

К вопросу модификации иммунореактивности миелотрансплантата после криоконсервирования

UDC 611- 018.46.085.1:615.014.41

A.N. GOLTSEV*, I.YU. MATSEVITAYA, YE. D. LUTSENKO,
M.V. OSTANKOV, T.G. DUBRAVA, K.A. GOLTSEV, YE.YE. YAMPOLSKAYA

On the Modification of Immunoreactivity of Myelotransplant after Cryopreservation

Проведен сравнительный анализ структурно-функциональных характеристик адгезивных клеток костного мозга (АККМ) до и после криоконсервирования. Полученные данные подтверждают значимость АККМ как компонента миелотрансплантата с антигенпрезентирующей функцией в общем механизме активации Т-клеток, индуцирующих реакцию "трансплантат против хозяина" (РТПХ). Результаты работы позволяют понять механизмы иммунных взаимодействий криоконсервированного алломиелотрансплантата с организмом реципиента и возможности использования криоконсервирования костного мозга для минимизации развития РТПХ.

Ключевые слова: адгезивные клетки костного мозга, криоконсервирование, иммунореактивность миелотрансплантата.

Проведено порівняльний аналіз структурно-функціональних характеристик адгезивних клітин кісткового мозку (АККМ) до і після криоконсервування. Отримані дані підтверджують значимість АККМ як компонента міелотрансплантата з антиген-презентуючою функцією в загальному механізмі активації Т-клітин, що індують реакцію „трансплантат проти хазяїна" (РТПХ). Результати роботи дозволяють зрозуміти механізми імунних взаємодій криоконсервованого аломіелотрансплантата з організмом реципієнта і можливості використання криоконсервування кісткового мозку для мінімізації розвитку РТПХ.

Ключові слова: адгезивні клітини кісткового мозку, криоконсервування, імунореактивність міелотрансплантата.

The comparative analysis of structure-functional characteristics of bone marrow adhesive cells (BMACs) prior to and after cryopreservation was carried out. The data obtained confirm importance of BMACs as a component of myelotransplant with antigen-presenting function in the general mechanism of T-cell activation that induce graft-versus-host reaction (GVHR). The results allow to understand the mechanisms of immune interactions between cryopreserved allomyelotransplant and the recipient's organism and opportunities of applying the cryopreservation of bone marrow for minimization of GVHR.

Key words: bone marrow adhesive cells, cryopreservation, myelotransplant immunoreactivity.

Существенной проблемой трансплантации гистонесовместимого костного мозга (КМ) является развитие иммунного конфликта, выражающегося реакцией "трансплантат против хозяина" (РТПХ), которая клинически манифестируется в виде болезни "трансплантат против хозяина" (БТПХ) [10, 11, 19]. Известно, что в реализации РТПХ основная роль отводится иммунокомпетентным клеткам (ИКК) миелотрансплантата, а именно Т-клеткам [12]. С этих позиций изучаются возможности минимизации осложнений иммунной природы при трансплантации гистонесовместимого КМ, лишённого антигенреактивных Т-лимфоцитов и их предшественников [13]. По мере расшифровки механизмов реализации реакций трансплантационного иммунитета стало очевидным, что в становлении эфферентного и афферентного звеньев РТПХ могут участвовать, кроме Т-лимфоцитов, и другие клетки миелотрансплантата, что подтверждает значи-

Development of an immune conflict being manifested as graft-versus-host reaction (GVHR), which is denoted clinically as graft-versus-host disease (GVHD), presents a great challenge for transplantation of histoincompatible bone marrow (BM) [10, 11, 19]. Immunocompetent cells (ICC) of myelotransplant, namely T-cells, are known to play the main part in GVHR [12]. In this respect the possibilities of minimization of immune complications after grafting a histoincompatible BM free of antigen-reactive T-lymphocytes and their precursors are studied [13]. As mechanisms of transplantation immunity reactions were clarified, it became evident that besides T-lymphocytes other cells of myelotransplant could participate in efferent and afferent GVHR stages, which confirms importance of myelotransplant component composition. Monocyte-phagocytic system (MPS) elements belonging to the bone marrow adhesive cell (BMAC) fraction can be referred to such components. Transplantability of these

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: (+38 057) 373-30-39, факс: (+38 057) 373-30-84, электронная почта:
cryopato@rambler.ru

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

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 373 3039, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryopato@rambler.ru

мость его компонентного состава. К таким компонентам можно отнести элементы моноцитарно-фагоцитарной системы (МФС), входящие во фракцию адгезивных клеток костного мозга (АККМ). Продемонстрированы "трансплантатность" этих клеток и регуляторная активность в отношении колониеобразующих единиц в селезенке облученных реципиентов (КОЕс). Так, удаление фракции АККМ сопровождалось снижением колониеобразующей активности КМ в системе *in vivo* [14]. Такого рода активность АККМ реализуется через присутствующие в миелотрансплантате Thy-1,2⁺ – Т-лимфоциты, имеющие отношение к развитию РТПХ [2, 14].

Альтернативным путем селективной элиминации клеток, присутствующих в адгезивной фракции КМ, является криоконсервирование миелокарицитов в определенных режимах [14]. В таком КМ, как и при механическом удалении фракции АККМ, снижалась не только колониеобразующая активность стволовых кроветворных клеток (СКК), но и иммунореактивность (РТПХ-активность). Однако не ясна причина модуляции состояния миелотрансплантата низкими температурами и особенно клеток, входящих в состав АККМ и определяющих особенности иммунных взаимодействий аллогенного КМ с организмом реципиента.

Цель работы – изучение особенностей изменения структурно-функциональных характеристик клеток, входящих во фракцию АККМ после криоконсервирования.

Материалы и методы

Эксперименты выполняли на 8–10-недельных мышцах-самцах линии СВА/Н и (СВА/Н×С57В1) F1 массой 22–24 г. Исследования проводили в соответствии с принципами "Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей" (Страсбург, 1985).

Клетки КМ вымывали из бедренных костей средой 199 с добавлением 3%-й эмбриональной телячьей сыворотки и 2%-го цитрата натрия (рабочая среда). Для получения АККМ суспензию клеток КМ инкубировали в стеклянных чашках (Sarstedt, Германия) диаметром 40 мм при 37°C в течение часа. Прикрепившиеся клетки снимали с чашек специальным шпателем. При оценке характера влияния криопротекторов на миелокарициты до криоконсервирования к полученной на рабочей среде суспензии КМ по каплям добавляли криоконсервирующий раствор в соотношении 1:1. Конечная концентрация диметилсульфоксида (ДМСО) составляла 10%, полиэтиленоксида с молекулярной массой 400 (ПЭО-400) – 7,5%. Клетки КМ инкубировали с криопротекторами в силиконизированной посуде при 4°C в течение 15 мин. Для обработки

cells as well as their activity towards colony-forming units (CFUs) in irradiated recipients' spleens were demonstrated. For example, removing BMAC fraction was accompanied by a reduction in the BM colony-forming activity *in vivo* [14]. Such BMAC activity is realized over myelotransplant Thy-1,2⁺ T-lymphocytes pertaining GVHR development [2, 14].

An alternative way of selective elimination of cells being present in BMAC fraction is cryopreservation of myelokaryocytes by certain regimens [14]. In such BM as well as in BM mechanically deprived of BMAC fraction there was a decrease not only in colony-forming activity of hemopoietic stem cells (HSCs) but also in immunoreactivity (GVHR-activity). However, causes of low temperature-induced modulation of myelotransplant, especially cells belonging to BMACs, which determine the peculiarities of immune interactions between allogenic BM and the recipient's organism, remain unclear.

The aim of the work is to study the structure-functional changes in peculiarities of cells of BMAC fraction after cryopreservation.

Materials and methods

8–10 week old mouse males of CBA/H and (CBA/H×C57B1) F1 lines with the weight of 22–24 g were used in the experiments. The experiments were carried-out according to the statements of "European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes" (Strasbourg, 1985).

BM cells were washed out of femour bones with medium 199 containing 3% embryonic calf serum and 2% sodium citrate (handling medium). To isolate BMACs the BM cell suspension was incubated in 40 mm glass plates (Sarstedt, Germany) at 37°C for one hour. Attached cells were removed from the plates with a special spreader. To assess cryoprotectants effects on myelokaryocytes prior to cryopreservation the cryopreservative solution was added drop by drop in the ratio 1:1 to the BM suspension in handling medium. The final concentration of dimethyl sulfoxide (Me₂SO) was 10%, polyethylene oxide with molecular weight of 400 (PEO-400) was 7.5%. BM cells were incubated with the cryoprotectants in siliconized dishes at 4°C for 15 min. 3% silicon solution (antiform-silica) in ether was used for processing the dishes. After the incubation cells were washed out from the cryoprotectant by dilution with the double volume of handling medium, centrifuged; smears were prepared from the pellets and studied morphologically after staining according to Romanovsky-Gimsa [6] with a light microscope. The average histochemical coefficient was determined cytochemically by acid phosphatase and non-specific esterase tests [8]. The cell functional activity of native intact, native after exposure to the cryoprotectant, and cryopreserved BM was estimated by cell phagocytic

посуды использовали 3%-й раствор силикона (антифом-силака, Sigma, США), приготовленный на эфире. После инкубации клетки отмывали от протектора простым разведением двукратным объемом рабочей среды, центрифугировали, из осадка готовили мазки, которые окрашивали по Романовскому-Гимза [6] для морфологической оценки в световом микроскопе. Средний гистохимический коэффициент определяли цитохимическим анализом на присутствие кислой фосфатазы и неспецифической эстеразы [8]. Функциональную активность клеток нативного интактного, нативного после экспонирования с криопротектором и криоконсервированного КМ оценивали по их фагоцитарной активности: фагоцитарному индексу (ФИ) – проценту фагоцитировавших клеток; фагоцитарному числу (ФЧ) – числу захваченных одной клеткой микроорганизмов (культура *St. aureus* с концентрацией 1×10^9 кл./мл); абсолютному показателю фагоцитарной активности (АПФА) = $ФИ \times ФЧ \times$ (абс. количество кл./мкл суспензии $\times 10^6$) [1].

Суспензию КМ криоконсервировали в полиэтиленовых ампулах (Nunc, Германия) в объеме 1,5 мл с 10%-м ДМСО (режим Крио-1) или 7,5%-м ПЭО-400 (режим Крио-2). Костный мозг замораживали на установке УОП-6 производства СКТБ с ОП ИПКиК НАН Украины. Скорость охлаждения до -25°C составила $1,5^\circ\text{C}/\text{мин}$ с последующим погружением ампул с КМ в жидкий азот. Суспензию размораживали на водяной бане при $39-40^\circ\text{C}$ в течение 50–60 с при постоянном покачивании ампул. Ранее полученные результаты [4] показали, что в КМ, криоконсервированном в режиме Крио-1, сохранялось до 95% СКК и 50% мезенхимальных стволовых клеток (МСК-КОЕф), тогда как в режиме Крио-2 – около 55% СКК и не более 15% МСК.

Уровень экспрессии антигена Mac-1 (CD11b) на клетках КМ определяли методом прямой иммунофлуоресценции на цитофлуориметре FACS Calibur (BD, США) с использованием моноклональных антител (МАТ) фирмы Caltag (США). Все манипуляции с МАТ выполняли в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя.

Полученные результаты статистически обрабатывали в электронных таблицах "Microsoft Excel 2000" с использованием критерия Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение

Для активации Т-лимфоцитов в иммунном ответе необходимы, как минимум, два сигнала. Один передается через специфический Т-клеточный рецептор (ТКР), другой – через рецептор к антиген-неспецифической костимуляторной молекуле на мембране Т-клетки, в частности, через CD28-структуру [17]. В роли костимуляторного сигнала-лиганда для этого рецептора выступают молекулы В.7.1 (В.7.2), продуцируемые антиген-

activity: phagocytic index (PI) is the percentage of phagocytosing cells; phagocytic number (PN) is the number of microorganisms (*S. aureus* culture at the concentration of 1×10^9 cells/ml) captured by one cell and by absolute index of phagocytic activity (AIPA) = $PI \times PN \times$ (absolute number of cells per μl of suspension $\times 10^6$) [1].

BM suspension was cryopreserved in polyethylene ampoules (Nunc, Germany) in the volume of 1.5 ml with 10% M_2SO (Cryo-1 regimen) or with 7.5% PEO-400 (Cryo-2 regimen). BM was frozen with the device UOP-6 (Special Designing and Technical Bureau of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine). The cooling rate down to -25°C was $1.5^\circ\text{C}/\text{min}$ and then the ampoules were plunged into liquid nitrogen. While being thawed, suspensions were shaken constantly in a water bath at $39-40^\circ\text{C}$ for 50–60 sec. The earlier data [4] showed that the Cryo-1 regimen preserved up to 95% of HSCs and 50% of mesenchymal stem cells (MSCs-CFUf) in BM, whereas the Cryo-2 regimen did about 55% of HSCs and not more than 15% of MSCs.

Mac-1 (CD11b) antigen expression in BM cells was determined by direct immunofluorescence on a cytofluorometer FACS Calibur (BD, USA) with the usage of monoclonal antibodies (MAB) (Caltag, USA). All the procedures with MAB were performed according to the manufacturer's recommendations.

The data obtained were statistically processed in electronic tables Microsoft Excel 2000 using Mann-Whitney criterion.

Results and discussion

Two signals at least are necessary to activate T-lymphocytes in immune response. One of them is transferred through a specific T-cellular receptor (TCR), the other – through a receptor to antigen-nonspecific co-stimulatory molecule on T-cell membrane, particularly through CD28-structure [17]. В.7.1 (В.7.2) molecules produced by antigen-presenting cells (APCs) act as a co-stimulatory signal-ligand for this receptor. When either of these signals is absent, non-responsiveness to an antigen, anergy, develops [17]. In this respect it is important to understand peculiarities of immune interactions development upon transplantation of histoincompatible BM to a recipient and a role of its component composition in this process.

As it follows from the data obtained the BM of CBA/H intact mice comprised about 20% of cells with adhesive potential. Cytomorphological analysis of BMAC fraction attests to a high content of macrophages and a low content of other BM stromal cells functioning as APCs in it (Fig. 1). Cytofluorometric assessment showed that more than 60% of MPS cells in BMAC fraction expressed the marker CD11b (Mac-1). These results agree with the data [18] on about 8%

презентирующими клетками (АПК). При отсутствии какого-то из этих сигналов развивается неотвечаемость на антиген – анергия [17]. В связи с этим важно понять особенности развития иммунных взаимодействий при трансплантации реципиенту гистонесовместимого КМ и роли в этом процессе его компонентного состава.

Как следует из полученных нами данных, в КМ интактных мышей линии СВА/Н содержится около 20% клеток с адгезивным потенциалом. Цитоморфологический анализ фракции АККМ свидетельствует о высоком содержании в ней макрофагов и небольшого количества других клеток стромы КМ (рис. 1), которые обладают функцией АПК. По данным цитофлуориметрической оценки более 60% клеток МФС во фракции АККМ экспрессировали маркер CD11b (MAC-1). Эти результаты совпадают с данными [18] о содержании около 8% CD11b⁺-клеток в нефракционированном КМ мышей этой линии.

Оценка активности кислой фосфатазы и эстеразы выявила высокий их уровень у 25–30% АККМ, что характерно для функционально-активных клеток МФС. Действительно, оценка фагоцитарного потенциала клеток КМ мышей СВА показала, что их ФИ составлял $14,8 \pm 1,7\%$; ФЧ – $8,6 \pm 0,7$ абс. ед.; АПФА $1,27 \pm 0,10$ абс. ед.

Известно, что развитие РТПХ в острой или хронической форме проявления соподчинено правилам, постулирующим принцип различных путей презентации антигена и активации Т-клеток в миелотрансплантате. Распознавание антигенов хозяина иммунореактивными клетками миелотрансплантата может осуществляться: прямым путем, когда донорские Т-лимфоциты распознают и антиген и молекулы II класса главного комплекса гистосовместимости (ГКГ) на АПК хозяина, либо непрямым, когда антигены хозяина и собственные молекулы II класса представляют донорским Т-лимфоцитам АПК трансплантируемого КМ. Непрямой (альтернативный) путь презентации антигена активирует донорские CD4⁺ – Т-клетки, не способные непосредственно взаимодействовать с клетками хозяина. При этом отмечается значимость обоих векторов активации Т-клеток алломиелотрансплантата [12], что подчеркивает важную роль клеток стромального микроокружения КМ в инициации РТПХ. Насколько изменяются структурно-функциональные характеристики этих клеток после криоконсервирования КМ видно из рис. 2.

Уже после экспозиции КМ с ДМСО или ПЭО-400 в суспензии увеличивалось содержание АККМ, что свидетельствует об экспансии молекул адгезии на клетках, которые не несли их в исход-

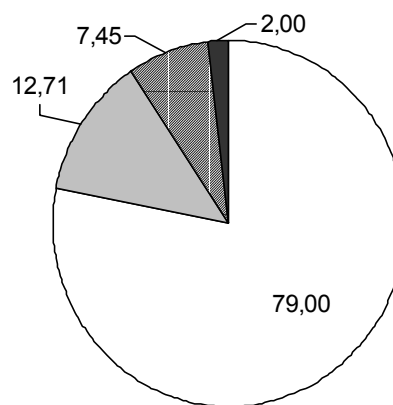


Рис. 1. Клеточный состав адгезивной фракции нативного КМ: □ – макрофаги + другие клетки стромы КМ; ▒ – гранулоциты; ▨ – лимфоциты; ■ – недифференцированные клетки, бласты.

Fig. 1. Cell composition of adhesive fraction of native BM: □ – macrophages + other BM stromal cells; ▒ – granulocytes; ▨ – lymphocytes; ■ – non-differentiated cells, blasts.

content of CD11b⁺ cells in non-fractionated BM of this mouse line.

The assessment of acid phosphatase and esterase activities demonstrated their high levels in 25–30% of BMACs, which is typical for functionally active MPS cells. Indeed, the assessment of the phagocytic potential of BM cells of CBA mice showed that their PI was $14.8 \pm 1.7\%$; PN was 8.6 ± 0.7 absolute units; AIPA was 1.27 ± 0.10 absolute units.

It is known that acute or chronic GVHR development complies with the principles of different ways of antigen presentation and T-cell activation in the myelotransplant. Recognizing the host's antigens by the myelotransplant immunoreactive cells can be realized either through a direct way, when the donor's lymphocytes recognize both the antigen and major histocompatibility complex (MHC) class II molecules on the host APCs, or through an indirect way, when the host's antigens and his own class II molecules present APCs of transplanted BM to the donor's T-lymphocytes. The indirect (alternative) way of the antigen presentation activates the donor's CD4⁺ T-cells incapable of a direct interacting with the host's cells. Herewith significance of the both activation ways of allomyelotransplant T-cells is noted [12], which emphasized an important role of BM stromal microenvironment cells in GVHR initiation. Fig. 2 shows how much structure-functional characteristics of these cells are changed after cryopreservation of BM.

After the exposure of BM to Me₂SO or to PEO-400 the BMAC content in suspension increased, that attests the adhesion molecules expansion on cells, which did not have them in the initial BM. Various intensity of this process means a different stress potential of each

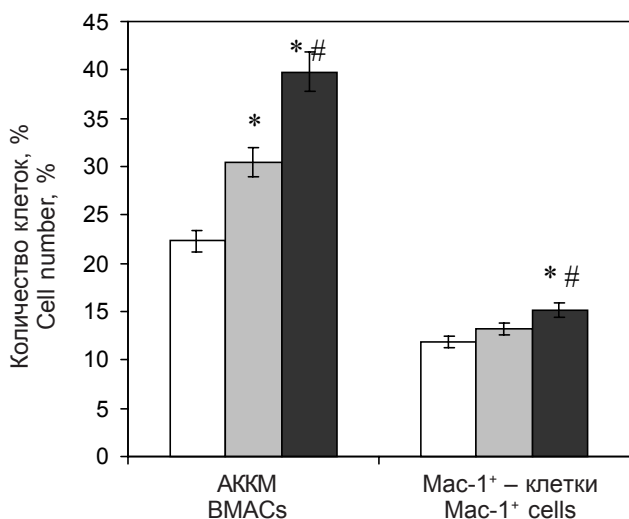


Рис. 2. Содержание адгезивных и Mac-1⁺ (CD11b) – клеток в КМ до и после экспозиции с криопротекторами: □ – исходный КМ (контроль); ▒ – КМ + ДМСО; ■ – КМ + ПЭО-400; достоверность различий ($p < 0,05$) в сравнении: * – с контролем; # – между опытными группами.

Fig. 2. Adhesive and Mac-1⁺ (CD11b) cells contents in BM prior to and after exposure to the cryoprotectants: □ – initial BM (control); ▒ – BM + Me₂SO; ■ – BM + PEO-400; the significance of differences ($p < 0.05$) in comparison: * – with the control; # – between the experimental groups.

ном КМ. Разная выраженность этого процесса подчеркивает проявление разной степени стрессиндубельного потенциала каждого криопротектора в отношении этих молекул на клетках КМ [5]. На это указывает и характер повышения в суспензии КМ содержания клеток с маркером Mac-1, который рассматривается как мембранная структура, присущая клеткам МФС [14].

Известно, что реаранжировка мембранных рецепторных молекул отражается на функциональном статусе клеток [3]. При определении фагоцитарной активности клеток КМ оказалось, что после экспозиции с протекторами их ФИ, ФЧ и АПФА изменялись по-разному (рис. 3). ДМСО индуцировал достоверное повышение только ФИ, тогда как после экспозиции с ПЭО-400 существенно повышался каждый из этих показателей, т. е. после этого этапа подготовки к криоконсервированию фагоцитирующие клетки КМ находились в разном исходном функциональном состоянии.

Такого рода изменения сказываются на криолабильности (криостабильности) этих клеток. Представленные на рис. 4 данные демонстрируют снижение количества АККМ в суспензии КМ после криоконсервирования. При этом степень снижения была обратно пропорциональна степени повышения их содержания после эквilibрации с протекторами. В результате при максимальном повышении содержания адгезивных клеток после эквilibрации

cryoprotectant towards these molecules on BM cells [5]. The manner of increasing in the number of cells with the Mac-1 marker in BM suspension, which is considered as a membrane structure intrinsic for MPS cells, also points to this difference [14].

Rearranging membrane receptor molecules is known to be reflected on the functional status of cells [3]. When BM cells phagocytic activity being determined, it turned out that their PI, PN and AIPA changed differently after exposure to the cryoprotectants (Fig. 3). Me₂SO only induced a significant rise in PI, whereas after the exposure to PEO-400 each of these indices increased significantly, *i. e.* after this pre-treatment stage the BM phagocytosing cells were in different initial functional states.

Such changes impact the cryolability (cryostability) of these cells. The data presented in Fig. 4 demonstrate a decrease in BMAC content in BM suspension after cryopreservation. Herewith the extent of the decrease is inversely proportional to the extent of the increase in their content after equilibration with the cryoprotectants. In the issue the maximal increase in adhesive cell content after equilibration with PEO-400 was paralleled by the maximal decrease in their content after cryopreservation with this cryoprotectant. Phenotypic analysis showed that in BM cryopreserved

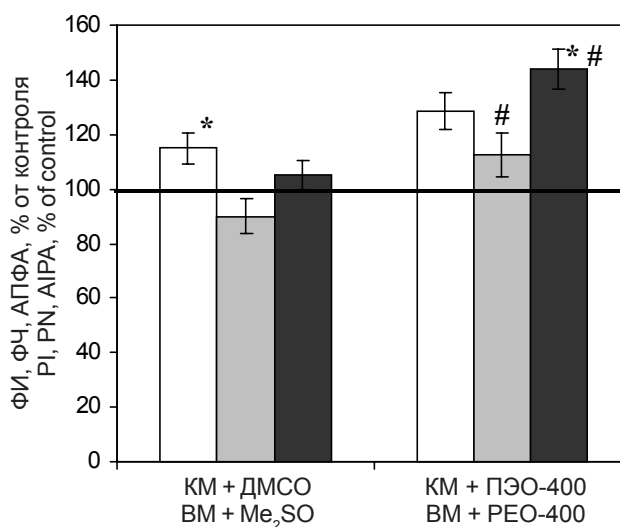


Рис. 3. Фагоцитарная активность клеток КМ после экспозиции с ДМСО и ПЭО-400: □ – фагоцитарный индекс; ▒ – фагоцитарное число; ■ – АПФА; достоверность различий ($p < 0,05$) в сравнении: * – с контролем; # – между опытными группами; здесь и далее за 100% приняты показатели клеток КМ до экспозиции с криопротектором.

Fig. 3. BM cells phagocytic activity after the exposure to Me₂SO or to PEO-400: □ – phagocytic index; ▒ – phagocytic number; ■ – AIPA; the significance of differences ($p < 0.05$) in comparison: * – with the control; # – between the experimental groups; hereinafter BM cells values prior to the exposure to the cryoprotectants are accepted as 100%.

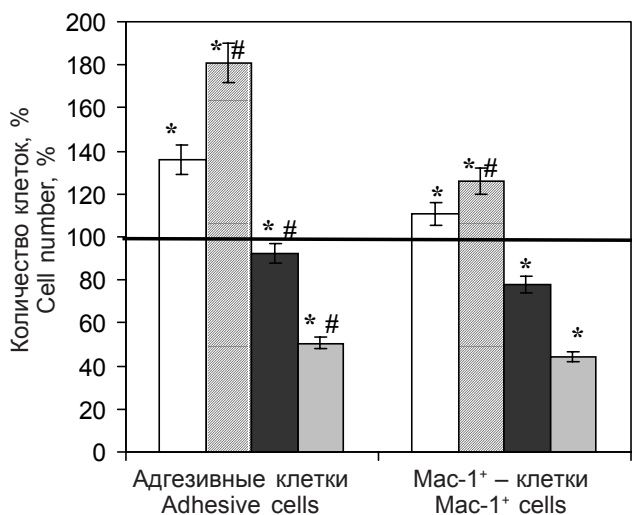


Рис. 4. Характер изменения содержания адгезивных и Mac-1⁺ (CD11b) – клеток в КМ после экспозиции с криопротектором и последующего криоконсервирования: □ – КМ + ДМСО; ▨ – КМ + ПЭО-400; ■ – КМ + Крио-1; ▩ – КМ + Крио-2; достоверность различий ($p < 0,05$) в сравнении: * – с контролем; # – между опытными группами.

Fig. 4. Pattern of changes in adhesive and Mac-1⁺ (CD11b) cells contents in BM after exposure to the cryoprotectant followed by cryopreservation: □ – BM + Me₂SO; ▨ – BM + PEO-400; ■ – BM + Cryo-1; ▩ – BM + Cryo-2; the significance of differences ($p < 0.05$) in comparison: * – with the control; # – between the experimental groups.

с ПЭО-400 наблюдалось и максимальное снижение их концентрации после криоконсервирования с этим протектором. Судя по результатам фенотипического анализа, в КМ, криоконсервированном с ПЭО-400, почти в 2 раза уменьшалось количество Mac-1⁺ – клеток, по сравнению с криоконсервированными в присутствии ДМСО. Вероятно, режим Крио-2 проявляет большую "агрессивность" в отношении молекул адгезии. Индуцируя их повышенную экспрессию на этапе эквilibрации, этот режим вызывает и более выраженное после криоконсервирования схождение (*shedding*) рецепторов, через которые клетки МФС, как известно, реализуют свою функциональную активность.

Оценка функционального статуса криоконсервированных клеток КМ с фагоцитарной активностью подтверждает данный тезис. Как видно (рис. 5), криоконсервирование КМ под защитой ПЭО-400 приводило к значительно большему снижению ФИ и ФЧ в сравнении с данными для ДМСО, что манифестировалось резким снижением АПФА, подчеркивая почти полное отсутствие интегральной функциональной активности клеток, криоконсервированных в этом режиме.

Полученные данные дают основание считать, что предпосылкой этого является изменение фагоцитарного потенциала клеток КМ уже на этапе их

with PEO-400 the number of CD11b⁺ cells was also twice as low as that in BM cryopreserved with Me₂SO. The Cryo-2 regimen is likely to be more "aggressive" towards adhesion molecules. Inducing their enhanced expression at the equilibration stage this regimen leads also to more significant post-thaw shedding of receptors, through which MPS cells are known to perform their functions.

The assessment of the functional state of cryopreserved BM cells with phagocytic activity confirms this statement. It can be seen (Fig. 5) that cryopreservation of BM protected by PEO-400 led to a more considerable decline in PI and PN comparing to the case of cryopreservation with Me₂SO, which was manifested as a drastic drop in AIPA emphasizing almost total absence of the integral functional activity of cells cryopreserved according to this regimen.

The data obtained allow suggesting that the change in the phagocytic potential of BM cells at the stage of their equilibration with the PEO-400 cryoprotectant is a pre-condition for this phenomenon. In fact the exposure of BM cells to the cryoprotectant sensitizes them to stress factors of the freeze-thawing process. It is logical that the more expressed such response of myelokaryocytes at the stage of equilibration with PEO-400 is, the more sensitive they become to the follow-up physico-chemical factors affecting at the cryopreservation stage.

It can be concluded that cryopreservation of BM protected by 10% Me₂SO or by 7.5% PEO-400 modi-

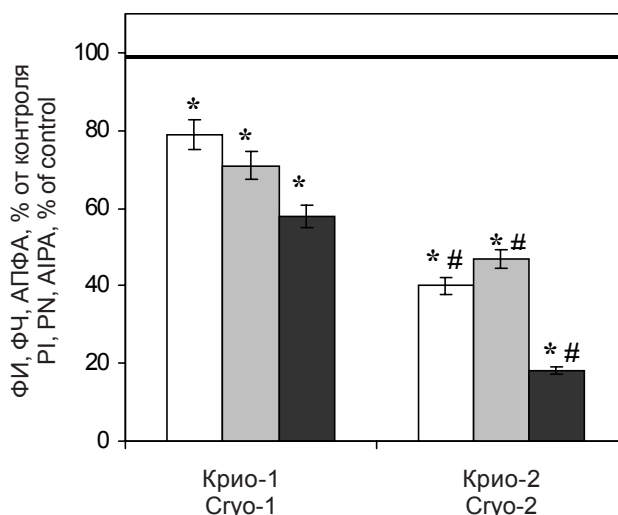


Рис. 5. Фагоцитарная активность клеток КМ после криоконсервирования: □ – фагоцитарный индекс; ▨ – фагоцитарное число; ■ – АПФА; достоверность различий ($p < 0,05$) в сравнении: * – с контролем; # – между опытными группами.

Fig. 5. BM cells phagocytic activity after cryopreservation: □ – phagocytic index; ▨ – phagocytic number; ■ – AIPA; the significance of differences ($p < 0.05$) in comparison: * – with the control; # – between the experimental groups.

эквilibрации с криопротектором ПЭО-400. Фактически экспозиция клеток КМ с криопротектором "сенсibiliзует" их к действию стрессорных факторов, реализуемых при замораживании-отогреве биообъекта. Логично, что чем более выражен такого рода ответ миелокариоцитов на этапе эквilibрации с ПЭО-400, тем более чувствительными они становятся к действию физико-химических факторов "второго эшелона", реализуемых на этапе криоконсервирования.

Можно заключить, что криоконсервирование КМ под защитой 10%-го ДМСО или 7,5%-го ПЭО-400 модифицирует структурные и функциональные характеристики клеток с функцией элементов МФС, входящих в состав миелотрансплантата. Такие клетки, как известно, потенциально являются АПК и участвуют в реализации иммунных взаимодействий трансплантируемого гистонесовместимого КМ с организмом реципиента, включая РТПХ [16]. Результаты работы подтверждают, что для КМ, криоконсервированного под защитой ПЭО-400, такого рода взаимодействия будут снижены. Следовательно, вполне логичны ранее полученные нами данные о минимизации степени проявления РТПХ-активности аллогенного КМ, криоконсервированного под защитой ПЭО-400 в сравнении с КМ, криоконсервированным под защитой ДМСО [7]. Кроме того, результаты этой работы вносят существенный вклад в понимание механизмов иммунных взаимодействий криоконсервированного алломиелотрансплантата с организмом реципиента и возможности использования криоконсервирования КМ для минимизации развития РТПХ. Это еще раз доказывает правомочность выдвинутой ранее концепции о способности криоконсервирования выступать в роли фактора управления внутренним состоянием (*intrinsic state*) биообъекта [15].

Выводы

1. Сравнительный анализ структурно-функциональных характеристик клеток, входящих во фракцию АККМ (фенотипические признаки, адгезивные свойства и фагоцитарная активность), продемонстрировал более выраженные изменения указанных свойств при криоконсервировании КМ под защитой ПЭО-400, чем ДМСО. Такого рода изменения развиваются уже на этапе экспозиции КМ с криопротектором.

2. Приведенные данные подчеркивают значимость АККМ как компонента миелотрансплантата в реализации его иммунореактивности и являются важным элементом доказательной базы состоятельности альтернативного пути презентации антигена донорскими стромальными элементами аллогенного КМ с функцией АПК в общем механизме активации Т-клеток, индуцирующих РТПХ.

ifies structural and functional characteristics of cells with MPS elements functions, which are a part of myelotransplant. Such cells are known to be potential APCs and take part in immune interactions between transplanted histoincompatible BM and the recipient's organism including GVHR [16]. The results of the work confirm that for BM cryopreserved with PEO-400 such interactions will be weakened. Consequently our earlier data on minimization of GVHR activity of allogenic BM cryopreserved with PEO-400 as compared to BM cryopreserved with Me₂SO are quite logical [7]. Besides, the results of this work contribute a lot to the insight into mechanisms of immune interactions between cryopreserved myelotransplant and the recipient's organism and to the opportunity of applying cryopreservation of BM for GVHR minimization. This fact proves once more the relevance of our conception proposed earlier on the ability of cryopreservation to act as a factor regulating the intrinsic state of a bioobject [15].

Conclusions

1. The comparative analysis of structure-functional characteristics of cells, which are a part of BMAC fraction (phenotypic features, adhesive properties and phagocytic activity), demonstrated more expressed changes of the properties above-mentioned upon cryopreservation of BM protected by PEO-400 than those of BM cryopreserved with Me₂SO. These changes develop as early as at the stage of exposure of BM to the cryoprotectants.

2. The data presented confirm importance of BMACs as a component of myelotransplant for realization of its immunoreactivity and are a vital argument for substantiality of the alternative way of antigen presentation by the donor's stromal elements with APC functions of allogenic BM in the general mechanism of T-cell activation inducing GVHR.

References

1. Aleksandrov M.G., Kudryavitsky A.I., Rumyantseva Ye.G. A method for calculation of phagocytosis absolute indices // Lab. Delo.— 1988.— N9.— P. 30–33.
2. Goltsev A.N., Dubrava T.G., Lutsenko Ye.D. Identification of the antigen Thy-1,2 on hemopoietic precursors (CFUs) and assessment of its state after cryopreservation of bone marrow.— Filed in VINITI 18.07.90. N4039-B90.— Kharkov, 1990.— 51 p.
3. Goltsev A.N., Dubrava T.G., Lutsenko Ye.D. et al. A search for the methods of modification of the immune reactivity of the allomyelotransplant, which are alternative to cryopreservation. Part I // Problems of Cryobiology.— 1996.— N4.— P. 3–16.
4. Goltsev A.N., Ostankova L.V., Lutsenko Ye.D. et al. The functional activity of cryopreserved hemopoietic cells (CFUs) as a function of the myelograft component composition // Problems of Cryobiology.— 1993.— N4.— P. 34–40.
5. Kozlova Yu.A., Goltsev A.N., Ostankov M.V. Influence of certain physical and chemical factors of cryopreservation on bone marrow cells with various initial structural and

Литература

1. Александров М.Г., Кудрявицкий А.И., Румянцева Е.Г. Метод вычисления абсолютных показателей фагоцитоза // Лаб. дело.– 1988.– №9.– С. 30–33.
2. Гольцев А.Н., Дубрава Т.Г., Луценко Е.Д. Идентификация антигена Thy-1,2 на клетках предшественников (КОЕс) и оценка его состояния после криоконсервирования костного мозга: Деп. в ВИНТИ 18.07.90. №4039-В90.– Харьков, 1990.– 51 с.
3. Гольцев А.Н., Дубрава Т.Г., Луценко Е.Д., Грищенко О.В. Поиск альтернативных путей модификации иммунореактивности алломиелотрансплантата. Часть I // Проблемы криобиологии.– 1996.– №4.– С. 3–16.
4. Гольцев А.Н., Останкова Л.В., Луценко Е.Д., Дубрава Т.Г. Функциональная активность криоконсервированных клеточных элементов (КОЕс) в зависимости от компонентного состава миелотрансплантата // Проблемы криобиологии.– 1993.– №4.– С. 34–40.
5. Козлова Ю.А., Гольцев А.Н., Останков М.В. Влияние изолированных физико-химических факторов криоконсервирования на клетки костного мозга с различным исходным структурно-функциональным статусом // Проблемы криобиологии.– 2003.– №4.– С. 3–11.
6. Лабораторные методы исследования в клинике / Под ред. В.В. Меньшикова.– М.: Медицина, 1987.– 368 с.
7. Мацевитая И.Ю., Останков М.В., Гольцев А.Н. Роль криоконсервирования в определении компонентного состава и иммунореактивности костного мозга // Проблемы криобиологии.– 2006.– №1.– С. 66–75
8. Хейхоу Ф.Г.Дж., Кваглино Д. Гематологическая цитохимия.– М.: Медицина.– 1983.– 340 с.
9. Хьюнбрехт Р. Партнерство между хорошей защитой животных и хорошей наукой // Междунар. семинар "Лабораторные животные – возможные альтернативы в экспериментальной фармакологии".– Харьков, 2002.– С. 22–24.
10. Шевелев А.С. Реакция "трансплантат против хозяина" и трансплантационная болезнь.– М.: Медицина, 1976.– 237 с.
11. Appelbaum F. The current status of hematopoietic cell transplantation // Annu. Rev.Med.– 2003.– Vol. 54.– P. 491–512.
12. Benichou C., Valujshkikh A., Heegeer P.S. Contributions of direct and indirect T-cell alloreactivity during allograft rejection in mice // J. Immunol.– 1999.– Vol. 162, N1.– P. 352–358.
13. Byers V., Henslee J.P., Kernan N.A. Use of anti-pan T-lymphocyte ricin A chain immunotoxin in steroid resistant acute graft-versus-host disease // Blood.– 1990.– Vol. 75, N7.– P. 1426–1432.
14. Goltsev A.N., Babenko N.N., Dubrava T.G. et al. Modification of the state of bone marrow hemopoietic cells after cryopreservation // Int. J. Refrigr.– 2006.– Vol. 29, N3.– P. 358–367.
15. Goltsev A.N., Grischenko V.I., Sirous M.A. et al. Cryopreservation: an optimizing factor for therapeutic potential of fetoplacental complex products // Biopreservation and Biobanking.– 2009.– Vol. 7, N1.– P. 29–38.
16. Goltsev A.N., Lutsenko E.D., Dubrava T.G. The importance of myelotransplant component content in the manifestation of cryopreserved hemopoietic precursors functional activity. Adequate methods for assessing the role of adhesive cells // Cryoletters.– 1996.– Vol. 17, N3.– P. 187–203.
17. Guinan E.S., Gribben J.G., Boussiotis V.A. Pivotal Role of the B7:CD28 pathway in transplantation tolerance and tumor immunity // Blood.– 1994.– Vol. 84, N10.– P. 3261–3282.
18. Soligo D., Cattoretti G., Colombi M. et al. Bone marrow and tissue expression of gp11b/IIIa, LFA-1, Mac-1 and gp150,95 glycoproteins // Eur. J. Haematol.– 2010.– Vol. 42, N2.– P. 173–181.
19. Tyndall A., Passweg J., Gratwohl A. Haemopoietic stem cell transplantation in the treatment of severe autoimmune diseases 2000 // Ann. Rheum. Dis.– 2001.– Vol. 60, N7.– P. 702–707.
- functional status // Problems of Cryobiology.– 2003.– N4.– P. 3–11.
6. Laboratory methods of investigation in clinics / Ed. by V.V. Menshikov.– Moscow: Meditsina, 1987.– 368 p.
7. Matsevitaya I.Yu., Ostankov M.V., Goltsev A.N. Role of cryopreservation in determining component composition and immune reactivity of bone marrow // Problems of Cryobiology.– 2006.– Vol. 16, N1.– P. 66–75.
8. Hayhoe F.G.J., Quglino D. Hematological cytochemistry.– Moscow: Meditsina, 1983.– 340 p.
9. Hunbrecht R. Partnership between good animal protection and good science // International Workshop "Laboratory Animals, Possible Alternatives in Experimental Pharmacology".– Kharkov, 2002.– P. 22–24.
10. Shevelev A.S. Graft-versus-host reaction and transplantation disease.– Moscow: Meditsina, 1976. - 237 p.
11. Appelbaum F. The current status of hematopoietic cell transplantation // Annu. Rev.Med.– 2003.– Vol. 54.– P. 491–512.
12. Benichou C., Valujshkikh A., Heegeer P.S. Contributions of direct and indirect T-cell alloreactivity during allograft rejection in mice // J. Immunol.– 1999.– Vol. 162, N1.– P. 352–358.
13. Byers V., Henslee J.P., Kernan N. A. Use of anti-pan T-lymphocyte ricin A chain immunotoxin in steroid resistant acute graft-versus-host disease // Blood.– 1990.– Vol. 75, N7.– P. 1426–1432.
14. Goltsev A.N., Babenko N.N., Dubrava T.G. et al. Modification of the state of bone marrow hemopoietic cells after cryopreservation // Int. J. Refrigr.– 2006.– Vol. 29, N3.– P. 358–367.
15. Goltsev A.N., Grischenko V.I., Sirous M.A. et al. Cryopreservation: an optimizing factor for therapeutic potential of fetoplacental complex products // Biopreservation and Biobanking.– 2009.– Vol. 7, N1.– P. 29–38.
16. Goltsev A.N., Lutsenko E.D., Dubrava T.G. The importance of myelotransplant component content in the manifestation of cryopreserved hemopoietic precursors functional activity. Adequate methods for assessing the role of adhesive cells // Cryoletters.– 1996.– Vol. 17, N3.– P. 187–203.
17. Guinan E.S., Gribben J.G., Boussiotis V.A. Pivotal Role of the B7:CD28 pathway in transplantation tolerance and tumor immunity // Blood.– 1994.– Vol. 84, N10.– P. 3261–3282.
18. Soligo D., Cattoretti G., Colombi M. et al. Bone marrow and tissue expression of gp11b/IIIa, LFA-1, Mac-1 and gp150,95 glycoproteins // Eur. J. Haematol.– 2010.– Vol. 42, N2.– P. 173–181.
19. Tyndall A., Passweg J., Gratwohl A. Haemopoietic stem cell transplantation in the treatment of severe autoimmune diseases 2000 // Ann. Rheum. Dis.– 2001.– Vol. 60, N7.– P. 702–707.

Accepted in 23.03.2010

Поступила 23.03.2010
Рецензент О.В. Кудкоцева