

# Использование метода сенсибилизации иммунокомпетентных клеток для оценки терапевтического эффекта криоконсервированных в разных режимах фетальных нервных клеток при ЭАЭ

Е.А. ПОРОЖАН, М.В. ОСТАНКОВ

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

## Use of Sensibilization of Immune Competent Cells for Assessment of Therapeutic Effect of Cryopreserved under Different Freezing Regimens Fetal Neuronal Cells at Experimental Allergic Encephalomyelitis

YE.A. POROZHAN, M.V. OSTANKOV

*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine*

Доказана связь патогенеза аутоиммунных заболеваний с нарушением внутритимической дифференцировки Т-клеток и формированием их антигенраспознающего рецепторного фенотипа. Т-лимфоциты вырабатывают толерантность к аутоантигенам в тимусе, обеспечивая защиту организма от экзогенной антигенной нагрузки. Для рассеянного склероза (РС) характерна аутоиммуноагрессия против основного белка миелина. Трансплантация фетальных нервных клеток (ФНК) при лечении нейродегенеративных заболеваний, в частности РС, предполагает их криоконсервирование как этап технологического процесса.

Цель работы – оценить влияние криоконсервированных при различных режимах режимов ФНК на степень десенсибилизации ИКК к энцефалитогенным структурам при экспериментальном аллергическом энцефаломиелите (ЭАЭ).

Эксперименты на животных были проведены в соответствии с правилами “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей” (Страсбург, 1985). Суспензию ФНК получали методом механической дезинтеграции фрагментов мозга эмбрионов крыс 11 суток гестации. Криоконсервирование ФНК проводили с использованием 10% ДМСО на программном замораживателе УОП-1 по режимам: P1, P2 и P3. Сравнительный анализ субпопуляционного состава нФНК и кФНК осуществляли методом проточной цитофлуориметрии с использованием моноклональных антител: nestin, GFAP,  $\beta$ -tubulin (BD Pharmingen). ЭАЭ индуцировали у крыс по методу Давыдовой. Суспензии нФНК и кФНК вводили внутрибрюшинно на 14-е сутки развития патологии в дозе  $5 \times 10^6$  клеток на 100 г массы животного. Степень сенсибилизации лимфоцитов селезенки животных с ЭАЭ к энцефалитогенным структурам оценивали с помощью метода сокультивирования этих клеток с ФНК. Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия Манна-Уитни.

Установлено, что криоконсервирование по режиму P1 и в большей степени по режиму P2 обеспечивало селективное перераспределение субпопуляционного состава ФНК в сторону увеличения nestin<sup>+</sup> и  $\beta$ -tubulin<sup>+</sup> и снижения GFAP<sup>+</sup>-клеток. Субпопуляционный состав кФНК при режиме P3 достоверно не отличался от нативного материала. Оценка эффекта ФНК на патологический процесс по степени десенсибилизации лимфоцитов показала, что режим P2 был оптимальным. Вероятно, ФНК действуют за счет активации супрессорного звена иммунитета, подавляя аутоиммунную реакцию.

Таким образом, продемонстрирована способность криоконсервирования управлять состоянием биообъекта, в частности ФНК, изменяя в разной степени при разных режимах проявления патологического процесса и, как следствие, сенсибилизацию ИКК при нейродегенеративных заболеваниях аутоиммунной природы.

The relationship of pathogenesis of autoimmune diseases with damage of intrathymic differentiation of T-cells and formation of their antigen-recognizing receptor phenotype has been proved. T-lymphocytes produce tolerance to autoantigens in thymus, providing the protection of an organism against exogenous antigen loading. For multiple sclerosis (MS) auto-immune aggression against myelin basic protein is characteristic. Transplantation of fetal neuronal cells (FNCs) when treating neurodegenerative diseases, in particular MS, supposes their cryopreservation as the stage of technological process.

The research aim is to estimate the effect of cryopreserved FNCs under different regimens on desensibilization rate of immune competent cells (ICCs) to encephalitogenic structures at experimental allergic encephalomyelitis (EAE).

The experiments in animals were carried-out according to the statements of “European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and scientific purposes” (Strasbourg, 1985). The suspension of FNCs was obtained with mechanical disintegration of rat's embryo brain fragments of 11 gestation days. FNCs were cryopreserved using 10% DMSO with programmable freezer UOP-1 according to R1, R2 and R3 regimens. Subpopulation composition of nFNCs and cFNCs was comparatively analyzed using flow cytofluorimeter with monoclonal antibodies: nestin, GFAP,  $\beta$ -tubulin (BD Pharmingen). EAE was induced in rats according to the Davydova's method. The suspensions of nFNCs and cFNCs were intraperitoneally introduced to the 14<sup>th</sup> day of pathology development in a dose of  $5 \times 10^6$  cells per 100 g of animal's mass. The sensibilization rate for lymphocytes of spleen of animals with EAE to encephalitogenic structures was assessed using coculturing of these cells with FNCs. The results were statistically processed using the Mann-Whitney's criterion.

It has been shown that cryopreservation on R1 regimen and in greater extent on R2 one provided the selective redistribution of sub-population composition of FNCs towards the increase of nestin<sup>+</sup> and  $\beta$ -tubulin<sup>+</sup> and decrease in GFAP<sup>+</sup> cells. Subpopulation composition of cFNCs at R3 regimen significantly did not differ from native material. The assessment of FNCs effect on pathological process on the degree of lymphocyte desensibilization has shown that R2 regimen was an optimal one. The FNCs likely act due to activation of suppressor link of immunity, suppressing an autoimmune reaction.

Thus, the ability of cryopreservation to control the state of biological object, in particular FNCs, by altering in a different extent at various regimens the pathological process manifestation and as a consequence the sensibilization of ICCs at neurodegenerative diseases of autoimmune origin was demonstrated.