

УДК 611.018.5:57.083.324

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

Состояние гена *gata2* в стволовых кроветворных клетках реципиентов с болезнью «трансплантат против хозяина», индуцированной аллогенным криоконсервированным материалом

UDC 611.018.5:57.083.324

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

State of *gata2* Gene in Hematopoietic Stem Cells of Recipients With Graft Versus Host Disease Induced by Cryopreserved Allogeneic Material

Реферат: Существенной проблемой трансплантации гистонесовместимого костного мозга (КМ) является развитие иммунного конфликта, который клинически манифестируется в виде болезни «трансплантат против хозяина» (БТПХ). На модели экспериментально индуцированной БТПХ изучено состояние кроветворной системы животных. Патологию индуцировали введением нативного или криоконсервированного аллогенного КМ совместно с клетками лимфоузлов. Определяли уровень экспрессии гена *gata2* в стволовых кроветворных клетках (СКК) КМ реципиентов с БТПХ. В работе использовали методы криоконсервирования, иммунофлуоресценции, ПЦР-анализа с этапом обратной транскрипции. Показано увеличение в клетках КМ уровня экспрессии гена *gata2*, отвечающего за самоподдержание СКК, на фоне изменения их субпопуляционного состава, что может приводить к снижению медуллярного кроветворения животных с БТПХ. В группе животных с БТПХ, индуцированной аллогенным криоконсервированным КМ с высоким уровнем экспрессии гена *gata2*, наблюдался низкий уровень медуллярного кроветворения. Данный факт подчеркивает значимость ингибирующего эффекта криоконсервирования в отношении функционального статуса СКК, выражающегося в данном случае снижением их дифференцировочного потенциала и восстановления медуллярного кроветворения. Проведенные исследования расширяют наше представление о механизмах развития БТПХ на клеточном и молекулярном уровнях, что может обосновать целесообразность направленного повышения эффективности лечения одной из форм аутоиммунных патологий.

Ключевые слова: болезнь «трансплантат против хозяина», стволовые кроветворные клетки, ген *gata2*.

Реферат: Істотною проблемою трансплантації гістонесумісного кісткового мозку (КМ) є розвиток імунного конфлікту, який клінічно маніфестується у вигляді хвороби «трансплантат проти хазяїна» (ХТПХ). На моделі експериментально індукованої ХТПХ було вивчено стан кровотвірної системи тварин. Патологію індукували введенням нативного або криоконсервованого алогенного КМ разом із клітинами лімфовузлів. Визначено рівень експресії гена *gata2* у стовбурових кровотвірних клітинах (СКК) КМ реципієнтів із ХТПХ. У роботі використовували методи криоконсервування, імунофлуоресценції, ПЛР-аналізу з етапом зворотної транскрипції. Показано збільшення у клітинах КМ експресії гена *gata2*, який відповідає за самопідтримку СКК, на тлі зміни їхнього субпопуляційного складу, що може приводити до зниження медулярного кровотворення тварин із ХТПХ. У групі тварин із ХТПХ, яку було індуковано криоконсервованим алогенним КМ із високим рівнем експресії гена *gata2*, спостерігався низький рівень медулярного кровотворення. Даний факт підкреслює значущість інгібуючого ефекту криоконсервування щодо функціонального статусу СКК, який виражається в даному випадку як зниження їх диференціального потенціалу та відновлення медулярного кровотворення. Проведені дослідження розширюють нашу уяву про механізми розвитку ХТПХ на клітинному й молекулярному рівнях, що може обґрунтувати доцільність спрямованого підвищення ефективності лікування однієї з форм аутоімунних патологій.

Ключові слова: хвороба «трансплантат проти хазяїна», стовбурові кровотвірні клітини, ген *gata2*.

Abstract: A significant problem of transplantation of histoincompatible bone marrow (BM) is the development of an immune conflict, which is clinically manifested as the graft-versus-host disease (GVHD). This paper concerns the state of hematopoietic system in animals under conditions of experimentally induced GVHD. The pathology was induced by introduction of either native or cryopreserved allogeneic BM jointly with lymph node cells. The rate of *gata2* gene expression was examined in hematopoietic stem cells (HSCs) of BMs from the recipients with GVHD. Methods of cryopreservation, immune fluorescence, and RT-PCR were used in the research. Bone marrow cells exhibited an increased expression of *gata2* gene, responsible for self-maintenance of HSCs, as well as changed subpopulation composition, that could lead to the reduction of the medullary haematopoiesis in GVHD animals. In the group of animals with GVHD, induced by allogeneic cryopreserved BM with a high level of *gata2* gene expression, a low rate of medullary haematopoiesis was found. This fact emphasizes the importance of inhibitory effect rendered by cryopreservation in terms of functional status of the HSCs, which is manifested in this case as the decrease of their differentiation potential and recovery of medullary haematopoiesis. The performed studies expand our understanding about the mechanisms of GVHD at cell and molecular levels, which may prove the expediency of the directed elevation of efficiency in the treatment of one of autoimmune pathologies.

Key words: graft-versus-host disease, hematopoietic stem cells, *gata2* gene.

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) 373-57-89, факс: (+38 057) 373-30-84,
электронная почта: cryopato@gmail.com

Поступила 30.09.2014
Принята в печать 12.11.2014

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2015. – Т. 25, №1. – С. 67–75.
© 2015 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

Department of Cryophysiology, 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 5789, fax: +380 57 373 3084,
e-mail: cryopato@gmail.com

Received September, 30, 2014
Accepted November, 12, 2014

Probl. Cryobiol. Cryomed. 2015. 25(1): 67–75.
© 2015 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

Неоднократно отмечалось, что применение аллогенной кроветворной ткани для лечения гематологических и онкологических заболеваний, иммунодефицитных состояний и других патологий вызывает развитие болезни «трансплантат против хозяина» (БТПХ) и сопровождается нарушением кроветворения на самых разных уровнях [3, 10, 12, 16]. В связи с этим очевидна актуальность исследований, направленных на расшифровку механизмов развития и предупреждения БТПХ [9, 12, 13]. Результаты наших предыдущих исследований продемонстрировали выраженное нарушение состояния Т-регуляторного звена иммунитета при развитии БТПХ [1]. Известно, что Т-лимфоциты, кроме реализации сугубо иммунного потенциала, имеют широкий спектр регуляторной активности в отношении гемопоэтической системы [6]. Поэтому представляло интерес определить популяционный состав кроветворных клеток стволового компартмента, а также уровень экспрессии генов, контролирующих кроветворение реципиентов с БТПХ. Данные исследования могут дать дополнительную информацию для понимания механизмов развития этой патологии. Известно, что *gata2* является транскрипционным фактором, который экспрессируется в стволовых кроветворных клетках (СКК) и их предшественниках [11, 15]. Важность функционирования гена *gata2* подтверждается тем, что его целенаправленная инактивация приводит к летальному исходу [15]. Установлено, что вследствие повышения экспрессии гена *gata2* происходит ингибирование G_0 -фазы клеточного цикла СКК, а также их предшественников *in vitro* и *in vivo* [14]. Весьма интересным представляется исследование состояния этого гена на фоне развития БТПХ.

Во многоступенчатом процессе аппликации клеток костного мозга (КМ) в клинической практике обязательным компонентом является их криоконсервирование, которое позволяет долговременно хранить биоматериал в условиях низкотемпературных банков и использовать его по мере востребованности. Ранее нами было получено экспериментальное подтверждение возможности снижения тяжести протекания БТПХ путем применения криоконсервированного аллогенного КМ [2]. В данном случае элиминация определенных субпопуляций клеток аллогенного КМ, наблюдаемая после криоконсервирования, может рассматриваться как позитивный момент, обуславливая минимизацию проявления его иммунореактивности. Оценка гемопоэтической системы реципиента с БТПХ на клеточном и молекулярном уровнях позволит расширить наше представление о механизмах развития этой патологии.

There is a widespread opinion that the use of allogeneic hematopoietic tissue to treat hematological and oncological diseases, immunodeficient states and other pathologies causes the development of graft-versus-host disease (GVHD) and could be accompanied with impaired haematopoiesis of different depth [4, 8, 11, 16]. Therefore the relevance of studies targeted to elucidation of the mechanisms of developing and preventing GVHD is evident [1, 11, 12]. The results of our previous studies have shown the marked impairment of T-regulatory immunity link under GVHD development [2]. In addition to their direct immune function T lymphocytes are known as possessing a wide range of regulatory activities in respect of hematopoietic system [10]. Therefore, it was of interest to examine the population of hematopoietic stem cells, as well as the rate of genes expression, controlling the hematopoiesis of the recipients with GVHD. These studies may provide an additional information for understanding the mechanisms of this pathology development. It is known, that *gata2* is a transcription factor, expressed in hematopoietic stem cells (HSCs) and their progenitors [9, 15]. The importance of *gata2* gene functioning is confirmed by the fact that its targeted inactivation leads to a lethal outcome [15]. It has been established that an increase of the *gata2* gene expression resulted in an inhibition of G_0 -phase of the HSCs cell cycle, as well as their progenitors *in vitro* and *in vivo* [14]. Of interest could be the investigation of this gene functioning on the background of GVHD development.

Multi-stage process of bone marrow (BM) cells application in clinical practice includes the cryopreservation as a mandatory step, allowing the storage of the biospecimen for a long time at low-temperature banks and their use on demand. We have previously confirmed experimentally the possibility of reducing the severity of GVHD proceeding by applying the cryopreserved allogeneic BM [3]. In this case the elimination of certain cell subpopulations in allogeneic BM after cryopreservation could be regarded as a positive moment, stipulating the minimal manifestation of its immune reactivity. Evaluation of the hematopoietic system of GVHD recipient at the cell and molecular levels would enhance our understanding about the mechanisms of this pathology.

The research aim was to determine the *gata2* gene expression rate in hematopoietic stem cells of bone marrow of the recipients with the graft-versus-host disease, induced by the introduction of cryopreserved allogeneic material with lymphocyte cells.

Materials and methods

The experiments were performed in CBA/H and (CBA/H×C57Bl)F1 mice weighing 24–26 g. The studies



Цель работы – определить уровень экспрессии гена *gata2* в стволовых кровяных клетках костного мозга реципиентов с болезнью «трансплантат против хозяина», индуцированной введением криоконсервированного аллогенного материала с клетками лимфоцитов.

Материалы и методы

Эксперименты выполняли на мышах линии СВА/Н и (СВА/Н×С57В1) F1 массой 24–26 г. Исследования проводили в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными 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).

Клетки КМ вымывали из бедренных костей, паховые лимфоузлы дезинтегрировали в гомогенизаторе Поттера в среде 199 (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов, Россия) с добавлением 10%-й эмбриональной телячьей сыворотки («БиолоТ», Россия) и 2%-го цитрата натрия (далее в тексте – рабочая среда).

Раствор для криоконсервирования КМ представлял собой рабочую среду с 20% ДМСО («Артериум», Украина). К полученной на рабочей среде суспензии клеток КМ по каплям добавляли раствор для криоконсервирования в соотношении 1:1 при температуре 22°C на протяжении 2–3 мин (конечная концентрация криопротектора составила 10%). Экспозицию клеток в растворе проводили в течение 10 мин при той же температуре. Охлаждение суспензии клеток КМ осуществляли на программном замораживателе УОП-6 (СКТБ с ОП ИПКиК НАН Украины, Харьков) по двухэтапной программе со скоростью 1 град/мин до –25°C и последующим погружением в жидкий азот (–196°C) [2]. Суспензию клеток КМ объемом 1,8 мл с концентрацией 5×10^6 кл/мл замораживали в пластиковых ампулах («Nunc», Германия). Образцы отогревали на водяной бане при температуре 40...41°C до исчезновения твердой фазы. Клетки однократно отмывали от ДМСО путем медленного добавления двойного объема рабочей среды и последующего 10-минутного центрифугирования (200g). Осадок разбавляли свежей порцией рабочей среды и подсчитывали содержание ядро-содержащих клеток. Суспензию клеток КМ, не подвергавшуюся процедуре замораживания-отогрева, далее будем называть нативной.

Реципиентами КМ были мыши (СВА/Н×С57В1)F1, облученные на установке РУМ-17 («Мосрентген», Россия) в дозе 850 Р, которым внутривенно вводили 5×10^6 /мышь нативных или

were carried out in accordance with General Principles of Experiments in Animals approved by the 5th National Congress in Bioethics (Kiev, 2013) and coordinated with the statements of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

Bone marrow cells were washed-out from the femurs, the inguinal lymph nodes were disintegrated in Potter's homogenizer in medium 199 (Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis of Russian Academy of Medical Sciences, Russia) supplemented with 10% fetal bovine serum (BioloT, Russia) and 2% sodium citrate (hereinafter the handling medium).

The solution for BM cryopreservation was a handling medium with 20% DMSO (Arterium, Ukraine). Suspension of BM cells in handling medium was dropwise mixed with the solution for cryopreservation in 1: 1 ratio at 22°C during 2–3 min (final cryoprotectant concentration was 10%). The cells were then exposed to the solution for 10 min at the stated temperature. The cell suspension was cooled with UOP-6 programmable freezer (Special Designing Technical Bureau with Experimental Unit of the IPC&C NAS of Ukraine) according to two-stage program with a rate of 1 deg/min down to –25°C and following immersion into liquid nitrogen (–196°C) [3]. The BM cell suspension of 1.8 ml and concentration of 5×10^6 cells/ml was frozen in plastic vials (Nunc, Germany). The samples were warmed in a water bath at 40...41°C up to the disappearance of solid phase. Cells were once washed of DMSO by slow adding of a double volume of handling medium and subsequent 10-min-long centrifugation (200g). The sediment was then diluted with a fresh portion of the handling medium and the content of nucleated cells was counted. The BM cell suspension, not subjected to freezing and thawing, would be defined hereinafter as native. Bone marrow recipients were (СВА/Н×С57В1)F1 mice, irradiated with RUM-17 (Mosrentgen, Russia) at a dose of 850 R, and then intravenously injected with 5×10^6 /mouse either native or cryopreserved BM cells (СВА/Н) with lymph node (LN) cells in 3: 1 ratio, respectively [5]. The irradiation conditions were as follows: 38.6 R/min dose rate, 220 kV voltage, 10 mA current, 0.5 mm Cu + 1 mm Al filters, 50 cm focal-dorsal length.

The GVHD intensity was evaluated to the day 14 according to the spleen index (SI), state of medullary hematopoiesis, content of HSCs and survival of the recipients. Previous studies have shown the true development of pathology in this model to the day 14 in terms of clinical and laboratory indices [5]. The SI was calculated as the ratio of the weights of spleen and entire body of the animals. In intact animals the SI



криоконсервированных клеток КМ (СВА/Н) с клетками лимфоузлов (ЛУ) в соотношении 3:1 соответственно [4]. 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.

Интенсивность развития БТПХ оценивали на 14-е сутки по индексу селезенки, состоянию медуллярного кроветворения, содержанию СКК и выживаемости реципиентов. В ранее проведенных исследованиях показано развитие патологии в данной модели к 14-м суткам по клиническим и лабораторным показателям [4]. Индекс селезенки (ИС) рассчитывали как соотношение массы органа к массе тела животных. У интактных животных ИС принимали за 1, показатель более 1,3 указывал на развитие БТПХ [8, 9].

Животные были разделены на следующие группы: 1 – интактные животные (интактный контроль); 2 – мыши, которым вводили сингенный КМ (сингенный контроль); 3 – мыши, у которых индуцировали БТПХ введением аллогенного нативного КМ совместно с клетками лимфоузлов – БТПХ (нКМ + ЛУ); 4 – мыши, у которых индуцировали БТПХ введением аллогенного криоконсервированного КМ совместно с клетками лимфоузлов – БТПХ (кКМ + ЛУ).

Содержание CD34⁺CD38⁻ и CD117⁺-клеток в КМ животных с БТПХ оценивали на проточном цитофлуориметре «FACS Calibur» («Becton Dickinson», США), используя моноклональные антимышинные антитела CD117 (FITC), CD34 (PE), CD38 (FITC) («BD Biosciences», США; «Abcam», Великобритания) согласно инструкции производителя. Статистический учет данных, полученных цитофлуориметрическим анализом, осуществляли с помощью программы «WinMDI 2.8.» (J. Trotter).

Для оценки скорости восстановления медуллярного кроветворения нами был введен такой показатель, как индекс дифференцировки СКК, представляющий собой соотношение содержания менее потенциальных СКК (CD117⁺) к более потенциальным (CD34⁺CD38⁻).

Фракцию СКК получали из КМ мышей методом позитивной селекции с применением магнитного сортера («BD Imagnet™», США) и CD117 «MicroBeads» («Miltenyi Biotec», США) согласно протоколу производителя.

Содержание транскриптов гена *gata2* в выделенной CD117⁺-фракции КМ животных всех групп определяли с помощью ПЦР-анализа с этапом обратной транскрипции (ОТ-ПЦР) [7]. Для выделения нуклеиновых кислот из 1×10⁵ кл использовали набор «Diatom RNA Prep 100» («Isogene Lab», Россия), содержащий лизирующий реагент – гуани-

was assumed as 1, the index of more than 1.3 indicated the GVHD development [1, 13].

The animals were divided into the following groups: group 1 comprised intact animals (intact control); group 2 were the mice injected with syngeneic BM (syngeneic control); group 3 consisted of the mice with GVHD, induced by introduction of allogeneic native BM with lymph node cells – GVHD (nBM + LN); group 4 was the mice with GVHD, induced by introduction of cryopreserved allogeneic BM with lymph node cells – GVHD (cBM + LN).

The content of CD34⁺CD38⁻ and CD117⁺ cells in the BM of animals with GVHD was evaluated with flow cytometer FACS Calibur (Becton Dickinson, USA) using the monoclonal anti-mouse antibodies CD117 (FITC), CD34 (PE), CD38 (F²TC) (BD Biosciences, USA; Abcam, UK) according to the manufacturers' instructions. The data of flow cytometric analysis were statistically processed using the WinMDI 2.8 software (J. Trotter).

To estimate the recovery rate of medullary hematopoiesis we introduced the differentiation index of HSCs, which was the ratio of the content of less potent HSCs (CD117⁺) to more potent ones (CD34⁺CD38⁻).

HSCs fraction was derived from the mice by positive selection using magnetic sorter (BD Imagnet™, USA) and CD117 MicroBeads (Miltenyi Biotec, USA) according to the manufacturers' protocols.

The contents of *gata2* gene transcripts in isolated CD117⁺ BM fraction of the animals of all the groups were determined by PCR with a reverse transcription (RT-PCR) [7]. The nucleic acids from 1×10⁵ cells were isolated using the Diatom RNA Prep 100 kit (Isogene Lab, Russia) containing guanidine thiocyanate lysis buffer. The RT-PCR was performed with a set of random-oligonucleotides and revertase (M-Mlv) according to the manufacturer's instructions (Reverta L, Russia). The primers of the studied genes: *gata2* (NM_008324.1, fragment length of 342 pn) and *beta actin* (NM_007393.3, fragment length of 113 pn) were developed on the basis of the GenBank database (NCBI BLAST, USA) and synthesized at the JSC Medbioservis (Ukraine).

DNA fragments were amplified in Tertsik incubator (JSC SPC DNA Technology, Russia). Denaturation was carried-out at 94°C for 30 seconds, the matrix hybridization was made with a primer at 60°C for 30 seconds and elongation at 72°C for 60 seconds. After PCR finishing the elongation was performed at 72°C for 5 min. The number of cycles for *gata2* gene was 40 and 20 for *beta actin*. The detection of amplification products and comparative assessment of their amount were done with capillary electrophoresis chip bioanalyzer Agilent 2100 (Agilent Technologies, USA), basing on a relative semi-quantitative scoring. The chips were



динтиоцианат. Для проведения ОТ-ПЦР использовали комплект random-олигонуклеотидов и ревертазы (M-Mlv) согласно инструкции фирмы-производителя «Реверта L» (Россия). Праймеры исследуемых генов: *gata2* (NM_008324.1 (длина фрагмента 342 п.н.) и *beta actin* (NM_007393.3 (длина фрагмента 113 п.н.) были сконструированы на основе базы данных «GenBank» (NCBI BLAST, США) и синтезированы в АОЗТ «Медбиосервис» (Украина).

Аmplификацию фрагментов ДНК осуществляли в термостате «Терцик» (ЗАО «НВФ ДНК-технология», Россия). Денатурацию проводили 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 осуществляли элонгацию при 72°C в течение 5 мин. Количество циклов для гена *gata2* – 40, для *beta actin* – 20. Детекцию и сравнение количества продуктов амплификации выполняли методом капиллярного электрофореза в чип-анализаторе «Agilent 2100» («Agilent Technologies», США) на основе относительной полуколичественной оценки. Подготовку чипов осуществляли согласно инструкции набора «ДНК 1000» («Fermentas», Литва).

Результаты нормировали по отношению к показателю экспрессии гена «домашнего хозяйства» *beta actin*.

Полученные данные статистически обрабатывали по методу Стьюдента с применением компьютерной программы «Excel» («Microsoft», США). Данные приведены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Одним из критериев развития БТПХ является спленомегалия, наличие которой в организме реципиента можно констатировать по индексу селезенки (ИС). Так, у реципиентов сингенного КМ (группа 2) ИС значимо не отличался от интактного контроля (группа 1), в то время, как у реципиентов аллогенного нативного материала (группа 3) он был в 1,7 раза выше (таблица). Вводимый аллогенный криоконсервированный материал (группа 4) вызывал меньшее по сравнению с группой 2 увеличение ИС, поскольку в процессе замораживания снижается иммунореактивность аллогенного КМ [3]. Тем не менее ИС у животных этой группы увеличивался в 1,5 раза по сравнению с интактным контролем, что также свидетельствует о развитии БТПХ. Следует отметить, что величина ИС, как и выживаемость животных, определяется степенью тяжести патологии [1, 2, 16]. Действительно, выживаемость реципиентов четко коррелировала с показателями

prepared according to the manufacturer's instructions using the DNA 1000 chip kit (Fermentas, Lithuania).

The results were normalized by values of 'house-keeping' *beta actin* gene expression.

The obtained data were statistically processed by the Student's test using the Excel software (Microsoft, USA). Data are presented as a mean \pm standard deviation. Differences would be considered as statistically significant at $p < 0.05$.

Results and discussion

One of the criteria of the GVHD development is splenomegaly, which could be discovered in an organisms using so-called spleen index (SI). In particular, the recipients of syngeneic BM (Group 2) had the SI not differing significantly from intact control (group 1), whereas the recipients of allogeneic native material (group 3) got 1.7 times higher value (Table). The introduced allogeneic cryopreserved material (group 4) caused less increase of SI in comparison with group 2, due to a known reduction of immune reactivity of allogeneic BM post-thaw [3]. Nevertheless, the SI in the animals of this group increased 1.5 times if compared with non-treated control, which also confirmed the GVHD development. It should be noted that the SI value as well as survival of the animals could be determined by the disease severity [1, 2, 16]. Actually, the survival of recipients was clearly coincided with the SI indices (see Table). For example, lower SI index in group 4 if compared to group 3 was correlated with higher survival rate of the animals. Introduction of syngeneic BM to irradiated recipients (group 2) did not cause the GVHD development, in terms of survival and SI values, which did not statistically and significantly differ from the untreated control (Table).

The results of assessment of medullary hematopoiesis (*i. e.* the number of cells per femur) in the BM recipients show a decrease of this index in all the experimental groups. In particular, when the syngeneic BM was administered (group 2), this index dropped down by 23% if compared with the untreated control (group 1). In the recipients of allogeneic BM (groups 3 and 4) a more pronounced BM hypoplasia was found if compared with syngeneic and especially untreated controls.

On this background there was a change in the content of the BM stem cells with CD34⁺CD38⁻ phenotype, associated mainly with linearly non-committed pluripotent HSCs. The cells expressing the CD117 marker are referred to the stem and their committed progenitors [6, 17]. To the day 14 after introduction of syngeneic BM (group 2) the content of both subpopulations of HSCs (CD117⁺ and CD34⁺ CD38⁻) increased if compared with the untreated control (Fig. 1). In the animals of groups 3 and 4 the content



ИС (таблица). Так, более низкий показатель ИС в группе 4 по сравнению с группой 3 коррелировал с большей выживаемостью животных. Введение облученным реципиентам сингенного КМ (группа 2) не вызывало развития БТПХ, судя по показателю выживаемости и ИС, которые значимо не отличались от интактного контроля (таблица).

Результаты оценки состояния медуллярного кроветворения, а именно количества клеток на бедро, у реципиентов КМ, свидетельствуют о снижении этого показателя во всех опытных группах. Так, при введении сингенного КМ (группа 2) данный показатель снижался на 23% по сравнению с интактным контролем (группа 1). У реципиентов аллогенного КМ (группы 3 и 4) наблюдалась более выраженная гипоплазия КМ по сравнению с сингенным и тем более интактным контролем.

На этом фоне изменялось содержание клеток стволового компартмента КМ с фенотипом CD34⁺CD38⁻, ассоциированным в основном с полипотентными линейно некоммутированными СКК. Клетки, экспрессирующие CD117-маркер, относятся к стволовым и их коммутированным предшественникам [5, 17]. На 14-е сутки после введения сингенного КМ (группа 2) содержание обеих субпопуляций СКК (CD117⁺ и CD34⁺CD38⁻) увеличивалось по сравнению с интактным контролем (рис. 1). У животных групп 3 и 4 содержание CD117⁺-клеток снижалось по сравнению с сингенным контролем в 1,4 и 2,5 раза соответственно, что, по-видимому, связано с недостатком медуллярного кроветворения. Содержание же более потенциальных СКК – CD34⁺CD38⁻-клеток было значимо ниже по сравнению с сингенным контролем только у животных группы 4.

В настоящее время накоплено большое количество данных, подчеркивающих значимость отдельных субпопуляций СКК в скорости восстановления кроветворения и их содержания в регенерирующем КМ [5]. В связи с этим нами был введен такой показатель, как индекс дифференцировки СКК, представляющий собой соотношение содержания менее потенциальных СКК (CD117⁺) к более потенциальным (CD34⁺CD38⁻). На рис. 2 видно снижение значения индекса дифференцировки по сравнению с сингенным и еще большее с интактным контролями в обеих группах животных с БТПХ. Данный факт свидетельствует о перераспределении кон-

Показатели развития БТПХ, 14-е сутки ($M \pm m, n = 5$)
GVHD development indices, day 14 ($M \pm m, n = 5$)

Показатель Index	Группа животных Group of animals			
	1	2	3	4
Индекс селезенки, усл. ед. Spleen index, arb. units	1,00 ± 0,09	1,10 ± 0,10	1,7 ± 0,11**	1,5 ± 0,9**
Количество клеток КМ на бедро, ×10 ⁶ Number of BM cells per femur, ×10 ⁶	9,54 ± 0,76	7,30 ± 0,58	4,01 ± 0,52**	2,77 ± 0,18**
Выживаемость, % Survival, %	100 ± 8,00	88,00 ± 6,88	63,34 ± 5,06**	70,27 ± 6,26**

Примечание: различия статистически значимы по сравнению с интактным (*) и сингенным (#) контролем, $p \leq 0,05$.

Note: differences are statically significant if compared with intact (*) and syngeneic (#) controls, $p \leq 0.05$.

of CD117⁺ cells decreased if compared with syngeneic control by 1.4 and 2.5 times, respectively, which was apparently due to the lack of medullary hematopoiesis. The content of more potent HSCs, *i. e.* CD34⁺CD38⁻ cells, was significantly reduced only in group 4 animals, if compared with syngeneic control.

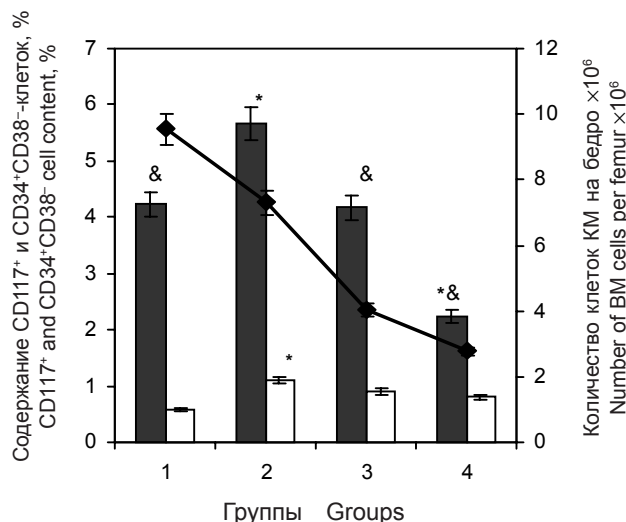


Рис. 1. Содержание клеток CD117⁺ и CD34⁺CD38⁻ в КМ животных до и после индукции БТПХ: ■ – CD117⁺-клетки; □ – CD34⁺CD38⁻-клетки; — – количество клеток КМ/бедро, ×10⁶; различия статистически значимы по сравнению с интактным (*) и сингенным (&) контролем ($p < 0,05$).

Fig. 1. Content of CD117⁺ and CD34⁺CD38⁻ cells in the BM animals prior to and after GVHD induction: ■ – CD117⁺ cells; □ – CD34⁺CD38⁻ cells, — – number of BM cells/femur, ×10⁶; differences are statistically significant if compared with intact (*) and syngeneic (&) controls ($p < 0.05$).



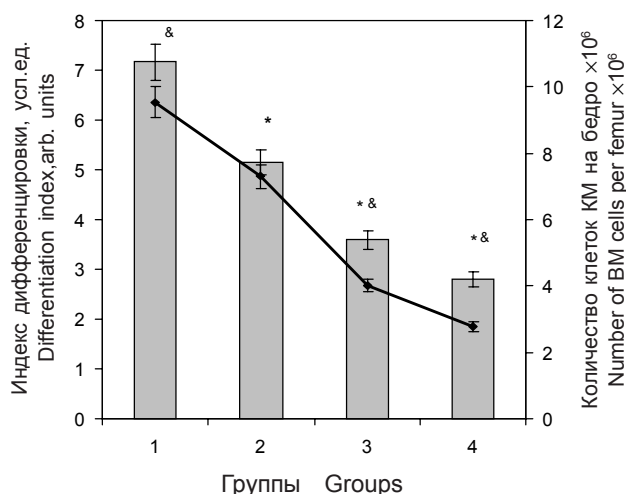


Рис. 2. Индекс дифференцировки СКК (CD117⁺/CD34⁺CD38⁻): □ – индекс дифференцировки СКК, — – количество клеток в КМ/бедро, ×10⁶; различия статистически значимы по сравнению с интактным (*) и сингенным (&) контролем ($p < 0,05$).

Fig. 2. Index of HSCs differentiation (CD117⁺/CD34⁺CD38⁻): □ – index of HSCs differentiation, — – number of cells in BM/femur, ×10⁶; differences are statistically significant if compared with intact (*) and syngeneic (&) controls ($p < 0.05$).

центрации исследуемых субпопуляций СКК в сторону более потенциальных (CD34⁺CD38⁻-клеток), что может быть причиной гипоплазии КМ. Вероятно, именно этот индекс, являясь критерием оценки медуллярного кроветворения, свидетельствует об ингибировании дифференцировки СКК и их неспособности компенсировать гипоплазию КМ у реципиентов с БТПХ. Тот факт, что у животных группы 4 индекс дифференцировки был ниже, чем у группы 3, а также отмечалось более выраженное снижение медуллярного кроветворения, свидетельствует об изменении функционального состояния КМ после криоконсервирования.

Таким образом, на 14-е сутки развития БТПХ, индуцированной аллогенным нативным или криоконсервированным КМ, подтвержденной увеличением ИС, наблюдалось ингибирование медуллярного кроветворения со снижением в КМ количества СКК, что может обуславливать прогрессирующую гибель животных к этому сроку.

Исследование уровня экспрессии гена *gata2* в кроветворных предшественниках стволового компартмента КМ реципиентов с БТПХ может дать дополнительную информацию для понимания механизмов развития данной патологии. Нами был проведен анализ уровня экспрессии гена *gata2* во фракции CD117⁺-клеток, выделенной из КМ реципиентов с БТПХ методом иммуномагнитного сортирования.

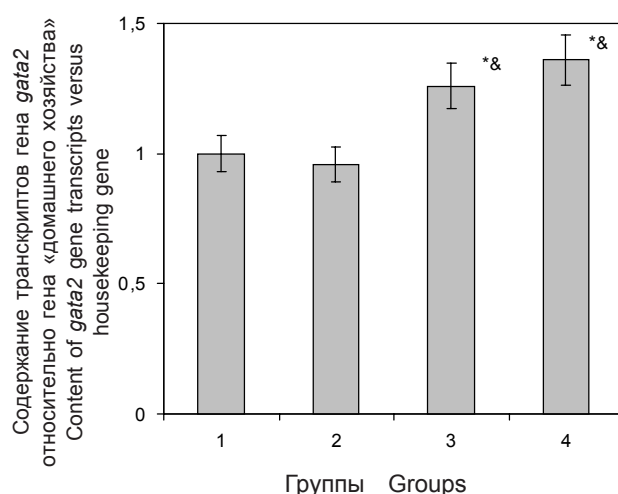


Рис. 3. Содержание транскриптов гена *gata2* в CD117⁺-фракции КМ у животных до и после индукции БТПХ; различия статистически значимы по сравнению с интактным (*) и сингенным (&) контролем ($p < 0,05$).

Fig. 3. Content of *gata2* gene transcripts in CD117⁺ fraction of BM in the animals prior to and after the GVHD induction; differences are statistically significant if compared with intact (*) and syngeneic (&) controls ($p < 0.05$).

To date there are numerous data emphasizing the significance of certain subpopulations of HSCs for the hematopoiesis recovery rate and their content in regenerating BM [6]. In this regard we have introduced the HSC differentiation index, being the ratio of the content of less potent HSCs (CD117⁺) to more potent ones (CD34⁺CD38⁻). Fig. 2 shows a decreased value of the differentiation index in both groups of the animals with GVHD if compared with syngeneic and even more with the untreated control. This fact testifies to the redistribution in the studied subpopulations of HSCs towards more potent (CD34⁺CD38⁻ cells), which may be the cause of BM hypoplasia. This index could be definitely the criterion for assessing the medullary hematopoiesis, and it likely points to the inhibition of HSCs differentiation and their inability to compensate BM hypoplasia of the recipients with GVHD. The fact that the differentiation index in the animals of group 4 was lower than in group 3 as well as the noted pronounced reduction in medullary hematopoiesis testifies to the change in functional state of post-thaw BM.

Thus, to the day 14 of GVHD development induced by either native or cryopreserved allogeneic BM, confirmed with an increased SI, an inhibition of medullary hematopoiesis was observed with a reduced amount of HSCs in BM that could be associated with a progressing death of the animals to this term.

Study of *gata2* gene expression rate in BM hematopoietic progenitors of the recipients with GVHD can

Как видно из рис. 3, при развитии БТПХ, вне зависимости от того нативным или криоконсервированным КМ была индуцирована патология, наблюдалось увеличение в сравнении с обоими контролями уровня экспрессии гена *gata2*. A.J. Tipping и соавт. [14] показали, что увеличение экспрессии гена *gata2* в гемопоэтических клетках мышей и человека сопровождается снижением экспрессии таких регуляторов клеточного цикла, как CCND3, CDK4 и CDK6, что, в свою очередь, выражалось угнетением кроветворения в целом. Наши данные по оценке медуллярного кроветворения у животных с БТПХ находятся в соответствии с данными этих исследователей (таблица). Хотя значимых различий в уровне экспрессии гена *gata2* между группами 3 и 4 выявлено не было, тем не менее максимальная его экспрессия отмечена после введения криоконсервированного КМ (группа 4). Самое низкое содержание клеток КМ на бедро ($2,77 \pm 0,18$) наблюдалось именно в этой группе. Данный факт подчеркивает значимость ингибирующего эффекта криоконсервирования в отношении функционального статуса кроветворных предшественников КМ, выражающегося в данном случае в ограничении их дифференцировочного потенциала и замедлении процесса восстановления медуллярного кроветворения. Однако именно у животных группы 4 клинические признаки патологии (ИС и выживаемость) были менее выражены, чем у группы 3. Таким образом, результаты данного исследования свидетельствуют о снижении иммунореактивности аллогенного КМ после криоконсервирования, причиной чего может быть изменение функции гена *gata2*.

Выводы

Проведенные исследования расширяют наше представление о механизмах развития БТПХ на клеточном и молекулярном уровнях, что может обосновать целесообразность направленного повышения эффективности лечения БТПХ.

Продемонстрировано, что при введении реципиентам аллогенного нативного или криоконсервированного КМ с клетками лимфоузлов к 14-м суткам наблюдается увеличение ИС, снижение медуллярного кроветворения и количества СКК в КМ животных и их прогрессирующая гибель, что является свидетельством развития БТПХ у животных к этому сроку.

Показано увеличение содержания транскриптов гена *gata2* в СКК у животных с БТПХ, что приводит к снижению медуллярного кроветворения.

В группе животных с БТПХ, индуцированной аллогенным криоконсервированным КМ с высоким уровнем экспрессии гена *gata2* по сравнению с интактным контролем, наблюдалось самое низкое

provide an additional information for understanding the mechanisms of this disease. We have analyzed the *gata2* gene expression rate in the fraction of CD117⁺ cells isolated from BM of the recipients with GVHD by immune magnetic sorting.

Fig. 3 shows an increase in *gata2* gene expression rate if compared with both controls observed during the GVHD development independently whether native or cryopreserved BM was used to induce the pathology. A.J. Tipping *et al.* [14] demonstrated that an increase in *gata2* gene expression in hematopoietic cells of mice and humans was accompanied by a decrease in expression of such cell cycle regulators as CCND3, CDK4 and CDK6, which in turn led to myelosuppression in general. These observations are in accordance with our data on evaluation of medullary hematopoiesis in the animals with GVHD (Table). Although no significant differences in *gata2* gene expression rates between groups 3 and 4 were found, its maximal expression was found after administration of cryopreserved BM (group 4). The lowest content of the BM cells per femur (2.77 ± 0.18) was observed in this group. This fact emphasizes the importance of inhibitory effect of cryopreservation in respect of the functional status of hematopoietic BM progenitors, which is expressed in limiting their differentiation potential and slowing down the recovery of medullary hematopoiesis. However, especially in the animals of group 4 the clinical signs of pathology (SI and survival) were less pronounced than in group 3. Thus, the results of this study demonstrate a decreased immune reactivity of allogeneic BM after cryopreservation, and that this could be caused by the changes in *gata2* gene function.

Conclusions

The performed studies expand our understanding about the mechanisms of GVHD development at cell and molecular levels, that may prove the expediency of the directed rise in the efficiency of GVHD treatment.

It was demonstrated that introduction of allogeneic native or cryopreserved BM mixed with lymph node cells to the recipients resulted in an increase of SI to the 14th day, as well as reduction of medullary hematopoiesis and number of HSCs in BM of the animals and their progressing death, and which was the evidence of developed GVHD in the animals by this term.

An increase was shown in the content of *gata2* gene transcripts in HSCs of the animals with GVHD, leading to the reduction of medullary hematopoiesis.

In the group of animals with GVHD, induced with allogeneic cryopreserved BM with a high rate of *gata2* gene expression if compared with untreated control, the lowest medullary hematopoiesis recovery was observed, indicating the inhibited differentiation potential of HSCs.



восстановление медуллярного кроветворения, что свидетельствует об ингибировании дифференцировочного потенциала СКК.

Литература

1. Гольцев А.Н., Дубрава Т.Г., Гаевская Ю.А. и др. Значение экспрессии гена foxp3 в Т-регуляторных клетках в патогенезе болезни «трансплантат против хозяина» индуцированной криоконсервированным аллогенным материалом // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2014. – Т. 24, №4. – С. 322–331.
2. Гольцев А.Н., Луценко Е.Д., Останкова Л.В. и др. Возможности криобиологии в решении иммуноконфликтных проблем при пересадке гистонесовместимого костного мозга // Проблемы криобиологии. – 1996. – №2. – С. 3–10.
3. 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.
4. Гольцев А.Н., Останкова Л.В., Дубрава Т.Г. и др. Криоконсервирование как фактор модификации структурно-функционального состояния и механизма реализации лечебного эффекта клеток стволового компартмента в условиях развития патологий аутоиммунного генеза // Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины / Под. ред. А.Н. Гольцева. – Харьков, 2012. – С. 551–563.
5. Гривцова Л.Ю., Тупицын Н.Н. Субпопуляции трансплантируемых стволовых кроветворных клеток // Современная онкология. – 2006. – Т. 8, №1. – С. 1–16.
6. Манько В.М., Петров Р.В. Трансплантология и тканевая инженерия кроветворных стволовых клеток. Факторы, контролируемые их функции // Аллергология и иммунология. – 2008. – Т. 9, №4. – С. 413–427.
7. Молекулярная клиническая диагностика. Методы: Пер. с англ. / Под ред. С. Херрингтона, Дж. Макги. – М.: Мир, 1999. – 558 с.
8. Шевелев А.С. Реакция «трансплантат против хозяина» и трансплантационная болезнь. – М.: Медицина, 1976. – 237 с.
9. Ball L.M., Egeler R.M. Acute GVHD: pathogenesis and classification // Bone marrow transplantation. – 2008. – Vol. 41, №2. – P. 58–64.
10. Ikehara S. A new concept of stem cell disorders and their new therapy // J. Hematother. Stem Cell Res. – 2003. – Vol. 12, №6. – P. 643–653.
11. Ling K.W., Ottersbach K., Hamburg J.P. GATA-2 plays two functionally distinct roles during the ontogeny of hematopoietic stem cells // JEM. – 2004. – Vol. 200, №7. – P. 871–882.
12. Pidala J. Graft-vs-host disease following allogeneic hematopoietic cell transplantation // Cancer Control. – 2011. – Vol. 18, №4. – P. 268–276.
13. Qian L., Wu Z., Shen J. Advances in the treatment of acute graft-versus-host disease // J. Cell. Mol. Med. – 2013. – Vol. 17, №8. – P. 966–975.
14. Tipping A.J., Pina C., Castor A. et al. High GATA-2 expression inhibits human hematopoietic stem and progenitor cell function by effects on cell cycle // Blood. – 2009. – Vol. 113, №12. – P. 2661–2672.
15. Tsai F.Y., Orkin S.H. Transcription factor GATA-2 is required for proliferation/survival of early hematopoietic cells and mast cell formation, but not for erythroid and myeloid terminal differentiation // Blood. – 1997. – Vol. 89, №10. – P. 3636–3626.
16. Van Dijken P.J., Wimperis J., Crawford J.M., Ferrara J.L.M. Effect of graft-versus-host disease on hematopoiesis after bone marrow transplantation in mice // Blood. – 1991. – Vol. 78, №10. – P. 2773–2779.
17. Zipori D. The renewal and differentiation of hematopoietic stem cells // FASEB Journal. – 1992. – №6. – P. 2691–2697.

References

1. Ball L.M., Egeler R.M. Acute GVHD: pathogenesis and classification. Bone marrow transplantation 2008; 41(2): 58–64.
2. Goltsev A.N., Dubrava T.G., Gayevskaya Yu.A. et al. Foxp3 gene expression value in regulatory T cells in pathogenesis of graft-versus-host disease induced with cryopreserved allogeneic material // Problems of Cryobiology and Cryomedicine 2014; 24(4): 322–331.
3. 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.
4. 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.
5. Goltsev A.N., Ostankova L.V., Dubrava T.G. et al. Cryopreservation as the factor of modifying structural and functional state and implementation mechanism of therapeutic effect of stem compartment cells under development of pathologies of autoimmune genesis. In: A.N. Goltsev, editor. Current problems of cryobiology and cryomedicine. Kharkov, 2012. p. 551–563.
6. Grivtsova L.Yu., Tupitsyn N.N. Subpopulations of hematopoietic stem cells to be transplanted. Sovremennaya Onkologiya 2006; 8(1): 1–16.
7. Herrington C., McGee J., editors. Molecular clinical diagnostics. Methods. Moscow: Mir; 1999.
8. Ikehara S. A new concept of stem cell disorders and their new therapy. J. Hematother. Stem Cell Res 2003; 12(6): 643–653.
9. Ling K.W., Ottersbach K., Hamburg J.P. GATA-2 plays two functionally distinct roles during the ontogeny of hematopoietic stem cells. JEM 2004; 200(7): 871–882.
10. 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.
11. Pidala J. Graft-vs-host disease following allogeneic hematopoietic cell transplantation. Cancer Control 2011; 18(4): 268–276.
12. Qian L., Wu Z., Shen J. Advances in the treatment of acute graft-versus-host disease. J. Cell. Mol. Med. 2013; 17(8): 966–975.
13. Shevelev A.S. Graft-versus-host reaction and transplantation disease. Moscow: Meditsyna; 1976.
14. Tipping A.J., Pina C., Castor A. et al. High GATA-2 expression inhibits human hematopoietic stem and progenitor cell function by effects on cell cycle. Blood 2009; 113(12): 2661–2672.
15. Tsai F.Y., Orkin S.H. Transcription factor GATA-2 is required for proliferation/survival of early hematopoietic cells and mast cell formation, but not for erythroid and myeloid terminal differentiation. Blood 1997; 89(10): 3636–3626.
16. Van Dijken P.J., Wimperis J., Crawford J.M., Ferrara J.L.M. Effect of graft-versus-host disease on hematopoiesis after bone marrow transplantation in mice. Blood 1991; 78(10): 2773–2779.
17. Zipori D. The renewal and differentiation of hematopoietic stem cells. FASEB Journal 1992; 6: 2691–2697.

