

Проявление иммунокорригирующего эффекта криоконсервированных клеток фетальной печени в условиях развития реакции «трансплантат против хозяина»

Е.Е. Ямпольская, И.Ю. Мацевитая, Ю.А. Гаевская, Е.Д. Луценко, М.В. Останков, А.Н. Гольцев
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Manifestation of Immunocorrective Effect of Cryopreserved Fetal Liver Cells Under Development of Graft-Versus-Host Disease

E.E. Yampolskaya, I.Yu. Matsevitaya, Yu.A. Gaevskaya, E.D. Lutsenko, M.V. Ostankov, A.N. Goltsev
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ) – одно из самых частых и опасных осложнений трансплантации аллогенного костного мозга. Коррекция состояния иммунокомпетентной сферы при аутоиммунной агрессии предусматривает необходимость подавления эффекторного и/или активации регуляторного звена иммунокомпетентных клеток с супрессорной активностью, как основного гаранта обеспечения естественной толерантности. Актуальным может быть использование клеток фетальной печени (КФП), потенциально обладающих иммунокорригирующей активностью. Неоднократно отмечалось, что КФП разных сроков гестации имеют существенные различия как качественно-количественных характеристик, так и особенностей ответа на действие факторов криоконсервирования. В связи с этим целью исследования была оценка характера проявления терапевтического эффекта криоконсервированных КФП разных сроков гестации у животных с локальной РТПХ (лРТПХ).

Индукцию лРТПХ проводили на мышах линии C57Bl/6 путем подкожного введения в подушечку задней лапы 2×10^7 клеток лимфоузлов (ЛУ) мышей линии СВА/Н. Через сутки после инициации лРТПХ мышам внутривенно вводили нативные или криоконсервированные КФП 14 или 18 суток гестации. Криоконсервирование КФП осуществляли под защитой 10% ДМСО со скоростью охлаждения 1 град/мин до -25°C с последующим погружением в жидкий азот. На 5-е сутки после инициации патологии оценивали следующие показатели: индекс РТПХ, содержание T_{reg} (FOXP3⁺, CD4⁺CD25⁺-клеток) в ЛУ на проточном цитофлуориметре «FACS Calibur» («BD», США); экспрессию гена *tgf-β* – методом ПЦР-анализа; детекцию продуктов амплификации – методом капиллярного электрофореза в чип-анализаторе «Agilent 2100» («Agilent Technologies», США).

В условиях развития лРТПХ КФП снижают клиническое проявление патологии и интенсивность развития иммуновоспалительной реакции. Проявление терапевтической активности КФП в большей степени коррелировало с увеличением содержания FOXP3⁺-клеток в ЛУ и экспрессии гена *tgf-β*, но не с содержанием CD4⁺CD25⁺-клеток. По мере увеличения срока гестации с 14 до 18 суток терапевтический потенциал КФП снижался. Однако после криоконсервирования КФП-18 приобретали иммунокорригирующую активность, соизмеримую с нативными КФП-14. Такой феномен базируется на экспериментально подтвержденной концепции о возможности «ревитализации» под действием факторов криоконсервирования функционального потенциала КФП поздних сроков гестации до уровня более ранних.

Graft-versus-host disease (GVHD) is one of the most frequent and dangerous complications of allogeneic bone marrow transplantation. Correcting the state of immunocompetent sphere at autoimmune aggression involves the need to suppress the effector and/or activation of the regulatory link of immunocompetent cells possessing suppressive activity as the main guaranting agent of natural tolerance. The use of fetal liver cells (FLCs), potentially having immunocorrecting activity may be of current interest. It was noted many times that the FLCs of different gestation terms had significant differences in both qualitative and quantitative characteristics as well as in features of response to the cryopreservation factors. In this regard, the research aim was to assess the character of the therapeutic effect manifestation of cryopreserved FLCs of different gestation terms in animals with local GVHD (IGVHD).

Induction of IGVHD was made in C57Bl/6 mice by subcutaneous injection of 2×10^7 lymph node (LN) cells of CBA/H mice into the arolium. In 1 day after initiation of IGVHD the mice were injected intravenously with native or cryopreserved FLCs of 14 or 18 days of gestation. Cryopreservation of FLCs was performed under 10% DMSO protection, the cooling rate was 1 deg/min down to -25°C thereafter the samples were plunged into liquid nitrogen. To the 5th day after the initiation of pathology the following parameters were evaluated: the index of GVHD, content of T_{reg} (FOXP3⁺, CD4⁺CD25⁺ cells) in the LN using flow cytometer FACS Calibur (BD, USA); *tgf-β* gene expression was determined by PCR method; detection of amplification products was carried out by capillary electrophoresis in chip analyzer Agilent 2100 (Agilent Technologies USA).

Introduction of FLCs on the background of IGVHD course resulted in reduction of clinical pathology manifestation and intensity of immunoinflammatory reaction development. Therapeutic activity of FLCs in a greater extent correlated with the increase of FOXP3⁺-cells content in lymph nodes and *tgf-β* gene expression, rather than the content of CD4⁺CD25⁺-cells. With the increasing of gestation term from 14 to 18 days the therapeutic potential of FLCs decreased. However, after cryopreservation FLC-18 revealed such an immunocorrecting activity which was similar to the one of the native FLC-14. This phenomenon is based on the experimentally proved concept of the possible 'revitalization' of functional potential of late gestation term FLCs to a level of the ones of earlier terms as the effect of cryopreservation factors.

