

## Анализ ИДО-зависимого иммуномодулирующего эффекта мезенхимальных стволовых клеток фетальной печени мышей до и после криоконсервирования

А.Ю. Димитров, Т.Г. Дубрава, А.Н. Гольцев

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

## Analysis of IDO-dependent Immunomodulatory Effect of Mice Fetal Liver Mesenchymal Stem Cells Prior to and After Cryopreservation

A.Yu. Dimitrov, T.G. Dubrava, A.N. Goltsev

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

Реакцию «трансплантат против хозяина» (РТПХ), возникающую после трансплантации гистонесовместимого костного мозга (КМ), ассоциируют с аутоиммунной патологией. В терапии аутоиммунных заболеваний (АИЗ) широко используются клетки фетальной печени (ФП), обладающие иммунокорригирующим эффектом благодаря содержанию мезенхимальных стволовых клеток (МСК), синтезирующих индоламин 2,3-диоксигеназу (ИДО). Работа этого фермента приводит к супрессии эффекторных Т-клеток и активации регуляторных Т-клеток ( $T_{reg}$ ), что снижает выраженность АИЗ. Экспериментальную инактивацию ИДО проводят с использованием конкурентного ингибитора 1-метилтриптофана (1-МТ). Известно, что криоконсервирование обеспечивает не только долгосрочное хранение биоматериала, но и может изменять его характеристики. Цель работы – исследовать ИДО-зависимый механизм влияния нативных и криоконсервированных МСК ФП на  $T_{reg}$ -клетки мышей в модели РТПХ.

Суспензию клеток получали путем гомогенизации ФП мышей линии C57BL (14-е сутки). Фракцию CD105<sup>+</sup> (МСК) выделяли методом иммуномагнитного сортирования. Клетки ( $1 \times 10^6$  клеток/мл) криоконсервировали под защитой 10% ДМСО в программном замораживателе УОП-6 (СКТБ с ОП ИПККиК НАН Украины) по программе: охлаждение со скоростью 10 град/мин до  $-25^\circ\text{C}$  с последующим погружением в жидкий азот. Образцы отогревали на водяной бане при  $40^\circ\text{C}$  до исчезновения твердой фазы. Для инактивации ИДО проводили инкубацию клеток ФП с 1 мМ 1-МТ при  $37^\circ\text{C}$  в течение 2 ч. Для индукции острой РТПХ летально облученным мышам (CBA/HxC57Bl)F1 внутривенно вводили  $5 \times 10^6$  клеток КМ с 30% клеток лимфоузлов мышей линии CBA/H;  $5 \times 10^5$  нативных или криоконсервированных МСК ФП вводили сразу после индукции патологии. Интенсивность РТПХ оценивали на 14-е сутки после индукции и лечения. Содержание  $T_{reg}$  в селезенках реципиентов оценивали на проточном цитофлуориметре с использованием антител к Foxp3, CD4 и CD25.

Установлено снижение содержания  $T_{reg}$  у реципиентов с РТПХ. Показан иммунокорригирующий эффект МСК ФП на модели острой РТПХ, выражающийся в стимуляции  $T_{reg}$ . Выявлена зависимость между клиническим проявлением РТПХ и снижением интенсивности формирования  $T_{reg}$  у животных после введения МСК ФП, обработанных 1-МТ. Криоконсервирование оказывало определенное влияние на терапевтическую активность МСК ФП при лечении АИЗ *in vivo*.

Полученные данные свидетельствуют о важной роли ИДО в реализации активности МСК ФП и могут учитываться при разработке методов клеточной терапии АИЗ.

Graft-versus-host disease (GVHD) occurring after transplantation of histoincompatible bone marrow (BM) is associated with autoimmune pathology. In the treatment of autoimmune diseases (AIDs) there are widely used fetal liver (FL) cells possessing an immunocorrecting effect due to the content of mesenchymal stem cells (MSCs), synthesizing indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO). Functioning of this enzyme leads to the suppression of effector T cells and activation of regulatory T cells ( $T_{reg}$ ) that reduces the severity of AIDs. Experimental inactivation of IDO is performed using a competitive inhibitor 1-methyltryptophan (1-MT). It is known that cryopreservation provides not only long-term storage of biomaterial but also can alter its characteristics. The purpose of research was to study the IDO-dependent mechanism of the effect of native and cryopreserved FL MSCs on  $T_{reg}$  cells in mice in the model of GVHD.

The cell suspension was derived by homogenization of C57BL mice FL (day 14). CD105<sup>+</sup> fraction (MSCs) was isolated by immunomagnetic sorting. Cells ( $1 \times 10^6$  cells/ml) were cryopreserved under 10% DMSO protection in programmable freezer UOP-6 (Special Designing and Technical Bureau with Experimental Unit of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of NAS of Ukraine) using the following program: cooling rate of 10 deg/min down to  $-25^\circ\text{C}$ , followed by plunging into liquid nitrogen. Samples were thawed in water bath at  $40^\circ\text{C}$  until the disappearance of solid phase. To inactivate IDO the FL cells were incubated with 1 mM 1-MT at  $37^\circ\text{C}$  for 2 hours. For the induction of acute GVHD lethally irradiated (CBA/HxC57Bl) F1 mice were injected intravenously with  $5 \times 10^6$  BM cells with 30% lymph node cells of CBA/H mice;  $5 \times 10^5$  native or cryopreserved FL MSCs were introduced immediately after the induction of pathology. GVHD intensity was assessed to day 14 after induction and treatment. Content of  $T_{reg}$  in the spleen of recipients was assessed with flow cytometer using antibodies to Foxp3, CD4 and CD25.

Reduction in  $T_{reg}$  content was noted in recipients with GVHD. We have shown the immunocorrecting effect of FL MSCs in the model of acute GVHD, which was manifested in the stimulation of  $T_{reg}$ . There was established the dependence between clinical manifestation of GVHD and decrease in intensity of  $T_{reg}$  formation in animals after administration of FL MSCs treated with 1-MT. Cryopreservation had a certain influence on therapeutic activity of FL MSCs in the treatment of AIDs *in vivo*.

The findings attest an important role of IDO in implementing the activity of FL MSCs and may be considered when developing the methods for cell therapy of AIDs.

