

## Вплив «Сандіму» на розвиток імунної відповіді при внутрішньоочеревинному та внутрішньомозковому введенні алогенних фетальних нейроклітин у мишей

UDC 612.017.1:591.481.1:591.3:591.881:616-092.9

L.D. LYUBICH\*, M.I. LISYANY

## Effect of Sandimmun on Immune Response Development in Mice after Intraperitoneal and Intracerebral Introduction of Allogeneic Fetal Neural Cells

Метою даної роботи було порівняння імунної відповіді у мишей при внутрішньоочеревинному та внутрішньомозковому введенні фетальних нейральних клітин-прекурсорів (НКП) (E13-15), а також визначення можливості пригнічення викликаної імунної відповіді. Клітинні суспензії фетальних НКП від мишей-донорів СВА вводили внутрішньоочеревинно або внутрішньомозково мишам-реципієнтам C57BL/6 ( $1 \times 10^6$  клітин на тварину). Частині тварин проводили імуносупресію «Сандімуном» (циклоспорин А для парентерального введення) у кількості 100 мкг на тварину на 0-, 3-, 6-у добу. Контролем слугували інтактні тварини. Дослідження алоімуних та антигенспецифічних реакцій проводили через 6, 12, 18 та 37 діб після введення клітин. Системне (внутрішньоочеревинне) введення фетальних НКП викликало більш виразну клітинну і гуморальну алоімунову відповідь порівняно з локальним (внутрішньомозковим). Клітинні алоцитотоксичні імунні реакції досягали піку на 6–12-у добу після імунізації з подальшим поступовим зниженням до 37-ї доби. Призначення «Сандіму» зменшувало ці прояви при внутрішньоочеревинному введенні клітин вже з 12-ї доби і суттєво не впливало на даний показник у тварин з внутрішньомозковим введенням. Гуморальні алоцитотоксичні імунні реакції при внутрішньоочеревинному введенні фетальних НКП досягали максимуму на 12–18-у добу і знижувались з 18-ї по 37-у добу дослідження. Рівень алоцитотоксичних антитіл знижувався до норми під впливом «Сандіму» до 37-ї доби. У тварин із внутрішньомозковим введенням клітин рівень гуморальних алоцитотоксичних імунних реакцій зменшувався з 18-ї доби і суттєво не змінювався за умов впливу «Сандіму». Після системного введення фетальних НКП зафіксовано підвищений рівень антитіл до основного білка мієліну (ОБМ) (18-а доба) та S-100 (37-а доба). У тварин із внутрішньомозковим введенням фетальних НКП розвивалась більш значна специфічна імунна відповідь на маркерні антигени клітин нервової системи (ОБМ і NSE), яка нарощувалась до 37-ї доби. Корекція «Сандімуном» дозволяє знизити на 37-у добу рівень нейроаутоантитіл до норми.

**Ключові слова:** алогенні фетальні нейральні прекурсорі, внутрішньоочеревинне введення, внутрішньомозкове введення, алоцитотоксичні реакції, антитіла до нейроспецифічних білків, «Сандімум».

Целью данной работы было сравнение иммунного ответа у мышей при внутрибрюшинном и внутримозговом введении фетальных нейральных клеток-прекурсоров (НКП) (E13-15), а также определение возможности угнетения вызванного иммунного ответа. Клеточные суспензии фетальных НКП от мышей-доноров СВА вводили внутрибрюшинно или внутримозгово мышам-реципиентам C57BL/6 ( $1 \times 10^6$  клеток на животное). Части животных проводили иммуносупрессию «Сандиммуном» (циклоспорин А для парентерального введения) в количестве 100 мкг на животное на 0-, 3-, 6-е сутки. Контролем были интактные животные. Исследование аллоиммунных и антигенспецифических реакций проводили на 6-, 12-, 18- и 37-е сутки после введения клеток. Системное (внутрибрюшинное) введение фетальных НКП вызывало более выраженный клеточный и гуморальный аллоиммунный ответ по сравнению с локальным (внутримозговым). Клеточные аллоцитотоксические иммунные реакции достигали пика на 6–12-е сутки после иммунизации с дальнейшим постепенным снижением к 37-м суткам. Назначение «Сандиммуна» снижало эти проявления при внутрибрюшинном введении клеток с 12-х суток, существенно не влияя на данный показатель у животных с внутримозговым введением. Гуморальные аллоцитотоксические иммунные реакции при внутрибрюшинном введении фетальных НКП достигали максимума на 12–18-е сутки и снижались с 18-х по 37-е сутки исследования. Уровень аллоцитотоксических антител снижался к норме под влиянием «Сандиммуна» к 37-м суткам. У животных с внутримозговым введением клеток уровень гуморальных аллоцитотоксических иммунных реакций снижался с 18-х сут и существенно не изменялся под влиянием «Сандиммуна». После системного введения фетальных НКП зафиксирован повышенный уровень антител к основному белку миеллина (ОБМ) (18-е сутки) и S-100 (37-е сутки). У животных с внутримозговым введением фетальных НКП развивался более значимый специфический иммунный ответ на маркерные антигены клеток нервной системы (ОБМ и NSE), возрастая к 37-м суткам. Коррекция «Сандиммуном» позволяет снизить на 37-е сутки уровень нейроаутоантител к норме.

**Ключевые слова:** аллогенные фетальные нейральные прекурсоры, внутрибрюшинное введение, внутримозговое введение, аллоцитотоксические реакции, антитела к нейроспецифическим белкам, «Сандиммум».

ДУ «Інститут нейрохірургії ім.акад.А.П.Ромоданова НАМН України», м. Київ

A.P. Romodanov Institute of Neurosurgery of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

\* Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію: вул. Платона Майбороди, 32, Київ, Україна 04050; тел.: (+38 044) 483-36-84, електронна пошта: Liubichld@mail.ru

\* To whom correspondence should be addressed: 32, Platon Mayboroda str., Kyiv, Ukraine 04050; tel.:+380 44 483 3684, e-mail: Liubichld@mail.ru

The purpose of the study was to compare immune responses after intraperitoneal and intracerebral introduction of allogeneic fetal neural progenitor cells (NPCs) (E13-15) and estimate the possibility of suppression of the arising immune response. Fetal NPC suspensions from donor CBA mice were intraperitoneally or intracerebrally introduced to recipient C57Bl/6 mice ( $1 \times 10^6$  cells per animal). The part of animals underwent immunosuppression by Sandimmun (cyclosporin A for parenteral administration) in dose of 100  $\mu\text{g}$  per animal on the 0<sup>th</sup>, 3<sup>rd</sup>, and 6<sup>th</sup> days. Intact animals served as the control. Alloimmune and antigen-specific responses were assessed on the 6<sup>th</sup>, 12<sup>th</sup>, 18<sup>th</sup>, and 37<sup>th</sup> day after cells introduction. Systemic (intraperitoneal) introduction of fetal NPCs caused more expressed cellular and humoral immune responses if compared to local (intracerebral) one. The cellular allocytotoxic responses reached their maximum on the 6–12<sup>th</sup> day after immunization and thereafter gradually decreased to the 37<sup>th</sup> day. Sandimmun decreased these manifestations in mice with intraperitoneal introduction of the cells starting from the 12<sup>th</sup> day and did not affect significantly this index in animals with intracerebral introduction. Humoral allocytotoxic responses in mice with intraperitoneal introduction of fetal NPCs achieved their maximum on the 12–18<sup>th</sup> day and thereafter decreased starting from the 18<sup>th</sup> till the 37<sup>th</sup> day. The level of allocytotoxic antibodies decreased down to the norm under the effect of Sandimmun to the 37<sup>th</sup> day. In mice with intracerebral introduction of the cells the level of humoral allocytotoxic immune responses decreased starting from the 18<sup>th</sup> day, and was not significantly changed under the effect of Sandimmun. Increased levels of antibodies against MBP (18<sup>th</sup> day) and S-100 (37<sup>th</sup> day) were found in mice with intraperitoneal introduction of the fetal NPCs. The mice with intracerebral introduction of foetal NPCs were characterized with more significant immune response to marker antigens of nervous system (MBP and NSE), increased to the 37<sup>th</sup> day. Sandimmun administration reduced the neural antibodies level down to the norm to the 37<sup>th</sup> day.

**Key words:** allogeneic fetal neural progenitor cells, intraperitoneal introduction, intracerebral introduction, allocytotoxic responses, antibodies to neurospecific antigens, Sandimmun.

В останні десятиліття інтенсивно розвиваються клітинна та тканинна трансплантація і терапія, які ґрунтуються на застосуванні тканин і клітин ембріофетоплацентарного комплексу. Фетальні клітини і тканини мають більшу пластичність та швидкість проліферації, ніж зрілі структури; здатні диференціюватись в залежності від мікрооточення. Особливості метаболізму фетальних клітин забезпечують їх високу стійкість до несприятливих факторів, що обумовлює можливість застосування як нативних, так і кріоконсервованих фетальних клітин.

Клінічні протоколи клітинної трансплантації на сьогодні створені при широкому спектрі захворювань і звичайно відтворюють стратегію клітинного заміщення, а також забезпечення ростовими факторами [9]. Успішність трансплантації нейральних стовбурових клітин (НСК) та нейральних клітин-прекурсорів (НКП) для заміщення втрачених або порушених функцій ЦНС визначається тривалим виживанням пересаджених клітин, інтеграцією з системою реципієнта, а також відсутністю імунообумовлених ускладнень. Фундаментальними експериментальними дослідженнями показано, що кріоконсервовані фетальні нервові клітини демонструють більш значущий терапевтичний ефект, а також більш виражені імуномодуючі властивості, ніж нативні фетальні нервові клітини, при застосуванні у лікуванні захворювань нервової системи [1–3].

Проте питання про можливу здатність алогенних НСК та НКП викликати імунну активацію у віддаленому періоді після трансплантації залишається до кінця не вирішеним. Дані щодо імуногенних властивостей НСК *in vivo* є неоднозначними, дискусійним залишається питання про експресію антигенів гістосумісності НСК та НКП. Існують свідчення того, що НСК людини розпізнаються і викликають імунну відповідь в ало- і ксеногенних системах *ex vivo*, тобто рівень їх імунологічного потенціалу

Recent decades are characterized with a rapid development of cell and tissue transplantation as well as the therapy based on the application of tissues and cells of embryo-feto-placental complex. Fetal cells and tissues are more flexible and proliferate faster than mature structures, and are able to differentiate depending on microenvironment. Fetal cell metabolism features provide their high resistance to adverse factors that facilitates the possibility to apply either native or cryopreserved fetal cells.

Clinical protocols of cell transplantation are presently available for a wide range of diseases and usually utilize the strategy of cell replacement, and supply of growth factors [9]. Successful transplantation of neural stem cells (NSCs) and neural precursor cells (NPCs) for the replacement of lost or impaired functions of CNS is possible due to long-term survival of transplanted cells, their integration with the recipient organism, and lack of immune complications. The fundamental experimental studies have shown that cryopreserved fetal nerve cells showed a significant therapeutic effect, as well as more pronounced immunomodulatory properties comparing to a native fetal nerve cells, when using them in the treatment of nervous system impairments [1–3].

However, the question about the possible ability of allogeneic NSCs and NPCs induce immune activation in remote period after transplantation has remained to be fully resolved. Data on the immunogenic properties of NSCs *in vivo* are controversial, as well as the question about expression of histocompatibility antigens on NSCs and NPCs. There is an evidence that human NSCs are recognized and provoke immune response in allo- and xenogeneic systems *ex vivo*, *i. e.* the level of their immunological capacity is sufficient to activate recipient peripheral lymphocytes [22, 33, 34].

Various approaches are applied for suppression of immune responses in transplantation. *e. g.* administra-

є достатнім для активації периферичних лімфоцитів реципієнта [22, 33, 34].

Для пригнічення імунних реакцій при трансплантації застосовують різні підходи: призначення імуносупресивних препаратів, моделювання імунологічної толерантності у реципієнта, застосування для трансплантації генетично модифікованих НСК. Зокрема, за допомогою імуногістохімічних досліджень показано, що при введенні НСК лінії c17.2 у мозок щурів з ознаками модельованого паркінсонізму розвивалась клітинна та гуморальна імунна відповідь, рівень якої значно зменшувався при трансплантації НСК, трансфікованих геном імуносупресивного цитокіна IL-10 [34]. Krystkowiak P. та співавтори [26] навели результати застосування трансплантації фетальних нейротканин у пацієнтів з хворобою Хантінгтона: у 4 з 13 хворих діагностовано ознаки алімунізації без відторгнення трансплантата; у 5 з 13 були виявлені біологічні, радіологічні та клінічні ознаки процесу відторгнення. У той же час процес відторгнення був зворотним при застосуванні імуносупресивної терапії: активність трансплантата відновлювалась через 6 місяців. За даними M. Ideguchi та співавторів [22] через 2 та 8 тижнів після нейротрансплантації НКП, отриманих з ембріональних стовбурових клітин мишей, навколо цієї ділянки спостерігалась акумуляція мікрогліальних/макрофагальних клітин і лімфоцитів, що відображує розвиток імунної відповіді в алографтах НКП. Але таких ознак не спостерігали при призначенні циклоспорину А: кількість нейронів та астроцитів у алографті була вища в імуносупресованих мишей.

Метою даної роботи було порівняння імунної відповіді у мишей при внутрішньоочеревинному та внутрішньомозковому введенні фетальних НКП (термін гестації 13–15 діб), а також визначення можливості пригнічення викликаної імунної відповіді. Для цього використали препарат «Сандіmun» (циклоспорин А для парентерального введення) – циклічний поліпептид з вираженою імуносупресивною дією, який пригнічує розвиток реакцій клітинного типу і Т-залежне утворення антитіл.

### Матеріали та методи

Матеріалом для дослідження були: 1) НКП мишей СВА 13–15 доби гестації; 2) клітини лімфовузлів дорослих мишей СВА; 3) клітини лімфовузлів дорослих мишей-реципієнтів C57Bl/6; 4) сироватка периферичної крові дорослих мишей-реципієнтів C57Bl/6. Усі роботи з експериментальними тваринами проводилися з дотриманням Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження», «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей», а також принципів біоетики та норм біологічної безпеки.

tion of immunosuppressive agents, simulation of immunological tolerance in the recipient, transplantation of genetically modified NSCs. In particular, immunohistochemical studies have shown that introduction of the c17.2 line NSCs to the brain of rats with experimental Parkinson's disease led to the development of cellular and humoral immune response, which degree decreased significantly after the transplantation of NSCs transfected with immunosuppressive cytokine IL-10 gene [34]. Krystkowiak *et al.* [25] presented the results of transplantation of fetal neural tissue in patients with Huntington's disease: in 4 of 13 patients they observed the alloimmunization without graft rejection, in 5 of 13 the biological, radiological and clinical features of rejection were found. At the same time, the process of rejection was reversible if immunosuppressive therapy was applied: the activity of the transplant recovered after 6 months. According to Ideguchi *et al.* [22], 2 and 8 weeks post neurotransplantation of NPCs derived from embryonic stem cells of mice, they observed the accumulation of microglial/macrophage cells and lymphocytes around the transplantation area, which reflected the development of an immune response in NPC allografts. However, such signs were not observed if cyclosporine A was administered: the number of neurons and astrocytes in allografts was higher in immune-suppressed mice.

The aim of this study was to compare the immune responses in mice after intraperitoneal and intracerebral administration of fetal NPCs (gestation term of 13–15 days), as well as the possibility to suppress the immune response induced. To do this we applied Sandimmun (cyclosporin A for parenteral administration), the cyclic polypeptide with a strong immunosuppressive effect, which inhibits the development of cell-type reactions and T-dependent antibody formation.

### Materials and methods

As a material for the study served: 1) NPCs of CBA mice of 13–15 days of gestation; 2) lymph node cells of adult CBA mice; 3) lymph node cells of adult recipient C57Bl/6 mice; 4) blood serum of adult recipient C57Bl/6 mice. All the manipulations with experimental animals were conducted in compliance with the Law of Ukraine 'On protection of animals from cruelty', and the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes as well as the principles of bioethics and biosafety regulations.

NPC suspensions were isolated from the mice brain of 13–15 days of gestation by the method described previously [4]. Suspensions of lymphocytes were obtained from lymph nodes ( $n = 6$ ) mice by mechanical homogenization of lymph node tissue in RPMI medium, followed by washing and counting of cells with 3%  $\text{CH}_3\text{COOH}$  solution and 0.2% trypan blue solution.

Суспензії НКП отримували з мозку мишей 13–15-ї доби гестації за методикою, описаною раніше [4]. Суспензії лімфоцитів отримували з лімфовузлів ( $n = 6$ ) мишей шляхом механічної гомогенізації тканини лімфовузлів у середовищі RPMI з подальшим відмиванням та підрахунком клітин з 3%-м розчином  $\text{CH}_3\text{COOH}$  та 0,2%-м розчином трипанового синього.

Клітинні суспензії фетальних НКП від мишей-донорів СВА вводили ін'єкційним способом внутрішньоочеревинно або внутрішньомозково (у праву півкулю мозку) мишам-реципієнтам C57BL/6 у кількості  $1 \times 10^6$  клітин на тварину. Відповідно формували групи тварин: 1) внутрішньоочеревинне введення фетальних НКП ( $n = 42$ ); 2) внутрішньомозкове введення фетальних НКП ( $n = 42$ ). Кожна група мала підгрупу ( $n = 18$ ), тваринам якої проводили імуносупресію «Сандімуном» (циклоспорин А для парентерального введення, «Novartis Pharma AG», Швейцарія) у кількості 100 мкг на тварину на 0-, 3- та 6-у добу. Контролем слугували інтактні тварини ( $n = 12$ ). Всього було досліджено 96 тварин.

Через 6, 12, 18 та 37 діб після введення клітин проведено дослідження алоімуних та антигенспецифічних реакцій. З цією метою визначали цитотоксичну активність імунокомпетентних клітин лімфовузлів реципієнтів та цитотоксичну активність алоантитіл стосовно клітин лімфовузлів донорів, а також рівень аутоантитіл до нейроспецифічних антигенів в сироватках реципієнтів.

Дослідження цитотоксичної активності імунокомпетентних клітин проводилось МТТ-колориметричним методом. В якості клітин-ефекторів використовували лімфоцити лімфовузлів мишей-реципієнтів C57BL/6 експериментальних груп, клітин-мішеней – лімфоцити лімфовузлів мишей-донорів СВА. Співвідношення ефектор-мішень складало 5:1. Цитотоксичний тест проводили за стандартним протоколом [12]. Цитотоксичність виражали цитотоксичним індексом (ЦІ) у відсотках:

$$\text{ЦІ} = 100 - \left( \frac{\text{ОГ}_{\text{e+m}} - \text{ОГ}_{\text{e}}}{\text{ОГ}_{\text{m}}} \times 100 \right) \%,$$

де  $\text{ОГ}_{\text{e+m}}$  – значення оптичної густини в лунках ефектори + мішені;  $\text{ОГ}_{\text{e}}$  – значення оптичної густини в лунках з ефекторами;  $\text{ОГ}_{\text{m}}$  – значення оптичної густини в лунках з мішенями.

Цитотоксичну активність алоантитіл також досліджували МТТ-колориметричним методом. В якості клітин-мішеней використовували лімфоцити лімфовузлів мишей-донорів СВА, які інкубували в присутності сироваток мишей-реципієнтів C57BL/6 експериментальних груп з додаванням комплексу морської свинки (1:10) 24 год при 37°C. Використовували розведення сироваток 1:10. Завер-

Cell suspensions of fetal NPCs from donor CBA mice were injected intraperitoneally or intracerebrally (into the right brain hemisphere) in recipient C57BL/6 mice in amount of  $1 \times 10^6$  cells per animal. According to the procedures performed the following groups of animals were formed: 1 – intraperitoneal introduction of fetal NCPs ( $n = 42$ ), 2 – the intracranial introduction of fetal NCPs ( $n = 42$ ). Each group of animals comprised a subgroup ( $n = 18$ ), where the animals underwent the immunosuppression with Sandimmun (cyclosporin A for parenteral administration, Novartis Pharma AG, Switzerland) administered in amount of 100 micrograms per animal at the 0<sup>th</sup>, 3<sup>rd</sup> and 6<sup>th</sup> day. Intact animals ( $n = 12$ ) served as the control. Total number of animals was 96.

After 6, 12, 18 and 37 days after cell introduction we performed the assessment of alloimmune and antigen-specific reactions. For this purpose, we determined the cytotoxic activities of recipient lymph node immune cells and of alloantibodies against donor lymph node cells as well as the level of autoantibodies against neurospecific antigens in recipient sera.

Cytotoxic activity of immune cells was assessed by MTT colorimetric method. As effector cells we used lymph node lymphocytes of recipient C57BL/6 mice from experimental groups. As target cells we used lymph node lymphocytes from donor CBA mice. The effector-target ratio was 5:1. Cytotoxic test was performed under the standard protocol [12]. Cytotoxicity was expressed as cytotoxic index (CI) in percents:

$$\text{CI} = 100 - \left( \frac{A_{\text{e+t}} - A_{\text{e}}}{A_{\text{t}}} \times 100 \right) \%,$$

where  $A_{\text{e+t}}$  was the value of absorbance in wells with effectors + target cells;  $A_{\text{e}}$  denoted the value of absorbance in wells with effector cells;  $A_{\text{t}}$  was the value of absorbance in wells with targets.

Investigation of cytotoxic activity of alloantibodies was also carried out by MTT-colorimetric method. As target cells we used lymph node cells from donor CBA mice; the cells were incubated during 24 hrs at 37°C in the presence of serum from recipient C57BL/6 mice from experimental groups supplemented with the guinea pig complement (1:10). We used serum dilution of 1:10. Completion of the reaction and recording the results was performed by the standard protocol [12]. Cytotoxicity was expressed as cytotoxic index (CI) in percents:

$$\text{CI} = 100 - \left( \frac{A_{\text{t}} - A_{\text{s+t}}}{A_{\text{t}}} \times 100 \right) \%,$$

where  $A_{\text{s+t}}$  was the value of absorbance in wells with serum + target cells;  $A_{\text{t}}$  was the value of absorbance in wells with targets.



шення реакції та реєстрацію результатів проводили за протоколом [12]. Цитотоксичність виражали цитотоксичним індексом (ЦІ) у відсотках:

$$\text{ЦІ} = 100 - \left( \frac{\text{ОГ}_m - \text{ОГ}_{c+m}}{\text{ОГ}_m} \times 100 \right) \%,$$

де  $\text{ОГ}_{c+m}$  – значення оптичної густини в лунках сироватка + мішені;  $\text{ОГ}_m$  – значення оптичної густини в лунках з мішенями.

Рівень гуморальних аутоімунних реакцій до нейроспецифічних білків (НСБ) (основний білок мієліну (ОБМ), S-100, NSE) в сироватках тварин експериментальних груп визначали твердофазним імуноферментним методом [6]. Принцип методу полягає в тому, що антитіла тестованого зразка взаємодіють з іммобілізованим на твердій фазі антигеном (НСБ), потім фіксують на собі антитіла (вторинні), кон'юговані з ферментом. Кількість зв'язаного кон'югата виявляється за допомогою хромогенного субстрату, причому інтенсивність забарвлення, що розвивається, пропорційна кількості антитіл у зразках. Антиген іммобілізували на твердій фазі (планшетах фірми «Dynatech Microtiter», Данія) в концентрації 10 мкг/мл; в кожен лунку планшета вносили по 100 мкл антигену. Сорбція антигену тривала 18–20 год при 4°C і проводилась: для ОБМ – у цитратно-фосфатному буфері 0,1 М, рН 6,0; S-100 і NSE – у карбонатно-бікарбонатному буфері 0,1 М з рН 9,6. Видалення антигену, що не зв'язався, а також розведення всіх реагентів і наступне видалення компонентів, які не зв'язалися, проводили тричі з використанням фосфатного буферу 0,01 М, рН 7,4 з додаванням 0,05%-го розчину твіну-20. Для заповнення місць, які не зв'язалися, з метою блокування подальшого неспецифічного зв'язування сайтів в лунки вносили 1% бичачого сироваткового альбуміну. Досліджувані зразки сироватки вносили у розведенні 1:100 по 100 мкл, інкубація тривала 24 год. Далі тричі відмивали фосфатним буфером і вносили по 100 мкл кон'югата антивидових кролячих імуноглобулінів з пероксидазою хрину (НДЦЕМ ім. акад. Н.Ф. Гамалеї, Росія) в робочому розведенні, яке підбирали методом титрування. Кон'югат інкубували протягом 1 год при 20°C; після відмивання в кожен лунку планшета вносили по 100 мкл ферментного субстрату (0,08% розчин 5-аміносалицилової кислоти з 0,05% пероксиду водню). Зупиняли реакцію через 40 хв додаванням 100 мкл NaOH. Рівень аутоантитіл визначали методом спектрофотометрії в аналізаторі імуноферментному фотоелектричному АІФ-Ц-01С (Білорусь) і виражали в умовних одиницях (ум. од. = оптична густина проби × ступінь розведення досліджуваного зразка).

The level of humoral autoimmune responses to neurospecific proteins (NSPs) (myeline basic protein (MBP), S-100, NSE) in serum of animals from experimental groups were determined by solid phase enzyme-immunoassay [6]. The principle of the method is that the antibodies from tested sample interact with the immobilized on a solid phase antigen (NSPs), then bind the antibodies (secondary), conjugated with the enzyme. Amount of bound conjugate is detected by chromogenic substrate, and the intensity of appeared color is proportional to the amount of antibodies in the sample. We immobilized the antigen on a solid phase (plates of Dynatech Microtiter, Denmark) at a concentration of 10 mg/ml; 100 ml of antigen was introduced into each well of the plates. Sorption of antigen lasted 18–20 hours at 4°C and was performed: in 0.1 M citrate-phosphate buffer, pH 6.0, for MBP; in 0.1 M carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6, for S-100 and NSE. Removing of non-bound antigen, as well as dilution of reagents and subsequent removal of non-bound components was performed thrice with 0.01 M phosphate buffer, pH 7.4, supplemented with 0.05% Twin-20. To block the non-bound sites for preventing the subsequent non-specific binding, we put 1% bovine serum albumin into the wells. Studied serum samples diluted 1:100 were introduced in amount of 100 ml, and incubation lasted 24 hrs. Then we performed triple washing in phosphate buffer and introduced 100 ml of anti-rabbit IgG conjugates with horse-radish peroxidase (R&D Institute for Epidemiology and Microbiology, Russia) in the operating dilution, selected by titration. The conjugates were incubated for 1 h at 20°C, washed-out, and then 100 ml of the enzyme substrate (0.08% solution of 5-aminosalicylic acid with 0.05% hydrogen peroxide) was put into each well. Reaction was stopped after 40 min by addition of 100 µl of NaOH. The level of autoantibodies was spectrophotometrically determined by immunoenzyme photoelectric analyzer AIF-U-01S (Belarus) and expressed in arbitrary units (a. u. = absorbance of the sample × degree of dilution of the sample).

Statistical analysis of the results was carried out using the Statistica 5,0 software package.

## Results

It was found that on the sixth day after both intraperitoneal and intracerebral introduction of fetal NPCs a cytotoxic activity of lymph node lymphocytes from recipient C57Bl/6 mice significantly increased in the MTT-test regarding lymph node lymphocytes from donor CBA mice ( $p < 0.0007$  compared with control) (Fig. 1). Thereafter these indices gradually diminished from 12<sup>th</sup> to 37<sup>th</sup> day ( $p < 0.014$ – $0.004$  compared with 6<sup>th</sup> day), reaching at the end the values of physiological norm. Moreover, in the group of animals with intraperitoneal introduction of fetal NPCs the cytotoxic acti-

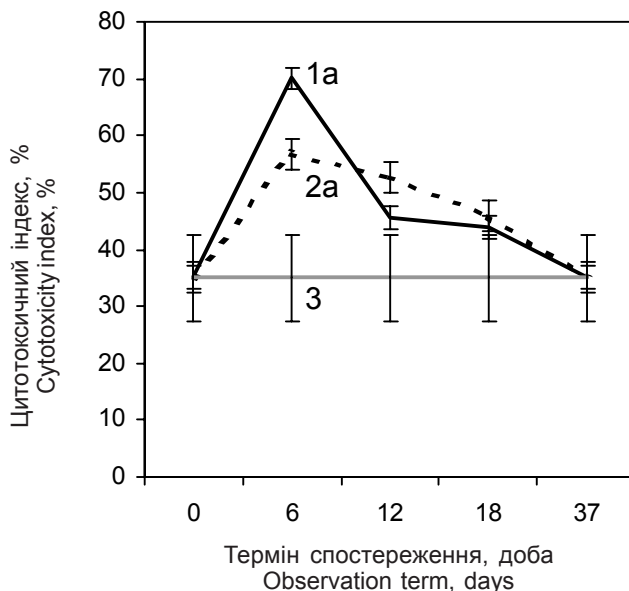
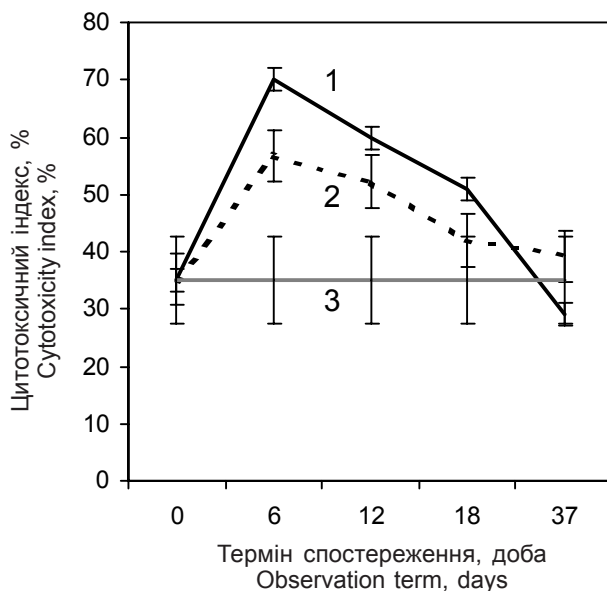
Статистична обробка отриманих результатів проводилася з використанням пакета програм «Statistica 5,0».

### Результати

Встановлено, що на 6-у добу як після внутрішньоочеревинного, так і після внутрішньомозкового введення фетальних НКП достовірно зростала цитотоксична активність лімфоцитів лімфовузлів мишей-реципієнтів C57Bl/6 у МТТ-тесті стосовно лімфоцитів лімфовузлів мишей-донорів СВА ( $p < 0,0007$  у порівнянні з контролем) (рис. 1). В наступні терміни ці показники поступово знижувались з 12-ї по 37-у добу ( $p < 0,014$ – $0,004$  у порівнянні з 6-ю добою), досягаючи в останній термін фізіологічної норми. При цьому у групі тварин із внутрішньоочеревинним введенням фетальних НКП цитотоксична активність лімфоцитів лімфовузлів була достовірно вищою за аналогічний показник тварин з внутрішньомозковим введенням клітин на 6-у ( $p < 0,012$ ), 18-у ( $p < 0,00071$ ) та 37-у добу ( $p < 0,049$ ). Призначення «Сандімуно» дозволило знизити рівень алоцитотоксичної активності у тварин із внутрішньоочеревинним введенням фетальних НКП з 12-ї по 37-у добу ( $p < 0,03$  та  $p < 0,034$  відповідно) після імунізації. У тварин з внутрішньомозковим введенням клітин цитотоксична активність лімфоцитів практично досягала контрольного рівня вже на 18-у добу, достовірно не відрізняючись від нього і в подальшому, на 37-у добу дослідження; імносупресія «Сандімуном» суттєво не впливала на даний показник у цих тварин.

При дослідженні сироватки периферичної крові мишей-реципієнтів C57Bl/6 у МТТ-тесті стосовно лімфоцитів лімфовузлів мишей-донорів СВА в титрі 1:10 встановлено зростання цитотоксичного індексу алоантитіл з 6-ї по 12-у добу в обох групах ( $p < 0,019$ ), який утримувався на високому рівні протягом 12-18-ї доби, і наступне його зменшення з 18-ї по 37-у добу ( $p < 0,03$ ) (рис. 2). У групі тварин з внутрішньоочеревинним введенням фетальних НКП досліджений показник був вищим, ніж у тварин із внутрішньомозковим введенням, достовірно відрізняючись на 12-у ( $p < 0,04$ ) та 18-у добу ( $p < 0,019$ ). На 37-у добу спостереження рівень алоантитіл у титрі 1:10 залишався підвищеним в обох досліджених групах ( $p < 0,05$ ). Корекція «Сандімуном» знизила вказаний показник до 37-ї доби спостереження у тварин із внутрішньоочеревинним введенням фетальних НКП ( $p < 0,05$ ), суттєво не вплинувши на показник тварин із внутрішньомозковим введенням клітин.

При дослідженні рівня аутоантитіл до нейроспецифічних антигенів встановлено, що рівень аутоантитіл до ОБМ (рис. 3, А) у групі тварин із внутрішньоочеревинним введенням фетальних НКП



**Рис. 1.** Цитотоксична активність лімфоцитів лімфовузлів мишей-реципієнтів C57Bl/6 стосовно лімфоцитів лімфовузлів мишей-донорів СВА при внутрішньоочеревинному і внутрішньомозковому введенні клітин (МТТ-тест, %): 1 – внутрішньоочеревинне введення нейроклітин E13-15 СВА донорів; 1a – внутрішньоочеревинне введення нейроклітин E13-15 СВА донорів + імносупресія; 2 – інтракраніальне введення нейроклітин E13-15 СВА донорів; 2a – інтракраніальне введення нейроклітин E13-15 СВА донорів + імносупресія; 3 – контроль C57BL/6 (інтактні).

**Fig. 1.** Cytotoxic activity of lymph node lymphocytes of recipient C57Bl/6 mice regarding lymph node lymphocytes of donor CBA mice after intraperitoneal and intracranial introduction of the cells (MTT test, %): 1 – intraperitoneal introduction of E13-15 neural cells of CBA donors; 1a – intraperitoneal introduction of E13-15 neural cells of CBA donors + immune suppression; 2 – intracranial introduction of E13-15 neural cells of CBA donors; 2a – intracranial introduction of E13-15 neural cells of CBA donors + immune suppression; 3 – control C57BL/6 mice (intact).



**Рис. 2.** Цитотоксичний індекс сироватки периферичної крові (титр 1:10) мишей-реципієнтів C57Bl/6 стосовно лімфоцитів лімфовузлів мишей-донорів CBA при внутрішньоочеревинному і внутрішньомозковому введенні клітин (МТТ-тест, %): 1 – внутрішньоочеревинне введення нейроклітин E13-15 CBA донорів; 1a – внутрішньоочеревинне введення нейроклітин E13-15 CBA донорів + імуносупресія; 2 – внутрішньомозкове введення нейроклітин E13-15 CBA донорів; 2a – внутрішньомозкове введення нейроклітин E13-15 CBA донорів + імуносупресія; 3 – контроль C57Bl/6 (інтактні).

**Fig. 2.** Cytotoxic index of peripheral blood serum (titer 1:10) of recipient C57Bl/6 mice regarding lymph node lymphocytes of donor CBA mice after intraperitoneal and intracranial introduction of the cells (MTT test, %): 1 – intraperitoneal introduction of E13-15 neural cells of CBA donors; 1a – intraperitoneal introduction of E13-15 neural cells of CBA donors + immune suppression; 2 – intracranial introduction of E13-15 neural cells of CBA donors; 2a – intracranial introduction of E13-15 neural cells of CBA donors + immune suppression; 3 – control C57Bl/6 mice (intact).

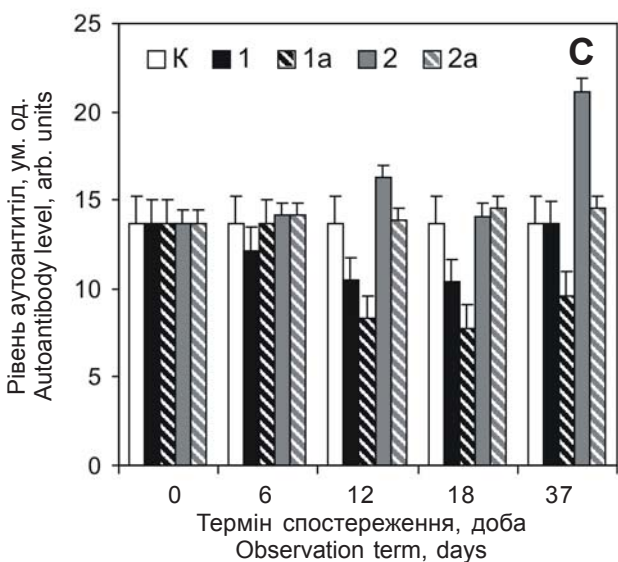
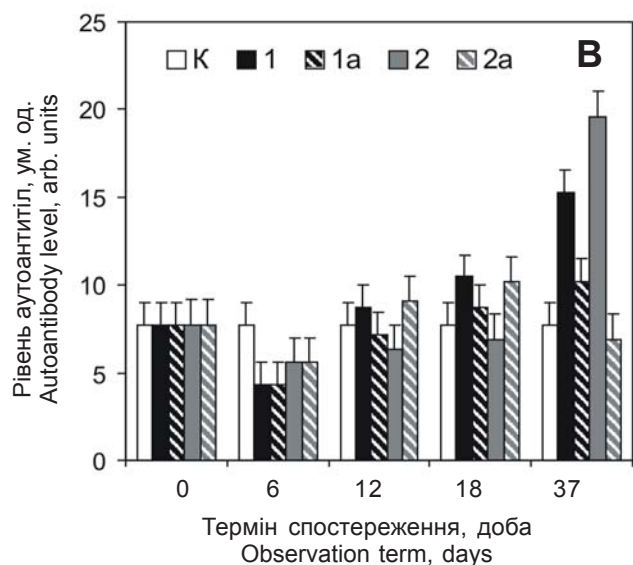
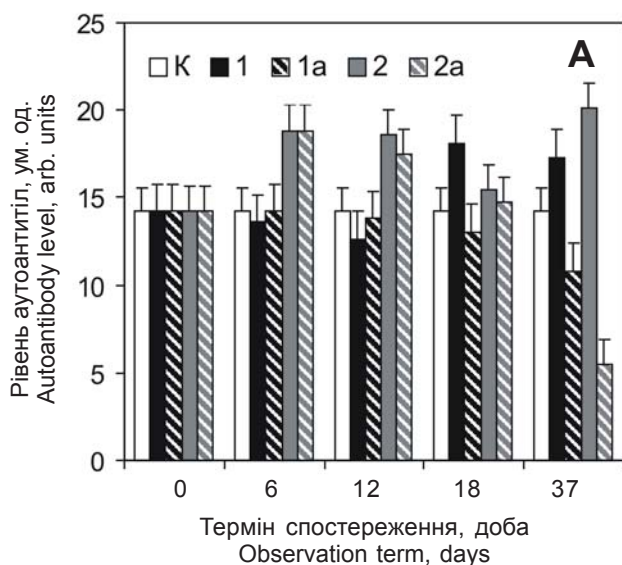
зростав на 18-у добу ( $p < 0,05$ ), в подальшому незначно знижуючись до 37-ї доби спостереження. В той же час у тварин з внутрішньомозковим введенням фетальних НКП рівень аутоантитіл до ОБМ зростав з 6-ї по 12-у добу, достовірно перевищуючи контрольні показники ( $p < 0,00028$  і  $p < 0,032$ ); у подальшому після зниження на 18-у добу після трансплантації рівень антитіл до ОБМ знову зростав на 37-у добу, достовірно перевищуючи контроль ( $p < 0,05$ ). При цьому даний показник достовірно відрізнявся у групах тварин при різних способах введення клітин на 6-у ( $p < 0,017$ ) та 12-у ( $p < 0,0092$ ) добу. Застосування імуносупресії «Сандімуном» дозволило знизити досліджуваний показник на 18–37-у добу в обох вказаних групах тварин.

У групі тварин із внутрішньоочеревинним введенням фетальних НКП рівень аутоантитіл до S-100 на 6-у добу дослідження достовірно знижувався відносно контролю ( $p < 0,015$ ), а в подальші терміни підвищувався, зростаючи вище норми на 37-у добу ( $p < 0,05$ ) (рис.3, В). Подібну динаміку цей показник мав у тварин з внутрішньомозковим введенням фетальних НКП: рівень аутоантитіл до S-100 зростав з 6-ї по 37-у добу, перевищуючи в останній термін контрольні показники. Призначення

вivity of lymph node lymphocytes was significantly higher than that of animals with intracerebral administration of cells on the 6<sup>th</sup> ( $p < 0.012$ ), 18<sup>th</sup> ( $p < 0.00071$ ) and 37<sup>th</sup> day ( $p < 0.049$ ). Administration of Sandimmun allowed to reduce the allocytotoxic activity in the animals with intraperitoneal introduction of fetal NPCs from 12<sup>th</sup> to the 37<sup>th</sup> day ( $p < 0.03$  and  $p < 0.034$ , respectively) after immunization. In the animals with intracerebral introduction of cells the cytotoxic activity of lymphocytes almost reached the control level even to the 18<sup>th</sup> day, and there was no significant differences with the control thereafter, at the 37<sup>th</sup> day of study, the immunosuppression with Sandimmun had no significant influence on the index in these animals.

The assessment of the blood serum of recipient C57Bl/6 mice by the MTT-test regarding lymph node lymphocytes from donor CBA mice in the titer of 1:10 revealed the rise in cytotoxic index of alloantibodies from 6<sup>th</sup> to 12<sup>th</sup> day in both groups ( $p < 0.019$ ), which was kept at a high level during the 12<sup>th</sup> to 18<sup>th</sup> day, and reduced thereafter from 18<sup>th</sup> to 37<sup>th</sup> day ( $p < 0.03$ ) (Fig. 2). In the group of animals with intraperitoneal introduction of fetal NPCs the studied index was higher than in the animals with intracerebral administration of the cells, with significant differences on the 12<sup>th</sup> ( $p < 0.04$ ) and 18<sup>th</sup> day ( $p < 0.019$ ). On the 37<sup>th</sup> obser-





**Рис. 3.** Рівень аутоантитіл до нейроспецифічних білків в сироватках периферичної крові мишей-реципієнтів C57Bl/6 при внутрішньоочеревинному і внутрішньомозковому введенні клітин мишей-донорів CBA (ум. од.): А – до ОБМ; В – до S-100; С – до NSE; 1 – внутрішньоочеревинне введення нейроклітин E13-15 CBA донорів; 1a – внутрішньоочеревинне введення нейроклітин E13-15 CBA донорів + імуносупресія; 2 – внутрішньомозкове введення нейроклітин E13-15 CBA донорів; 2a – внутрішньомозкове введення нейроклітин E13-15 CBA донорів + імуносупресія; К – контроль C57BL/6 (інтактні).

**Fig. 3.** Level of autoantibodies against neurospecific proteins in sera of peripheric blood of recipient C57Bl/6 mice after intraperitoneal and intracranial introduction of the cells from donor CBA mice (arb. units): A – against MBP; B – against S-100; C – against NSE; 1 – intraperitoneal introduction of E13-15 neural cells of CBA donors; 1a – intraperitoneal introduction of E13-15 neural cells of CBA donors + immune suppression; 2 – intracranial introduction of E13-15 neural cells of CBA donors; 2a – intracranial introduction of E13-15 neural cells of CBA donors + immune suppression; K – control C57BL/6 mice (intact).

імуносупресії «Сандімуном» дозволило знизити рівень аутоантитіл до S-100 до 37-ї доби в обох групах.

Аналіз динаміки рівня аутоантитіл до NSE показав, що у групі тварин із внутрішньоочеревинним введенням фетальних НКП рівень аутоантитіл до NSE достовірно знижувався на 12–18-у добу ( $p < 0,0095$ ), в подальшому підвищуючись до контрольних значень до 37-ї доби спостереження (рис. 3, С). У тварин з внутрішньомозковим введенням фетальних НКП даний показник зростав на 12-у добу ( $p < 0,031$ ); у подальшому після зниження на 18-у добу після трансплантації рівень антитіл до NSE знову зростав на 37-у добу, достовірно перевищуючи контроль ( $p < 0,05$ ). При цьому даний показник достовірно відрізнявся у групах тварин при різних способах введення клітин на 6-у ( $p < 0,035$ ), 12-у ( $p < 0,0014$ ) та 18-у ( $p < 0,0077$ ) добу. Імуносупресія

на день трансплантації рівень аутоантитіл до S-100 в обох групах тварин знизився до рівня контролю. На день трансплантації рівень аутоантитіл до S-100 в обох групах тварин знизився до рівня контролю. На день трансплантації рівень аутоантитіл до S-100 в обох групах тварин знизився до рівня контролю. На день трансплантації рівень аутоантитіл до S-100 в обох групах тварин знизився до рівня контролю.

Investigation of the level of autoantibodies against neurospecific antigens revealed that levels of autoantibodies against MBP (Fig. 3A) in the group of animals with intraperitoneal introduction of fetal NPCs increased on the 18<sup>th</sup> day ( $p < 0.05$ ), and slightly decreased to 37<sup>th</sup> day of observation. At the same time in the animals with intracranial introduction of fetal NPCs the level of autoantibodies to MBP rised from the 6<sup>th</sup> to the 12<sup>th</sup> day, significantly exceeding the control values ( $p < 0.00028$  and  $p < 0.032$ ), declined thereafter to the 18<sup>th</sup> day post transplantation, and again increased on



«Сандімуном» достовірно знижувала рівень аутоантитіл до NSE у групах тварин із введенням фетальних НКП на 37-у добу спостереження.

### Обговорення

В результаті проведених досліджень показано, що клітинні алоцитотоксичні імунні реакції генеруються у відповідь як на внутрішньоочеревинне, так і внутрішньомозкове введення фетальних НКП з максимальним проявом на 6–12-у добу після імунізації і подальшим поступовим зниженням до 37-ї доби. Системне (внутрішньоочеревинне) введення клітин викликало більш виразну клітинну алоімунну відповідь, порівняно із локальним (внутрішньомозковим) введенням клітин.

Ці результати, на наш погляд, підтверджують літературні дані про те, що алотрансплантати можуть активувати природну та адаптивну імунну відповідь [17] та за умови підвищення на НСК експресії антигенів головного комплексу гістосумісності (ГКГ) і наявності коstimуляторних молекул можуть індукувати ефекторну фазу імунної відповіді із залученням Т-клітин та цитотоксичну відповідь натуральних кілерних клітин [30]. Розвиток клітинних алоцитотоксичних реакцій після введення алогенних фетальних НКП свідчить про наявність антигенів ГКГ на клітинах фетального мозку [5, 7, 11, 13, 27–29], рівень експресії яких є, вочевидь, достатнім для генерації алоцитотоксичної клітинної відповіді і забезпечує розпізнавання алогенних детермінант як природними кілерами та цитотоксичними лімфоцитами, так і Т-лімфоцитами-хелперами. При цьому, крім представлення антигену за допомогою антигенпрезентуючих клітин лімфатичних вузлів реципієнта, не можна виключати прямого представлення антигену введеними реципієнту НКП фетального мозку, що експресують молекули ГКГ II класу.

З 12-ї доби реєструвалось зниження алоцитотоксичної клітинної відповіді реципієнтів на алоантигени мишей-донорів. Можна припустити, що на цю ланку імунної відповіді введені НКП чинили імносупресивний вплив, що фіксувався вже на 12-у добу після введення клітин, можливість якого підтверджена даними інших дослідників [13, 15, 20]. Так, N. Fainstein та співавтори [20] встановили, що НПК пригнічували *in vitro* індукцію маркерів активації Т-клітин (IL-2R- $\alpha$ , PD-1, CTLA) та проліферацію Т-клітин у відповідь на стимули, опосередковані Т-клітинним рецептором, а також пригнічували проведення сигналу прозапальних цитокінів в імуніцитах. Akesson E. та співавтори [13] при порівнянні алогенної імунної відповіді на НСК, астроцити та нейрони встановили, що астроцити експресували молекули як ГКГ I класу, так і ГКГ II класу, на тому ж рівні, що і НСК, тоді як нейрони – тільки

the 37<sup>th</sup> day, significantly exceeding the control ( $p < 0.05$ ). Moreover, this index was significantly different in the groups of animals with different ways of introduction of the cells on the 6<sup>th</sup> ( $p < 0,017$ ) and 12<sup>th</sup> ( $p < 0.0092$ ) day. Application of immunosuppression with Sandimmun allowed to reduce the index on 18–37<sup>th</sup> day in both groups of animals.

In the group of animals with intraperitoneal introduction of fetal NPCs the level of autoantibodies against S-100 was significantly reduced if compared with the control ( $p < 0.015$ ) on the 6<sup>th</sup> observation day, and increased in next terms, exceeding the norm on the 37<sup>th</sup> day ( $p < 0.05$ ) (Fig. 3B). A similar pattern was observed in the animals with intracranial introduction of fetal NPCs: the level of antibodies against S-100 grew from the 6<sup>th</sup> to the 37<sup>th</sup> day, exceeding the control values in the last term. Administration of immunosuppression with Sandimmun allowed to reduce the level of autoantibodies against S-100 to the 37<sup>th</sup> day in both groups.

The analysis of the level of antibodies against NSE showed that in the group of animals with intraperitoneal introduction of fetal NPCs the level of autoantibodies against NSE was significantly decreased in the 12–18<sup>th</sup> day ( $p < 0.0095$ ), with following rise up to the control values to 37<sup>th</sup> day of observation (Fig. 3C). In animals with intracranial introduction of fetal NPCs the index increased to the 12<sup>th</sup> day ( $p < 0.031$ ); and after further reduction on the 18<sup>th</sup> day post transplantation the level of antibodies against NSE rose again on the 37<sup>th</sup> day, significantly exceeding the control ( $p < 0.05$ ). Moreover, this index was significantly different in the groups of animals with different ways of introducing the cells on the 6<sup>th</sup> ( $p < 0.035$ ), 12<sup>th</sup> ( $p < 0.0014$ ) and 18<sup>th</sup> ( $p < 0.0077$ ) day. Immunosuppression with Sandimmun significantly reduced the level of antibodies against NSE in groups of animals with the introduction of fetal NPCs on the 37<sup>th</sup> day of observation.

### Discussion

The conducted research showed that cellular alloctotoxic immune responses were generated in response to both intraperitoneal and intracerebral introduction of fetal NPCs with the maximum expression at the 6–12<sup>th</sup> day after immunization and subsequent gradual decrease to the 37<sup>th</sup> day. Systemic (intraperitoneal) introduction of cells caused more expressed cell alloimmune response if compared to the local (intracerebral) entering cells.

These results, in our opinion, confirm the reported data that allografts can activate natural and adaptive immune response [17] and if major histocompatibility complex (MHC) antigens expression on NSCs is elevated and co-stimulatory molecules are present they can induce the effector phase of the immune response involving T cells and cytotoxic response of natural killers [30]. Development of cell alloctotoxic reactions after

молекули ГКГ I. Астроцити та НСК, але не нейрони, виявляли супресивний ефект на алогенну імунну відповідь. Ben-Hur T. показав [15], що при внутрішньовенному введенні НПК останні не потрапляли в ЦНС, а транзиторно виявлялись у лімфовузлах та селезінці, де вони пригнічували активацію та проліферацію Т-клітин. На нашу думку, схожий механізм може реалізуватись при внутрішньоочеревинному введенні фетальних НПК.

Особливості динаміки клітинних алоімунних реакцій після введення фетальних нейральних клітин (НК) можуть пояснюватись кількома механізмами: безпосередньою взаємодією НСК чи НПК з Т-лімфоцитами, яка призводить до клональної анергії чи апоптозу останніх через відсутність ко-стимулюючого сигналу від ко-стимуляторних молекул; секрецією НСК біологічно активних сполук із імуносупресивною дією; супресивною дією регуляторних Т-лімфоцитів  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ , здатних пригнічувати алоспецифічні Т-лімфоцити, що розглядаються як засіб індукції імунологічної толерантності до алотрансплантатів для попередження гострого та хронічного відторгнення трансплантатів [10].

Прояви алоцитотоксичних клітинних реакцій зменшувались до 37-ї доби після трансплантації фетальних НПК, тоді як призначення «Сандімуно» дозволило зменшити ці прояви при внутрішньоочеревинному введенні клітин, починаючи вже з 12-ї доби. В той же час імуносупресія «Сандімуном» суттєво не вплинула на даний показник у тварин з внутрішньомозковим введенням клітин, що можна пояснити тим, що цитотоксична активність лімфоцитів тварин даної групи практично досягала контрольного рівня вже на 18-у добу, утримуючись на ньому до 37-ї доби дослідження.

При внутрішньоочеревинному введенні клітин гуморальні алоцитотоксичні імунні реакції досягали максимуму на 12–18-у добу і знижувались з 18-ї по 37-у добу дослідження, що узгоджується з даними X.J. Wang та співавторів [34]. Через місяць після внутрішньоочеревинного введення різних типів клітин реєструвався залишковий рівень алоцитотоксичних антитіл, який вдалося знизити призначенням «Сандімуно». Системне (внутрішньоочеревинне) введення клітин викликало більш виразну гуморальну алоімунну відповідь, порівняно із локальним (внутрішньомозковим). У тварин із внутрішньомозковим введенням клітин рівень гуморальних алоцитотоксичних імунних реакцій зменшувався, починаючи з 18-ї доби, і суттєво не змінювався за умов впливу «Сандімуно».

Зафіксований нами розвиток алоцитотоксичних реакцій після внутрішньомозкового введення фетальних НПК мишей СВА імунокомпетентним мишам C57Bl/6 узгоджується з даними інших

introduction of allogeneic fetal NPCs indicates the presence of MHC antigens on fetal brain cells [5, 7, 11, 13, 27–29], which expression is apparently sufficient to generate cell allocytotoxic response and provides recognition of allogeneic determinants by both natural killers and cytotoxic lymphocytes as well as by helper T cells. Moreover, along with the presentation of antigen by lymph node antigen presenting cells of recipient, one can not exclude the direct presentation of antigen by MHC II antigen expressing NPCs of fetal brain introduced to recipient.

From 12<sup>th</sup> day we observed the decline in cell allocytotoxic response of recipient to alloantigens of donor mice. We can assume that this component of the immune response was immunosuppressed by introduced NPCs that was revealed on the 12<sup>th</sup> day after introduction of the cells, and this possibility was confirmed by other researchers [13, 15, 20]. For example, Fainstein *et al.* [20] found that the NPCs suppressed *in vitro* the induction of T cell activation markers (IL-2R- $\alpha$ , PD-1, CTLA) as well as T cell proliferation in response to stimuli mediated by T cell receptor and inhibited the signaling of proinflammatory cytokines in immunocytes. Akesson *et al.* [13] had compared allogeneic immune response to NSCs, astrocytes and neurons and had found that astrocytes expressed both MHC I and MHC II molecules at the same level like the NSCs, while the neurons did only MHC I molecules. NSCs and astrocytes, unlike neurons, showed suppressive effect on allogeneic immune response. Ben-Hur [15] showed that intravenously injected NPCs did not appear in CNS, but were transiently found in lymph nodes and spleen, where they inhibited the activation and proliferation of T cells. We believe that a similar mechanism may be implemented by intraperitoneal administration of fetal NPCs.

Features of the dynamics of cellular alloimmune reactions after administration of fetal neural cells (NCs) can be explained by several mechanisms: direct interaction of NSCs or NPCs with T lymphocytes, which leads to apoptosis or clonal anergy of the latter due to the lack of co-stimulating signal from co-stimulating molecules; secretion by NSCs of biologically active substances with immunosuppressive action; suppressive effect of  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  regulatory T lymphocytes, being able to inhibit allospecific T cells, considered as a means of inducing immunological tolerance to allografts for preventing acute and chronic transplant rejection [10].

Manifestations of cell allocytotoxic reactions were decreased to the 37<sup>th</sup> day post transplantation of fetal NPCs, while the administration of Sandimmun allowed to reduce these manifestations at the intraperitoneal introduction of cells, starting from the 12<sup>th</sup> day. At the same time, the immunosuppression with Sandimmun had no significant influence on this index in animals

авторів [16, 22, 23], які показали, що НСК та НПК індукують ефektorну фазу імунної відповіді при трансплантації у мозок. При розвитку імунної відповіді на алографти НПК виявляється імунозалежна втрата пересаджених клітин [24], акумуляція мікрогліальних/макрофагальних клітин та лімфоцитів у алографтах, проте рівень імунної відповіді недостатній для відторгнення трансплантата [31].

Динаміка розвитку алоімуних реакцій, отримана в наших дослідженнях, узгоджується з результатами інших авторів. Зокрема, при алотрансплантації клітин з периферичної нервової тканини мишей C57BL/6 у мозок мишей BALB/c на 10-у добу гістологічно виявлялась значна клітинна інфільтрація в алографтах [31]. При порівнянні імунної відповіді мишей цих ліній на трансплантати нервів і шкіри (трансплантати шкіри являють собою «золотий стандарт» – їх відторгнення прямо корелює з клітинною та гуморальною відповіддю реципієнтів) встановлено [32], що при обох варіантах трансплантації реєструвалася значна клітинна імунна відповідь з максимальним розвитком на 14-у добу. При цьому гуморальна імунна відповідь з наростанням титру антитіл досягала піку на 14-у та 21-у добу.

Показана в нашому дослідженні можливість розвитку клітинних і гуморальних алоцитотоксичних реакцій при внутрішньомозковому введенні фетальних НКП підтверджує умовність концепції «імунопривілейованості» головного мозку [18, 19, 26, 34]. Донедавна панівна точка зору, згідно з якою мозок – «абсолютно імунопривілейована зона», що дозволяє виживати клітинним трансплантатам без відторгнення, на даний час підлягає сумніву [14, 25]. Мозок може бути визнаний місцем, в якому розвиток імунної відповіді є можливим [26], і при схожих обставинах досягає такої ж сили, як і у периферичних зонах. Локальна прозапальна та імунна відповідь у ЦНС при трансплантації є ключовим елементом, який запускає трофічну відповідь паренхіми ЦНС і стимулює пластичні зміни у нейральних зв'язках реципієнта [14]. Відомо, що дендритні клітини знаходяться у прямому контакті з спинномозковою рідиною, і у відповідь на антигенний стимул мігрують назвні ЦНС у глибокі потилично-шийні лімфовузли; крім того, у спинномозковій рідині, а також в уражених ділянках паренхіми ЦНС знаходять Т-, В-клітини та антитіло-продукуючі клітини [29]. В той же час відомо, що НСК можуть модифікувати імунну відповідь у центральній та периферичній нервовій системі, посилюючи нейропротекторний ефект [21].

Поряд з алоцитотоксичною гуморальною відповіддю, нами досліджено також нейроаутоімуні гуморальні реакції. Після внутрішньоочеревинного введення клітин зафіксовано підвищений рівень антитіл до ОБМ (18-а доба) та S-100 (37-а доба) у

with intracerebral introduction of cells that can be explained by the fact that the cytotoxic activity of lymphocytes of animals from this group almost reached the control level already on the 18<sup>th</sup> day, and kept it to the 37<sup>th</sup> day of observation.

After intraperitoneal introduction of cells the humoral alloctotoxic immune responses reached the maximum at the 12–18<sup>th</sup> day and decreased from the 18<sup>th</sup> to the 37<sup>th</sup> day of the study, which is consistent with the data of Wang *et al.* [34]. A month after the intraperitoneal introduction of cells of different types we recorded a residual level of alloctotoxic antibodies, which was successfully reduced by the Sandimmun administration. Systemic (intraperitoneal) injection of cells caused a more expressed humoral alloimmune response compared to the local (intracerebral) one. In animals with intracerebral introduction of cells the level of humoral alloctotoxic immune responses decreased from the 18<sup>th</sup> day, and has not significantly changed under the influence of Sandimmun.

Revealed by us development of alloctotoxic reactions after intracerebral introduction of fetal NPCs from CBA mice to immunocompetent C57Bl/6 mice is consistent with the data of other authors [16, 22, 23], which showed that the NSCs and NPCs induce the effector phase of the immune response after the transplantation to brain. Development of the immune response to NPC allografts is accompanied by immunodependent loss of transplanted cells [24], accumulation of microglial/macrophage cells and lymphocytes in allografts, however, the level of immune response is insufficient for transplant rejection [31].

The dynamics of alloimmune reactions development obtained in our study is consistent with results of other authors. In particular, the allotransplantation of cells from peripheral nervous tissue of C57Bl/6 mice to the brain of BALB/c mice resulted in significant cell infiltration in allografts on the 10<sup>th</sup> day revealed histologically [31]. Comparing the immune responses in mice of these lines to grafts of nerves and skin (skin grafts are the 'gold standard', their rejection directly correlates with cellular and humoral response in recipients) established [32] that in both cases of transplantation there was a significant cellular immune response with the maximum on the 14<sup>th</sup> day. Moreover, the humoral immune response reached its peak in the 14<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> day with the increase in antibody titer.

The possibility of cellular and humoral alloctotoxic reactions when intracerebrally introducing fetal NPCs, shown in our study, confirms the conditionality of the concept of 'immune privileges' of brain [18, 19, 26, 34]. The opinion, prevailing until recently, considered the brain as absolutely immune privileged zone that allowed cell transplants to survive without rejection, is currently doubt [14, 25]. Brain can be recognized as a place where the development of the immune response



тварин з введенням фетальних НКП, що свідчить про потенційну можливість розвитку нейроспецифічних аутоімунних реакцій після внутрішньоочеревинного введення попередників НК. Очевидно, контакт фетальних НКП з антигенпрезентуючими клітинами реципієнта веде до індукції специфічних антитілопродукуючих клітин.

У тварин із внутрішньомозковим введенням фетальних НКП розвивалась більш значуща специфічна імунна відповідь на маркерні антигени клітин нервової системи (ОБМ і NSE), що пов'язано, на нашу думку, з додатковою антигенною стимуляцією в результаті порушення гематоенцефалічного бар'єра в процесі трансплантації клітин. На 37-у добу рівні аутоантитіл до всіх досліджених нейробілків достовірно перевищували нормальний рівень, знижуючись до контрольних значень лише у групі з корекцією «Сандімуном», що свідчить про тривалу аутоімунну відповідь до нейроспецифічних антигенів, які експресуються клітинами фетального мозку.

За даними літератури, вміст НСБ збільшується в процесі дозрівання структур мозку у ссавців і корелює з функціональним розвитком нервової тканини [8]. Наприклад, S-100 в мозку ембріонів людини з'являється у спинному, довгастому, середньому мозку, мості та мозочку у віці 10–15 тижнів пренатального онтогенезу. Вважають, що період експоненціального зростання НСБ в онтогенезі співпадає із закінченням проліферації, диференціювання та початком функціонування клітин [8]. Виходячи з вищевикладеного, НКП з фетального мозку миші 13–15-ї доби гестації експресують досліджувані НСБ на рівні, достатньому для індукції гуморальної аутоімунної відповіді.

Як відомо, в нормальних умовах у інтактних організмів НСБ присутні у сироватці крові у низьких концентраціях внаслідок природної загибелі нейроклітин [11], а також існує базовий низький рівень природних аутоантитіл до власних НСБ; в нормі підтримується динамічна рівновага між рівнями НСБ та відповідними специфічними аутоантитілами. Можна припустити, що при внутрішньоочеревинному введенні фетальних НКП частина клітин потрапляє у лімфовузли та селезінку, де вони контактують з антигенпрезентуючими клітинами та індують специфічні антитілопродукуючі клітини. У результаті здійснення ефекторної функції алоцитотоксичних лімфоцитів та антитіл інша частина фетальних клітин гине, вивільняючи НСБ, які зв'язуються циркулюючими природними аутоантитілами і таким чином відтермінують наростання титрів нейроаутоантитіл, чим пояснюється розвиток нейроаутоімунної гуморальної відповіді у більш пізній термін (18–37-а доба), ніж алоцитотоксичної (6–18-а доба), а також зменшення нижче контролю

is possible [26], which in similar circumstances achieves the same power as in the peripheral areas. Local proinflammatory and immune response in the CNS at transplantation is a key element that triggers trophic response in CNS parenchyma and promotes plastic changes in recipient's neural network [14]. It is known that dendritic cells are in direct contact with the cerebrospinal fluid, and in response to antigenic stimulus migrate outside the CNS into deep occipital-cervical lymph nodes; moreover, T, B cells and antibody-producing cells were found in the cerebro-spinal fluid and in the affected areas of the CNS parenchyma [29]. At the same time, it is known that the NSCs can modify the immune response in the central and peripheral nervous system, increasing the neuroprotective effect [21].

Along with humoral alloctotoxic response, we also investigated humoral neuroautoimmune responses. After intraperitoneal introduction of the cells we revealed an elevation in levels of antibodies against MBP (18<sup>th</sup> day) and S-100 (37<sup>th</sup> day) in animals with the introduction of fetal NPCs, that indicated the probable development of neurospecific autoimmune reactions after intraperitoneal introduction of NC progenitors. Obviously, the contact of fetal NPCs with recipient's antigen presenting cells leads to the induction of specific antibody producing cells.

In animals with intracranial introduction of fetal NPCs we observed a significant specific immune response to marker antigens of cells of the nervous system (MBP and NSE), caused, in our opinion, by additional antigenic stimulation due to impairments in the blood-brain barrier after transplantation of the cells. On the 37<sup>th</sup> day the levels of autoantibodies against all investigated neural proteins significantly exceeded the normal levels, decreasing to the control values only in the group with Sandimmun correction, indicating a long-term autoimmune response to neurospecific antigens being expressed by fetal brain cells .

According to the reported data, the amount of NSPs increases during maturation of brain structures in mammals and correlates with the functional development of the nervous tissue [8]. For example, S-100 in human fetal brain appears in spinal cord, macromyelon, mid-brain, *pons cerebelli* and cerebellum at the age of 10–15 weeks of prenatal ontogenesis. It is believed that the period of exponential rise in NSP content during ontogenesis coincides with the termination of proliferation, differentiation and following start of cells' functioning [8]. In terms of above stated, the NPCs of fetal mice brain of 13–15 days of gestation express the studied NSPs at a level being sufficient to induce humoral autoimmune response.

The NSPs are known to be present in serum at low concentrations even under normal conditions in intact organisms due to natural death of neural cells [11] as well there is a basic low level of natural autoanti-



рівнів аутоантитіл до S-100 (6-а доба) та NSE (12–18-а доба).

При внутрішньомозковому введенні фетальних НКП індукція аутоімунних реакцій до НСБ може відбуватись за наступними механізмами: а) захват НСБ у тканині мозку дендритними клітинами (із міжклітинної та спинномозкової рідини), їх активація та розвиток класичної імунної відповіді з генерацією антитіл; б) поглинання тканинними макрофагами та макрофагами периферичної крові НСБ, що вийшли за межі мозку; в) деградація НСБ тканинними протеазами [11]. В той же час відмінність у динаміці алоцитотоксичної та нейроаутоімунної гуморальної відповіді при внутрішньомозковому введенні фетальних НКП, очевидно, свідчить про процеси деструкції загиблих імплантованих клітин внаслідок розвитку реакції відторгнення, а також процеси активзації функції та проліферації різних популяцій клітин в зоні вогнища імплантації та на віддаленні від неї, які супроводжуються, вочевидь, зростанням виходу НСБ через лікворні простори у кров, контактом з антигенпрезентуючими клітинами та індукцією специфічних антитілопродуруючих клітин. Крім того, циркулюючі природні аутоантитіла до НСБ у ранні терміни можуть зв'язувати НСБ, що вивільняються, і таким чином дещо відтермінувати наростання титрів нейроаутоантитіл, чим пояснюється розвиток нейроаутоімунної гуморальної відповіді у більш пізній термін, ніж алоцитотоксичної.

Таким чином, поряд з імунною відповіддю на алоантигени системи ГКГ, експресовані на фетальних НКП, розвивається довготривала аутоімунна відповідь на нейроантигени. Корекція «Сандімуном» в дозі 100 мкг на 0-, 3- та 6-у добу дозволяє знизити рівень нейроаутоантитіл на 37-у добу до норми.

В наших дослідженнях застосування циклоспорину А в дозі 100 мкг на тварину трикратно сприяло зменшенню проявів імунних реакцій алогенного та нейроаутоімунного спрямування, що узгоджується з опублікованими даними [31]. Однак не у всіх випадках нами досягнуто значного імуносупресивного ефекту при використаних дозах та трикратному режимі введення «Сандімуну».

Таким чином, необхідно враховувати, що як при внутрішньомозковому, так і внутрішньоочеревинному введенні фетальних НКП гуморальна відповідь може розвиватись не тільки до алоантигенів, але й до специфічних нейроантигенів. Використання імуносупресорного препарату «Сандімун» дозволяє значно знизити прояви реакцій трансплантаційного імунітету та рівень гуморальної нейросенсибілізації, що обґрунтовує показання до обов'язкового застосування імуносупресії при клінічній нейротрансплантації клітин фетального мозку.

bodies against own NSPs; and there is normally a dynamic equilibrium between the levels of NSPs and related specific autoantibodies. One can assume that the intraperitoneal introduction of fetal NCPs is followed by appearing of the part of the cells in the lymph nodes and spleen, where they come in contact with antigen presenting cells and induce specific antibody producing cells. As a result of effector function of allocytotoxic lymphocytes and antibodies the rest of fetal cells die, releasing NSPs that are bound by circulating natural antibodies, and thereby postpone the increase in titers of neural autoantibodies. This explains the development of humoral neuroautoimmune responses in more later period (18<sup>th</sup>–37<sup>th</sup> day) comparing to allocytotoxic one (6<sup>th</sup>–18<sup>th</sup> day), and the decrease below the control levels of antibodies against S-100 (6<sup>th</sup> day) and NSE (12<sup>th</sup>–18<sup>th</sup> day) as well.

Induction of autoimmune reactions to the NSPs after the intracranial introduction of fetal NPCs may occur by the following mechanisms: a) capturing NSPs in brain tissue by dendritic cells (from interstitial and cerebrospinal fluid), their activation and development of classical immune response with antibodies formation; b) absorption of NSPs outside the brain by tissue macrophages and peripheral blood macrophages; c) NSPs degradation by tissue proteases [11]. At the same time, the difference in the dynamics of allocytotoxic and neuroautoimmune humoral responses after intracerebral introduction of fetal NPCs clearly indicates the processes of degradation of implanted cells died due to rejection reactions as well as denotes the activation of the function and proliferation of different cell populations in the implantation locus and around it, that are apparently accompanied by an increased NSP peripheralization through liquor, its contact with antigen presenting cells and induction of specific antigen producing cells. Moreover, the circulating natural antibodies against NSPs can bind released NSPs in the early stages, and thereby fairly postpone the increase of neural alloantibody titers, which explains the development of neuroautoimmune humoral responses in more later period than allocytotoxic one.

Thus, along with the immune response to MHC antigens, expressed on fetal NPCs, the long-term autoimmune response to neuroantigens develops. Correction with Sandimmun in amount of 100 micrograms on the 0<sup>th</sup>, 3<sup>rd</sup> and 6<sup>th</sup> day reduces the level of neural autoantibodies on the 37<sup>th</sup> day down to the norm.

In our studies, the application of cyclosporine A in amount of 100 µg per animal, thrice, contributed to reduction of symptoms of immune reactions of allogeneic and neuroautoimmune character, which is consistent with the reported data [31]. However, we have not succeeded in all cases to achieve a significant immunosuppressive effect in the case of utilized dosage and triple injection of Sandimmun.

## Висновки

1. Системне (внутрішньоочеревинне) введення фетальних НКП викликало більш виразну клітинну і гуморальну алоімунову відповідь, порівняно із локальним (внутрішньомозковим).

2. Клітинні алоцитотоксичні імунні реакції генеруються у відповідь як на внутрішньоочеревинне, так і внутрішньомозкове введення фетальних НКП з максимальним проявом на 6–12-у добу після імунізації і подальшим поступовим зниженням до 37-ї доби. Призначення «Сандіму» зменшувало ці прояви при внутрішньоочеревинному введенні клітин, починаючи вже з 12-ї доби, суттєво не впливаючи на даний показник у тварин з внутрішньомозковим введенням.

3. Гуморальні алоцитотоксичні імунні реакції при внутрішньоочеревинному введенні фетальних НКП досягали максимуму на 12–18-у добу і знижувались з 18-ї по 37-у добу дослідження. Рівень алоцитотоксичних антитіл знижувався до норми під впливом «Сандіму» до 37-ї доби. У тварин із внутрішньомозковим введенням клітин рівень гуморальних алоцитотоксичних імунних реакцій зменшувався, починаючи з 18-ї доби, і суттєво не змінювався за умов впливу «Сандіму».

4. Після системного введення фетальних НКП зафіксовано підвищений рівень антитіл до ОБМ (18-а доба) та S-100 (37-а доба). У тварин із внутрішньомозковим введенням фетальних НКП розвивалась більш значуща специфічна імунна відповідь на маркерні антигени клітин нервової системи (ОБМ і NSE), яка нарощувалась до 37-ї доби. Корекція «Сандіму» в дозі 100 мкг на 0-, 3- та 6-у добу дозволяє знизити рівень нейроаутоантитіл на 37-у добу до норми.

## Література

1. Гольцев А.Н., Дубрава Т.Г., Гаевская Ю.А. и др. Кробиологические технологии как компонент оптимизированных методов лечения аутоиммунных заболеваний // Клиническая иммунология. Аллергология. Инфектология. – 2009. – №1–2 (20–21). – С. 46–51.
2. Гольцев А.Н., Порожан Е.А., Бабенко Н.Н., Останков М.В. Апоптотические процессы в тимусе и головном мозге при развитии экспериментального аллергического энцефаломиелита до и после лечения фетальными нервными клетками // Патология. – 2011. – Т. 8, №2. – С. 69–71.
3. Гольцев А.Н., Порожан Е.А., Останков М.В. и др. Роль натуральных Т-регуляторных клеток в патогенезе экспериментального аллергического энцефаломиелита и возможные пути коррекции данной патологии криоконсервированными фетальными нервными клетками // Иммунология та алергологія: наука і практика. – 2012. – №1. – С. 57–66.
4. Зозуля Ю.А., Лисяний Н.И., Любич Л.Д. и др. Длительное культивирование *in vitro* криоконсервированных и нативных нейроклеток эмбрионов человека // Укр. нейрохірургічний журнал. – 2003. – №2. – С. 11–14.

Thus, it should be considered, that after both intracerebral and intraperitoneal introduction of fetal NPC the humoral response may develop not only to alloantigens, but also to specific neural antigens. Administration of immune suppressing medication Sandimmun can significantly reduce the manifestations of transplantation immunity reactions as well as the humoral neurosensibilization level, that validates the indications for mandatory application of immunosuppression during clinical neurotransplantation of fetal brain cells.

## Conclusions

1. Systemic (intraperitoneal) injection of fetal NPCs caused more expressed cellular and humoral alloimmune response if compared to the local (intracerebral) one.

2. Cellular allocytotoxic immune responses are generated in response to both intraperitoneal and intracerebral introduction of fetal NPCs with maximum expression at the 6–12<sup>th</sup> day after immunization and following gradual decrease to the 37<sup>th</sup> day. Administration of Sandimmun reduced these manifestations after intraperitoneal introduction of the cells, starting already from the 12<sup>th</sup> day, and without significant effect on the index in animals with intracerebral introduction.

3. Humoral allocytotoxic immune responses after intraperitoneal introduction of fetal NPCs reached their maximum at the 12–18<sup>th</sup> day and decreased from the 18<sup>th</sup> to the 37<sup>th</sup> day of the study. Level of allocytotoxic antibodies decreased to the norm to the 37<sup>th</sup> day under the influence of Sandimmun. In animals with intracerebral introduction of cells the level of humoral allocytotoxic immune responses decreased from the 18<sup>th</sup> day, and has not changed significantly under the influence of Sandimmun.

4. After systemic administration of fetal NPCs the elevated levels of antibodies against MBP (18<sup>th</sup> day) and S-100 (37<sup>th</sup> day) was revealed. In animals with intracranial introduction of fetal NPCs there was a significant specific immune response to marker antigens of cells of the nervous system (MBP and NSE), increasing to the 37<sup>th</sup> day. Correction by Sandimmun in dose of 100 micrograms at the 0<sup>th</sup>, 3<sup>rd</sup> and 6<sup>th</sup> day reduces the level of neural antibodies on the 37<sup>th</sup> day down to the norm.

## References

1. Goltsev A.N., Dubrava T.G., Gayevskaya Yu.A. et al. Cryobiological technologies as a component of optimized methods of treating autoimmune diseases // Klinichna Immunologiya. Alergologiya. Infektologiya. – 2009. – N1–2 (20–21). – P. 46–51.
2. Goltsev A.N., Porozhan Ye.A., Babenko N.N., Ostankov M.V. Apoptotic processes in thymus and brain at experimental allergic encephalomyelitis prior to and after treating with fetal neural cells // Patologiya. – 2011. – Vol. 8, N2. – P. 69–71.

5. Лисяний М.І., Любич Л.Д., Семенова В.М. та інш. Дослідження експресії антигенів HLA нейроклітинами людини різного терміну гестації *in vitro* // Імунологія та алергологія. – 2008. – №1. – С. 14–19.
6. Лисяний М.І., Любич Л.Д., Черченко А.П., Верхоглядюв Ю.П. Дослідження рівня аутоантитіл до нейроспецифічних білків у кролів після аlogenної внутрішньомозкової трансплантації ембріональних клітин-попередників нервової системи // Фізіологічний журнал. – 2006. – Т. 52, №3. – С. 64–69.
7. Любич Л.Д., Лисяний Н.І., Семенова В.М., Стайно Л.П. HLA-антигенна характеристика нативних і культивованих нейроклеток фетального і постнатального головного мозка человека // Клеточные культуры. Информационный бюллетень. Выпуск 25. – СПб.: Изд-во Политех. ун-та, 2010. – С. 47–59.
8. Никандров В.Н., Чаплинская Е.В. Протеин S-100: структурно-функциональные свойства и роль в нервной ткани // Биополимеры и клетка. – 2005. – Т. 21, №1. – С. 12–27.
9. Селедцова Г.В., Селедцов В.И., Рабинович С.С. и др. Трансплантация фетальных клеток в лечении неврологических расстройств // Клеточная трансплантация и тканевая инженерия. – 2008. – Т. 3, №1. – С. 49–56.
10. Сергеев В.С. Предотвращение острого и хронического отторжения трансплантатов у мышей адоптивным введением CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> регуляторных Т-лимфоцитов // Клеточная трансплантация и тканевая инженерия. – 2008. – Т. 3, №4. – С. 10–12.
11. Чехонин В.П., Лебедев С.В., Гурина О.И. и др. Элиминация нейроспецифических белков из ЦНС (патогенетические и методические аспекты) // Вестник Российской АМН. – 2006. – №6. – С. 3–12.
12. Шпакова А.П., Павлова К.С., Булычева Т.И. МТТ-колориметрический метод определения цитотоксической активности естественных киллерных клеток // Клини. лаб. диагностика. – 2000. – №2. – С. 20–23.
13. Akesson E., Wolmer-Solberg N., Cederarv M. et al. Human neural stem cells and astrocytes, but not neurons, suppress an allogeneic lymphocyte response // Stem Cell Res. – 2009. – Vol. 2, №1. – P. 56–67.
14. Barker R.A., Widner H. Immune problems in central nervous system cell therapy // NeuroRx. – 2004. – Vol.1, №4. – P. 472–481.
15. Ben-Hur T. Immunomodulation by neural stem cells // J. Neurol. Sci. – 2008. – Vol. 265, №1–2. – P. 102–104.
16. Chen Z., Palmer T.D. Cellular repair of CNS disorders: an immunological perspective // Hum. Mol. Genet. – 2008. – Vol. 17, №1. – P. 84–92.
17. Czeonkowska A., Kurkowska-Jastrzebska I., Czeonkowski A. et al. Immune processes in the pathogenesis of Parkinson's disease – a potential role for microglia and nitric oxide // Med. Sci. Monit. – 2002. – Vol. 8, №8. – P. 165–177.
18. D'Mello C., Le T., Swain M.G. Cerebral microglia recruit monocytes into the brain in response to tumor necrosis factor alpha signaling during peripheral organ inflammation // J. Neurosci. – 2009. – Vol. 29, №7. – P. 2089–2102.
19. Engelhardt B. The blood-central nervous system barriers actively control immune cell entry into the central nervous system // Curr. Pharm. Des. – 2008. – Vol.14, №16. – P. 1555–1565.
20. Fainstein N., Vaknin I., Einstein O. et al. Neural precursor cells inhibit multiple inflammatory signals // Mol. Cell Neurosci. – 2008. – Vol. 39, №3. – P.335–341.
21. Graber J.J., Dhib-Jalbut S. Protective autoimmunity in the nervous system // Pharmacol. Ther. – 2009. – Vol. 121, №2. – P. 147–159.
22. Ideguchi M., Shinoyama M., Gomi M. et al. Immune or inflammatory response by the host brain suppresses neuronal differentiation of transplanted ES cell-derived neural precursor cells // J. Neurosci. Res. – 2008. – Vol. 86, №9. – P. 1936–1943.
23. Imitola J., Comabella M., Chandraker A.K. et al. Neural stem/progenitor cells express costimulatory molecules that are differentially regulated by inflammatory and apoptotic stimuli // Am. J. Pathol. – 2004. – Vol. 164, №5. – P. 1615–1622.
3. Goltsev A.N., Porozhan Ye.A., Ostankov M.V. et al. Role of natural regulatory T cells in pathogenesis of experimental allergic encephalomyelitis and possible ways of correction of this pathology by cryopreserved fetal neural cells // Immunologiya ta Alergologiya: Nauka i Praktika. – 2012. – N1. – P. 57–66.
4. Zozulya Yu.A., Lisyanyy N.I., Lyubich L.D. et al. Long-term culture *in vitro* of cryopreserved and native neural cells of human embryos // Ukr. Neurokhirurgichnyy Zhurnal. – 2003. – N2. – P. 11–14.
5. Lisyanyy M.I., Lyubich L.D., Semenova V.M. et al. Investigating the *in vitro* expression of HLA antigens by human neural cells of different gestation terms // Immunologiya ta Alergologiya. – 2008. – N1. – P. 14–19.
6. Lisyanyy M.I., Lyubich L.D., Cherchenko A.P., Verkhoglyadov Yu.P. Investigation of the level of autoantibodies against neurospecific proteins in rabbits after allogeneic intracranial transplantation of embryonic progenitor cells of nervous system // Fiziol. Zhurnal. – 2006. – Vol. 52, N3. – P. 64–69.
7. Lyubich L.D., Lisyanyy N.I., Semenova V.M., Stayno L.P. HLA-antigene characteristics of native and cultured neural cells of fetal and post-natal human brain // Kletochnye Kultury. Informatsionnyy Byulleten. Issue 25. – St.-Peterburg: Polytechnic University, 2010. – P. 47–59.
8. Nikandrov V.N., Chaplinskaya Ye.V. S-100 protein: structure and function properties and the role in neural tissue // Biopolymers and Cell. – 2005. – Vol. 21, N1. – P. 12–27.
9. Seledtsova G.V., Seledtsov V.I., Rabinovich S.S. et al. Transplantation of fetal cells in treatment of neurologic impairments // Kletochnaya Transplantatsiya i Tkanevaya Inzheneriya. – 2008. – Vol. 3, N1. – P. 49–56.
10. Sergeev V.S. Prevention of acute and chronic rejection of transplants in mice by adoptive introduction of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T lymphocytes // Kletochnaya Transplantatsiya i Tkanevaya Inzheneriya. – 2008. – Vol. 3, N4. – P. 10–12.
11. Chekhonin V.P., Lebedev S.V., Gurina O.I. et al. Elimination of neurospecific proteins from CNS (pathogenetics and methods) // Vestnik Rossiyskoy AMN. – 2006. – N6. – P. 3–12.
12. Shpakova A.P., Pavlova K.S., Bulycheva T.I. MTT-colorimetric assay for determining the cytotoxic activity of natural killer cells // Klin. Lab. Diagnostika. – 2000. – N2. – P. 20–23.
13. Akesson E., Wolmer-Solberg N., Cederarv M. et al. Human neural stem cells and astrocytes, but not neurons, suppress an allogeneic lymphocyte response // Stem Cell Res. – 2009. – Vol. 2, N1. – P. 56–67.
14. Barker R.A., Widner H. Immune problems in central nervous system cell therapy // NeuroRx. – 2004. – Vol.1, N4. – P. 472–481.
15. Ben-Hur T. Immunomodulation by neural stem cells // J. Neurol. Sci. – 2008. – Vol. 265, N1–2. – P. 102–104.
16. Chen Z., Palmer T.D. Cellular repair of CNS disorders: an immunological perspective // Hum. Mol. Genet. – 2008. – Vol. 17, N1. – P. 84–92.
17. Czeonkowska A., Kurkowska-Jastrzebska I., Czeonkowski A. et al. Immune processes in the pathogenesis of Parkinson's disease – a potential role for microglia and nitric oxide // Med. Sci. Monit. – 2002. – Vol. 8, N8. – P. 165–177.
18. D'Mello C., Le T., Swain M.G. Cerebral microglia recruit monocytes into the brain in response to tumor necrosis factor alpha signaling during peripheral organ inflammation // J. Neurosci. – 2009. – Vol. 29, N7. – P. 2089–2102.
19. Engelhardt B. The blood-central nervous system barriers actively control immune cell entry into the central nervous system // Curr. Pharm. Des. – 2008. – Vol.14, N16. – P. 1555–1565.
20. Fainstein N., Vaknin I., Einstein O. et al. Neural precursor cells inhibit multiple inflammatory signals // Mol. Cell Neurosci. – 2008. – Vol. 39, N3. – P.335–341.
21. Graber J.J., Dhib-Jalbut S. Protective autoimmunity in the nervous system // Pharmacol. Ther. – 2009. – Vol. 121, N2. – P. 147–159.
22. Ideguchi M., Shinoyama M., Gomi M. et al. Immune or inflammatory response by the host brain suppresses neuronal differentiation of transplanted ES cell-derived neural precursor cells // J. Neurosci. Res. – 2008. – Vol. 86, N9. – P. 1936–1943.

24. Kim D.E., Tsuji K., Kim Y.R. et al. Neural stem cell transplant survival in brains of mice: assessing the effect of immunity and ischemia by using real-time bioluminescent imaging // *Radiology*. – 2006. – Vol. 241, №3. – P. 822–830.
25. Krystkowiak P., Gaura V., Labalette M. et al. Alloimmunisation to donor antigens and immune rejection following foetal neural grafts to the brain in patients with Huntington's disease // *PLoS ONE*. – 2007. – Vol. 2, №1. – P. 166–168.
26. Liblau R, Cassan C. Tolérance immunitaire vis-à-vis d'auto-antigènes du système nerveux : implications thérapeutiques // *Rev. Neurol. (Paris)*. – 2007. – Vol. 163, №1. – P. 12–22.
27. Modo M., Mellodew K., Rezaie P. In vitro expression of major histocompatibility class I and class II antigens by conditionally immortalized murine neural stem cells // *Neurosci. Lett.* – 2003. – Vol. 337, №2. – P. 85–88.
28. Odeberg J., Piao J.H., Samuelsson E.B. et al. Low immunogenicity of *in vitro*-expanded human neural cells despite high MHC expression // *J. Neuroimmunol.* – 2005. – Vol. 161, №1–2. – P. 1–11.
29. Pedemonte E., Mancardi G., Giunti D. et al. Mechanisms of the adaptive immune response inside the central nervous system during inflammatory and autoimmune diseases // *Pharmacol. Ther.* – 2006. – Vol. 111, №3. – P. 555–566.
30. Preynat-Seauve O., de Rham C., Tirefort D. et al. Neural progenitors derived from human embryonic stem cells are targeted by allogeneic T and natural killer cells // *J. Cell Mol. Med.* – 2009. – Vol. 13, №9. – P. 3556–3569.
31. Sen S.K, Lowe J.B.3rd, Brenner M.J. et al. Assessment of the immune response to dose of nerve allografts // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2005. – Vol. 115, №3. – P. 823–830.
32. Trumble T., Gunlikson R., Parvin D. A comparison of immune response to nerve and skin allografts // *J. Reconstr. Microsurg.* – 1993. – Vol. 9, №5. – P. 367–372.
33. Ubiali F., Nava S., Nessi V. et al. Allorecognition of human neural stem cells by peripheral blood lymphocytes despite low expression of MHC molecules: role of TGF-beta in modulating proliferation // *Int. Immunol.* – 2007. – Vol. 19, №9. – P. 1063–1074.
34. Wang X.J., Liu W.G., Zhang Y.H. et al. Effect of transplantation of c17.2 cells transfected with interleukin-10 gene on intracerebral immune response in rat model of Parkinson's disease // *Neurosci. Lett.* – 2007. – Vol. 423, №2. – P. 95–99.
23. Imitola J., Comabella M., Chandraker A.K. et al. Neural stem/progenitor cells express costimulatory molecules that are differentially regulated by inflammatory and apoptotic stimuli // *Am. J. Pathol.* – 2004. – Vol. 164, N5. – P. 1615–1622.
24. Kim D.E., Tsuji K., Kim Y.R. et al. Neural stem cell transplant survival in brains of mice: assessing the effect of immunity and ischemia by using real-time bioluminescent imaging // *Radiology*. – 2006. – Vol. 241, N3. – P. 822–830.
25. Krystkowiak P., Gaura V., Labalette M. et al. Alloimmunisation to donor antigens and immune rejection following foetal neural grafts to the brain in patients with Huntington's disease // *PLoS ONE*. – 2007. – Vol. 2, N1. – P. 166–168.
26. Liblau R, Cassan C. Tolérance immunitaire vis-à-vis d'auto-antigènes du système nerveux : implications thérapeutiques // *Rev. Neurol. (Paris)*. – 2007. – Vol. 163, N1. – P. 12–22.
27. Modo M., Mellodew K., Rezaie P. In vitro expression of major histocompatibility class I and class II antigens by conditionally immortalized murine neural stem cells // *Neurosci. Lett.* – 2003. – Vol. 337, N2. – P. 85–88.
28. Odeberg J., Piao J.H., Samuelsson E.B. et al. Low immunogenicity of *in vitro*-expanded human neural cells despite high MHC expression // *J. Neuroimmunol.* – 2005. – Vol. 161, N1–2. – P. 1–11.
29. Pedemonte E., Mancardi G., Giunti D. et al. Mechanisms of the adaptive immune response inside the central nervous system during inflammatory and autoimmune diseases // *Pharmacol. Ther.* – 2006. – Vol. 111, N3. – P. 555–566.
30. Preynat-Seauve O., de Rham C., Tirefort D. et al. Neural progenitors derived from human embryonic stem cells are targeted by allogeneic T and natural killer cells // *J. Cell Mol. Med.* – 2009. – Vol. 13, N9. – P. 3556–3569.
31. Sen S.K, Lowe J.B.3rd, Brenner M.J. et al. Assessment of the immune response to dose of nerve allografts // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2005. – Vol. 115, N3. – P. 823–830.
32. Trumble T., Gunlikson R., Parvin D. A comparison of immune response to nerve and skin allografts // *J. Reconstr. Microsurg.* – 1993. – Vol. 9, N5. – P. 367–372.
33. Ubiali F., Nava S., Nessi V. et al. Allorecognition of human neural stem cells by peripheral blood lymphocytes despite low expression of MHC molecules: role of TGF-beta in modulating proliferation // *Int. Immunol.* – 2007. – Vol. 19, N9. – P. 1063–1074.
34. Wang X.J., Liu W.G., Zhang Y.H. et al. Effect of transplantation of c17.2 cells transfected with interleukin-10 gene on intracerebral immune response in rat model of Parkinson's disease // *Neurosci. Lett.* – 2007. – Vol. 423, N2. – P. 95–99.

Поступила 20.06.12

Accepted 20.06.12