

Новые возможности терапевтического потенциала криоконсервированных фетальных нервных клеток. Способность коррекции цитокин-продуцирующей функции тимуса при развитии экспериментального аллергического энцефаломиелита

Е.А. ПОРОЖАН, М.В. ОСТАНКОВ, А.Н. ГОЛЬЦЕВ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

New Possibilities of Therapeutic Potential of Cryopreserved Fetal Neural Cells Correctability of Cytokine-Producing Thymus Function in Development of Experimental Allergic Encephalomyelitis

E.A. POROZHAN, M.V. OSTANKOV, A.N. GOLTSEV

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

Накоплен огромный опыт экспериментального и клинического применения фетальных нервных клеток (ФНК) при различных патологических состояниях организма [Skardelly M. *et al.*, 2011]. Обязательным этапом клинического использования ФНК является криоконсервирование. Ранее нами были получены результаты применения ФНК для коррекции состояния центральной нервной системы, однако актуальным остается изучение их иммуномодулирующей активности. Экспериментальный аллергический энцефаломиелит (ЭАЭ) как аналог рассеянного склероза человека характеризуется рядом функциональных нарушений главного органа иммуногенеза – тимуса, в частности его цитокин-продуцирующей функции. Исходя из того, что ФНК могут проникать через гематогимический барьер [Bubanovic V., 2003], существенный интерес для выяснения механизмов иммуномодулирующей активности этих клеток представляет изучение их влияния на разбалансированное состояние тимуса. Цель работы – оценить способность криоконсервированных ФНК корректировать цитокин-продуцирующую активность тимуса в динамике развития ЭАЭ.

Исследования выполнены на белых беспородных крысах с индукцией ЭАЭ [Давыдова Г.С., 1969]. Криоконсервирование ФНК крыс 11 суток гестации проводили по двум режимам: P1 [Грищенко В.И. и др., 2004] и P2 [Гольцев А.Н. и др., 2011], затем вводили животным внутривентриально на 14-е сутки развития ЭАЭ в концентрации 5×10^6 кл./мл. Контролем служили нативные ФНК и взрослые нервные клетки. Методом проточной цитофлуориметрии с использованием соответствующих моноклональных антител (BD, США) определяли IL-10⁺- и IFN- γ -клетки тимуса. Анализ продукции цитокинов тимуса осуществляли методом ELISA с использованием моноклональных антител к IFN- γ , IL-10 и TGF- β (BD, США).

Установлено нарушение цитокин-продуцирующей активности тимуса при развитии ЭАЭ. Так, на начальных этапах развития патологии концентрация TGF- β существенно увеличивалась (в 1,8 раза), постепенно снижаясь к концу срока наблюдения. Несмотря на повышенное содержание в тимусе IL-10⁺- и IFN- γ -клеток на пике развития ЭАЭ, продукция ими указанных медиаторов была снижена, что свидетельствует о функциональной неполноценности этих клеток. Введенные ФНК (независимо от вида) достоверно снижали количество IL-10⁺- и IFN- γ -клеток и повышали концентрацию IFN- γ , IL-10 и TGF- β , тем самым проявляя цитокин-корректирующий эффект в отношении тимуса. При этом криоконсервированный материал по ряду критериев имел преимущество перед нативным. Обсуждаются возможные механизмы действия ФНК на цитокиновый профиль тимуса при ЭАЭ.

There has been accumulated a huge experience of experimental and clinical application of fetal neural cells (FNCs) at different pathological states of an organism [Skardelly M. *et al.*, 2011]. Cryopreservation is a mandatory stage of clinical use of FNCs. Previously we have obtained the results of FNCs application to correct the state of central nervous system, however the study of their immune modulating activity has remained an actual one. Experimental allergic encephalomyelitis (EAE) as the analogue of human multiple sclerosis is characterized with some functional disorders of immune genesis main organ, thymus, in particular its cytokine-producing function. Regarding to the fact that FNCs can penetrate through blood-thymus barrier [Bubanovic V., 2003], a strong interest for elucidating the mechanisms of immune modulating activity of these cells is driven by the study of their effect on misbalanced thymus state. The research aim was to estimate the ability of cryopreserved FNCs to correct the cytokine-producing activity of thymus in EAE development dynamics.

The investigations are carried-out in white breedless rats with induced EAE [Davydova G.S., 1969]. The rats' FNCs of 11th gestation day were cryopreserved according to two regimens: R1 [Grishchenko V.I. *et al.*, 2004] and R2 [Goltsev A.N. *et al.*, 2011], then the animals were intraperitoneally introduced with these cells in concentration of 5×10^6 cells/ml at the 14th day of EAE development. Native FNCs and adult nerve cells served as the control. By the method of flow cytometry using corresponding monoclonal antibodies (BD, USA) the thymus cells IL-10⁺ and IFN- γ were examined. Thymus cytokine production was analyzed by ELISA using monoclonal antibodies to IFN- γ , IL-10 and TGF- β (BD, USA).

There was found an impairment of cytokine-producing activity of thymus at EAE development. So, at initial stages of pathology development the concentration of TGF- β significantly increased (in 1.8 times), gradually reducing to the end of observation term. Despite an increased content in thymus of IL-10⁺ and IFN- γ cells at the peak of EAE development, the production by them of the mentioned mediators was decreased, testifying to a functional incompetence of these cells. The introduced FNCs (independently on type) statistically and significantly reduced the number of IL-10⁺ and IFN- γ cells and increased the concentration of IFN- γ , IL-10 and TGF- β , thereby manifesting cytokine-correcting effect in respect of thymus. Herewith the cryopreserved material according to some criteria had advantages versus native one. There are discussed possible mechanisms of FNCs effect on cytokine profile of thymus at EAE.