

# Влияние криоконсервированных фетальных нервных клеток на фенотипические характеристики Т-клеток тимуса животных с экспериментальным аллергическим энцефаломиелитом

Е.А. ПОРОЖАН, М.В. ОСТАНКОВ, А.Н. ГОЛЬШЕВ

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

## Effect of Cryopreserved Fetal Nerve Cells on Phenotype Characteristics of Thymus T Cells of Animals With Experimental Allergic Encephalomyelitis

YE.A. POROZHAN, M.V. OSTANKOV, A.N. GOLTSEV

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

Этиопатогенетические механизмы развития рассеянного склероза (РС), вероятно, связаны с нарушениями в главном органе иммуногенеза – тимусе, который отвечает за становление естественной толерантности в организме. Концептуальное понимание РС основывается на модели экспериментального аллергического энцефаломиелита (ЭАЭ). Возможные терапевтические подходы к нейродегенеративным патологиям аутоиммунного генеза должны базироваться на использовании препаратов надсистемного действия, так как наблюдается разбалансировка нейроиммуноэндокринного блока. К таким препаратам можно отнести фетальные нервные клетки (ФНК), применение которых оптимизирует процесс криоконсервирования.

Цель исследования – изучить Т-клетки тимуса с разным фенотипом в динамике развития ЭАЭ до и после применения криоконсервированных ФНК (кФНК).

ЭАЭ индуцировали у крыс по методу Давыдовой. Суспензию ФНК из мозга эмбрионов крыс 11 суток гестации криоконсервировали по двум режимам (P1 и P2) на программном замораживателе УОП-06. Животные были разделены на 6 групп: 1 – здоровые животные; 2 – животные с ЭАЭ; 3 – ЭАЭ + введение нативных ФНК; 4 – ЭАЭ+ кФНК (криоконсервирование согласно P1); 5 – ЭАЭ+ кФНК (P2); 6 – контроль. Суспензию клеток вводили внутрибрюшинно на 14-е сутки развития ЭАЭ в дозе  $5 \times 10^6$  клеток/животное. Субпопуляционный состав Т-клеток тимуса исследовали в динамике на 7–35-е сутки развития патологии методом проточной цитофлуориметрии с использованием моноклональных антител к CD3, CD8, CD25 (FITC), CD4 (PE) (BD, США). При статистической обработке результатов применяли критерий Манна-Уитни.

Полученные результаты продемонстрировали способность кФНК влиять на субпопуляционный состав Т-клеток тимуса. Более раннее и существенное снижение клинических признаков проявления патологии наблюдалось после применения кФНК (P2). На 35-е сутки наблюдения уровень CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, CD8<sup>+</sup>-клеток, иммунорегуляторный индекс приближались к контрольным значениям в группах 3, 4 и 5. Содержание CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-клеток к концу срока наблюдения в 3 и 5-й группах достигало контрольного уровня.

Таким образом, установлена зависимость терапевтического эффекта кФНК от восстановления содержания CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-клеток тимуса при развитии ЭАЭ. Рассматриваются возможные причины патогенеза ЭАЭ в разбалансировке субпопуляционного состава Т-клеток тимуса и пути коррекции подобного рода нарушений введением кФНК.

Etiopathogenetic mechanisms of multiple sclerosis (MS) development are likely related to the impairments in main organ of immune genesis, thymus, responsible for the setting of natural tolerance in an organism. Conceptual understanding of MS is based on the model of experimental allergic encephalomyelitis (EAE). Possible therapeutic approaches to neurodegenerative pathologies of autoimmune genesis should be based in the preparations of over-system effect, since there is a misbalancing of neuroimmune endocrine block. Fetal nerve cells (FNCs) can be referred to such preparations, and cryopreservation optimizes their application possibility.

The research aim is to study thymus T-cells with different phenotype in dynamics of EAE development prior to and after use of cryopreserved FNCs (cFNCs).

EAE was induced in rats according to Davydova method. FNCs suspension derived from brains of rats' embryos of 11<sup>th</sup> gestation day were cryopreserved according to two regimens (R1 and R2) by means of programmable freezer UOP-6. The animals were divided into 6 groups: 1 – healthy animals; 2 – those with EAE, 3 – the ones with EAE + introduction of native FNCs; 4 – animals with EAE + cFNCs (cryopreserved according to R1 regimen); 5 – those with EAE + cFNCs (R2); 6 – control. Cell suspension was intraperitoneally introduced to the 14<sup>th</sup> day of EAE development in a dose of  $5 \times 10^6$  cells per animal. Subpopulational composition of thymus T-cells was studied in the dynamics to the 7–35 days of pathology development by means of flow cytometry using monoantibodies to CD3, CD8, CD25 (FITC), CD4 (PE) (BD, USA). The results were statistically processed using the Mann-Whitney criterion.

The findings demonstrated the ability of cFNCs to affect subpopulational composition of thymus T-cells. Earlier and more significant reduction of clinical pathology manifestation signs was observed after use of cFNCs in R2. To the 35<sup>th</sup> observation day the level of CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, CD8<sup>+</sup> cells, immune regulatory index reached to the control values in the groups 3, 4 and 5. Content of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells to the end of observation term in groups 3 and 5 approached to the control level.

Thus, there has been found the dependence of therapeutic effect of cFNCs on recovery of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> thymus cells at EAE development. Possible causes of EAE pathogenesis in misbalancing of subpopulational composition of thymus T-cells and the ways of correction of similar impairments of cFNCs are under consideration.