

Применение клеток фетальной печени как один из возможных путей модификации иммунореактивности криоконсервированного алломиелотрансплантата

UDC 611.36.013:615.361.018.46.014.41

I.YU. MATSEVITAYA, M.V. OSTANKOV*

Application of Fetal Liver Cells as One of Possible Ways for Modification of Cryopreserved Allomyelotransplant Immune Reactivity

Экспериментально подтверждена возможность снижения иммунореактивности аллогенного костного мозга (КМ) в виде болезни “трансплантат против хозяина” (БТПХ) изменением сбалансированного содержания в нем аксессуарно-регуляторных клеток кроветворного микроокружения криоконсервированием при определенных режимах [2, 3]. Однако наряду со снижением иммунореактивности криоконсервированный миелотрансплантат снижал и гемопоэтический потенциал. Возможность изменения компонентного состава миелотрансплантата и его функционального потенциала не элиминацией, а дополнительным введением с ним клеток, обладающих регуляторной активностью, определила необходимость поиска сотрансплантируемого материала с такими характеристиками.

К настоящему времени накоплена информация о выраженной иммуномодулирующей способности продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса (ПЭФПК) [4]. Особый интерес представляет их тропность в отношении клеток с супрессорной функцией. Фетальная печень (ФП), например, на протяжении почти всего срока гестации продуцирует α -фетопротеин – важнейший триггерный фактор Т-лимфоцитов с супрессорной активностью. Фетальная печень обладает также высокой гемопоэтической активностью и, следовательно, может быть использована как сотрансплантат аллогенного криоконсервированного костного мозга (кКМ), способный одновременно повышать кроветворную функцию и минимизировать развитие иммунного конфликта.

Цель данной работы – экспериментальное обоснование возможности использования клеток фетальной печени (КФП) как модулятора иммунной гемопоэтической активности аллогенного кКМ и повышения его защитного потенциала.

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Перейславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-57-89, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта:
cryo@online.kharkov.ua

There has been experimentally proved the possibility to reduce the immune reactivity of allogenic bone marrow (BM) as “graft versus host” response (GVHR) by changing in it a balanced content of the accessory-regulatory cells of hemopoietic microenvironment with cryopreservation under certain regimens [2, 3]. However along with a decrease in the immune reactivity the cryopreserved material reduced hemopoietic potential as well. The possibility to change a myelotransplant’s immune competent composition and its functional potential not with elimination, but additional introduction with it of cells with regulatory activity, determined the need in searching for a cotransplanted material with these characteristics.

Nowadays there has been accumulated the information about a manifested immune modulating ability of products of fetoplacental complex (PFPC) [4]. Of a special interest is their tropism towards cells with a suppressive function. Fetal liver (FL), for example, within all gestation term produces α -fetoprotein: most important trigger factor of T-lymphocytes with a suppressive activity. Fetal liver possesses a high hemopoietic activity as well and, as a result, may be used as a co-transplant of allogenic cryopreserved bone marrow (cBM), being capable of simultaneous augmentation of hemopoietic function and minimisation of immune conflict development.

This research was targeted to experimentally substantiate the possibilities for fetal liver cells (FLCs) usage as a modulator of immune and hemopoietic activities of allogenic cBM and an increase in its protective potential.

Materials and methods

Balb/c and CBA 4 months’ mice of 18-20 g weight were used in the research. BM and FL cells (13 gestation days) were derived with medium 199, supplemented by 3% fetal calf serum and 5% sodium

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: cryo@online.kharkov.ua

Материалы и методы

В работе использованы 4-месячные мыши Balb/c и CBA массой 18-20 г. Клетки КМ и ФП (13 суток гестации) получали на среде 199 с добавлением 3%-й эмбриональной телячьей сыворотки и 5%-го цитрата натрия. Программное замораживание КМ проводили на установке УОП-6 (СКТБ с ОП ИПКиК НАН Украины, г. Харьков), используя режим: 1°C/мин до -25°C с последующим погружением в жидкий азот, отогревали при 41°C на водяной бане. Костный мозг криоконсервировали под защитой криопротектора диметилсульфоксида (ДМСО) в концентрации 7,5%.

Мышам линии CBA, облученным летальной дозой, внутривенно вводили кКМ в дозе 5×10^6 /мышь (сингенная система). Облученным в той же дозе мышам линии Balb/c внутривенно сотрансплантировали кКМ и КФП мышей линии CBA 13 дней гестации (аллогенная система) в дозе 5×10^6 /мышь.

Интенсивность развития БТПХ оценивали по индексу селезенки, количеству ядросодержащих клеток тимуса и выживаемости животных. Проводились биохимические и иммунологические исследования: содержания С-реактивного белка (CRP-Latex), сиаловых кислот (резорциновый метод), серомукоидов (турбометрический метод) [6]. Экспериментальные данные статистически обрабатывали по методу Фишера-Стьюдента в электронных таблицах Microsoft Excel 2000.

Результаты и обсуждение

Проведены биохимические и иммунологические исследования, которые позволили получить новые качественные характеристики развития БТПХ и сравнительную оценку воспалительного процесса, протекающего при введении аллогенного кКМ и кКМ с ФП. Уже с 7-х суток после введения аллогенного кКМ начал увеличиваться СРБ, который является центральным компонентом острой фазы воспаления. Существует прямая связь между изменением его уровня тяжести и динамики клинических проявлений воспаления. Чем выше концентрация СРБ, тяжелее протекает воспалительный процесс [6]. Содержание СРБ было повышено вплоть до 50-х суток, тогда как при сочетанном введении аллогенного кКМ с КФП уже на 30-е сутки отмечали снижение воспалительного процесса со слабopоложительным результатом, а к 70-м – отрицательным (рис. 1).

О развитии иммунного конфликта свидетельствует и повышение на протяжении 50 суток содержания сиаловых кислот, которое наблюдается и при ряде других АИЗ, сопровождающихся воспалительными процессами [6]. При сочетанном введении кКМ и КФП такое увеличение наблюдалось только до 30-х суток, к 70-м – показатель приближался к контролю (рис.2).

citrate. BM programmed freezing was realised by means of UOP-6 device (Special Designing and Technical Bureau with Experimental Unit, Kharkov), using the following regimen: 1°C/min down to -25°C with further immersion into liquid nitrogen, then thawing at 41°C on water bath. Bone marrow was cryopreserved under 7.5% dimethyl sulfoxide protection.

Cryopreserved BM in 5×10^6 /mouse dose (syngeneic system) was intravenously injected to the lethally irradiated CBA mice. Balb/c mouse, irradiated with the same dose received intravenously the cBM and FLCs co-transplantation of CBA mice of 13 gestation days (allogenic system) in dose of 5×10^5 /mouse.

The intensity of GVHR progress was evaluated by the spleen index, number of nucleated thymus cells and animal survival. Biochemical and immunological studies such as: C-reactive protein (CRP) content (CRP-Latex), sialic acids (resorcinol method), seromucoids (turbometric method) were carried-out [6]. Experimental data were statistically processed using the Fisher-Student's method by Microsoft Excel 2000. software

Results and discussion

There were performed the biochemical and immunological studies, which enabled to obtain the new qualitative characteristics of GVHR development and a comparative estimation of inflammatory process, proceeding during allogeneic cBM and cBM with FL introduction. The CRP, being a central component of acute inflammatory phase, started to increase even after the 7th day of allogeneic cBM introduction. There is a direct link between the changes in its severity level and the dynamics of clinical signs of inflammation. Higher is CRP concentration, the more severe is inflammatory process [6]. CRP content was increased up to the 50th day, meanwhile under combined introduction of allogenic cBM with FLCs a decrease in inflammatory process with slightly positive results and negative ones was observed even to the 30th and 70th days, correspondingly (Fig. 1).

An increase in sial acid content within 50 days, observed under some other AID, accompanied with inflammatory processes, testifies to the immune conflict development as well [6]. Under BM and cFL combined introduction such an increase was observed only up to the 30th day and to the 70th one the index approached the control (Fig. 2).

Determination of seromucoids (specific glycoprotein) is of the most diagnostic value to find-out the slow inflammatory processes, which growth testifies to their activation even if clinical symptoms have not been manifested yet [6]. In this experiment when only cBM was introduced an increase in seromucoids was noted up to and including the 50th day, but slight decrease was only to the 70th one. When introducing



Рис. 1. Содержание СРБ после сотрансплантации криоконсервированного аллогенного КМ с клетками ФП: ■ – сингенный кКМ; □ – кКМ; □ – кКМ+ФП.

Fig. 1. CRP content after transplantation of cryopreserved allogeneic BM with FL cells: ■ – syngeneic cBM; □ – cBM; □ – cBM+FL.

Определение серомукоидов (особого вида гликопротеидов) имеет наибольшее диагностическое значение для выявления вялотекущих воспалительных процессов, повышение которых свидетельствует об их активации, даже если клинические симптомы еще не проявились [6]. В данном эксперименте при введении только кКМ повышение серомукоидов отмечали до 50-х суток включительно, а незначительное снижение – только к 70-м суткам. При введении кКМ с КФП увеличение наблюдалось до 30-х суток, затем постепенно снижаясь с 40-х по 70-е сутки (рис. 3).

Проведенные биохимические и иммунологические исследования подтвердили целесообразность применения сочетанного введения КФП с аллогенным кКМ, которые способствовали снижению выраженности воспалительного процесса при БТПХ. Сотрансплантация КФП с аллогенным кКМ синхронно снижала показатели уже после 30-х суток, а к 70-м – возвращала показатели к контролю, тогда как без ФП показатели к 70-м суткам не восстанавливались (рис. 4).

Признаками развития БТПХ также являются спленомегалия и гипоплазия тимуса. Полученные нами данные подтверждают снижение количества клеток в тимусе и увеличение массы селезенки (рис. 5, а). В этой же группе была отмечена большая гибель животных (рис. 5, б).

Сотрансплантация КФП с аллогенным кКМ полностью возвращала к норме показатель индекса селезенки, подчеркивая снижение ее массы у реципиентов аллогенного кКМ (рис. 5). Уже на 50-е сутки, после сотрансплантации КФП, наблюдалось

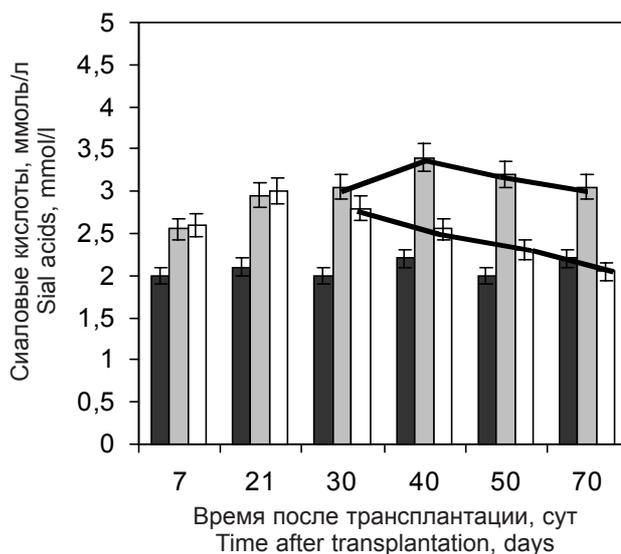


Рис. 2. Содержание сиаловых кислот после сотрансплантации криоконсервированного аллогенного КМ с клетками ФП: ■ – сингенный кКМ; □ – кКМ; □ – кКМ+ФП.

Fig. 2. Sialic acid content after co-transplantation of cryopreserved allogeneic BM with FL cells: ■ – syngeneic cBM; □ – cBM; □ – cBM+FL.

cBM with CFL their increase was observed up to the 30th day then gradually decreasing from 40th to 70th days (Fig. 3).

The performed biochemical and immunological studies confirmed the expedience for applying a combined introduction of CFL with allogeneic cBM, which contributed to a decrease in inflammatory process manifestation at GVHR. CFL and allogeneic

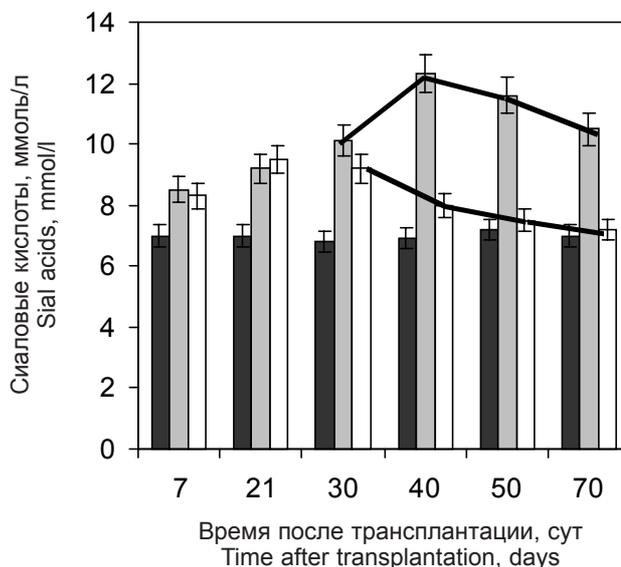


Рис. 3. Содержание серомукоидов после сотрансплантации криоконсервированного аллогенного КМ с клетками ФП: ■ – сингенный кКМ; □ – кКМ; □ – кКМ+ФП.

Fig. 3. Seromucoid content after co-transplantation of cryopreserved allogeneic BM with FL cells: ■ – syngeneic cBM; □ – cBM; □ – cBM+FL.

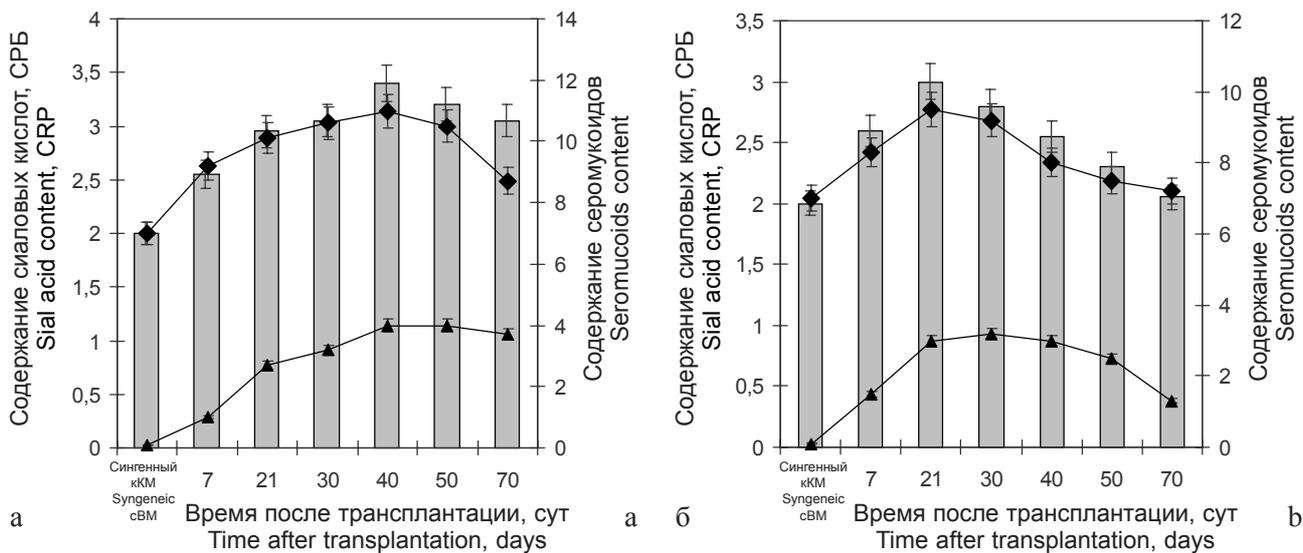


Рис. 4. Синхронность показателей воспаления в динамике проявления БТПХ: а – после трансплантации кКМ; б – сотрансплантации кКМ и ФП: □ – сиаловые кислоты; ◆ – серумукоиды; ▲ – СРБ.

Fig. 4. Simultaneity of inflammation indices in dynamics of GVHR manifestation: a – after cBM transplantation; b – cBM and FL co-transplantation: □ – sial acids; ◆ – serumucoids; ▲ – CRP.

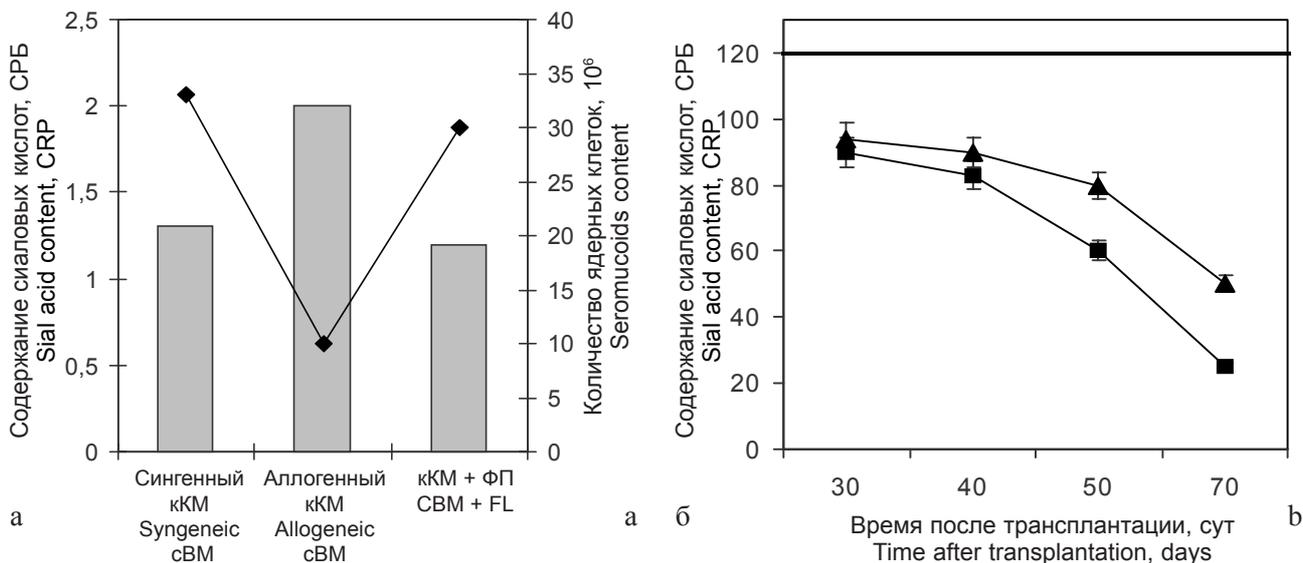


Рис. 5. Основные показатели БТПХ после сотрансплантации криоконсервированного аллогенного КМ с клетками ФП: а – индекс селезенки и количество ядерных клеток в тимусе; б – выживаемость реципиентов; □ – ИС; ◆ – количество ядерных клеток в тимусе (50 сутки); ■ – кКМ; ▲ – кКМ+ФП; — – сингенный КМ.

Fig. 5. Main indices of GVHR after co-transplantation of cryopreserved allogeneic BM with FL cells: a is spleen index and a number of nucleated cells in thymus; b is recipients' survival; □ – spleen index; ◆ – number of nucleated cells in thymus (50 days); ■ – cBM; ▲ – cBM+FL; — – syngeneic BM.

достоверное увеличение количества клеток в тимусе.

Выживаемость реципиентов, являясь интегральным показателем оценки интенсивности проявления БТПХ, также подтвердила способность КФП снижать иммунореактивность алломиелотрансплантата, уменьшая смертность животных данной группы к 70-м суткам.

Выводы

Проведенные исследования позволяют сделать важный вывод, что КФП при сотрансплантации с

cBM co-transplantation decreased simultaneously the indices even after 30 days, but got back the indices to the control by the 70th one, meanwhile free of FL they did not recover to the 70th day (Fig. 4).

Splenomegalia and thymus hypoplasia are also the signs of GVHR development. The data obtained confirm a decrease of cell number in thymus and spleen mass growth (Fig. 5, a). In the same group quite a high animal death rate was observed (Fig. 5, b).

FLCs and allogeneic cBM co-transplantation recovered the spleen index completely to the norm, by emphasising its mass decrease in recipients of

криоконсервированным аллогенным КМ реализуют как минимум дуалистическую активность, а именно снижают его иммунореактивность и через дополнительную активацию стволового гемопоэтического компартмента повышают защитный потенциал.

Литература

1. Гольцев А.Н., Останкова Л.В., Луценко Е.Д., Дубрава Т.Г. и др. Функциональная активность криоконсервированных кроветворных клеток (КОЕс) в зависимости от компонентного состава миелотрансплантата // Пробл. криобиологии.– 1993.– №4.– С. 34–39.
2. Гольцев А.Н., Луценко Е.Д., Останкова Л.В. и др. Возможности криобиологии в решении иммуноконфликтных проблем при пересадке гистонесовместимого костного мозга // Пробл. криобиологии.– 1996.– №2.– С. 3–10.
3. Мацевитая И.Ю., Останков М.В., Гольцев А.Н. Роль криоконсервирования в определении компонентного состава иммунореактивности костного мозга // Пробл. криобиологии.– 2006.– Т. 16, №1.– С. 66–75.
4. Гольцев А.Н., Луценко Е.Д., Дубрава Т.Г. и др. Поиск альтернативных криоконсервированию путей модификации иммунореактивности алломиелотрансплантата. Часть II. Возможность сотрансплантации клеток эмбриональной печени // Пробл. криобиологии.– 2000.– №1.– С. 10–21.
5. Шевелев А.С. Реакция “трансплантат против хозяина” и трансплантационная болезнь.– М.: Медицина.– 1976.– 215 с.
6. Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник.– М.: Медицина.– 1987.– 364 с.

Поступила 20.05.2008

allogeneic BM. Even to the 50th day after FLCs transplantation a statistically significant increase of cell number in thymus was observed.

Recipients' survival being an integral index of estimation of GVHR manifestation intensity also confirmed the FLC ability to reduce the immune reactivity of allomyelotransplant by reducing the death rate in this group of animals to the 70th day.

Conclusions

The research performed enables concluding about the realisation by FLCs under co-transplantation with cryopreserved allogeneic BM of a minimum dual activity, namely they reduce its immune reactivity and increase a protective potential via additional activation of a stem hemopoietic compartment.

References

1. Goltsev A.N., Ostankova L.V., Lutsenko E.D., Dubrava T.G. The functional activity of cryopreserved hemopoietic cells (CFUs) as a function of the myelograft component composition // Problems of Cryobiology.– 1993.– N4.– P. 34–39.
2. 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.– N2.– P. 3–10.
3. Matsevitaya I.Yu., Ostankov M.V., Goltsev A.N. Role of cryopreservation in determining component composition and immune reactivity of bone marrow // Problems of Cryobiology.– 2006.– Vol. 16, N1.– P. 66–75.
4. Goltsev A.N., Dubrava T.G., Lutsenko E.D. et al. Search for the alternative to cryopreservation methods of modifying the immune reactivity of the allomyelotransplant. Part II. Possible co-transplantation of embryonic liver cells // Problems of Cryobiology.– 2000.– N1.– P. 10–21.
5. Shevelev A.S. “Graft versus host” response and transplantation disease.– Moscow: Meditsina.– 1976.– 215 p.
6. Menshikov V.V. Laboratory research methods in clinic: Reference book.– Moscow: Meditsina.– 1987.– 364 p.

Accepted in 20.05.2008