивности алломиелотрансплантата. Часть I / Гольцев А.Н., Дубрава Т.Г., Луценко Е.Д. [и др.] // *Пробл. криобиологии.*-1996. №4.-С.3-16.

5. Гольцев А.Н. Крיוконсервированный аллогенный костный мозг – новая мишень иммуномодулирующей активности клеток фетальной печени / Гольцев А.Н., Останкова Л.В., Мацевитая И.Ю. [и др.] // Пробл. криобиологии.- 2008.- Т.18, № 3.- С. 313-315
6. Gluckman E. The therapeutic potential of fetal and neonatal hematopoietic stem cells // The New England Journal of Medicine.- 1996.- №12, P.1839-1840.
7. Гольцев А.Н. Проявление иммунокорригирующего эффекта крיוконсервированных клеток фетальной печени разных сроков гестации в условиях развития экспериментальной модели реакции «трансплантат против хозяина» / А.Н. Гольцев, Т.Г. Дубрава, Е.Д. Луценко, [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010.- № 3.- С. 1-5.
8. Goltsev A.N. Cryopreservation: an optimizing factor for therapeutic potential of fetoplacental complex products / Goltsev A.N., Grischenko V.I., Sirous M.A. [et al] // Biopreservation and biobanking.- 2009.- Vol.7, N1.-P.29-38.
9. Гольцев А.Н. Особенности влияния крיוконсервирования на функциональный потенциал стволовых кроветворных клеток фетальной печени разных сроков гестации / А.Н. Гольцев, Т.Г. Дубрава, Л.В. Останкова [и др.] // Пробл. криобиологии.- 2009.- Т. 9, №2.- С.186-199.
10. Кудрина Г.П., Алтынбаева Р.Ф., Буров Ю.В. Методические рекомендации по оценке иммунотоксических свойств фармакологических средств. Москва. 1992.- 39с.
11. Ярилин А.А. Естественные регуляторные Т-клетки и фактор FOXP3 // Иммунология.- 2006.- №3.- С.176-188.
12. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self / S. Sakaguchi, R. Setoguchi, H. Yagi, [et al] // Nat.Immunol.- 2005.- №6.- P.345-352.
13. Sugita S. Transforming growth factor producing FoxP3⁺CD4⁺CD25⁺ T cells by iris pigment epithelial cells display regulatory phenotype and acquire regulatory functions / S. Sugita, Y. Futagami, S. Hori [et al] // Exp. eye research.- 2007.- Vol.85, N5.-P.626-636.
14. Фуллер Б. Охлаждение, крיוконсервирование и экспрессия генов в клетках млекопитающих / Б. Фуллер, К. Грин, В.И. Грищенко // Пробл. криобиологии. – 2004. - №3. – С.58-71.
15. Oertel M. Properties of cryopreserved fetal liver stem/progenitor cells that exhibit long-term repopulation of the normal rat liver / M. Oertel, A. Menthen, Yu. Chen [et al] // Stem Cells. – 2006. - Vol. 24, №10. - P. 2244 -2251.
16. Goltsev A.N. Peculiarities of functional state modulation of genetic apparatus of fetal liver cells with stemness characteristics after cryopreservation

/A.N. Goltsev, E.D. Lutsenko, A.Yu. Dimitrov [et al] // Cryoletters.- 2011.- Vol.32, N6.- P.543-544.

17. Цуцаева А.А. Влияние низкотемпературного консервирования на пролиферативную активность и топографию расселения донорских и трупных колониеобразующих единиц (КОЕ) в облученном организме / А.А. Цуцаева, А.Н. Гольцев, О.А. Дроздова [и др.] // Цитология и генетика. – 1980. –Т.14, №6. – С.25-30.

РЕЗЮМЕ

ЗНИЖЕННЯ ІМУНОРЕАКТИВНОСТІ АЛОГЕННОГО КІСТКОВОГО МОЗКУ КРІОКОНСЕРВОВАНИМИ КЛІТИНАМИ ФЕТАЛЬНОЇ ПЕЧІНКИ В УМОВАХ РОЗВИТКУ РЕАКЦІЇ «ТРАНСПЛАНТАТ ПРОТИ ХАЗЯЇНА»

Гольцев А.М., Дубрава Т.Г., Луценко О.Д., Мацевита І.Ю., Гаєвська Ю.О., Останкова Л.В., Останков М.В., Гольцев К.А., Челомбитко О.В.

Інститут проблем криобіології і крїомедицини НАН України

У роботі проведена порівняльна оцінка імунорегулюючої активності крїоконсервованих і нативних клітин фетальної печінки (КФП) різних термінів гестації в експериментальній моделі локальної РТПХ (лРТПХ). Встановлено, що при індукції лРТПХ манифестуються ознаки, які характерні для патологій аутоімунного генезу. Терапевтична активність КФП у більшому ступені корелювала із вмістом у лімфовузлах FOXP3⁺ та CD4⁺CD25^{hi} клітин, а також експресією гена *tgf-β*, але не вмістом CD4⁺CD25⁺ клітин і ступенем їхньої флуоресценції. При збільшенні терміну гестації з 14 пкд до 18 пкд імунорегулююча активність КФП знижувалася. Однак після крїоконсервування КФП-18 здобували імунорегулюючий потенціал нКФП-14.

Ключові слова: РТПХ, клітини фетальної печінки, імунорекція, Treg.

SUMMARY

REDUCTION OF IMMUNOREACTIVITY OF ALLOGENIC BONE MARROW WITH CRYOPRESERVED FETAL LIVER CELLS UNDER DEVELOPMENT OF GRAFT-VERSUS-HOST REACTION

Goltsev A.N., Dubrava T.G., Lutsenko E.D., Matsevitaya I.Yu., Gaevskaya Yu.O., Ostankova L.V., Ostankov M.V., Goltsev K.A., Chelombitko O.V.

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine

In the research there has been estimated an immune correcting activity of cryopreserved and native fetal liver cells (FLCs) of different gestation terms in experimental model of local graft-versus-host disease (IGVHD). It has been established that during induction of IGVHD there are manifested the signs characteristics for the pathologies of immune genesis. Therapeutic activity of FLCs in greater extent correlated to the content in nyde lymphocytes of FOXP3⁺ and CD4⁺CD25^{hi} cells and expression of *tgf-beta* gene, but not to the content of CD4⁺CD25⁺ cells and rate of their fluorescence. With the increasing of gestation terms from 14 post-coital days to 18 ones immune correcting activity of FLCs reduced. However after cryopreservation the FLCs-18 gained immune correcting activity of nFLC-14.

Key words: GVHR, fetal liver cells, immune correction, Treg.