

УДК 612.017.1:57.083.324

А.Н. Гольцев*, Т.Г. Дубрава, Ю.А. Гаевская,
Е.Д. Луценко, М.В. Останков, И.Ю. Мацевитая

Значение экспрессии гена *Foxp3* в Т-регуляторных клетках в патогенезе болезни «трансплантат против хозяина», индуцированной криоконсервированным аллогенным материалом

UDC 612.44.014.086.3:616.127-002:612.649.011.87.014.3

A.N. Goltsev*, T.G. Dubrava, Yu.A. Gayevskaya,
E.D. Lutsenko, M.V. Ostankov, I.Yu. Matsevitaya

Foxp3 Gene Expression Value in Regulatory T Cells in Pathogenesis of Graft-Versus-Host Disease Induced with Cryopreserved Allogenic Material

Реферат: В работе исследованы содержание Т-регуляторных клеток (T_{reg}) и уровень экспрессии в них гена *Foxp3* у реципиентов с болезнью «трансплантат против хозяина» (БТПХ), индуцированной введением аллогенного нативного или криоконсервированного костного мозга с клетками лимфоузлов. В экспериментальной модели БТПХ показано, что дефицит T_{reg} играет важную роль в поддержании аутоиммунного процесса. У животных с БТПХ, индуцированной аллогенным нативным костным мозгом (КМ), установлено почти двукратное снижение как содержания T_{reg} , так и уровня экспрессии в них гена *Foxp3* по сравнению с реципиентами сингенного КМ. Отмечено увеличение уровня экспрессии гена *Foxp3* в T_{reg} при максимальном снижении их содержания у животных с БТПХ, индуцированной аллогенным криоконсервированным КМ. Криоконсервирование аллогенного КМ, которым индуцировали БТПХ, приводило к снижению его иммунореактивности и, как следствие, клинического проявления патологии. Результаты проведенных исследований позволяют расширить представление о механизмах развития иммунных конфликтов при БТПХ на клеточном и молекулярном уровнях.

Ключевые слова: болезнь «трансплантат против хозяина», Т-регуляторные клетки, ген *Foxp3*, криоконсервированный костный мозг.

Реферат: У роботі досліджено вміст Т-регуляторних клітин (T_{reg}) і рівень експресії у них гена *Foxp3* у реципієнтів із хворобою «трансплантат проти хазяїна» (ХТПХ), індукованою введенням алогенного нативного або криоконсервованого кісткового мозку із клітинами лімфовузлів. У експериментальній моделі ХТПХ показано, що дефіцит T_{reg} відіграє важливу роль у підтримці аутоімунного процесу. У тварин із ХТПХ, індукованої алогенним нативним кістковим мозгом (КМ), встановлено майже дворазове зниження як вмісту T_{reg} , так і рівня експресії в них гена *Foxp3* у порівнянні з реципієнтами сингенного КМ. Відзначено збільшення рівня експресії гена *Foxp3* у T_{reg} при максимальному зниженні їх вмісту у тварин із ХТПХ, індукованої алогенним криоконсервованим КМ. Криоконсервування алогенного КМ, яким індукували ХТПХ, приводило до зниження його імунореактивності й, як наслідок, клінічного прояву патології. Результати проведених досліджень дозволяють розширити нашу уяву про механізми розвитку імунних конфліктів при ХТПХ на клітинному й молекулярному рівнях.

Ключові слова: хвороба «трансплантат проти хазяїна», Т-регуляторні клітини, ген *Foxp3*, криоконсервовані кістковий мозок.

Abstract: Content of regulatory T cells (T_{reg}) and their *Foxp3* gene expression level in the recipients with graft-versus-host disease (GVHD) induced by introduction of fresh aspirated or cryopreserved allogenic bone marrow combined with lymph node cells were under study in this research. In GVHD experimental model the deficiency in T_{reg} was shown to play an important role in maintaining autoimmune process. In the animals with GVHD induced with fresh aspirated allogenic bone marrow (BM) almost twofold decrease in both T_{reg} content and the expression level of *Foxp3* gene were established as compared to the syngeneic BM recipients. An increased level of *Foxp3* gene expression under the maximum reduction of their content in the animals with GVHD, induced with cryopreserved allogenic BM introduction, was noted. Cryopreservation of allogenic BM, used for GVHD induction, reduced its immune reactivity and, as a result, clinical evidence of pathology. Our findings enable to broaden the notion about the mechanisms of immune conflicts development in GVHD both at cellular and molecular levels.

Key words: graft-versus-host disease, regulatory T cells, *Foxp3* gene, cryopreserved bone marrow.

Отдел криопатофизиологии и иммунологии, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015;
тел.: (+38 057) 373-41-43, факс: (+38 057) 373-30-84,
электронная почта: cryopato@rambler.ru

Поступила 23.09.2014
Принята в печать 04.11.2014

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2014. – Т. 24, №4. – С. 322–331.
© 2014 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

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

*To whom correspondence should be addressed:
23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015;
tel.: +380 57 373 4143, fax: +380 57 373 3084,
e-mail: cryopato@rambler.ru

Received September, 23, 2014
Accepted November, 04, 2014

Probl. Cryobiol. Cryomed. 2014. 24(4): 322–331.
© 2014 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

Исследование механизмов развития и предупреждения болезни «трансплантат против хозяина» (БТПХ) обусловлено расширением области применения кроветворной ткани для лечения лучевой болезни, злокачественных новообразований, иммунодефицитных расстройств. Во всех случаях основным препятствием для успешного приживания пересаженной ткани является БТПХ, ключевую роль в патогенезе которой играют Т-регуляторные клетки ($T_{\text{рег}}$) [8, 17, 19]. Установлено, что главная их функция состоит в сдерживании активности аутоспецифических клонов Т-лимфоцитов, что обеспечивает предотвращение аутоиммунных процессов. Поэтому принято считать, что нарушение структуры и функции $T_{\text{рег}}$ играют важную роль в патогенезе различных заболеваний [8, 15]. В настоящее время рассматриваются перспективы использования этих клеток в качестве адаптивной терапии при аутоиммунной патологии [13]. В экспериментальных моделях на мышах показано, что дефицит $T_{\text{рег}}$ не являясь главным фактором патогенеза, играет важную роль в поддержании аутоиммунного процесса [15]. С популяцией регуляторных Т-клеток связывают экспрессию гена *Foxp3*. Miura Yu. и соавт. [16] показали, что экспрессия *Foxp3* была значительно снижена в мононуклеарах периферической крови пациентов при развитии БТПХ, при этом уровень его экспрессии был обратно пропорционален тяжести патологии. Известно, что FOXP3 – наиболее специфический внутриклеточный маркер для $T_{\text{рег}}$, а ген *Foxp3* отвечает за их развитие и супрессорную функцию. Именно поэтому необходимо изучение иммунных механизмов развития БТПХ не только на клеточном (содержание $T_{\text{рег}}$), но и молекулярно-генетическом (экспрессия гена *Foxp3*) уровнях.

В связи с необходимостью создания запасов костного мозга для лечения лучевой болезни и других гемодифицитных состояний организма необходимо его криоконсервирование и хранение при температуре жидкого азота (-196°C). Поэтому в наших исследованиях был использован криоконсервированный аллогенный КМ для введения летально облученным животным.

Целью настоящего исследования было оценить содержание $T_{\text{рег}}$ и уровень экспрессии в них гена *Foxp3* у реципиентов с БТПХ, индуцированной введением аллогенного нативного или криоконсервированного костного мозга с клетками лимфоузлов.

Материалы и методы

Исследования проводили на мышах линий СВА/Н и (СВА/Н×С57В1) F1 20-недельного возраста массой 24–26 г в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одоб-

Studying the mechanisms of graft-versus-host disease (GVHD) progress and prevention is stipulated by the extending of application scope for hematopoietic tissue to treat radiation sickness, malignancy and immunodeficiency disorders. In all the cases the main obstacle for successful engraftment of transplanted tissue is GVHD, in pathogenesis of which a key role is played by regulatory T cells ($T_{\text{рег}}$) [8, 17, 19]. Their main function was established to consist in suppressing the activity of autospecific clones of T-lymphocyte, thereby preventing the autoimmune processes. Therefore, the disorder in $T_{\text{рег}}$ structure and function is commonly assumed to play an important role in pathogenesis of various diseases [8, 15]. Prospects of using these cells as an adaptive therapy in autoimmune diseases are currently under consideration [13]. In experimental murine models the $T_{\text{рег}}$ deficiency, not being the main factor of pathogenesis, was demonstrated as playing an important role in autoimmune process maintenance [15]. One associates *Foxp3* gene expression with the population of regulatory T cells. Miura Yu. *et al.* [16] demonstrated the *Foxp3* expression to be significantly reduced in peripheral blood mononuclear cells of patients during GVHD progress, wherein the level of its expression was inversely proportional to the pathology severity. FOXP3 is known to be the most specific intracellular marker for $T_{\text{рег}}$, and *Foxp3* gene is responsible for their development and a suppressive function. That is exactly why it is necessary to study the immune mechanisms of GVHD development not only at cellular level ($T_{\text{рег}}$ content), but at molecular and genetic ones as well (*Foxp3* gene expression).

Due to a need in creating bone marrow stocks to treat a radiation sickness and other hemodeficits of a body, its cryopreservation and storage at liquid nitrogen temperature (-196°C) are essential. Therefore, in our studies we used the cryopreserved allogenic BM for introduction to lethally irradiated animals.

This research was aimed to assess $T_{\text{рег}}$ content and *Foxp3* gene expression rate in the cells of recipients with GVHD induced by an introduction of fresh aspirated or cryopreserved allogenic bone marrow with lymph node cells.

Materials and methods

Research was carried out in CBA/H and (CBA/H×C57B1) F1 mice of 20 weeks age weighing 24–26 g, according to the General Principles of Experiments in Animals approved by the 5th National Congress in Bioethics (Kyiv, 2013) and agreed to the statements of European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasburg, 1986).

To prepare cell suspensions the CBA/H mice bone marrow (BM) was washed out from femurs, and the lymph nodes and spleen were disintegrated in Potter



ренными V Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2013) и согласованными с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

Для приготовления клеточных суспензий костный мозг (КМ) мышей линии СВА/Н вымывали из бедренных костей, а лимфоузлы и селезенки дезинтегрировали в гомогенизаторе Поттера в среде 199 (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов, Россия) с добавлением 3% эмбриональной телячьей сыворотки («БиолоТ», Россия) и 2% цитрата натрия (далее в тексте – рабочая среда). Криоконсервирование КМ осуществляли под защитой 10% диметилсульфоксида (ДМСО) («Arterium», Украина) в пластиковых ампулах («Nunc», Германия) объемом 1,8 мл с концентрацией 2×10^6 клеток/мл на программном замораживателе УОП-6 (ИПККиК НАН Украины, Харьков): скорость охлаждения 1 град/мин до -25°C и последующее погружение в жидкий азот (-196°C) [1]. Хранившиеся в течение месяца клетки КМ перед введением облученным реципиентам отогревали на водяной бане при температуре 41°C до исчезновения твердой фазы. Клетки однократно отмывали от ДМСО путем медленного добавления равного объема рабочей среды и последующего 10-минутного центрифугирования (200g). Суспензия клеток КМ, не подвергавшаяся процедуре замораживания-отогрева, далее в тексте будет называться нативной.

Индукцию БТПХ осуществляли следующим образом. Мышей линии (СВА/Н \times С57Bl)F1 облучали на установке РУМ-17 («Мосрентген», Россия) в дозе 850 Р. Условия облучения: мощность дозы – 38,6 Р/мин; напряжение – 220 кВ; сила тока – 10 мА; фильтры – 0,5 мм Cu + 1 мм Al; фокусно-дорзальное расстояние – 50 см. Через час после облучения животным внутривенно вводили 5×10^6 клеток/мышь нативного или криоконсервированного КМ с клетками лимфоузлов линии СВА/Н в соотношении 3:1 соответственно. В качестве контроля использовали интактных мышей линии (СВА/Н \times С57Bl)F1 до и после введения 5×10^6 клеток/мышь сингенного КМ.

Животные были разделены на следующие группы: группа 1 – сингенный контроль (введение сингенного КМ); группа 2 – БТПХ(нКМ+ЛУ), индукция БТПХ введением аллогенного нативного КМ вместе с клетками лимфоузлов; группа 3 – БТПХ(кКМ + ЛУ), индукция БТПХ введением аллогенного криоконсервированного КМ вместе с клетками лимфоузлов; группа 4 – интактный контроль.

Интенсивность развития БТПХ оценивали на 14-е сутки развития патологии по индексу селе-

homogenizer with medium 199 (Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis of Russian Academy of Medical Sciences, Russia) supplemented with 3% fetal bovine serum (BioloT, Russia) and 2% sodium citrate (hereafter the handling medium). BM was cryopreserved under protection of 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) (Arterium Corporation, Ukraine) in 1.8 ml plastic vials (Nunc, Germany) with 2×10^6 cells/ml concentration using the programmed freezer UOP-6 (Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of NAS of Ukraine, Kharkov) by the two-step program: cooling rate of 1 deg/min down to -25°C and following immersion into liquid nitrogen (-196°C) [1]. Stored for a month the BM cells before introduction to the irradiated recipients were thawed in 41°C water bath up to solid phase disappearance. Cells were one-fold washed of DMSO by a slow adding of an equal volume of handling medium and a subsequent 10-min centrifugation (200g). BM cell suspension not subjected to freeze-thawing hereinafter will be referred as the 'native' one.

GVHD was induced as follows. The (CBA/H \times С57Bl)F1 mice were irradiated using RUM-17 device (Mosrentgen, Russia) in 850 R dose. The irradiation conditions were as follows: dose rate of 38.6 R/min; 220 kV voltage; 10 mA current intensity; 0.5 mm Cu + 1 mm Al filters; 50 cm focus-dorsal distance. One hour later irradiation the animals were intravenously injected with 5×10^6 cells/mouse of either native or cryopreserved BM with CBA/H lymph node cells in ratio of 3:1 respectively. The (CBA/H \times С57Bl)F1 intact mice before and after administering 5×10^6 cells/mouse of syngeneic BM were used as the control.

The animals were divided into the following groups: group 1 was the syngeneic control (syngeneic BM introduction); group 2 – GVHD (nBM + ln), GVHD induction with administering an allogenic native BM together with lymph node cells; group 3 – GVHD (cBM+ln), GVHD induction with introducing allogenic cryopreserved BM together with lymph node cells; group 4 – the intact control.

The intensity of GVHD development was assessed to day 14 of pathology development by the spleen index (SI), survival rate and regulatory T cells content. Spleen index was calculated as the ratio of organ mass to body one of an animal. The spleen index of intact mice was assumed as 1, the index higher than 1.3 indicated the GVHD development [7, 10].

The content of T_{reg} (CD4⁺CD25⁺ and FOXP3⁺ cells) in GVHD recipient spleen was determined with flow cytometer FACS Calibur (Becton Dickinson, USA) using the anti-mouse monoclonal antibodies (BD Pharmingen, USA; Abcam, UK) according to the protocols of manufacturing companies. The specimens supplemented with either nonimmune labeled F²TC or PE of monoclonal antibodies of the same isotype as



зенки (ИС), показателю выживаемости и содержанию Т-регуляторных клеток. Индекс селезенки рассчитывали как соотношение массы органа к массе тела животного, умноженное на 100. Индекс селезенки интактных мышей принимали за 1, индекс больше 1,3 свидетельствовал о развитии БТПХ [7, 10].

Содержание T_{per} ($CD4^+CD25^-$ и $FOXP3^+$ -клеток) в селезенке реципиентов с БТПХ определяли на проточном цитофлуориметре «FACS Calibur» («Becton Dickinson», США) с применением антимышинных моноклональных антител («BD Pharmingen», США; «Abcam», Великобритания) по протоколам фирм-производителей. В качестве контроля использовали пробы с добавлением неиммунных меченных FITC или PE моноклональных антител того же изотипа, что и антитела против исследуемого маркера. Показатель, характеризующий среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ), определяли по степени экспрессии CD25 маркера на мембране клеток, а в случае исследования FOXP3 – по содержанию внутриклеточного белка скурфина. Для статистического учета данных цитофлуориметрического анализа использовали программу «WinMDI 2.8» (Trotter J.).

Уровень экспрессии гена *Foxp3* оценивали в $CD4^+$ -фракции клеток селезенки животных с БТПХ. Указанные клетки из селезенки реципиентов выделяли методом иммуномагнитного сепарирования на магнитном сортере («BD Imagnet», США) с помощью антимышинных $CD4$ магнитных частиц – «Magnetic Particles DM» («BD Biosciences», США) по соответствующему протоколу. Содержание транскриптов гена *Foxp3* определяли методом полимеразной цепной реакции с этапом обратной транскрипции (ОТ-ПЦР). Для выделения нуклеиновых кислот из 1×10^5 $CD4^+$ -клеток использовали наборы «Diatom RNA Prep 100» («Isogene Lab», Россия), содержащие лизирующий реагент – гуанидинтиоцианат. Для проведения ОТ-ПЦР использовали комплект random-олигонуклеотидов и ревертазы (M-Mlv) согласно инструкции фирмы-производителя («Реверта Л», Россия). Праймеры гена *Foxp3* (NM_054039.2) и гена «домашнего хозяйства» beta actin (NM_007393.3) были сконструированы на основе базы данных Национального центра биотехнологической информации («NCBI BLAST», США) и синтезированы в АОЗТ «Медбиосервис» (Киев). Амплификацию фрагментов ДНК осуществляли в термостате «Терцик» («ДНК-технология», Россия), денатурацию – при 94°C в течение 30 с, гибридизацию матрицы с праймером при 60°C – 30 с, элонгацию при 72°C – 60 с. После окончания ПЦР проводили элонгацию при 72°C в течение 5 мин. Количество циклов – 40. Детекцию

the antibodies versus the studied marker were used as the control. The index characterizing the mean fluorescence intensity (MFI) was determined by the expression rate of CD25 marker on cell membrane, and in case of FOXP3 – by the content of intracellular protein skurfina. The data of flow cytometry analysis were statistically processed using W³nMDI 2.8 software (Trotter J.).

The *Foxp3* gene expression level was evaluated in $CD4^+$ fraction of spleen cells in GVHD animals. These cells from the recipient spleens were isolated via immune magnetic separation with magnetic sorter (BD Imagnet, USA) using the anti-mouse $CD4$ magnetic particles: Magnetic Particles – DM (BD Biosciences, USA) by the corresponding protocol. The content of *Foxp3* gene transcripts was determined with the reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). To isolate nucleic acids from 1×10^5 $CD4^+$ cells we used Diatom RNA Prep 100 sets (Isogene Lab, Russia), containing the lysing reagent, guanidine thiocyanate. RT-PCR reaction was performed using the set of random-oligonucleotides and reverse transcriptase (M-Mlv) according to instructions of the manufacturer (Reverta L, Russia). The primers of *Foxp3* gene (NM_054039.2) and housekeeping gene *beta actin* (NM_007393.3) were designed basing on the National Center for Biotechnology Information (NCBI BLAST, USA) database and synthesized in CJSC Medbioservis (Ukraine). The amplification of DNA fragments was performed in Tercyc Conventional PCR thermal cycler (DNA-Technology, Russia), the denaturation was done at 94°C for 30 sec, matrix hybridization with a primer was performed at 60°C within 30 sec, and the elongation was done at 72°C for 60 sec. After PCR completing the elongation was done at 72°C for 5 min. Number of cycles was 40. Transcript number of the studied genes was detected using the capillary electrophoresis with chip-analyzer Agilent 2100 (Agilent Technologies, USA), based on the relative semi-quantitative assessment of amplified products [6]. Chips were prepared according to instructions of DNA 1000 kit (Fermentas, Lithuania). The results were normalized in respect to the index of housekeeping gene beta actin expression: internal control for PCR.

Experimental results were statistically processed with t-test and Excel software (Microsoft, USA). Data are presented as the mean \pm standard deviation. Differences were considered as statistically significant at $p < 0.05$.

Results and discussion

Development of GVHD, induced by introduced either native or cryopreserved allogenic BMs with lymph node cells is confirmed by splenomegaly, which

количества транскриптов исследуемых генов осуществляли методом капиллярного электрофореза в чип-анализаторе «Agilent 2100» («Agilent Technologies», США) на основе относительной полуколичественной оценки продуктов амплификации [6]. Подготовку чипов осуществляли согласно инструкции набора «ДНК 1000» («Fermentas», Литва). Результаты нормировали относительно показателя экспрессии гена «домашнего хозяйства» *beta actin* – внутреннего контроля для ПЦР.

Для статистической обработки результатов экспериментов применяли метод Стьюдента и компьютерную программу «Excel» («Microsoft», США). Данные приводили в виде среднего значения \pm стандартное отклонение. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Подтверждением развития БТПХ, индуцированной введением нативного или криоконсервированного аллогенного КМ с клетками лимфоузлов, является спленомегалия, характерный признак которой – это увеличение ИС (рис. 1). Так, ИС у реципиентов сингенного КМ значимо не отличался от интактного контроля, а у реципиентов группы 2 (БТПХ (нКМ + ЛУ)) он был в 1,7 раза выше. У животных группы 3 (БТПХ (кКМ+ЛУ)) ИС увеличивался в меньшей степени по сравнению с группой 2, поскольку в процессе замораживания снижается иммунореактивность аллогенного КМ [2]. Однако данный показатель у животных этой группы увеличился в 1,5 раза по сравнению с интактным контролем, что также свидетельствовало о развитии БТПХ. Следует отметить, что величина ИС, как и показатель выживаемости животных, обусловлены степенью тяжести патологического процесса (рис. 2) [1].

Действительно, было установлено, что показатель выживаемости реципиентов коррелировал с величиной ИС. Так, меньшая величина ИС у животных группы 3 по сравнению с группой 2 коррелировала с большим показателем их выживаемости.

Развитие аутоиммунных процессов, сопровождающих также БТПХ, обуславливает снижение в организме реципиентов количества и функциональной активности T_{reg} , которые супрессируют активность аутоспецифических Т-эффекторных клеток [8]. Аттестация состояния Т-регуляторного звена иммунитета реципиентов с различными формами трансплантируемого материала была проведена на 14-е сутки, т. е. в тот срок, когда клинические и лабораторные показатели свидетельствовали о развитии трансплантационной болезни (см. рис. 1; рис. 2).

Поскольку селезенка – основной орган, в котором формируются зрелые элементы Т-ряда, в нем

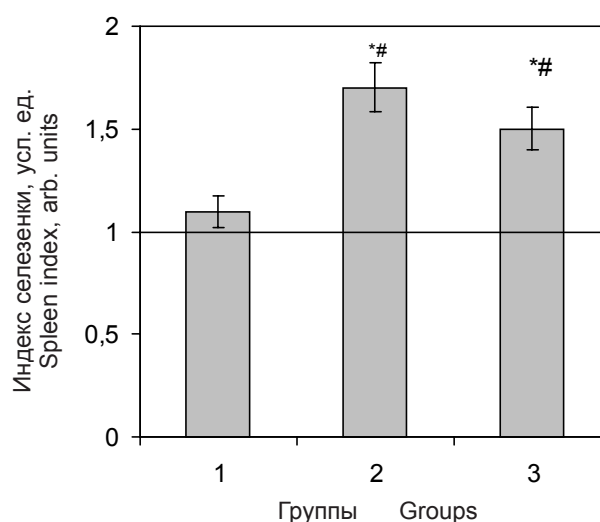


Рис. 1. Индекс селезенки реципиентов на 14-е сутки развития БТПХ; * – различия статистически значимы относительно интактного и # – сингенного (группа 1) контролей, $p < 0,05$ (за 1 принят ИС интактных животных).

Fig. 1. Spleen index of recipients to day 14 of GVHD development; * – differences are statistically significant if compared to the intact and # – syngeneic (group 1) controls, $p < 0.05$; SI of intact animals is assumed as 1.

characteristic feature is an increased SI (Fig. 1). Thus, the SI in syngeneic BM recipients was not significantly different from the intact control, but for the recipients of group 2 (GVHD (nBM + ln)) it was 1.7 times higher. In group 3 animals (GVHD (cBM + ln)) the SI increased to a lesser extent than in group 2, since the immune reactivity of allogenic BM reduced during freezing [2]. However, this index in this animal group increased in 1.5 times as compared to the intact control, that also testified to the GVHD development. Of note is the fact, that both SI value and the survival rate of animals are stipulated by pathology severity (Fig. 2) [1].

Actually the survival rate in recipients was established to correlate with the SI value. Thus, a lower value of SI in group 3 animals than in group 2 correlated with higher index of their survival.

The development of autoimmune processes, also accompanying the GVHD, stipulates a decrease in a recipient body of a number and functional activity of T_{reg} , suppressing the activity of autospecific effector T cells [8]. The state of regulatory T immunity link in recipients with various forms of transplanted material was evaluated to day 14, *i.e.* when clinical and laboratory indices confirmed the GVHD development (see Figs. 1 and 2).

A quantitative content of T_{reg} was assessed in spleen, since it is the main organ wherein the mature elements of T-series are formed. The population of



была проведена оценка количественного содержания T_{reg} . Популяция $CD4^+CD25^+FOXP3^+T_{reg}$ является «минорной»; их содержание в периферической крови составляет около 5–10% от T-клеток $CD4^+$ у мышей и человека [8, 9]. По нашим данным, содержание T_{reg} в селезенке интактных мышей соответствовало этому показателю. Регуляторные T-клетки играют ключевую роль в иммунной системе благодаря уникальной способности контролировать иммунный ответ. Вследствие их недостаточного количества развиваются аутоиммунные заболевания и снижается показатель выживаемости реципиентов [4, 14].

Известно, что БТПХ ассоциируется с появлением в организме «аутореактивного» клона T-эффекторных клеток ($CD4^+$), формируемого донорскими стволовыми кроветворными клетками [5], а цитокиновый «шторм», вызванный ее развитием, приводит к экспрессии поверхностных маркеров как на эффекторных, так и регуляторных клетках [16]. Экспрессия CD25 маркера под действием трансформирующего фактора роста- β и интерлейкина-2 на T-клетках $CD4^+CD25^-$ переводит их в категорию T_{reg} с супрессорной активностью [19].

Исследование содержания T_{reg} в селезенках опытных животных показало, что после введения сингенного КМ БТПХ не развивалась, исходя из величины ИС (см. рис.1), однако содержание T_{reg} в этой группе снижалось в 1,3–1,8 раза (рис. 3). При этом показатель СИФ, отражающий степень экспрессии CD25 маркера на мембране $CD4^+CD25^+$ -клеток, или содержание белка скурфина в $FOXP3^+$ -клетках значительно не изменялись, что может свидетельствовать об их функциональной активности, адекватной интактному контролю. У реципиентов группы 2 отмечено снижение содержания $CD4^+CD25^+$ - и $FOXP3^+$ -клеток в 1,4 и 1,6 раза соответственно по сравнению с группой 1 (рис. 3). Показатель СИФ T_{reg} также снижался у реципиентов группы 2, что свидетельствует об изменении функциональной активности этих клеток. Наши данные нашли подтверждение в работе X. Chen и соавт. [12], в которой было отмечено прогрессивное снижение содержания $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ -клеток в селезенках реципиентов с БТПХ, вызванной введением аллогенного КМ со спленоцитами.

В клинической практике в основном используется не аутологичный (сингенный), а криоконсервированный аллогенный КМ, поэтому представляло интерес определить содержание T_{reg} и их СИФ при индукции БТПХ аллогенным кКМ + ЛУ (группа 3). Так, содержание исследуемых субпопуляций T_{reg} в этой группе животных снижалось еще в большей степени, чем при введении нКМ + ЛУ (группа 2), однако показатели их СИФ значительно не отличались.

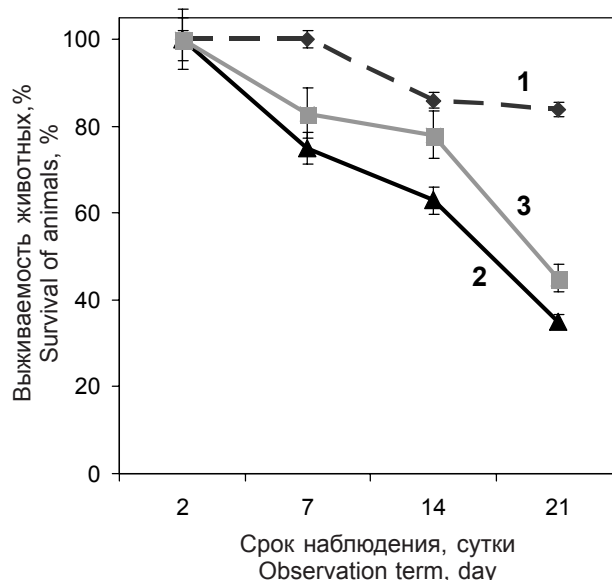


Рис. 2. Выживаемость реципиентов с БТПХ, вызванной введением нативного или криоконсервированного КМ с клетками лимфоузлов: 1 – группа 1 (сингенный КМ); 2 – группа 2 (БТПХ(нКМ+ЛУ)); 3 – группа 3 (БТПХ(кКМ+ЛУ)).

Fig. 2. Survival of recipients with GVHD caused by administered either native or cryopreserved BM with lymph node cells: 1 – Group 1 (syngeneic BM); 2 – Group 2 (GVHD (nBM + In)); 3 – Group 3 (GVHD (cBM + In)).

$CD4^+CD25^+FOXP3^+T_{reg}$ is the ‘minor’ one; their content in peripheral blood makes approximately 5–10% of $CD4^+$ T cells in mice and humans [8, 9]. According to our data the T_{reg} content in spleen of intact mice corresponded to this index. Regulatory T cells play a key role in an immune system due to the unique capability for immune response control. Due to their insufficient number the autoimmune diseases develop and the survival rate in recipients is decreased [4, 14].

GVHD is known as associated with the appearance in a body of ‘autoreactive’ clone of effector T cells ($CD4^+$), formed by donor stem hematopoietic cells [5], and a cytokine ‘storm’, caused by its development, induces the expression of surface markers both on effector and regulatory cells [16]. The expression of CD25 marker under the effect of transforming growth factor beta and interleukin-2 in $CD4^+CD25^-$ T cells transfers them into the T_{reg} category with suppressor activity [19].

Study of T_{reg} content in spleen of experimental animals showed that after administering syngeneic BM no GVHD was progressing, based on the SI value (see Fig. 1), but the T_{reg} content in this group was 1.3–1.8 times decreased (Fig. 3). In this case the MFI index, reflecting the expression degree of CD25 marker on membrane of $CD4^+CD25^+$ cells, or the skurfina protein

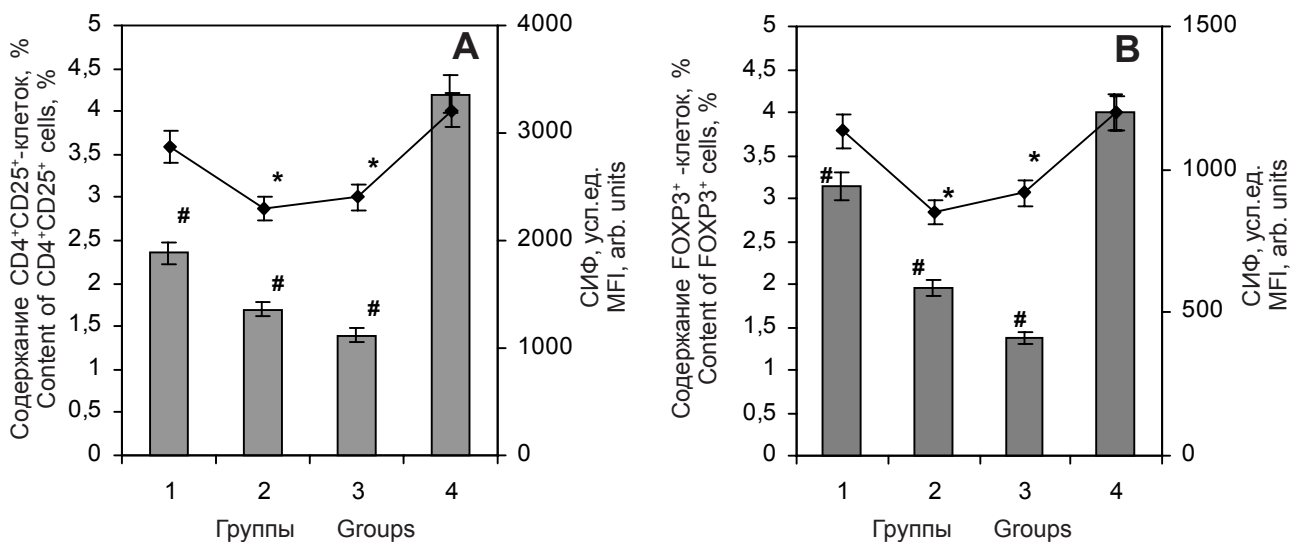


Рис. 3. Содержание CD4⁺CD25⁺- (A), FOXP3⁺-клеток (B) и их СИФ в селезенках животных с БТПХ на 14-е сутки развития патологии; ** – различия статистически значимы относительно соответствующего интактного контроля (группа 4), $p < 0,05$.

Fig. 3. Content of CD4⁺CD25⁺ (A), FOXP3⁺ cells (B) and their MFI in spleens of GVHD animals to day 14 of pathology development; ** – differences are statistically significant relative to the respective intact control (group 4), $p < 0.05$.

Данный факт указывает на большую функциональную активность T_{рег} при меньшем их количестве (рис. 3).

Следует отметить, что T_{рег} играют главную роль в контроле развития БТПХ: уменьшение этой клеточной популяции и нарушение ее функционального статуса усиливают клинические симптомы патологии и, в частности, снижают показатель выживаемости животных. Для расшифровки механизмов развития БТПХ важно проведение исследований не только на клеточном, но и молекулярном уровне. Поэтому следующим этапом наших исследований была оценка уровня экспрессии гена *Foxp3*, определяющего супрессорную функцию T_{рег}.

У регуляторных T-клеток, которые играют главную роль в поддержании толерантности, экспрессируется уникальный транскрипционный репрессор *Foxp3* [8, 16]. Как представлено на рис. 4, уровень его экспрессии во всех исследуемых группах был ниже интактного контроля.

Полученные нами данные соответствуют результатам исследований Yu. Miura и соавт. [16], которые установили, что экспрессия мРНК гена *Foxp3* была снижена в мононуклеарах периферической крови пациентов с аллогенной и аутологичной БТПХ по сравнению с реципиентами, у которых БТПХ не развилась. Авторы показали, что экспрессия гена *Foxp3* находилась в обратной зависимости со степенью тяжести патологии, что также подтверждает наши результаты (см. рис. 1, 2; рис. 4).

У животных группы 2 по сравнению с группой 1 (сингенный контроль) (см. рис. 3), содержание T_{рег} уменьшалось: CD4⁺CD25⁺ – на 28%, а FOXP3⁺ –

content in FOXP3⁺ cells was not significantly changed, that might testify to their functional activity, being adequate to the intact control. In group 2 recipients there was noted a decreased content of CD4⁺CD25⁺ and FOXP3⁺ cells in 1.4 and 1.6 times, respectively, as compared to group 1 (Fig. 3). The MFI index of T_{рег} was also reduced in recipients of group 2, testifying to a change in functional activity of these cells. Our findings were confirmed in the report of Chen X. *et al.* [12], where they noted a progressive reduction of CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ cells content in spleens of recipients with GVHD, caused by administered allogenic BM with splenocytes.

Clinical practice usually involves not autologous (syngenic) BM, but cryopreserved allogenic one, therefore of interest was to determine the content of T_{рег} and their MFI when inducing GVHD with allogenic cBM+In (group 3). Thus, the content of the studied T_{рег} subpopulations in this group of animals decreased in a greater extent than when nBM + In (group 2) was administered, but the indices of their MFI did not significantly differ. This fact indicates the higher functional activity of Treg at their lower amount (Fig. 3).

Of note is the fact, that T_{рег} play a major role in controlling GVHD development: a decrease in this cell population and a disorder in its functional status strengthen clinical symptoms of pathology, in particular, reduce the survival rate in animals. To decode the mechanisms of GVHD development it is important to perform studies both at cellular and molecular levels. So the next step of our research was to evaluate the *Foxp3* gene expression level, determining a suppressor function of T_{рег}.



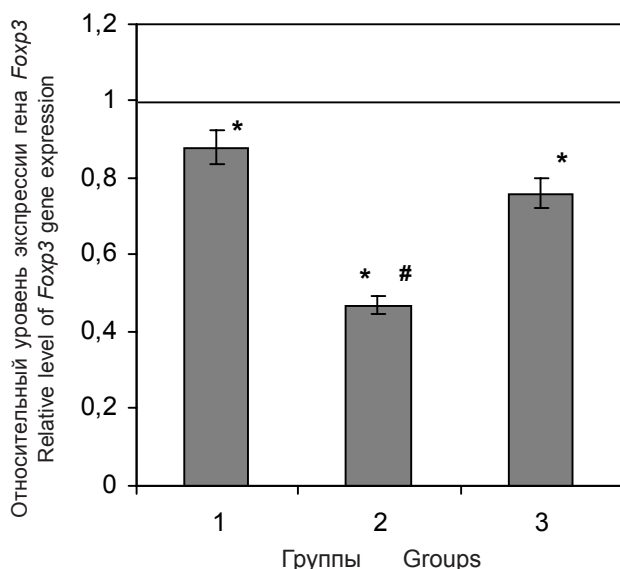


Рис. 4. Относительное содержание транскриптов гена *foxp3* в CD4⁺-фракциях клеток селезенок животных опытных групп на 14-е сутки после индукции БТПХ; * – различия статистически значимы относительно интактного и # – сингенного (группа 1) контролей, $p < 0,05$; за 1 принят показатель интактного контроля.

Fig. 4. Relative content of *foxp3* gene transcripts in CD4⁺-fractions of spleen cells of experimental animals to day 14 after GVHD induction; * – differences are statistically significant if compared to the intact and # – syngeneic (group 1) controls, $p < 0.05$; the index of intact control was assumed as 1.

на 37%, при этом уровень экспрессии гена *Foxp3* был снижен на 46% (рис. 4).

У животных группы 3 содержание T_{reg} было еще меньше, чем в группе 2, а экспрессия исследуемого гена была выше. По-видимому, повышение уровня экспрессии гена *Foxp3* в группе 3 (в отличие от группы 2) является следствием компенсации функциональной активности низкого содержания T_{reg}. Исходя из данных, полученных Yu. Miura и соавт. [16], повышение экспрессии гена *Foxp3* приводит к снижению степени тяжести БТПХ. В нашем исследовании показатель выживаемости животных группы 3 подтверждает данный факт (см. рис. 2).

В литературе появились сообщения о том, что *Foxp3* могут экспрессировать и эффекторныe T клетки после активации [11], а экспрессия *Foxp3* T-хелперными клетками CD4⁺CD25⁻ не всегда сопровождается приобретением супрессорной функции и стабильного регуляторного фенотипа [18].

Таким образом, результаты наших исследований согласуются с данными литературы [11, 16], которые показывают, что корреляция между содержанием T_{reg} и уровнем экспрессии гена *Foxp3* су-

The unique transcriptional repressor *Foxp3* is expressed in regulatory T-cells, playing a major role in tolerance maintenance [8, 16]. Fig. 4 shows the level of its expression in all the studied groups to be below the intact control.

Our findings are consistent with those of Miura Yu. *et al.* [16], who found out that the mRNA expression of *Foxp3* gene was reduced in mononuclear cells of peripheral blood of patients with allogenic and autologous GVHD as compared to the recipients in which no GVHD was developed. The authors demonstrated the *Foxp3* gene expression to be inversely related to the severity degree of pathology, also confirming our results (see Fig. 1, 2, and 4).

In group 2 animals as compared to group 1 (syngeneic control) (see Fig. 3) the T_{reg} content decreased: CD4⁺CD25⁺ and FOXP3⁺ by 28 and 37% respectively, wherein the expression level of *Foxp3* gene was reduced by 46% (Fig. 4).

In animals of group 3 the T_{reg} content was even lower than in group 2, but the expression of the studied gene was higher. An increase in the expression level of *Foxp3* gene in group 3 (contrary to group 2) evidently results from the compensation of functional activity of T_{reg} low content. Proceeding from Miura Yu. *et al.* report [16], the augmentation of *Foxp3* gene expression results in a decreased GVHD severity. In our study this fact is confirmed by the survival rate in group 3 animals (see Fig. 2).

There was reported that *Foxp3* might be expressed by the effector T cells after activation [11], but the expression of *Foxp3* by CD4⁺CD25⁻ T helper cells was not always accompanied by the gaining the suppressor function and a stable regulatory phenotype [18].

Thus, our findings are consistent with the data reported [11, 16], demonstrating the correlation between the T_{reg} content and expression level of *Foxp3* gene as not always existing. For example, in patients with chronic autoimmune thyroiditis on the background of a constant content of CD4⁺CD25^{hi} cells in peripheral blood the expression level of *Foxp3* gene was established to be 1.6 times lower than in healthy patients [3]. It should be noted that only in human the CD4⁺CD25^{hi} cells in CD4⁺CD25⁺ population are true T_{reg} [9]. The authors concluded that an increased number of CD4⁺CD25^{hi} cells under this pathology might be a compensatory response of their functional deficiency, resulting from a reduced *Foxp3* expression.

Thus, in the animals of group 3 with an introduced cryopreserved material the SI (see Fig. 1), characterizing the GVHD severity degree, was lower than when applying the native one (group 2), and a suppressor activity of FOXP3⁺ cells, determined by MFI, and the expression level of *Foxp3* gene (Fig. 5) were higher.



ществует не всегда. Установлено, например, что у пациентов с хроническим аутоиммунным тиреоидитом на фоне неизменного содержания CD4⁺CD25^{hi}-клеток в периферической крови уровень экспрессии гена *Foxp3* был в 1,6 раза ниже, чем у здоровых пациентов [3]. Следует отметить, что только у человека CD4⁺CD25^{hi}-клетки в популяции CD4⁺CD25⁺ являются истинными T_{рег} [9]. Авторы пришли к выводу, что увеличение количества CD4⁺CD25^{hi}-клеток при этой патологии может быть компенсаторной реакцией их функциональной неполноценности, которая является следствием пониженной экспрессии *Foxp3*.

Таким образом, у животных группы 3 с введением криоконсервированного материала показатель ИС (см. рис. 1), характеризующий степень тяжести БТПХ, был ниже, чем при введении нативного (группа 2), а супрессорная активность FOXP3⁺-клеток, определяемая по СИФ, и уровень экспрессии гена *Foxp3* (рис. 5) были выше.

Возможно, криоконсервированный КМ, обладающий меньшей иммунореактивностью, чем нативный, был менее агрессивен в отношении иммунокомпетентной сферы реципиентов. Эффект подтверждался повышением интегрального клинического показателя – выживаемости животных.

Выводы

1. На модели экспериментально индуцированной БТПХ продемонстрировано участие T_{рег} в патогенезе развития данной патологии и зависимости степени тяжести ее протекания от их количественного содержания, функциональной активности, уровня экспрессии гена *Foxp3*, определяющих супрессорную функцию данных клеток.

2. У животных с БТПХ, индуцированной аллогенным нативным костным мозгом, установлено почти двукратное снижение как содержания T_{рег}, так и уровня экспрессии в них гена *Foxp3* по сравнению с реципиентами сингенного костного мозга.

3. При БТПХ, индуцированной аллогенным криоконсервированным костным мозгом по сравнению с нативным, отмечено увеличение в 1,5 раза уровня экспрессии гена *Foxp3* в T_{рег}, которое является, по-видимому, компенсацией функциональной недостаточности T_{рег} при максимальном снижении их содержания у животных этой группы.

4. Криоконсервированный аллогенный костный мозг, которым индуцировали БТПХ, по сравнению с нативным, вызывал повышение уровня экспрессии гена *Foxp3* в T_{рег}, что, по-видимому, обусловлено снижением его иммунореактивности и, как следствие, клинического проявления трансплантационной болезни.

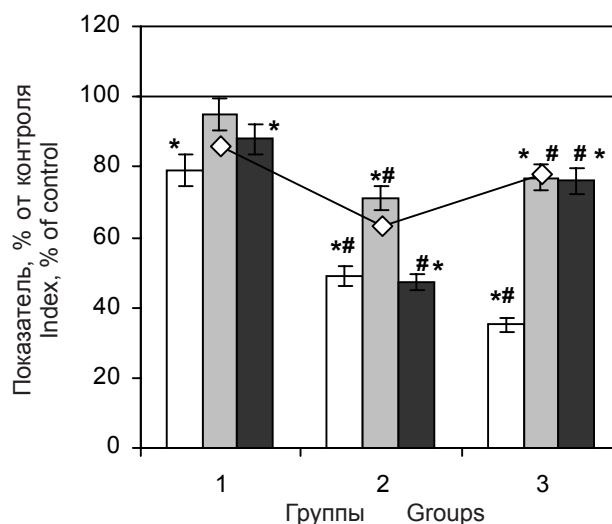


Рис. 5. Содержание FOXP3⁺-клеток (□), их СИФ (▣), уровень экспрессии в них гена *foxp3* (■) и выживаемость животных (линия); * – различия статистически значимы относительно интактного и # – сингенного (группа 1) контролей, $p < 0,05$; за 100% приняты показатели интактного контроля.

Fig. 5. Content of FOXP3⁺-cells, their MFI, *foxp3* gene expression level in them and survival rate (line) of animals; * – differences are statistically significant if compared to the intact and # – syngeneic (group 1) controls, $p < 0.05$; intact control indices were assumed as 100%.

Possibly the cryopreserved BM having a lower immune reactivity than the native one was less aggressive in respect to the immune competent sphere of recipients. This was confirmed by an increased integral clinical index: survival rate of animals.

Conclusions

1. The participation of T_{рег} in pathogenesis of this pathology development and the dependencies of severity rate of its proceeding on their quantitative content, functional activity, *Foxp3* gene expression level, determining a suppressor function of these cells, were demonstrated in the model of experimentally induced GVHD.

2. In the animals with GVHD induced with allogeneic native bone marrow there was established almost twofold decrease in both T_{рег} content and the expression level of *Foxp3* gene, as compared to syngeneic bone marrow recipients.

3. During GVHD induced with cryopreserved allogeneic bone marrow there was noted an 1.5 times increase in the expression rate of *Foxp3* gene in T_{рег} if compared to application of native cells, which was apparently the compensation of T_{рег} functional failure under the maximum reduction of their content in animals of this group.



Литература

1. Гольцев А.Н., Луценко Е.Д., Останкова Л.В. и др. Возможности криобиологии в решении иммуноконфликтных проблем при пересадке гистнесовместимого костного мозга // Проблемы криобиологии. – 1996. – №2. – С. 3–10.
2. Гольцев А.Н., Мацевитая И.Ю., Луценко Е.Д. и др. К вопросу модификации иммунореактивности миелотрансплантата после криоконсервирования // Проблемы криобиологии. – 2010. – Т. 20, №2. – С. 145–152.
3. Козлов В.А., Ярилин А.А., Аметов А.С. и др. Естественные регуляторные Т-клетки и связанные с ними цитокины при хроническом аутоиммунном тиреоидите // Иммунопатология и клин. иммунология. – 2008. – №6. – С. 357–361.
4. Корсунский И. А., Румянцев А. Г., Быковская С. Н. Роль регуляторных Т-клеток CD4⁺CD25⁺ и мезенхимальных стволовых клеток костного мозга в подавлении реакции трансплантат против хозяина // Онкогематология. – 2008. – №3. – С. 45–51.
5. Манько В.М., Петров Р.В. Трансплантология и тканевая инженерия кроветворных стволовых клеток. Факторы, контролирующие их функции // Аллергология и иммунология. – 2008. – Т. 9, №4. – С. 413–427.
6. Молекулярная клиническая диагностика. Методы / Под ред. С.Херрингтона, Дж. Макги. – М.: Мир, 1999. – 558 с.
7. Шевелев А.С. Реакция «трансплантат против хозяина» и трансплантационная болезнь. – М.: Медицина, 1976. – 237 с.
8. Ярилин А.А., Донецкова А.Д. Естественные регуляторные Т-клетки и фактор FOXP3 // Иммунология. – 2006. – Т. 27, №3. – С. 176–188.
9. Baecher-Allan C., Brown J.A., Freeman G.J., Hafler D.A. CD4⁺CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood // J. Immunol. – 2001. – Vol. 167, №2. – P. 1245–1253.
10. Ball L.M., Egeler R.M. Acute GVHD: pathogenesis and classification // Bone marrow transplantation. – 2008. – Vol. 41, №2. – P. 58–64.
11. Buckner J. H. Mechanisms of impaired regulation by CD4⁺CD25⁺ FOXP3⁺ regulatory T cells in human autoimmune diseases // Nat. Rev. Immunol. – 2010. – Vol. 10, №12. – P. 849–859.
12. Chen X., Vodanovic-Jankovic S., Johnson B. et al. Absence of T-cell control of Th1 and Th17 cells is responsible for the autoimmune-mediated pathology in chronic graft-versus-host disease // Blood. – 2007. – Vol. 110, №10. – P. 3804–3813.
13. Hori S., Nomura T., Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3 // Science. – 2004. – Vol. 299, №5609. – P. 1057–1061.
14. Maloy K.J., Powrie F. Regulatory T cells in the control of immune pathology // Nat. Immunol. – 2001. – Vol. 2, №9. – P. 816–822.
15. McGeachy M.J., Stephens L.A., Anderton S.M. Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: Contribution of CD4⁺CD25⁺ regulatory cells within the central nervous system // J. Immunol. – 2005. – Vol. 175, №5. – P. 3025–3032.
16. Miura Yu., Thoburn C. J., Bright E.C. et al. Association of Foxp3 regulatory gene expression with graft-versus-host disease // Blood. – 2004. – Vol. 104, №7. – P. 2187–2193.
17. Sakaguchi S. Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses // Annu. Rev. Immunol. – 2004. – Vol. 22. – P. 531–562.
18. Sakaguchi S., Miyara M., Costantino C. M., Hafler D. A. FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system // Nat. Rev. Immunol. – 2010. – Vol. 10, № 7. – P. 490–500.
19. Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M. et al. Immunologic cell-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25) // J. Immunol. – 1995. – Vol. 155, №3. – P. 1151–1164.

4. Cryopreserved allogenic bone marrow which induced GVHD caused an increased level of *Foxp3* gene expression in T_{reg} if compared to a native one, which was apparently stipulated by a decrease in its immune reactivity and, as a result, in clinical manifestations of graft-versus-host disease.

References

1. Baecher-Allan C., Brown J.A., Freeman G.J., Hafler D.A. CD4⁺CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. J Immunol 2001; 167(2): 1245–1253.
2. Ball L.M., Egeler R.M. Acute GVHD: pathogenesis and classification. Bone Marrow Transplantation 2008; 41(2): 58–64.
3. Buckner J.H. Mechanisms of impaired regulation by CD4⁺CD25⁺ FOXP3⁺ regulatory T cells in human autoimmune diseases. Nat Rev Immunol; 2010; 10(12): 849–859.
4. Chen X., Vodanovic-Jankovic S., Johnson B. et al. Absence of T-cell control of Th1 and Th17 cells is responsible for the autoimmune-mediated pathology in chronic graft-versus-host disease. Blood 2007; 110(10): 3804–3813.
5. Goltsev A.N., Lutsenko E.D., Ostankova L.V. et al. Application of cryobiology in solving immune-conflict problems when grafting a histoincompatible bone marrow. Problems of Cryobiology 1996; (2): 3–10.
6. Goltsev A.N., Matsevitaya I.Yu., Lutsenko E.D. et al. On the modification of immunoreactivity of myelotransplant after cryopreservation. Problems of Cryobiology 2010; 20(2): 145–152.
7. Herrington C., McGee J., editors. Molecular clinical diagnostics. Methods. Moscow: Mir; 1999.
8. Hori S., Nomura T., Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. Science 2004; 299(5609): 1057–1061.
9. Korsunsky I.A., Rumyantsev A.G., Bykovskaya S.N. Role of regulatory T-cells of CD4⁺CD25⁺ and mesenchymal stem cells of bone marrow in suppressing graft-versus-host response. Onkogematologiya 2008; (3): 45–51.
10. Kozlov V.A., Yarilin A.A., Ametov A.S. et al. Natural regulator T-cells and bound with them cytokines under chronic autoimmune thyroiditis. Immunologiya 2008; (6): 357–361.
11. Maloy K.J., Powrie F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. Nat Immunol 2001; 2(9): 816–822.
12. Manko V.M., Petrov R.V. Transplantation and tissue engineering of hematopoietic stem cells. Factors controlling their functions. Allergologiya i Immunologiya 2008; 9(4): 413–427.
13. McGeachy M.J., Stephens L.A., Anderton S.M. Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: Contribution of CD4⁺CD25⁺ regulatory cells within the central nervous system. J Immunol 2005; 175(5): 3025–3032.
14. Miura Yu., Thoburn C. J., Bright E.C. et al. Association of Foxp3 regulatory gene expression with graft-versus-host disease. Blood 2004; 104(7): 2187–2193.
15. Sakaguchi S. Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. Ann Rev Immunol 2004; 22: 531–562.
16. Sakaguchi S., Miyara M., Costantino C. M., Hafler D. A. FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system. Nat Rev Immunol 2010; 10(7): 490–500.
17. Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M. et al. Immunologic cell-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25). J Immunol 1995; 155(3): 1151–1164.
18. Shevelev A.S. Graft-versus-host response and transplantation disease. Moscow: Meditsina; 1976.
19. Yarilin A.A., Donetskova A.D. Natural regulatory T cells and FOXP3 factor. Immunologiya 2006; 27(3): 176–188.

