

УДК 57.086.13:577.322.23:611.018.83

Г.Г. Кісельова*, Т.Г. Дубрава, А.М. Гольцев

Білки теплового шоку — ключові тригери формування толерогенних дендритних клітин з кріоконсервованих попередників

UDC 57.086.13:577.322.23:611.018.83

H.G. Kisielova*, T.G. Dubrava, A.M. Goltsev

Heat Shock Proteins as Key Triggers to Form Cryopreserved Progenitors-Derived Tolerogenic Dendritic Cells

Ключові слова: кріоконсервування, білки теплового шоку, мононуклеарні клітини, толерогенні дендритні клітини, ад'ювантний артрит, цитокіни.

Key words: cryopreservation, heat shock proteins, mononuclear cells, tolerogenic dendritic cells, adjuvant arthritis, cytokines.

Відомо, що за умов кріоконсервування клітин і тканин, які застосовуються в терапевтичних цілях, змінюються структурні характеристики і функціональний потенціал, а це може впливати на ефективність їхнього застосування [2, 5]. Не є винятком і дендритні клітини (ДК), які останнім часом все частіше використовуються як коректори стану імунної системи при різних патологіях [6]. Враховуючи високу кріочутливість ДК, запропоновані методичні підходи їх отримання з кріоконсервованих попередників — мононуклеарів (МНК) кісткового мозку [7]. Однак у цьому випадку умови кріоконсервування МНК відбиваються на характері зміни рецепторного репертуару, цитокінпродукуючої активності ДК, отриманих *in vitro* з МНК. Особлива увага в зміні функціонального стану таких ДК звертається на здатність продукції білків теплового шоку (БТШ), зокрема сімейства Hsp70 [3, 8]. Білкам Hsp70 відводиться роль «імуно-тропних» сполук, які активують протизапальний каскад імунної відповіді [3]. S. Tukai було доведено [8], що здатність Hsp70 реалізувати імуносупресивну активність з'являється вже на рівні попередників незрілих ДК у кістковому мозку і зберігається при подальшому формуванні з них ДК з толерогенною функцією (толДК).

During cryopreservation of cells and tissues used for therapeutic purposes, the structural characteristics and functional potential are known to change, that can affect the effectiveness of their application [3, 5]. Dendritic cells (DCs), which have recently been increasingly used as immune system correctors in various pathologies [6], are no exception. Taking into account the high cryosensitivity of DCs, methodical approaches for obtaining them from cryopreserved precursors, *i. e.* bone marrow mononuclear cells (MNCs) have been proposed [7]. However, in this case, the conditions of cryopreservation of MNCs are reflected in the nature of changes of the receptor repertoire, cytokine-producing activity of DCs obtained *in vitro* from MNCs. Special attention in changing the functional state of such DCs is paid to the ability to produce the heat shock proteins (HSP), in particular the Hsp70 family [1, 8]. Hsp70 proteins are assigned the role of 'immunotropic' compounds that activate the anti-inflammatory cascade of the immune response [1]. S. Tukai proved [8] that the ability of Hsp70 to implement immune suppressive activity appeared already at the level of precursors of immature DCs in the bone marrow and was kept during the subsequent formation of DCs with tolerogenic function (tolDCs). It

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків, Україна

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

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52
електронна пошта: cryopato@gmail.com

*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952
e-mail: cryopato@gmail.com

Надійшла 27.02.2023
Прийнята до друку 17.05.2023

Received 27, February, 2023
Accepted 17, May, 2023

© Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, 2023
© Publisher Publishing House 'Akademperiodyka' of the National Academy of Sciences of Ukraine, 2023

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Саме Hsp70 стимулює синтез протизапального цитокіну ІЛ-10 з подальшим формуванням під його впливом Т-регуляторних клітин (Трег). Такі якісні ознаки толДК повинні враховуватися при використанні в програмах терапії аутоімунних захворювань (АІЗ). Крім того, клінічна практика передбачає кріоконсервування попередників ДК для подальшого отримання з них *in vitro* толДК при лікуванні АІЗ.

Мета дослідження — вивчення особливостей впливу різних умов кріоконсервування на здатність напрацювання внутрішньоклітинних Hsp70 у мононуклеарах кісткового мозку тварин та отриманих із них *in vitro* дендритних клітинах з оцінкою толерогенного потенціалу на моделі ад'ювантного артриту.

Експерименти виконували на мишах лінії СВА/Н. Усі маніпуляції з тваринами затверджені Комітетом з біоетики Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (Протокол № 5 від 26.11.2019) і відповідають основним положенням «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних і інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) та Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження».

Виділення МНК з кісткового мозку здійснювали центрифугуванням суспензії клітин у градієнті щільності препарату «Тразограф» (Юнік Фармасьютикал Лабораторіз, Індія) [1].

Кріоконсервування МНК проводили за двома режимами (Р) під захистом 10% ДМСО з повільною швидкістю охолодження 1 град/хв: до -80°C (Р1); до -40°C (Р2) з наступним зануренням зразків у кожному випадку у рідкий азот (-196°C).

Толерогенні ДК отримували з МНК, які культивували впродовж 7 діб у середовищі RPMI-1640 (Biowest, Франція) з додаванням мишачих рекомбінантних GM-CSF, ІЛ-4 та дексаметазону (Sigma-Aldrich, Велика Британія) [4].

Належність ДК, отриманих *in vitro* з попередників кісткового мозку, до толерогенних була підтверджена за експресією характерних фенотипових маркерів на проточному цитофлуориметрі «FACS Calibur» (Becton Dickinson, США) з використанням моноклональних антимишачих антитіл: CD11b (FITC), CD14 (FITC), CD83 (PE), CD80 (FITC) і CD86 (FITC) (BD Biosciences, США) [1]. Вміст БТШ визначали цитофлуориметричним методом за допомогою FITC-мічених моноклональних антимишачих антитіл hsp70 (Abcam, США).

is the Hsp70 that stimulates the synthesis of the anti-inflammatory cytokine IL-10, followed by the formation of T-regulatory cells (Treg) under its influence. Such qualitative features of tolDCs should be taken into account when used in the protocols for the therapy of autoimmune diseases (AIDs). In addition, clinical practice involves the cryopreservation of DCs precursors for further tolDC obtaining from them *in vitro* in to treat the AIDs.

The purpose of this research was to study the specifics impact of various cryopreservation conditions on the ability to develop intracellular Hsp70 in animal bone marrow mononuclear cells and dendritic cells obtained from them *in vitro*, with an assessment of tolerogenic potential in the model of adjuvant arthritis.

The experiments were performed in CBA/H mice. All manipulations with animals were approved by the Bioethics Committee of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine (Protocol No. 5 dated of November 26th, 2019) and complied with the main provisions of the 'European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes' (Strasbourg, 1986) and the Law of Ukraine 'On the Protection of Animals Against Cruelty'.

MNCs from the bone marrow were isolated by centrifugation of the cell suspension in the density gradient of the drug 'Trazograph' (Unique Pharmaceutical Laboratories, India) [2].

MNCs were cryopreserved by two regimens (R) under the protection of 10% DMSO with a slow cooling rate of 1 deg/min: to -80°C (R1); to -40°C (R2) followed by immersion of the samples in each case in liquid nitrogen (-196°C).

Tolerogenic DCs were obtained from MNCs, which were cultured for 7 days in RPMI-1640 medium (Biowest, France) with the addition of murine recombinant GM-CSF, IL-4 and dexamethasone (Sigma-Aldrich, Great Britain) [4].

DCs obtained *in vitro* from bone marrow progenitors were confirmed as tolerogenic by the expression of characteristic phenotypic markers with the FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson, USA) using monoclonal anti-mouse antibodies: CD11b (FITC), CD14 (FITC), CD83 (PE), CD80 (FITC) and CD86 (FITC) (BD Biosciences, USA) [1]. The content of BTSH was determined by the flow cytometry using FITC-labeled monoclonal anti-mouse hsp70 antibodies (Abcam, USA).



Ад'ювантний артрит (АА) індукували у мишей лінії СВА/Н субплантарним введенням повного ад'юванта Фрейнда (ПАФ) [1]. Дендритні клітини, вирощені *in vitro* з нативних або кріоконсервованих МНК, вводили тваринам з АА внутрішньовенно у дозі 5×10^5 кл/на мишу на 14-у добу розвитку АА. Через 7 днів після введення різного виду ДК у сироватці крові мишей з АА визначали вміст прозапальних (ФНП- α , ІЛ-6) і протизапальних (ІЛ-4, ІЛ-10) цитокінів за допомогою набору «Cytometric Bead Array Th1/Th2/Th17 (mouse) Kit IL-10 set s» (BD Biosciences) згідно з інструкцією виробника.

Статистичну обробку даних проводили за допомогою пакета програм «Statistica 10.0» (StatSoft, Inc., США). Результати було представлено як медіани з нижнім і верхнім квантилями (Me [LQ; UQ]) відповідно до Міжнародної системи одиниць, рекомендованих для використання в клінічній та лабораторній практиці. Критерій Крускала-Уолліса застосовується для багаторазового порівняння незалежних зразків при $p < 0,05$. Групи ($n = 5$ у кожній) попарно порівнювали за допомогою непараметричного критерію Манна-Уїтні з поправкою Бонферроні (відмінності вважалися значущими при $p < 0,01$).

Результати оцінки кількості і життєздатності МНК одразу після разморожування й відмивання від кріопротектора свідчать про перевагу Р2 (КріоР2МНК) у порівнянні з Р1 (КріоР1МНК) (таблиця): скорочення часу дії повільної температури охолодження до -40°C (Р2) сприяло підвищенню вказаних показників.

На рис. 1, А представлені результати атестації вмісту hsp70^+ -клітин у нативних (НатМНК) і відразу після разморожування й відмивання від ДМСО кріоконсервованих МНК. Як видно, в КріоР2МНК вміст hsp70^+ -клітин, був більше за КріоР1МНК у порівнянні з НатМНК (у 3,4 і 2,2 рази відповідно). Цей факт орієнтує на більш активне формування з КріоМНК незрілих ДК з толерогенним потенціалом. У той самий час дані, подані на рис. 1, В, свідчать, що в ДК (КріоР1ДК) із КріоР1МНК концентрація hsp70^+ -клітин не перевищувала цей показник в ДК (НатДК) із НатМНК. Слід зазначити, що серед КріоР2ДК вміст hsp70^+ -клітин був вище у порівнянні з НатДК і КріоР1ДК майже в 2 рази. Отже, умови кріоконсервування МНК відіграють ключову роль у формуванні з них толДК, і в нашому випадку Р2 мав суттєві переваги.

Adjuvant arthritis (AA) was induced in CBA/H mice by subplantar administration of complete Freund's adjuvant (CFA) [2]. Dendritic cells grown *in vitro* from either native or cryopreserved MNCs were injected intravenously to the animals with AA at a dose of 5×10^5 cells/mouse on day 14 of AA development. Seven days after the introduction of different types of DC in the blood serum of mice with AA, the content of pro-inflammatory (TNF- α , IL-6) and anti-inflammatory (IL-4, IL-10) cytokines was determined using the Cytometric Bead Array Th1/Th2/Th17 kit (mouse) Kit IL-10 set (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions.

The data were statistically processed using the Statistica 10.0 software (StatSoft, Inc., USA).

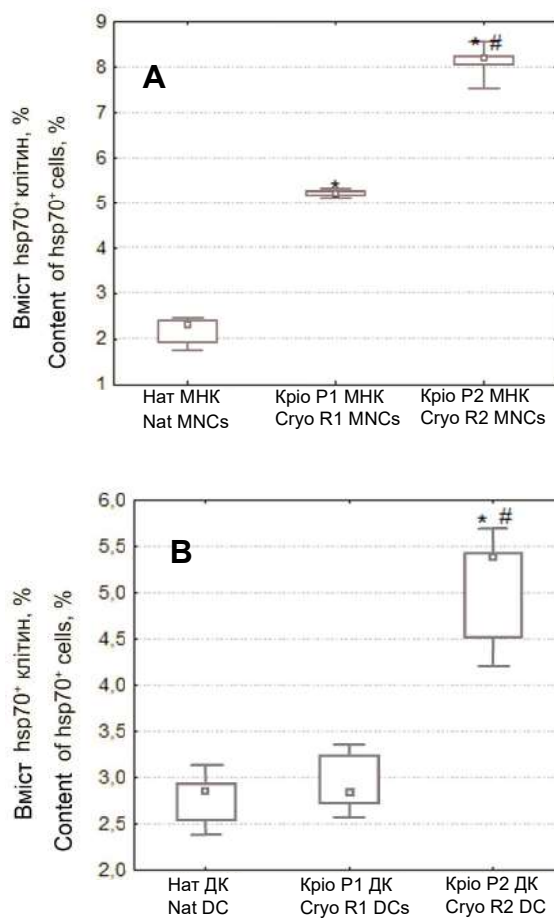


Рис. 1. Вміст hsp70^+ -клітин у НатМНК і КріоМНК одразу після разморожування (А) та в ДК, отриманих з них після 7 днів культивування з індукторами ДК (В); * — показники значущі відносно НатМНК; # — показники значущі відносно КріоР1МНК ($p < 0,01$ за U-критерієм Манна-Уїтні з урахуванням поправки Бонферроні).

Fig. 1. Content of hsp70^+ cells in NatMNCs and CryoMNCs immediately after warming (A) and in DCs obtained from them after 7 days of cultivation with DC inducers (B); * — the indices are significant in respect of the NatMNCs; # — indices are significant in respect of o CryoR1MNCs ($p < 0.01$ according to the Mann-Whitney U-test with Bonferroni correction).



Кількість і життєздатність кріоконсервованих за різними режимами МНК, Me [LQ; UQ]
The number and viability of MNCs cryopreserved under different regimens, Me [LQ; UQ]

Групи МНК Groups of MNCs	Показники Indices	
	Кількість, $\times 10^7$ Amount, $\times 10^7$	Життєздатність, % Viability, %
НатМНК (контроль) Nat MNCs (control)	0,96 [0,94; 1,10]	97,0 [96,0; 97,0]
КріоР1МНК CryoR1MNCs	0,73 [0,71; 0,75]*	78,0 [77,0; 79,0]*
КріоР2МНК CryoR2MNCs	0,85 [0,84; 0,94]#	88,0 [85,0; 91,0]#

Примітки: * — показники значущі відносно НатМНК; # — показники значущі відносно КріоР1МНК ($p < 0,01$ за U-критерієм Манна-Уїтні з урахуванням поправки Бонферроні).

Notes: * – indices are significant in respect of NatMNCs; # – indices are significant in respect of CryoR1MNCs ($p < 0.01$ according to the Mann-Whitney U-test with Bonferroni correction).

Білкам Hsp70 відводиться роль активаторів протизапального процесу. Припускають, що механізми їх імуносупресивної дії реалізуються шляхом модуляції фенотипу і функції мієлоїдних клітин-супресорів, моноцитів і ДК до толерогенного, включаючи продукцію ними ІЛ-10 [3, 8].

Слід зазначити, що всі види ДК (НатДК, КріоР1ДК і КріоР2ДК) в більшому ступені стимулювали продукцію протизапальних цито-

Results were presented as medians with lower and upper quartiles (Me [LQ; UQ]) according to the International System of Units recommended for use in clinical and laboratory practice. The Kruskal-Wallis test was used for multiple comparison of independent samples at $p < 0.05$. Groups ($n = 5$ each) were compared pairwise using the non-parametric Mann-Whitney test with Bonferroni correction (differences were considered significant at $p < 0.01$).

The results of evaluating the number and viability of MNCs immediately after thawing and washing from the cryoprotectant indicate the superiority of R2 (CryoR2MNCs) compared to R1 (CryoR1MNCs) (Table): reducing the time of the slow cooling temperature to -40°C (R2) contributed to the increase of the indicated indices.

Fig. 1A presents the results of the attestation of the content of hsp70⁺ cells in native (NatMNCs) and immediately after thawing and washing from DMSO cryopreserved MNCs. As can be seen, the content of hsp70⁺ cells in CryoR2MNCs was higher than in CryoR1MNCs compared to NatMNCs (by 3.4 and 2.2 times, respectively). This fact points to a more active formation of immature DCs with tolerogenic potential from CryoMNCs. At the same time, the data presented in Fig. 1B, show that in DCs (CryoR1DCs) with CryoR1MNCs, the concentration of hsp70⁺

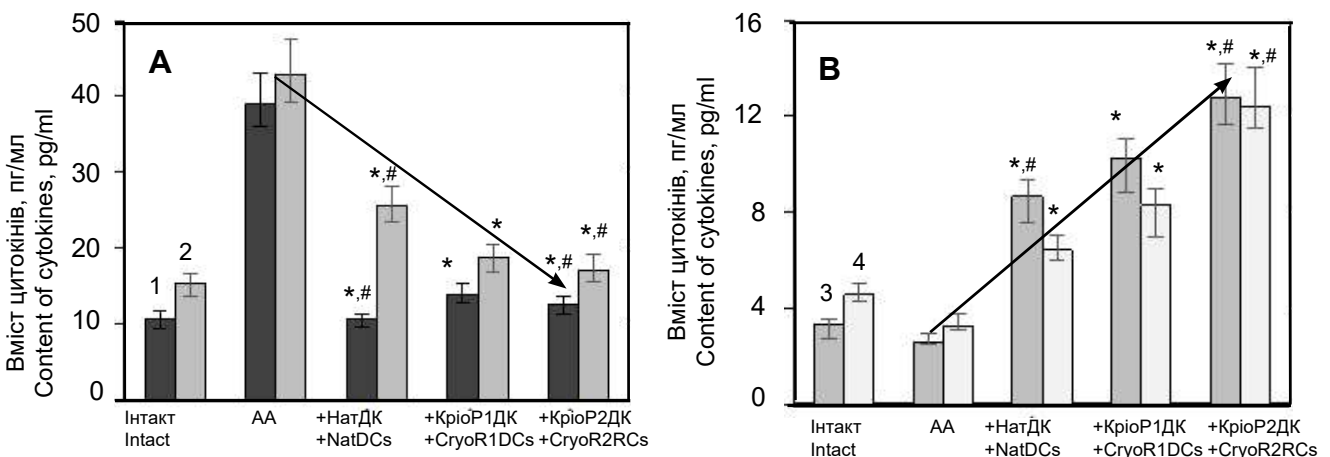


Рис. 2. Вміст прозапальних цитокінів (А): ФНП-альфа (1), ІЛ-6 (2); протизапальних цитокінів (В): ІЛ-4 (3), ІЛ-10 (4) у сироватці крові тварин з АА до і після введення НатДК або КріоДК. * — показники значущі відносно НатМНК; # — показники значущі відносно КріоР1МНК ($p < 0,01$ за U-критерієм Манна-Уїтні з урахуванням поправки Бонферроні). Стрілками позначена тенденція зміни показників.

Fig. 2. Content of pro-inflammatory cytokines (A): TNF-alpha (1), IL-6 (2); anti-inflammatory cytokines (B): IL-4 (3), IL-10 (4) in blood serum of animals with AA before and after administration of NatDCs or CryoDCs. * — the indices are significant in respect of the NatMNCs; # — indices are significant in respect of CryoR1MNCs ($p < 0.01$ according to the Mann-Whitney U-test with Bonferroni correction). Arrows indicate the trend of changing indices.

кінів (рис. 2, В), ніж гальмували продукцію прозапальних цитокінів (рис. 2, А). При цьому КріоР2ДК мали перевагу над КріоР1ДК і НатДК у «гармонізації» співвідношення різних видів про- і протизапальних цитокінів, тобто наближеного до показників інтактного контролю.

Таким чином, результати наших досліджень демонструють здатність Hsp70 підвищувати толерогенну активність ДК, отриманих із кріоконсервованих попередників кісткового мозку. Встановлено переваги КріоДК, особливо Кріо Р2ДК, в порівнянні з НатДК за стимулюванням продукції протизапальних цитокінів у тварин з АА.

Література

1. Гольцев АМ, Дубрава ТГ, Ямпольська КЄ, та ін. Оптимізація методу одержання незрілих дендритних клітин для терапевтичного застосування. *Фізіологічний журнал*. 2018; 64 (5): 33–40.
2. Гольцев АН, Останкова ЛВ, Дубрава ТГ, и др. Криоконсервирование как фактор модификации структурно-функционального состояния и механизма реализации лечебного эффекта клеток стволового компартмента в условиях развития патологий аутоиммунного генеза. В: Гольцев АН редактор. *Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины*. Харьков; 2012. С. 501– 612.
3. Borges TJ, Porto BN, Teixeira CA, et al. Prolonged survival of allografts induced by mycobacterial Hsp70 is dependent on CD4+CD25+ regulatory T cells. *PLoS ONE*. [Internet]. 2010 Dec 8 [cited 2022 Sept 05]; 2010; 5(12): e14264. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0014264>
4. Lee J-H, Park C-S, Jang S, Kim J-W, et al. Tolerogenic dendritic cells are efficiently generated using minocycline and dexamethasone. *Sci Rep*. [Internet]. 2017 Nov 08. [cited 2023 March 02]; 7(1): 15087. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-15569-1>
5. Martikainen MV, Roponen M. Cryopreservation affected the levels of immune responses of PBMCs and antigen-presenting cells. *Toxicology in Vitro*. [Internet]. 2020 Jun 19. [cited 2023 March 02]; 67:104918. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0887233320304689>
6. Sesti-Costa R, Mendes de Moraes-Vieira PM, Cervantes-Barragan L. Dendritic cells: immune response in infectious diseases and autoimmunity. *Mediators Inflamm*. [Internet]. 2020 March 20 [cited 2022 Sept 02]; 2020: 2948525. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/mi/2020/2948525/>
7. Silveira GF, Wowk PF, Machado AMB, et al. Immature dendritic cells generated from cryopreserved human monocytes show impaired ability to respond to LPS and to induce allogeneic lymphocyte proliferation. *PLoS One*. [Internet]. 2013 Jul 31. [cited 2023 March 02]; 8(7):e71291. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0071291>
8. Tukai S. Heat shock protein 70 as a double agent acting inside and outside the cell: Insights into Autoimmunity. *Int J Mol Sci*.

cells did not exceed this index in DCs (NatDCs) with NatMNCs. It should be noted that the content of hsp70+ cells among CryoR2DCs was almost 2 times higher compared to NatDCs and CryoR1DCs. That is, the conditions of cryopreservation of MNCs play a key role in the formation of tolDCs from them, and in our case R2 had significant advantages.

Hsp70 proteins are assigned the role of activators of the anti-inflammatory process. It is assumed that the mechanisms of their immune suppressive action are implemented by modulating the phenotype and function of myeloid suppressor cells, monocytes and DCs to tolerogenic ones, including their production of IL-10 [1, 8].

It should be noted that all types of DCs (NatDCs, CryoR1DCs and CryoR2DCs) to a greater extent stimulated the production of anti-inflammatory cytokines (Fig. 2B) than inhibited the production of pro-inflammatory ones (Fig. 2A). At the same time, CryoR2DCs had an advantage over CryoR1DCs and NatDCs in ‘harmonizing’ the ratio of various types of pro- and anti-inflammatory cytokines, that is, close to the intact control indices.

Thus, the results of our studies demonstrate the ability of Hsp70 to increase the tolerogenic activity of DCs derived from cryopreserved bone marrow progenitors. The advantages of CryoDCs, especially CryoR2DCs, compared to NatDCs in stimulating the production of anti-inflammatory cytokines in animals with AA have been established.

References

1. Borges TJ, Porto BN, Teixeira CA, et al. Prolonged survival of allografts induced by mycobacterial Hsp70 is dependent on CD4+CD25+ regulatory T cells. *PLoS ONE*. [Internet]. 2010 Dec 8 [cited 2022 Sept 05]; 2010; 5(12):e14264. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0014264>
2. Goltsev AN, Dubrava TG, Yampolskaya EE, et al. [Optimization of the method of obtaining immature dendritic cells for therapeutic use]. *Fiziologichnyi Zhurnal*. 2018; 64 (5): 33-40. Ukrainian.
3. Goltsev AN, Ostankova LV, Dubrava TG, et al. [Cryopreservation as the factor of modification of structural and functional state and the realization mechanism of therapeutic effect of compartment stem cells under autoimmune genesis pathology development]. In: Goltsev AN, editor [Current problems of cryobiology and cryomedicine.] Kharkiv; 2012. p. 501 – 612. Russian.
4. Lee J-H, Park C-S, Jang S, Kim J-W, et al. Tolerogenic dendritic cells are efficiently generated using minocycline and dexamethasone. *Sci Rep*. [Internet]. 2017 Nov 08. [cited 2023 March 02]; 7(1): 15087. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-15569-1>
5. Martikainen MV, Roponen M. Cryopreservation affected the levels of immune responses of PBMCs and antigen-presenting cells. *Toxicology in Vitro*. [Internet]. 2020 Jun 19. [cited 2023 March



[Internet]. Jul 26 [cited 2023 March 02]; 2020; 21(15):5298. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/15/5298>.

- 02]; 67:104918. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0887233320304689>
6. Sesti-Costa R, Mendes de Moraes-Vieira PM, Cervantes-Barragan L. Dendritic cells: immune response in infectious diseases and autoimmunity. *Mediators Inflamm*. [Internet]. 2020 March 20 [cited 2022 Sept 02]; 2020: 2948525. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/mi/2020/2948525/>
 7. Silveira GF, Wowk PF, Machado AMB, et al. Immature dendritic cells generated from cryopreserved human monocytes show impaired ability to respond to LPS and to induce allogeneic lymphocyte proliferation. *PLoS One*. [Internet]. 2013 Jul 31. [cited 2023 March 02]; 8(7):e71291. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0071291>
 8. Tukai S. Heat shock protein 70 as a double agent acting inside and outside the cell: Insights into Autoimmunity. *Int J Mol Sci*. [Internet]. Jul 26 [cited 2023 March 02]; 2020; 21(15):5298. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/15/5298>.

