

## Криоконсервированный аллогенный костный мозг – новая мишень иммуномодулирующей активности клеток фетальной печени

UDC 611.36.013.089.67

A.N. GOLTSEV, L.V. OSTANKOVA\*, I.YU. MATSEVITAYA, T.G. DUBRAVA

## Cryopreserved Allogeneic Bone Marrow As Novel Target of Immune Modulating Activity of Fetal Liver Cells

Экспериментально доказана модулирующая активность клеток фетальной печени при сотрансплантации с криоконсервированным аллогенным костным мозгом. Такая сотрансплантация повышает гемопоэтический потенциал аллогенного костного мозга и снижает его иммунореактивность, что выражается в минимизации проявления активности реакции “трансплантат против хозяина” и повышении выживаемости реципиентов.

**Ключевые слова:** криоконсервирование, аллогенный костный мозг, клетки фетальной печени, реакция “трансплантат против хозяина”.

Експериментально доведена модулююча активність фетальної печінки при сотрансплантації з криоконсервованим алогенним кістковим мозгом. Така котрансплантація підвищує гемопоетичний потенціал алогенного кісткового мозку і знижує його імунореактивність, що виявляється в мінімізації прояву активності реакції „трансплантат проти хазяїна” і підвищенні виживання реципієнтів.

**Ключові слова:** криоконсервування, алогенний кістковий мозок, клітини фетальної печінки, реакція „трансплантат проти хазяїна”.

Modulating activity of fetal liver cells at co-transplantation with cryopreserved allogeneic bone marrow was experimentally proved. This co-transplantation increases hemopoietic potential of allogeneic bone marrow and reduces its immune reactivity, manifesting in the activity of “graft versus host” reaction and rise in the survival of recipients.

**Key-words:** cryopreservation, allogeneic bone marrow, fetal liver cells, “graft versus host” reaction.

С каждым годом расширяется круг патологий аутоиммунного генеза. Данный факт объясняется тем, что в этот список попадают заболевания, в развитии которых ранее не акцентировалось внимание на реактивности иммунокомпетентных клеток (ИКК) к собственным антигенам. Кроме того, к этому типу заболеваний отнесены и те, патогенез которых соподчинен общим принципам развития аутоиммунных заболеваний (АИЗ), в частности болезни “трансплантат против хозяина” (БТПХ). В настоящее время эффективные профилактические меры по предупреждению развития иммунного конфликта в виде БТПХ при пересадке гистонесовместимого костного мозга (КМ) не разработаны. Поэтому необходим новый подход к изучению патофизиологических основ развития данной патологии.

Более 20 лет назад нами было получено экспериментальное подтверждение возможности снижения иммунореактивности аллогенного КМ в виде БТПХ путем криоконсервирования с использованием определенных режимов [1]. Однако в результате этой манипуляции снижался гемопоэтический потенциал криоконсервированного миелотранс-

плантата, поэтому возникла необходимость поиска соответствующего сотрансплантата. Длительный опыт работы с продуктами эмбриофетоплацентарного комплекса (ПЭФПК) позволил сделать заключение об использовании в качестве такого материала клеток фетальной печени (КФП), которые обладают выраженной иммуно- и гемопоэзодулирующей способностью [2] и содержат мезенхимальные (МСК) и кроветворные стволовые клетки (СКК). Важно, что МСК даже в малой концентрации в общем пуле КФП способны реализовать иммуносупрессивный эффект в отношении клеток индукторов (эффекторов) развития БТПХ за счет продукции таких цитокинов, как ТРФ-β, простагландин Е, ИЛ-2, ИЛ-10 и др. [5]. Известно, что механизм иммуносупрессии реализуется также через индукцию в МСК экспрессии триптофанкатаболизирующего фермента indolamin 2,3-дезоксигеназы (ИДО) с образованием L-кинурина, пиколиновой и квинолиновой кислот [6]. Подобно продуцируемому фетальной печенью альфа-фетопротеину, супрессивный эффект этих катаболитов триптофана распространяется в основном на активированные и пролиферирующие ИКК.

Институт проблем криобиологии и криомедицины  
НАН Украины, г. Харьков

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

\* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Перейславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.:+38 (057) 373-31-26, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

\* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 373 3126, fax: +380 57 373 3084, e-mail:cryo@online.kharkov.ua

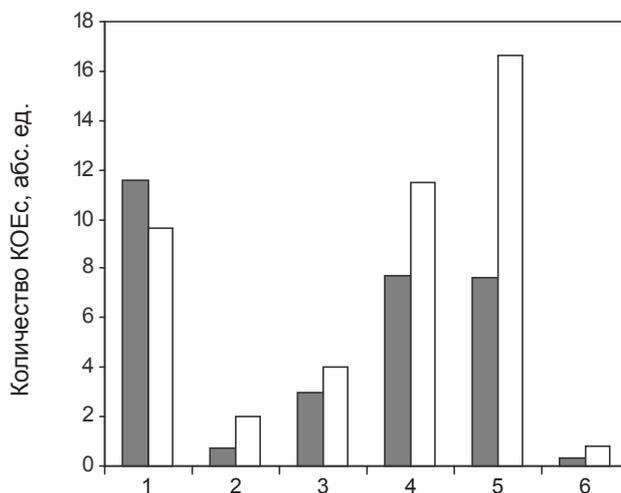
Цель работы – изучить особенности иммуно- и гемопозкорректирующей активности КФП в модели развития БТПХ при трансплантации криоконсервированного аллогенного КМ.

### Материалы и методы

Работу выполняли на 4-месячных мышах (массой 18–20 г) линий СВА (Н-2<sup>к</sup>) и (СВА×С57В1)F1. Клетки КМ и ФП (13 сут гестации) получали на среде 199 с необходимыми добавками. КМ мышей СВА вводили внутривенно летально облученным мышам (СВА×С57В1)F1 в дозе  $5 \times 10^6$  клеток/мышь совместно с КФП в дозе  $5 \times 10^5$  клеток/мышь или без них. Интенсивность развития БТПХ оценивали по общепринятым показателям [4]. Регуляторное влияние КФП на гемопозитическую функцию трансплантируемого аллогенного КМ определяли по содержанию стволовых кроветворных клеток (КОЕс) в КМ реципиентов общепринятым методом на 8-е (КОЕс-8) и 12-е (КОЕс-12) сутки после сотрансплантации [7]. Костный мозг криоконсервировали по разработанной нами ранее программе [3]. Полученные экспериментальные данные статистически обрабатывали в электронных таблицах “Microsoft Excel 2000”.

### Результаты и обсуждение

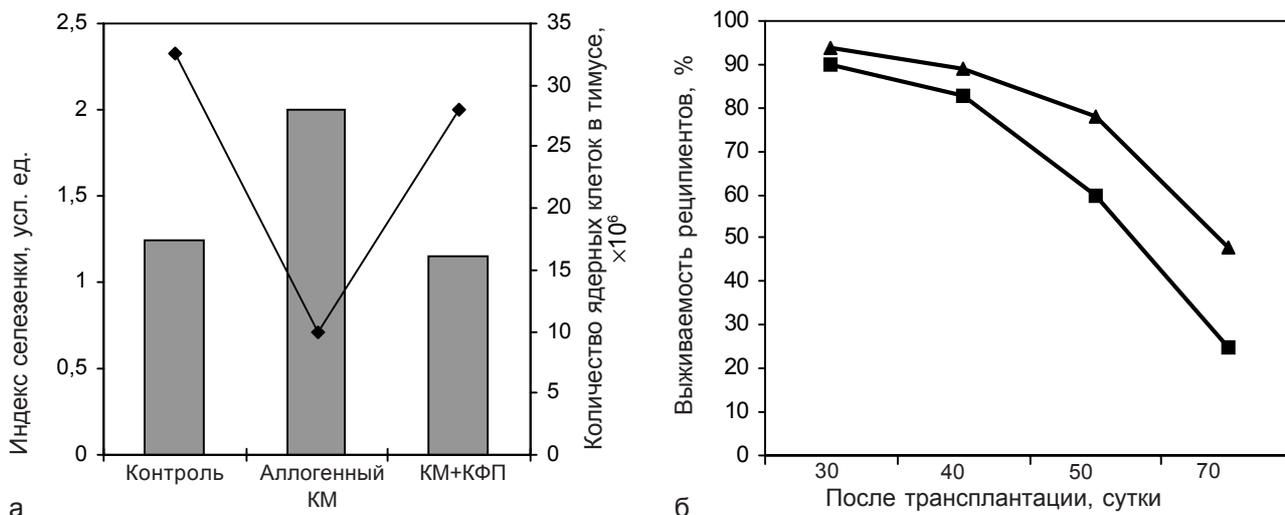
КФП, не обладая высокой колониеобразующей активностью, оказывали выраженное регуляторное влияние на гемопозитическую функцию трансплантируемого аллогенного КМ, имеющее дозозависимый эффект (рис. 1). Минимальная доза КФП ингибировала функцию КОЕс-8 и достоверно не изменяла КОЕс-12 в сравнении с вводимым КМ *per se*. Двукратное увеличение дозы КФП не вызывало изменения колониеобразующей активности



**Рис. 1.** Гемопозкорректирующий эффект КФП при сотрансплантации с криоконсервированным аллогенным КМ. 1 – КМ  $1 \times 10^5$ ; 2 – ФП  $1 \times 10^4$ ; 3 – ФП  $1 \times 10^5$ ; 4 – КМ+ФП  $1 \times 10^4$ ; 5 – КМ+ФП  $1 \times 10^5$ ; 6 – контроль облучения; ■ – КОЕс-8; □ – КОЕс-12.

КОЕс-8, но в 2 раза повышало КОЕс-12. Степень влияния регуляторных факторов фетальных клеток определялась не только дозой вводимых КФП, но и уровнем дифференцировки КОЕс. Важно, что стимулирующая активность фетальных медиаторов в большей степени проявлялась в отношении менее дифференцированных КОЕс-12.

Основными признаками развития БТПХ являются: спленомегалия, гипоплазия тимуса, снижение массы тела реципиента КМ и как следствие – гибель животных. Сотрансплантация КФП с аллогенным КМ полностью возвращала к норме показатель индекса селезенки, подчеркивая снижение ее массы у реципиентов аллогенного КМ (рис. 2). Уже на 50-е сутки после сотрансплантации КФП



**Рис. 2.** Основные показатели РТПХ и степень выраженности БТПХ после сотрансплантации криоконсервированного аллогенного КМ с клетками ФП: а – индекс селезенки и количество клеток в тимусе; ■ – ИС; ◆ – количество ядерных клеток в тимусе (50-е сутки); б – выживаемость реципиентов; ▲ – КМ+ФП; ■ – КМ.

наблюдалось увеличение количества клеток в тимусе. Выживаемость реципиентов, являясь интегральным показателем оценки интенсивности проявления БТПХ, также подтвердила способность КФП коррегировать иммунореактивность алломиелотрансплантата.

### Выводы

Оценка модулирующей активности КФП при сотрансплантации с аллогенным криоконсервированным КМ продемонстрировала минимизацию проявления его БТПХ-активности, улучшение показателей состояния тимуса, КМ, селезенки и, как следствие, повышение выживаемости реципиентов. Данный факт позволяет сделать важный вывод о том, что КФП реализуют как минимум дуалистическую активность, а именно: снижают иммунореактивность КМ и через дополнительную активацию стволового гемопоэтического компартамента повышают его защитный потенциал.

### Литература

1. Гольцев А.Н., Луценко Е.Д., Останкова Л.В. и др. Возможности криобиологии в решении иммуноконфликтных проблем при пересадке гистонесовместимого костного мозга // Пробл. криобиологии.– 1996.– №2.– С. 3–10.
2. Гольцев А.Н., Луценко Е.Д., Дубрава Т.Г. и др. Поиск альтернативных криоконсервированию путей модификации иммунореактивности алломиелотрансплантата. Часть II. Возможность сотрансплантации эмбриональной печени // Пробл. криобиологии.– 2000.– №1.– С. 10–21.
3. Гольцев А.Н., Останкова Л.В., Луценко Е.Д. и др. Функциональная активность криоконсервированных кровяных клеток (КОЕс) в зависимости от компонентного состава миелотрансплантата // Пробл. криобиологии.– 1993.– №4.– С. 34–39.
4. Шевелев А.С. Реакция «трансплантат против хозяина» и трансплантационная болезнь.– М.: Медицина, 1976.– 215 с.
5. Krampera M., Glennie S., Dyson J. et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide // Blood.– 2003.– Vol. 101, N9.– P. 3722–3729.
6. Jaspersen L.K., Bucher C., Panoskaltsis-Mortari A. et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a critical regulator of acute graft-versus-host disease lethality // Blood.– 2008.– Vol. 111, N6.– P. 3257–3265.
7. Till J.E., McCulloch E.A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells // Radiat. Res.– 1961.– Vol. 14, N2.– P. 213–222.

Поступила 11.07.2008