УДК 612.35.014-053.1.083.324.084

М.В. Останков, А.Н. Гольцев, Т.Г. Дубрава, Е.Д. Луценко, Ю.А. Гаевская, А.Ю. Димитров, П.А. Борисов, О.В. Челомбитько

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

ПРИМЕНЕНИЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ КЛЕТОК ФЕТАЛЬНОЙ ПЕЧЕНИ ДЛЯ ИММУНОКОРРЕКЦИИ СОСТОЯНИЯ РЕЦИПИЕНТОВ С РТПХ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Проведена сравнительная оценка иммунокорригирующей активности криоконсервированных и нативных клеток фетальной печени (КФП) разных сроков гестации в экспериментальной модели локальной РТПХ (лРТПХ). Индукцию лРТПХ проводили на мышах линии C57Bl/6 путем подкожного введения в подушечку задней лапы клеток лимфоузлов (ЛУ) линии CBA/H. Через 1 сутки после инициации лРТПХ мышам внутривенно вводили нативные (нКФП) или криоконсервированные (кКФП) КФП 14 или 18 суток гестации мышей линии CBA/H. На 5-е сутки после инициации патологии оценивали следующие показатели: индекс РТПХ, содержание Treg ($FOXP3^+$, $CD4^+CD25^+$-клеток) лимфоузлов (ЛУ) на проточном цитофлуориметре FACS Calibur (Becton Dickinson, США), экспрессию гена tgf-β — методом ПЦР; содержание ИЛ-2, ИЛ-10, ФНО-α в сыворотке крови животных — иммуноферментным методом на анализаторе Stat Fax 2100 (США). Установлено, что при индукции лРТПХ манифестируются признаки, характерные для патологий аутоиммунного генеза. В условиях развития лРТПХ КФП минимизируют клинические признаки патологии и интенсивность развития иммуновоспалительной реакции. Терапевтическая активность КФП в большей степени коррелировала с содержанием в ЛУ $FOXP3^+$-клеток и экспрессией гена tgf-β, но не с содержанием $CD4^+CD25^+$-клеток и степенью их флуоресценции. По мере увеличения срока гестации с 14 до 18 пкд иммунокорригирующая активность КФП снижалась. Однако после криоконсервирования КФП-18 приобретали иммунокорригирующую активность нКФП-14.

Ключевые слова: *РТПХ, клетки фетальной печени, иммунокоррекция, Treg.*

Одной из серьезных проблем, связанных с трансплантацией аллогенного костного мозга (КМ), является развитие иммунного конфликта в виде болезни «трансплантат против хозяина» (БТПХ) [1]. Данная патология имеет ряд признаков аутоиммунного заболевания (АИЗ) и ассоциируется с появлением в организме аутореактивного клона иммунокомпетентных клеток (ИКК) [2]. Экспериментальным аналогом данного системного АИЗ является локальная РТПХ (лРТПХ), которую индуцируют введением аллогенных лимфоидных клеток в регионарном к месту их введения лимфоузле [3].

Одной из основных причин развития АИЗ является разбалансировка состояния субпопуляций ИКК с регуляторной активностью [4]. Факт причастности к развитию АИЗ нарушения гемопоэза [2] определил необходимость применения при их лечении препаратов, обладающих способностью комплексно корригировать состояние гемопоэтической и иммунной систем [2]. Коррекция иммунокомпетентной сферы при аутоиммунной агрессии предусматривает необходимость подавления эффекторного и/или активации регуляторного звена ИКК с супрессорной активностью. Неоднократно отмечалась уникальная способность мезенхимальных стволовых клеток (МСК) оказывать гемато- и иммунокорригирующий эффект [5]. Потенциально гемато- и иммунокорригирующей активностью и, соответственно, возможностью применения для лечения РТПХ обладает фетальная печень (ФП), в которой СКК и МСК являются основными структурно-функциональными единицами [2].

Неоднократно отмечалось, что в общем технологическом процессе апликации фета-

© *М.В. Останков, А.Н. Гольцев, Т.Г. Дубрава и др., 2011*

льных тканей в клинической практике обязательным компонентом является их криоконсервирование [6]. При этом известно, что эффективность криоконсервирования биообъекта определяется его исходным структурно-функциональным состоянием [7], т. е. КФП разных сроков гестации, априори имея разный исходный статус и различную криочувствительность, по-разному могут изменять свой терапевтический потенциал.

Целью исследования была оценка особенностей модуляции субпопуляций регуляторных Т-клеток и в целом иммунокомпетентной сферы животных с лРТПХ после применения нативных и криоконсервированных КФП разных сроков гестации.

Материал и методы. Эксперименты проводили на мышах линий C57Bl/6, CBA/H 3-месячного возраста массой 22–24 г в соответствии с Международными принципами «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

КФП 14 (КФП-14) и 18 (КФП-18) суток гестации выделяли на рабочей среде 199 с 10 % эмбриональной телячьей сывороткой и 2 % цитратом натрия и криоконсервировали по [6]. Клетки лимфоузлов выделяли путем их гомогенизации на той же среде.

Локальную РТПХ (лРТПХ) индуцировали у мышей линий C57Bl/6 по общепринятой методике [3]. Контрольным мышам вводили физиологический раствор. Индекс РТПХ определяли на 5-е сутки после инициации патологии [3] по отношению количества клеток в опытном лимфоузле к контрольному.

Нативные (нКФП) или криоконсервированные (кКФП) КФП разных сроков гестации (КФП-14 или КФП-18) мышей линии CBA/H вводили внутривенно в дозе $5 \cdot 10^6$ кл/мышь через 1 сутки после инициации лРТПХ.

Фенотипические характеристик клеток лимфоузлов определяли на проточном цитофлуориметре FACS Calibur (Becton Dickinson, USA) с использованием моноклональных антител (BD Bioscience, USA) к FOXP3, CD4, CD25 структурам согласно инструкции фирмы-производителя. Помимо процентного содержания $FOXP3^+$, $CD4^+CD25^+$-клеток оценивали степень экспрессии этих молекул по средней интенсивности флуоресценции (СИФ).

Экспрессию гена tgf-β определяли методом ОТ-ПЦР. Амплификацию фрагментов ДНК проводили в термостате «Терцик» ЗАО «НПФ ДНК-технология» (Россия). Последующие этапы реакции выполняли согласно общепринятым рекомендациям [8]. Детекцию продуктов амплификации и количественный анализ проводили методом капиллярного электрофореза в чип-анализаторе «Agilent 2100» (США).

Содержание цитокинов: ИЛ-2, ИЛ-10, ФНО-α — в сыворотке крови животных с лРТПХ определяли иммуноферментным методом на анализаторе Stat Fax 2100 (USA) с помощью наборов реагентов фирмы BD Pharmingen по прилагаемым протоколам.

Полученные данные статистически обрабатывали по методу Стьюдента.

Результаты и их обсуждение. Известно, что в экспериментальной модели лРТПХ манифестируемая ответная реакция лимфоузлов на введение аллогенных лимфоцитов является обоюдно направленной реакцией донорских и клеток реципиента. Установленное нами двукратное увеличение индекса РТПХ в сравнении с контролем является четким свидетельством развития этой реакции [1]. Как видно (таблица), в условиях развития лРТПХ более чем в 3 раза снижа-

Сравнительная оценка показателей, характеризующих развитие лРТПХ

Группа животных	Индекс РТПХ	$FOXP3^+$-клетки		$CD4^+CD25^+$
		%	СИФ	%
Контроль (интакт.)	1,00±0,10	2,16±0,32	3774,12±247,70	2,61±0,23
лРТПХ	2,04±0,30*	0,65±0,04*	1790,32±148,50*	1,47±0,17*
лРТПХ + нКФП-14	1,01±0,30#	2,11±0,05#	1809,31±199,40*	1,12±0,15*
лРТПХ + нКФП-18	1,16±0,02*#	1,12±0,02*#	2505,02±239,40*#	1,82±0,09*#
лРТПХ + кКФП-14	1,30±0,12*#	1,53±0,15*#	1410,53±109,40*#	4,34±0,27*#
лРТПХ + кКФП-18	0,86±0,11#	1,94±0,04#	1180,00±134,90*#	4,12±0,21*#

Примечания: 1. СИФ — средняя интенсивность флуоресценции.
2. $p<0,05$; достоверно при сравнении с показателем: * контроля; # группы лРТПХ.

лась концентрация FOXP3$^+$-клеток, которые характеризуются как Treg [4]. Оценка СИФ FOXP3$^+$-клеток продемонстрировала снижение содержания в них FoxP3 белка, концентрация которого коррелирует с активностью FOXP3$^+$-клеток [4].

На протяжении длительного времени дискутируется вопрос по поводу идентичности пула FOXP3$^+$ и CD4$^+$CD25$^+$-клеток, проявления их иммуносупрессивной активности и соподчиненности понятию Т-регуляторные (Treg) клетки [4]. Как видно, в контроле показатели процентного содержания этих субпопуляций в лимфоузлах были достаточно близки. Вместе с тем оценка СИФ по маркеру CD25, имеющему приоритетную значимость для включения этих клеток в категорию Treg, показала, что она в 3 раза уступала СИФ FOXP3$^+$-клеток. При этом при лРТПХ данные показатели снижались в 1,6 и 2,1 раза для CD4$^+$CD25$^+$ и FOXP3$^+$-клеток соответственно.

Известно, что в реализации супрессорной функции Treg активное участие принимает трансформирующий ростовой фактор-β (TGF-β) [9]. Этот медиатор индуцирует экспрессию рецептора ИЛ-2 (CD25) и гена белка FoxP3 в CD4$^+$CD25$^-$-Т-хелперах, переводя их в категорию Treg. Полученные нами результаты показали снижение в условиях развития лРТПХ степени экспрессии гена tgf-β в клетках лимфоузлов в 2,5 раза в сравнении с контролем.

Как и для многих АИЗ, в том числе и системных [10], при лРТПХ было отмечено перераспределение цитокинового профиля организма (таблица). Так, повышался уровень воспалительных цитокинов ФНО-α, ИЛ-2 и снижался противовоспалительного ИЛ-10.

КФП как препарат лечения лРТПХ оказывали выраженный корригирующий эффект в отношении всех исследуемых показателей. Индекс РТПХ в наибольшей степени приближался к уровню контроля у животных после применения нКФП-14 и кКФП-18. Интересно, что до криоконсервирования КФП-18 проявляли более низкий корригирующий эффект, тогда как КФП-14 после криоконсервирования теряли его.

Максимальная коррекция процентного содержания FOXP3$^+$-клеток наблюдалась также после введения нКФП-14 и кКФП-18. Обращает на себя внимание тот факт, что после применения кКФП-18 СИФ в FOXP3$^+$-клетках была почти в 1,5 раза ниже, чем после введения нКФП-14. Бесспорно, что кКФП-18 активируют формирование Treg, которые идентифицируются цитофлуориметрически как FOXP3$^+$-клетки, но с более низкой концентрацией скурфина [4]. Корригирующий эффект нКФП-18 был минимальным, судя по процентному содержанию FOXP3$^+$-клеток, однако по СИФ он имел максимальную выраженность.

Иная картина наблюдалась при анализе содержания CD4$^+$CD25$^+$-Т-лимфоцитов. Известно, что эти клетки предупреждают развитие заболеваний аутоиммунного генеза, в системе *in vitro* ингибируют эффекторные клетки, проявляют ряд других иммуносупрессивных эффектов. Однако в условиях развития лРТПХ и применения КФП их поведение существенно отличалось от FOXP3$^+$-клеток. Во-первых, не было обнаружено, как для FOXP3$^+$-клеток, «синхронизированного» проявления корригирующего эффекта нКФП-14 и кКФП-18. Во-вторых, была очевидной превалирующая «индуцибельность» в отношении повышения концентрации CD4$^+$CD25$^+$-клеток после применения криоконсервированных КФП. Такого рода феноменология могла быть обусловлена имеющими в некоторых случаях место измене-

до и после применения КФП разного вида и срока гестации

-клетки	Уровень экспрессии гена tgf-β, % от контр	Уровень цитокинов, % от контроля		
СИФ		ИЛ-2	ФНО-α	ИЛ-10
1232,21±58,24	100	100	100	100
755,80±72,35*	39,24±0,37*	140,00±1,80*	130,00±2,13*	86,91±0,90*
1643,95±84,52*#	82,35±0,72*#	112,20±4,77	101,85±3,41#	96,60±2,70#
410,00±36,13*#	58,35±1,76*#	120,00±2,16*	114,35±1,74*#	124,84±3,90*#
977,07±84,62*	55,05±0,98*#	109,90±3,68#	137,00±2,08*	94,35±2,45#
783,43±63,32*	80,00±3,57*#	120,00±2,72*#	110,37±5,21#	95,00±3,34#

ниями после криоконсервирования иммуногенных характеристик аллогенного материала [2] и возможной активации субпопуляции клеток реципиента с низким профилем экспрессии рецептора ИЛ-2 ($CD4^+CD25^{low}$), которые функционально не являются Treg [4]. Однако СИФ этих клеток по CD25 маркеру в группах животных с введением криоконсервированных КФП не существенно отличался от его уровня у контрольных мышей. Как приведено в [4], формирование $CD4^+CD25^+$-клеток в периферическом отделе ИС может реализоваться путем «передифференцировки» $CD4^+CD25^-$-клеток в Treg с фенотипом $CD4^+CD25^+FOXP3^+$. В таком случае потенциал индукции экспрессии маркера ИЛ-2 у КФП (вне зависимости от срока гестации) после криоконсервирования становится более выраженным.

Степень экспрессии гена tgf-β после введения КФП в большей мере коррелировала с характером восстановления содержания $FOXP3^+$ Treg. Как известно, TGF-β играет важную роль в развитии и реализации супрессивной функции Treg в периферическом компартменте ИС [9] и представляет собой один из основных триггеров экспрессии ИЛ-2R. Особую значимость при этом играют элементы стволового компартмента стромы, прежде всего упоминавшиеся выше МСК [5]. Важным компонентом иммуномодулирующей активности МСК является вырабатываемый ими уникальный по своему потенциалу фермент индоламин 2,3-диоксигеназа (ИДО), которому принадлежит ключевая роль в активации супрессорного звена ИС [11]. Недавно нами была подтверждена активация гена ИДО в кКФП-18 [12]. Эти данные также говорят о том, что 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 приложения которых могут быть сигнальные пути наработки FoxP3 белка и/или ИЛ-2R.

Не удивительно, что модификация состояния субпопуляций регуляторных клеток после применения КФП находит отражение и в изменении цитокинового профиля организма in general.

Максимально выраженный эффект коррекции оцененных показателей наблюдается после применения нКФП-14 и кКФП-18.

Выводы

При индукции лРТПХ манифестируются признаки, характерные для патологий аутоиммунного генеза.Очевидно, что лечебный эффект КФП, сопровождающийся минимизацией клинических признаков данной патологии и интенсивности развития иммуновоспалительной реакции, реализуется через коррекцию состояния субпопуляций ИКК с регуляторной активностью (Treg). Терапевтическая активность КФП в большей степени коррелировала с восстановлением количественного содержания в лимфоузлах $FOXP3^+$-клеток и экспрессией гена tgf-β, но не с содержанием $CD4^+CD25^+$-клеток и степенью их флуоресценции. По мере увеличения срока гестации с 14-х по 18-е сутки иммунокорригирующая активность КФП снижалась. Однако после криоконсервирования КФП-18 приобретали иммунокорригирующую активность нКФП-14.

Список литературы

1. *Шевелев А. С.* Реакция «трансплантат против хозяина» и трансплантационная болезнь / А. С. Шевелев. — М. : Медицина, 1976. — 237 с.

2. *Грищенко В. И.* Трансплантация продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса. От понимания механизма действия к повышению эффективности применения / В. И. Грищенко, А. Н. Гольцев // Пробл. криобиологии. — 2002. — Т. 1. — С. 54–84.

3. *Кудрина Г. П.* Методрекомендации по оценке иммунотоксических свойств фармакологических средств / Г. П. Кудрина, Р. Ф. Алтынбаева, Ю. В. Буров. — М. : Медицина, 1992. — 39 с.

4. *Ярилин А. А.* Естественные регуляторные Т-клетки и фактор FOXP3 / А. А. Ярилин // Иммунология. — 2006. — № 3. — С. 176–188.

5. Immunosupressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogenic animals / F. Djouad, P. Plence, C. Bony [et al.] // Blood. — 2003. — V. 102. — P. 3837–3844.

6. Особенности влияния криоконсервирования 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. 19 (2). — С. 186–199.

7. Cryopreservation: an optimizing factor for therapeutic potential of fetoplacental complex products / A. N. Goltsev, V. I. Grischenko, M. A. Sirous [et al] // Biopreservation and biobanking. — 2009. — V. 7 (1). — P. 29–38.

8. Молекулярная клиническая диагностика / под. ред. С. Херрингтон, Дж. Макги. — М. : Мир, 1999. — 558 с.

9. 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, M. Mochizuki // Exp. Eye Res. — 2007. — V. 85 (5). — P. 626–636.

10. *Sakaguchi S*. Animal models of autoimmunity and their relevance to human diseases / S. Sakaguchi // Curr. Opin. Immunol. — 2000. — V. 12. — P. 684–690.

11. Indoleamine 2,3-dioxygenase, immunosupression and pregnancy / A. L. Mellor, Ph. Chandler, G. K. Lee [et al.] // J. Reproductive Immunol. — 2002. — V. 57. — P. 143–150.

12. Криоконсервирование как фактор модуляции гемо- и иммунокоррегирующей активности клеток фетальной печени разных сроков гестации / А. Н. Гольцев, Т. Г. Дубрава, Е. Д. Луценко [и др.] // Імунологія та алергологія. — 2011. — Т. 1. — С. 64.

М.В. Останков, А.М. Гольцев, Т.Г. Дубрава, О.Д. Луценко, Ю.О. Гаєвська, О.Ю. Димитров, П.О. Борисов, О.В. Челомбітько

ЗАСТОСУВАННЯ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ КЛІТИН ФЕТАЛЬНОЇ ПЕЧІНКИ ДЛЯ ІМУНОКОРЕКЦІЇ СТАНУ РЕЦИПІЄНТІВ З РТПХ У ЕКСПЕРИМЕНТІ

Проведена порівняльна оцінка імунокоригуючої активності кріоконсервованих і нативних клітин фетальної печінки (КФП) різних термінів гестації в експериментальній моделі локальної РТПХ (лРТПХ). Індукцію лРТПХ проводили на мишах лінії C57Bl/6 шляхом підшкірного введення в подушечку задньої лапи клітин лимфовузлів (ЛВ) лінії CBA/H. Через 1 добу після ініціації лРТПХ мишам внутрішньовенно вводили нативні (нКФП) або кріоконсервовані (кКФП) КФП 14 або 18 діб гестації мишей лінії CBA/H. На 5-ту добу після ініціації патології оцінювали такі показники: індекс РТПХ, вміст Treg (FOXP3$^+$, CD4$^+$CD25$^+$-клітин) лімфовузлів (ЛВ) на проточному цитофлуориметрі FACS Calibur (Becton Dickinson, США), експресію гена tgf-β — методом ПЛР; вміст ІЛ-2, ІЛ-10, ФНО-α у сироватці крові тварин — імуноферментним методом на аналізаторі Stat Fax 2100 (США). Встановлено, що при індукції лРТПХ маніфестуються ознаки, характерні для патологій аутоімунного генезу. В умовах розвитку лРТПХ, КФП мінімізують клінічні ознаки патології та інтенсивність розвитку імунозапальної реакції. Терапевтична активність КФП більшою мірою корелювала з вмістом у ЛВ FOXP3$^+$-клітин і експресією гена tgf-β, але не з вмістом CD4$^+$CD25$^+$-клітин і ступенем їхньої флуоресценції. При збільшенні терміну гестації з 14 до 18 пкд імунокоригуюча активність КФП знижувалася. Однак після кріоконсервування КФП-18 здобували імунокоригуючу активність нКФП-14.

Ключові слова: *РТПХ, клітини фетальної печінки, імунокорекція, Treg.*

M.V. Ostankov, A.N. Goltsev, T.G. Dubrava, E.D. Lutsenko, Yu.A. Gaevskaya, A.Yu. Dimitrov, P.A. Borisov, O.V. Chelombitko

APPLICATION OF FETAL LIVER CRYOPRESERVED CELLS TO IMMUNOLOGICALLY CORRECT STATE OF RECIPIENTS WITH GVHD IN EXPERIMENT

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 GVHR (lGVHR). lGVHR was induced in C57Bl/6 mice by means of subcutaneous introduction of CBA/H lymph nodes (LN) cells into the hindpaw pad. In 24 hrs after initiation of lGVHR the mcie were intravenously injected with either native (nFLCs) or cryopreserved FLCs (cFLCs) of the 14th and 18th gestation days of CBA/H mice. To the 5th day after initiation of pathology the following indices were estimated: GVHR index, content of Treg (FOXP3$^+$, CD4$^+$CD25$^+$ cells) of LNs with flow cytometer FACS Calibur (Becton Dicknson, USA), the expression of tgf-β gene by means of PCR; content of IL-2, IL-10, TNF-β in blood serum of animals by means of immune enzyme method with analyzer Stat Fax 2100 (USA). It has been established, that during induction of lGVDR there are manifested the signs characteristics for the pathologies of immune genesis. Under development of GCH, FLCs minimize clinical signs of pathologies and intensity of development of immune inflammatory reaction. Therapeutic activity of FLCs in greater extent correlated to the content in LNs of FOXP3$^+$ cells and expression of tgf-β 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.*