

Роль криоконсервирования в определении компонентного состава и иммунореактивности костного мозга

UDC 615.014.41:616.419-089.873:612.017.1

I.YU. MATSEVITAYA, M.V. OSTANKOV*, A.N. GOLTSEV

Role of Cryopreservation in Determining Component Composition and Immune Reactivity of Bone Marrow

Представлены данные, характеризующие развитие РТПХ после трансплантации модифицированного по компонентному составу аллогенного костного мозга. Показано, что определенные условия криоконсервирования костного мозга позволяют вследствие ингибции функции аксессуарно-регуляторных элементов снизить иммунореактивность миелотрансплантата и, как следствие, выраженность РТПХ, повышая его защитный потенциал.

Ключевые слова: криоконсервирование, костный мозг, иммунореактивность, трансплантация, РТПХ.

Представлено дані, які характеризують розвиток РТПХ після трансплантації модифікованого по компонентному складу алогенного кісткового мозку. Показано, що певні умови криоконсервування кісткового мозку дозволяють внаслідок інгібіції функції аксесорно-регуляторних елементів знизити імунореактивність миелотрансплантата і, як наслідок, вираженість РТПХ, підвищуючи його захисний потенціал.

Ключові слова: криоконсервування, кістковий мозок, імунореактивність, трансплантація, РТПХ.

The data, characterising GVHR development after transplantation of allogenic bone marrow, modified by component composition, are shown. Certain conditions of bone marrow cryopreservation were demonstrated as enabling to decrease a myelotransplant's immune reactivity due to inhibiting accessory-regulatory elements function and as a result GVHR manifestation rate by increasing its protective potential.

Key-words: cryopresevation, bone marrow, immunoactivity, transplantation, GVHR.

Ученые и клиницисты всего мира внесли существенный вклад в разработку теоретических основ трансплантологии, в том числе трансплантационной иммунологии, иммуносупрессии, но многие аспекты этой проблемы требуют дальнейшего изучения. Особое место среди них занимают те, которые касаются трансплантации КМ, в частности пересадка гистонесовместимого (аллогенного) материала [16, 29]. Применение аллогенных миелокариоцитов связано с развитием иммунного конфликта в виде реакции трансплантата против хозяина (РТПХ) [15, 16, 18, 22, 29]. Установление основного субстрата индукции этой реакции, а именно иммунокомпетентных Т-лимфоцитов [2, 4, 5, 16, 19], обусловило необходимость поиска тех методических подходов, с помощью которых можно было бы эти клетки элиминировать из миелотрансплантата или минимизировать их активность [24, 26-28]. Однако полученные данные свидетельствуют о том, что иммунореактивность антигенраспознающих клеток в миелотрансплантате реализуется при участии ряда вспомогательных аксессуарно-регуляторных элементов кроветворного микроокружения не только реципи-

Researchers and clinicians all over the world made a significant contribution in developing theoretical bases of transplantology, including transplantation immunology, immune suppression, but many aspects of this problem need further studying. A special place is taken by those, relating to BM transplantation, in particular, histoincompatible (allogenic) material engraftment [16, 29]. Application of allogenic myelokaryocytes is associated with immune conflict development in the form of graft-versus-host reaction (GVHR) [15, 16, 18, 22, 29]. Establishing the principle substrate of this reaction induction, namely immune-competent T-lymphocytes [2, 4, 5, 16, 19], stipulated the necessity to search for those methodical approaches, using which we could eliminate these cells out of myelotransplant or minimise their activity [24, 26-28]. However the data obtained testify to the fact, that immune reactivity of antigen-recognising cells in myelotransplant is realised with participation of some auxiliary, accessory-regulatory elements of hemopoietic microenvironment not only of recipient, but transplanted BM as well [4, 5, 19]. Consequently, there are the premises, that modification of qualitative and quantitative characteristics of component composition of hemopoietic

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Перейславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.:+38
(057) 373-31-04, факс:+38(057)373-30-84, электронная почта:
cryo@online.kharkov.ua

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 3104, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

ента, но и трансплантируемого КМ [4, 5, 19]. Следовательно, есть предпосылки, что модификация качественных и количественных характеристик компонентного состава клеток кроветворного микроокружения может обусловить изменение иммунореактивности миелотрансплантата. Обоснованность такого предположения подтверждается полученными ранее данными о возможности модификации функции кроветворных предшественников КМ изменением его компонентного состава, а именно количественного содержания аксессуарно-регуляторных клеток [5, 6]. Манипуляции с аллогенным КМ *in vitro* (фракционирование, воздействие различных физико-химических факторов и т.д.) с целью элиминации тех или иных клеточных популяций представляют собой основные методические подходы (наряду с обработкой донора и реципиента алломиелотрансплантата) снижения иммунореактивности КМ [4, 20]. Учитывая факт изменения ряда структурно-функциональных характеристик биологических объектов после криоконсервирования [5, 7, 19], вполне вероятно криоконсервирование можно считать фактором предобработки КМ *in vitro*, а следовательно модификации иммунореактивности при трансплантации [3, 4, 19, 36]. В связи с этим цель данной работы – изучение активности РТПХ криоконсервированного при различных условиях аллогенного КМ.

Материалы и методы

Эксперименты выполнены на 294 мышах линии СВА и (СВА×С57В1) F_1 массой 22-23 г. Все манипуляции с животными проводили согласно принципам “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей” (Страсбург, 1985). Костный мозг получали из бедренных костей мышей-доноров на среде 199 с соответствующими добавками. Адгезивные клетки удаляли из суспензии КМ экспонированием в чашках Петри при температуре 20-22°C 2 раза по 40 мин.

Для изучения активности РТПХ нативный или криоконсервированный КМ мышей линии СВА трансплантировали мышам линии (СВА×С57В1) F_1 внутривенно в дозе 1×10^6 на 0,3 мл через 4 ч после облучения в дозе 8 Гр. Условия облучения: установка РУМ 17; мощность дозы – 38,6 рад/мин, напряжение – 220 кВ, сила тока – 10 А, фильтры – 1 мм Cu + 1 мм Al. Фокусно-дорзальное расстояние составляло 45 см. Признаки развития РТПХ идентифицировали по таким показателям, как изменение массы тела, выживаемость животных, оценка индекса лимфоузлов и тимуса. Индекс рассчитывали делением относительной массы органа мышей опытных групп на относительную

microenvironment cells can stipulate a change in myelotransplant's immune reactivity. The substantiation of such supposition is confirmed by previously obtained data about the possibility to modify the functions of BM hemopoietic precursors by changing its component composition, namely quantitative content of accessory-regulatory cells [5,6]. Manipulations with allogenic BM *in vitro* (fractionation, effect of various physical and chemical factors etc.) with the aim to eliminate these or those cell populations, are the main methodical approaches (along with allomyelotransplant's donor and recipient treatment) to reduce BM immune reactivity [4, 20]. Taking into consideration the fact of change in some structural and functional characteristics of biological objects after cryopreservation [5, 7, 19], the latter quite probably may act as a factor of BM preliminary treatment *in vitro*, and, consequently, immune reactivity modification at transplantation [3, 4, 19, 36]. In this connection this work was aimed to study the GVHR activity of allogenic BM, cryopreserved under different conditions.

Materials and methods

Experiments were carried-out in 294 mice of CBA and (CBA×C57B1) F_1 lines with 22-23 g weight. All manipulations with animals were carried-out according to the principles of European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes” (Strasbourg, 1985). Bone marrow was procured from femur bones of mice-donors on 199 medium with corresponding additives. Adhesive cells were removed from BM suspension by double exposure in Petri dishes for 40 min at 20-22°C.

To study GVHR activity the native or cryopreserved BM of CBA mice was transplanted to the (CBA×C57B1) F_1 mice intravenously in 1×10^6 dose in 0.3 ml volume in 4 hours after irradiation in 8 Gr dose. Irradiation conditions were as follows: RUM 17 device; 38.6 rad/min dose power, 220 kV voltage, 10A amperage, 1 mm Cu + 1 mm Al filters. Focus-dorsal distance was 45 cm. Signs of GVHR development were identified by such indices as a change in body weight, animal survival, estimation of index of lymph nodes and thymus. Index was calculated by dividing a relative organ weight of experimental groups' animals by that of control group's ones. Irradiated in the same dose mice with the syngeneic BM transplant served as the control. Indices less than 0.7 and higher than 1.3 testified to GVHR development [4, 12, 19].

BM cryopreservation was carried-out with UOP-06 device, using 2 regimens, we defined as C-I and C-II. The C-I regimen was as follow: BM cells were frozen under dimethyl sulfoxide (DMSO) protection in 10% concentration, C-II regimen comprised PEO-400 in the same concentration instead of DMSO. In

массу органа мышей контрольной группы. Контролем служили облученные в аналогичной дозе мыши с трансплантатом сингенного КМ. Индексы меньше 0,7 и больше 1,3 свидетельствовали о развитии РТПХ [4, 12, 19].

Криоконсервирование КМ проводили на установке УОП-06, используя 2 режима, названные нами К-I и К-II. Режим К-I: клетки КМ замораживали под защитой криопротектора диметилсульфоксида (ДМСО) в концентрации 10%, режим К-II – вместо ДМСО использовали ПЭО-400 в аналогичной концентрации. В обоих случаях скорость замораживания составляла 1°C/мин от комнатной температуры до -25°C с последующим погружением ампул в жидкий азот. Суспензии отогревали на водяной бане при температуре 39-40°C в течение минуты с постоянным шутелированием ампулы.

Содержание в КМ Т-лимфоцитов определяли с помощью моноклональных антител (МАТ) к антигенам Thy-1,2, LyT2 и L3T4 в цитотоксическом тесте прямым пеннинг-методом [2, 8]. Для постановки пеннинг-метода МАТ к Thy-1,2 антигену вносили в планшеты с ячейками 16 мм в разведении 1:300 и выдерживали 120 мин при комнатной температуре. Неприкрепившиеся антитела удаляли вместе со средой разведения. После этого в ячейки вносили суспензию КМ в объеме 0,5 мл с концентрацией 4×10^6 /мл ядродержащих клеток, из которой предварительно удаляли фракцию адгезивных клеток костного

both cases freezing rate made 1°C/min from room temperature down to -25°C with following ampoules immersion into liquid nitrogen. Suspensions were thawed on water bath at 39-40°C for 1 min with constant ampoule shuttling.

T-lymphocyte content in BM was determined using monoclonal antibodies (MAB) to Thy-1,2, LyT2 and L3T4 antigens in cytotoxic test and by direct penning-method [2, 8]. To perform penning-method the MAB to Thy-1,2 antigen were introduced to the plate with 16 mm wells in 1:300 dilution and exposed 120 min at room temperature. Non-adhered antibodies were removed together with dilution medium. Afterwards BM suspension was introduced into the wells in 0.5 ml volume with 4×10^6 /ml concentration of nucleated cells, where bone marrow adhesive cells (BMAC) fraction was preliminarily removed. BMAC fraction was introduced in a similar way into the wells with adhered MAB. Cells of both suspensions were exposed at 4°C for 70 min, cells, the non-adhered to MAB, i.e. Thy-1,2-cells, were removed. Percentage content of Thy-1,2⁺-cells was calculated by difference in the amount of non-adhered cells and the initial concentration in suspension.

Results of all experiments were statistically processed by Student-Fisher method [1].

Results and discussion

Using penning-method with Thy-1,2 MAB, we established that in BM of CBA mice there was not more than 2% of Thy-1,2⁺-cells. Along with this, in all population of BM cells about 15% had adhesive capability, where Thy-1,2⁺-cells were revealed in 3.5 times more in comparison with non-fractionated BM ($7.25 \pm 0.25\%$). Consequently, allogenic BM of mice contains insignificant amount of Thy-1,2⁺ immune reactive cells of T-series, potentially capable to initiate acute form of GVHR. In fact, during allogenic BM trans-plantation not acute form of immune conflict, but the chronic one in the form of “secondary disease” develops in mice [10, 12].

The main symptoms of secondary disease begin to be manifested in mice-recipients from the 4th week after transplantation of histoincompatible BM [4, 12]. It is mostly manifested in a constant decrease of body weight and atrophy of

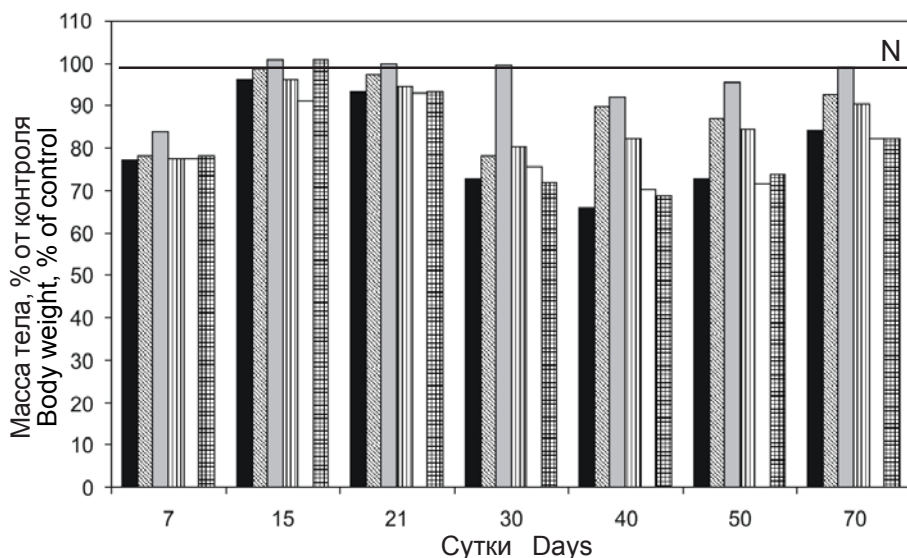


Рис. 1. Изменение массы тела летально облученных мышей после трансплантации КМ: ■ – интактного (1-я группа); ▨ – интактного аллогенного без АКМ (2-я группа); ▩ – сингенного (3-я группа); ▪ – аллогенного К-II (4-я группа); □ – аллогенного К-I (5-я группа); ▤ – аллогенного К-II+АКМ (6-я группа). За 100% (сплошная линия) приняты показатели интактных животных.

Fig.1. Change in body weight of lethally irradiated mice after BM transplantation: ■ – intact (1st group); ▨ – intact allogenic without BMAC (2nd group); ▩ – syngeneic (3rd group); ▪ – allogenic C-II (4th group); □ – allogenic C-I (5th group); ▤ – allogenic C-II+BMAC (6th group). Indices of intact animals were assumed as 100% (solid line).

мозга (АККМ). Фракцию АККМ аналогичным образом вносили в лунки с прикрепившимися МАТ. Клетки обеих суспензий экспонировали при 4°C в течение 70 мин, неприкрепившиеся к МАТ клетки, т.е. Thy-1,2-клетки, удаляли. Процентное содержание Thy-1,2⁺-клеток рассчитывали по разнице количества неприкрепившихся клеток и исходной концентрации в суспензии.

Результаты всех экспериментов обрабатывали статистически по методу Стьюдента-Фишера [1].

Результаты и обсуждение

Используя пеннинг-метод с Thy-1,2 МАТ, установили, что в КМ мышей линии СВА содержится не более 2% Thy-1,2⁺-клеток. Наряду с этим, во всей популяции клеток КМ около 15% обладали адгезивной способностью, среди которых Thy-1,2⁺-клеток было выявлено в 3,5 раза больше по сравнению с нефракционированным КМ (7,25±0,25%). Следовательно, аллогенный КМ мышей содержит незначительное количество потенциально способных инициировать острую форму РТПХ Thy-1,2⁺ иммунореактивных клеток Т-ряда. Действительно, при трансплантации аллогенного КМ у мышей развивается не острая форма иммунного конфликта, а хроническая в виде “вторичной болезни” [10, 12].

Основные симптомы “вторичной болезни” начинают проявляться у мышей-реципиентов с 4-й недели после трансплантации гистонесовместимого КМ [4, 12]. Прежде всего это выражается в постоянном снижении массы тела и атрофии структур лимфоидной ткани, что, по всей видимости, является основной причиной гибели реципиентов. Полученные данные свидетельствуют о том, что у облученных животных, вне зависимости от вида трансплантируемого КМ, резкое снижение массы тела наблюдалось на протяжении первой недели (рис. 1).

К 15-м суткам масса тела животных всех групп восстанавливалась почти до уровня контроля, оставаясь практически без изменений до 21-х суток посттрансплантационного периода.

lymphoid tissue structures, that is apparently the main cause of recipient death. Data obtained testify to the fact the in irradiated animals independently on type of transplanted BM a sharp decrease in body weight was observed within first week (Fig. 1).

To the 15th day the body weight in all groups of animals recovered almost to the control level, remaining practically without changes to the 21st day of post-transplantation period. Further the character of body weight change depended on myelotransplant type. Thus, a stable keeping of body weight at the level of control values to the end of observation term was observed only during syngenic BM transplantation.

A distinct tendency of animals' body weight decrease during histoincompatible BM transplantation was observed in 1st, 5th and 6th groups, beginning from 21st-30th days, by achieving the minimum values to the 70th day of post-transplantation period. Animals for this period lost to 30-35% of initial body weight. Later beginning and less manifested decrease in body weight was noted in animals of the 2nd and 4th groups (with transplant of allogenic BM, deprived of adhesive cells and cryopreserved with C-II regimen). From 30th and 70th days the body weight of these groups of animals was significantly higher than in 5th and 6th ones. Of importance is that since the 70th day a gradual increase in body weight of survived animals independently on myelotransplant type was noted.

Hypoplasia of lymphoid structures of organism is characteristic for “secondary disease” development

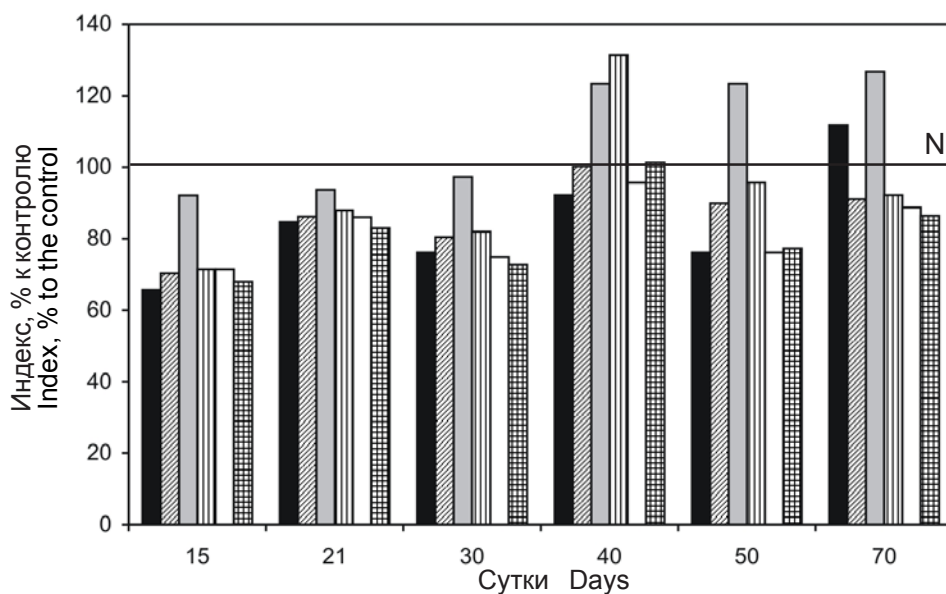


Рис. 2. Изменение индекса лимфоузлов летально облученных мышей после трансплантации КМ: ■ – интактного (1-я группа); ▨ – интактного аллогенного без АККМ (2-я группа); ▩ – сингенного (3-я группа); ▪ – аллогенного К-II (4-я группа); □ – аллогенного К-I (5-я группа); ▩ – аллогенного К-II+АККМ (6-я группа). За 100% (сплошная линия) приняты показатели интактных животных.

Fig. 2. Change in lymph nodes index of lethally irradiated mice after BM transplantation: ■ – intact (1st group); ▨ – intact allogenic without BMAC (2nd group); ▩ – syngenic (3rd group); ▪ – allogenic C-II (4th group); □ – allogenic C-I (5th group); ▩ – allogenic C-II+BMAC (6th group). Indices of intact animals were assumed as 100% (solid line).

В дальнейшем характер изменения массы тела зависел от вида миелотрансплантата. Так, стабильное сохранение массы тела на уровне контрольных величин до конца срока наблюдения отмечали только при трансплантации сингенного КМ.

Четкую тенденцию снижения массы тела животных при трансплантации гистонесовместимого КМ прослеживали в группах 1, 5 и 6, начиная с 21-30-х суток, достигая минимальных величин к 70-м суткам посттрансплантационного периода. Животные за это время теряли до 30-35% исходной массы тела. Более позднее начало и менее выраженное снижение массы тела было отмечено у животных групп 2 и 4 (с трансплантатом аллогенного КМ, лишённого адгезивных клеток и криоконсервированного в режиме К-II). С 30-х и до 70-х суток масса тела животных этих групп была достоверно выше, чем животных групп 5 и 6. Важно, что с 70-х суток наблюдалось постепенное увеличение массы тела выживших животных вне зависимости от вида миелотрансплантата.

Характерным признаком развития “вторичной болезни” [4, 12, 32, 33] является гипоплазия лимфоидных структур организма, что соответствует полученным данным. Так, у облученных животных с трансплантатом интактного аллогенного КМ (группа 1) индекс лимфоузлов и тимуса был существенно ниже по сравнению с данными, полученными при трансплантации сингенного КМ (группа 3 – контрольная). При этом важно отметить различие во времени начала снижения индекса лимфоузлов и тимуса. Выявленное снижение данного показателя в тимусе начиналось с 21-х суток у всех опытных групп, что свидетельствует о развитии “вторичной болезни”.

Следует отметить, что при оценке степени изменения индекса лимфоузлов в сравниваемых группах прослеживалась та же закономерность, что и при оценке массы тела (рис. 2).

На протяжении всего срока наблюдения были более выражены изменения индекса тимуса, чем лимфоузлов. В течение первого месяца постлучевого периода в тимусе не было отмечено восстановления количества клеток в органе (рис. 3).

[4, 12, 32, 33], that corresponds to the data obtained. Thus, in irradiated animals with intact allogenic BM transplant (1st group) the index of lymph nodes and thymus was significantly lower in comparison with data, obtained during syngeneic BM transplantation (3rd group). At the same time of note is a time difference in of decrease beginning of lymph nodes and thymus index A manifested reduction of this index in thymus began from the 21st day in all experimental groups, that testified to “secondary” disease development.

We should note, that when evaluating the degree of change in lymph nodes index the same regularity was traced in the compared groups as during body weigh estimation (Fig. 2).

Within whole observation term the changes in thymus index were more manifested than those in lymph nodes. Within first month of post-irradiation period no recovery of cell amount was observed in thymus (Fig. 3). In addition, thymus regeneration began in later post-transplantation terms, being significantly less manifested. Finally, the minimum values of absolute values of thymus index were lower than in lymph nodes. Central immunity organ: thymus can be considered as being the most sensitive indicator of both immune conflict beginning at histoincompatible BM transplantation, and the degree of its manifestation rate. Of note is that namely by thymus index one manages ivery properly to determine the less extent of index deviation in animals of 2nd and 4th groups from 30th till 70th days (Fig. 3).

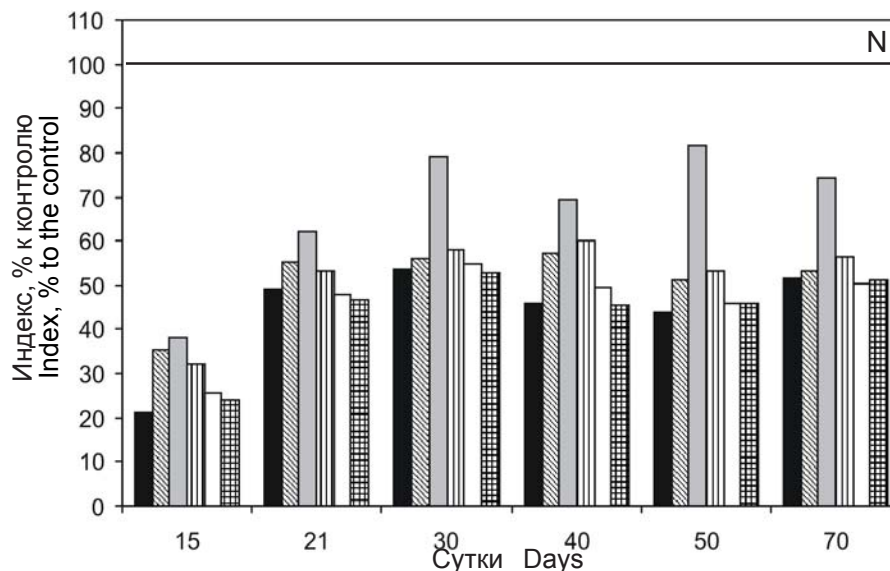


Рис. 3. Изменение индекса тимуса летально облученных мышей после трансплантации КМ: ■ – интактного (1-я группа); ▨ – интактного аллогенного без АККМ (2-я группа); □ – сингенного (3-я группа); ▤ – аллогенного К-II (4-я группа); □ – аллогенного К-I (5-я группа); ▩ – аллогенного К-II+АККМ (6-я группа). За 100% (сплошная линия) приняты показатели интактных животных.

Fig. 3. Change in thymus index in lethally irradiated mice after BM transplantation: ■ – intact (1st group); ▨ – intact allogenic without BMAC (2nd group); □ – syngeneic (3rd group); ▤ – allogenic C-II (4th group); □ – allogenic C-I (5th group); ▩ – allogenic C-II+BMAC (6th group). Indices of intact animals were assumed as 100% (solid line).

Кроме того, регенерация тимуса начиналась в более поздние сроки после трансплантации и была менее выражена. Минимальные значения абсолютных величин индекса тимуса были ниже, чем в лимфоузлах. Можно считать, что центральный орган иммунитета – тимус – является наиболее чувствительным индикатором как начала иммунного конфликта при трансплантации гистнесовместимого КМ, так и степени его выраженности. Важно отметить, что именно по индексу тимуса наиболее манифестно удается определить меньшую степень отклонения показателя у животных групп 2 и 4 с 30-х по 70-е сутки (рис. 3).

Оценивая интегральный показатель степени развития “вторичной болезни”, а именно выживаемость реципиентов КМ (рис. 4), следует отметить, что он является четким подтверждением особенностей проявления синдрома в виде изменения массы тела реципиентов и индексов органов иммунной системы. Наименьшая выживаемость реципиентов отмечена в группах 1, 5, 6 во все сроки наблюдения.

При сопоставлении данных, представленных на рис. 3 и 4, установлено, что независимо от вида трансплантируемого КМ наиболее выраженная гипоплазия тимуса отмечена на 50-е сутки. Именно с этого времени резко повышается смертность реципиентов, что можно характеризовать как развитие “следовой” реакции на развивающееся дисфункциональное состояние тимуса – регулятора многих структур нейроиммуноэндокринной сферы организма [32].

Феноменология клинического применения КМ, а также полученные в последнее время данные о механизме развития “вторичной болезни”, в основе которой лежит РТПХ, ориентируют нас на то, что основное звено каскадно развивающейся реакции данного типа – дисбаланс продукции цитокинов воспалительного и противовоспалительного паттернов иммунновоспалительной реакции [13, 17, 18, 23, 25, 33]. При этом важно, что такого рода дисбаланс является следствием не только дисрегуляторного состояния иммуно-реактивных Т-лимфоцитов, но и ряда других фактор-продуцирующих клеток лимфогемопозитического микроокружения реципиента и трансплантата КМ [11, 31, 35], выступающих в роли аксессуар-

When evaluating the integral index of “secondary” disease development degree, namely the BM recipients survival (Fig. 4), it should be noted its distinct confirmation of syndrome manifestation peculiarities in the form of a change in recipient’s body weight and immune system organs’ indices. The lowest survival of recipients was noted in 1st, 5th, 6th groups within all observation terms.

When comparing the data in Fig. 3 and 4 there was established that independently on a type of transplanted BM the most manifested thymus hypoplasia was noted to the 50th day. It is from that time there was a sharp increase in recipient’s death rate, that can be characterised as the development of “trace” response on progressing dysfunctional state of thymus: regulator of many structures of neuroimmunoendocrine sphere of organism [32].

Phenomenology of clinical application, as well as the recent data about the mechanism of secondary disease development, which base is GVHD, orient us to the fact, that the main link of cascade-like developing reaction of this type is the dysbalance in cytokine production of inflammatory and anti-inflammatory patterns of immune inflammatory reaction [13, 17, 18, 23, 25, 33]. At the same time it is important that such a dysbalance is a result of not only dysregulatory state of immune reactive T-lymphocytes, but some other factor-producing cells of lymphohemopoietic microenvironment of BM recipient and transplant [11, 31, 35], acting as accessory-regulatory elements [5, 36]. For example, an increased elimination of these cells from BM or their hyperplasia in this organ

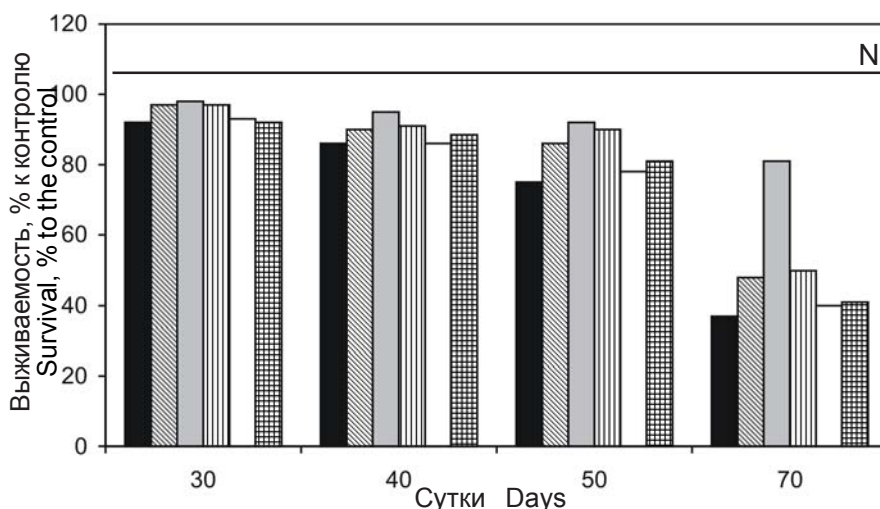


Рис. 4. Выживаемость летально облученных мышей после трансплантации КМ: ■ – интактного (1-я группа); ▨ – интактного аллогенного без АККМ (2-я группа); ▩ – сингенного (3-я группа); ▪ – аллогенного К-II (4-я группа); □ – аллогенного К-I (5-я группа); ▤ – аллогенного К-II + АККМ (6-я группа). За 100% (сплошная линия) приняты показатели интактных животных.

Fig. 4. Survival of lethally irradiated mice after BM transplantation: ■ – intact (1st group); ▨ – intact allogenic without BMAC (2nd group); ▩ – syngeneic (3rd group); ▪ – allogenic C-II (4th group); □ – allogenic C-I (5th group); ▤ – allogenic C-II + BMAC (6th group). Indices of intact animals were assumed as 100% (solid line).

но-регуляторных элементов [5, 36]. Показано, например, что повышенная элиминация данных клеток из КМ или их гиперплазия в этом органе обуславливают изменение его гемопоэтической функции, опосредованное влияние на которую оказывают Т-клетки [5, 9, 30, 33, 34]. Из этого следует, что в проявлении иммунореактивности трансплантата КМ существенную роль играет его компонентный состав. Полученные данные подтверждают то, что по всем выбранным критериям оценки выраженность развития “вторичной болезни” в значительной степени зависит от компонентного состава трансплантата. Так, сходные результаты получены в группах животных, которым трансплантировали модифицированный аллогенный КМ. Например, РТПХ-активность нативного КМ была близка криоконсервированному в режиме К-I, а нативного без АККМ – в режиме К-II. Добавление к криоконсервированному в режиме К-II костному мозгу АК в концентрации, соответствующей нативному КМ (15-18%), “восстанавливает” РТПХ-активность до уровня нативного. Следовательно, режим К-II выступает в данном случае как фактор селективной элиминации из трансплантата КМ фракции АК, что было подтверждено при определении колониеобразующей активности криоконсервированного костного мозга [4, 7]. Кроме того, этот факт подтверждает важность компонентного состава трансплантата, доказывая “трансплантабельность” АККМ, присутствие которых в аллогенном КМ “обеспечивает” его иммунореактивность. Не исключено, что повышение РТПХ-активности КМ после “возвращения” в суспензию АК обусловлено повышенным содержанием в этой фракции иммунореактивных Т-клеток. Например, фракция АККМ усиливает индукцию острой РТПХ при их совместном введении со спленоцитами [17, 32]. Однако полученные данные позволяют предполагать, что важными в этой фракции являются клетки, относящиеся к аксессуарно-регуляторным цитокин-продуцирующим элементам стромы КМ, на важную роль которых в инициации РТПХ неоднократно указывалось [22, 27, 28]. Именно эти клетки участвуют в развитии так называемого “цитокинового шторма” и острой формы РТПХ при пересадке гистонесовместимого КМ. Следовательно, присутствие этих клеток в КМ имеет определенную значимость и при развитии хронической формы РТПХ, т.е. “вторичной болезни”.

Выводы

Таким образом, апробированные режимы криоконсервирования выступают в роли фактора элиминации или, по крайней мере, ингибиции функции аксессуарно-регуляторных элементов КМ,

was shown to stipulate a change in its hemopoietic function, which was indirectly affected by T-cells [5, 9, 30, 33, 34]. It proceeds that its component composition plays a significant role in manifestation of BM transplant immune reactivity. The data obtained confirm the fact, that the manifestation rate of “secondary” disease development depend in a significant extent by all selected estimation criteria on a transplant’s component composition. Thus, similar results were obtained in groups of animals with modified allogenic BM transplanted using different ways. For example, GVHR-activity of native BM was close to the cryopreserved one with C-I regimen, and native without BMAC – with C-II regimen. Addition into bone marrow, cryopreserved by C-II regimen, of AC in the concentration, corresponding to the native BM (15-18%), “recover” GVHR-activity up to the native one. Consequently, C-II regimen acts in this case as the factor of selective elimination from BM transplant of AC fraction, that was confirmed when determining colony-forming activity of cryopreserved BM [4, 7]. In addition, this fact confirms the importance of transplant’s component composition, by proving the “transplantability” of BMAC, which presence in allogenic BM “provides” its immune reactivity. It is not excluded that an increase in BM GVHR-activity after being “returned” in AC suspension is stipulated by the augmentation of immune reactive T-cells content in this fraction. For example, BMAC fraction strengthens the induction of acute GVHR at mutual introduction with splenocytes [17, 32]. However, the data obtained allow to assume that important cells in this fraction are those, relating to accessory-regulatory cytokine-producing elements of BM stroma, which significant role in GVHR initiation was often indicated [22, 27, 28]. Namely these cells participate in the development of so-called “cytokine storm” during histoincompatible BM grafting and acute GVHS form. Consequently, these cells presence in BM has a certain importance at chronic GVHR form development as well, i.e. “secondary” disease.

Conclusions

Thus, the approved cryopreservation regimens act as eliminative factor or, at least, inhibition of function of accessory-regulatory BM elements, being a part of BMAC fraction. By other words, with alteration of the certain parameters of cryopreservation conditions, moreover not only of freeze-thawing process, we can select those, which can reduce immune reactivity of BM allotransplant, i.e. GVHR manifestation extent.

Data, characterising peculiarities of GVHR development after transplantation of BM, modified by component composition confirm this pathology being a complex multistep process. Cell elements of both myelotransplant and recipient’s organism participate

входящих в состав фракции АККМ. Другими словами, варьируя определенными параметрами условий криоконсервирования, причем не только процессом замораживания-оттаивания, можно подобрать те из них, которые могут снижать иммунореактивность аллотрансплантата КМ, т.е. степень проявления РТПХ.

Данные, характеризующие особенности развития РТПХ после трансплантации модифицированного по компонентному составу КМ, подтверждают, что эта патология является сложным многоступенчатым процессом. В ее индукции и поддержании течения участвуют клеточные элементы как миелотрансплантата, так и организма реципиента. Как отмечено в [14, 28], важность изменения содержания в трансплантате АККМ отражается в той или иной степени практически на всех оцененных показателях. Но важно и другое, что у животных, перенесших “вторичную болезнь”, практически до конца срока наблюдения эти показатели оставались измененными в сравнении с контролем. Это свидетельствует о том, что даже после минимизации степени проявления РТПХ выбранным нами путем ее хронически текущая форма приводит к существенным и длительным нарушениям состояния “бодигеостаза” [19] и требует специальной поддерживающей терапии, включающей и иммуномодулирующий компонент [28]. Такое заключение принято на основании полученных данных о состоянии центральных и периферических лимфоидных структур организма опытных животных. Действительно, полученные экспериментальные результаты подтверждают факт развития гипоплазии лимфоидных органов при РТПХ как обязательного компонента данной патологии [12]. Следует подчеркнуть, что такая феноменология является результатом ответной реакции лимфоидных структур на развитие мощного стрессорного фактора в виде РТПХ [10, 12]. На этом фоне в органотканевых структурах с высоким содержанием Т-лимфоцитов (в первую очередь, тимусе), чувствительных к глюкокортикоидам, имеются все предпосылки развития выраженной инволюции. В этих условиях в тимусе, как основной структуре, продуцирующей широчайший спектр регуляторных субстанций (хемокины, цитомедины и т.д.) [13, 14, 18], меняется сбалансированный спектр их продукции, что также существенно влияет на разбалансировку состояния “бодигеостаза” [21]. Этот тезис подтверждается четкой корреляцией начала периода выраженной инволюции тимуса и гибели мышечных реципиентов. Данный факт, по-видимому, имеет прикладное значение для проведения соответствующей терапии в определенные сроки развития синдрома РТПХ, но

in its induction and course maintaining. As noted in papers [14, 28] a significance of content change in BMAC transplant affect more or less practically all estimated indices. But the fact, that in animals, which had “secondary” disease these indices remained changed in comparison with the control was also important. This testifies to the fact, that even after minimising the extent of GVHR manifestation rate by the way we chosen, its chronically proceeding form results in considerable and long-term disorders in “body homeostasis” state [19] and requires special maintaining therapy, including immune-modulating component as well [28]. This was concluded basing on the data obtained about state of central and peripheral lymphoid structures of experimental animals’ organism. In fact, the obtained experimental results confirm the fact of lymphoid organ hypoplasia development at GVHR as an obligatory component of this pathology [12]. It should be emphasised that such phenomenology is a result of lymphoid structure response on the strong stress factor development in the form of GVHR [10, 12]. At this background in organ-tissue structures with a high T-lymphocyte content (primarily thymus), being sensitive to glucocorticoids there are all premises for manifested involution development. Under these conditions in thymus, as the main structure producing wide range of regulatory substances (chemokines, cytomedines etc.) [13, 14, 18] there is a change in balanced range of their production, that affects in a considerably extent the misbalancing of “body homeostasis” state as well [21]. This thesis is confirmed by a distinct correlation of manifested thymus involution period beginning and mice-recipients death. Apparently, this fact has an applied value in performing corresponding therapy within certain terms of GVHR syndrome development, but needs further experimental approval.

References

1. *Ashmarin I.P., Vorobiev A.A.* Statistical methods for microbiological research.— Leningrad: Meditsina, 1972.— 180 p.
2. *Belokrylov G.A.* Thy-antigen and its functions // *Uspekhi sovr. biologii.*— 1986.— 102, N1.— P. 39-51.
3. *Belous A.M., Grischenko V.I.* Cryobiology.— Kiev: Naukova dumka, 1994.— 431 p.
4. *Goltsev A.N.* Effect of cryopreservation factors on immune biological properties and bone marrow hemopoietic cells: Author’s abstract of thesis for doctor of medical sciences degree.— Kharkov, 1988.— 35 p.
5. *Goltsev A.N., Ostankova L.V., Dubrava T.G., Lutsenko E.D.* Functional activity of cryopreserved hemopoietic cells (CFUs) depending on myelotransplant component composition // *Problems of Cryobiology.*— 1993.— N3.— P.34-40.
6. *Dygay A.T., Shakhov V.P.* Role of intercellular interactions in hemopoiesis regulation.— Tomsk: Publishing House of Tomsk University.— 1989.— 224 p.
7. *Cryopreservation of cell suspensions* // Edited by A.A. Tsutsayeva.— Kiev: Naukova dumka, 1983.— 240 p.

требует дальнейшего экспериментального подтверждения.

Литература

1. *Ашмарин И.П., Воробьев А.А.* Статистические методы микробиологических исследований.– Л.: Медицина, 1972.– 180 с.
2. *Белокрылов Г.А.* Thu-антиген и его функции // Успехи совр. биологии.– 1986.– 102, №1.– С. 39-51.
3. *Белоус А.М., Грищенко В.И.* Кробиология.– Киев: Наук. думка, 1994.– 431 с.
4. *Гольцев А.Н.* Влияние факторов криоконсервирования на иммунобиологические свойства кроветворных клеток костного мозга: Автореф. дис....д-ра мед. наук.– Харьков, 1988.– 35 с.
5. *Гольцев А.Н., Останкова Л.В., Дубрава Т.Г., Луценко Е.Д.* Функциональная активность криоконсервированных кроветворных клеток (КОЕс) в зависимости от компонентного состава миелотрансплантата // Пробл. кробиологии.– 1993.– №3.– С.34-40.
6. *Дыгай А.Т., Шахов В.П.* Роль межклеточных взаимодействий в регуляции гемопоэза.– Томск: Изд-во Томск. ун-та.– 1989.– 224 с.
7. *Криоконсервирование клеточных суспензий* / Под ред. А.А. Цуцаевой.– Киев: Наук. думка, 1983.– 240 с.
8. *Лимфоциты: Методы* / Под ред. Дж. Клауса.– М.: Мир, 1990.– 386 с.
9. *Семенков В.Ф.* Использование РТПХ для специфического подавления гематотрансплантационного иммунитета у взрослых мышей // Бюл. эксперим. биол. и мед.– 1970.– №7.– С. 78-81.
10. *Романова О.А.* Роль лімфоїдного пулу клітин у реконструкції кровотворення опромінених реципієнтів лімфомієло-трансплантату // Укр. радіологічний журнал.– 2004.– Т.12, Вып. 1.– С. 53-57.
11. *Фриденштейн А.Я., Чайлахян Р.К., Герасимов Ю.В.* Стволовые стромальные клетки костного мозга // Стволовые клетки и опухолевый рост.– Киев: Наук. думка, 1985.– С. 80-87.
12. *Шевелев А.С.* Реакция “трансплантат против хозяина” и трансплантационная болезнь.– М.: Медицина, 1976.– 237 с.
13. *Antin J.H., Ferrara J.L.M.* Cytokine dysregulation and acute graft-versus-host disease // Blood.– 1992.– Vol. 80, N12.– P. 2964-2968.
14. *Bhalla K.S., Foltz R.J.* Idiopathic pneumonia syndrome after syngeneic bone marrow transplant in mice // J. Respir. Crit. Care. Med.– 2002.– Vol. 15, N166.– P.1579-1589.
15. *Bobe P., Benihoud K., Grandjon D. et al.* Nitric oxide mediation of active immunosuppression associated with graft-versus-host reaction // Blood.– 1999.– Vol. 94, N3.– P. 1028-1037.
16. *Cavazzana-Calvo M., Andre-Schmutz I., Hacein-Bey S. et al.* T-cell-depleted HLA non-identical bone marrow transplantation in the child: prevention of graft-versus-host reaction by administration of donor T lymphocyte alloreactive against the recipient // J Soc Biol.– 2001.– Vol. 195, N1.– P. 65-68.
17. *Das H., Imoto S. Murayama T. et al.* Kinetic analysis of cytokine gene expression in patients with GVHD after donor lymphocyte infusion // Bone Marrow Transplant.– 2001.– Vol. 27, N4.– P. 373-380.
18. *Ferrara J.L.M., Krenner W.* Role of cytokines in the immunopathophysiology of acute GVH Disease // Stem cells.– 1996.– Vol. 14, N5.– P. 473-489.
19. *Goltsev A.N., Ostankova L.V., Lutsenko E.D. et al.* Usage of cryopreservation as a proof of the role of cells monocytic-phagocytic system in modulation of myelotransplant's GVHR-
8. *Lymphocytes: Methods* // Edited by J. Claus.– Moscow: Mir, 1990.– 386 p.
9. *Semenkov V.F.* GVHR usage for specific suppression of hematotransplantation immunity in adult mice // Bull eksperim. biol. i med.– 1970.– N7.– P. 78-81.
10. *Romanova O.A.* Role of lymphoid cell pool in hemopoiesis reconstruction of irradiated recipients of lymphomyelotransplant // Ukr. radiologichny zhurnal.– 2004.– Vol.12, Issue 1.– P.53-57.
11. *Fridenshtein A. Ya., Chajlakhyan R.K., Gerasimov Yu.V.* Stem stromal cells of bone marrow//Stem cells and tumour growth.– Kiev: Naukova dumka, 1985.– P. 80-87.
12. *Shevelev A.S.* “Graft versus host” reaction and transplantation disease.– Moscow: Meditsina.– 1976.– 237 p.
13. *Antin J.H., Ferrara J.L.* Cytokine dysregulation and acute graft-versus-host disease // Blood.– 1992.– Vol. 80, N12.– P. 2964-2968.
14. *Bhalla K.S., Foltz R.J.* Idiopathic pneumonia syndrome after syngeneic bone marrow transplant in mice // J. Respir. Crit. Care. Med.– 2002.– Vol. 15, N166.– P.1579-1589.
15. *Bobe P., Benihoud K., Grandjon D. et al.* Nitric oxide mediation of active immunosuppression associated with graft-versus-host reaction // Blood.– 1999.– Vol. 94.– N3.– P. 1028-1037.
16. *Cavazzana-Calvo M., Andre-Schmutz I., Hacein-Bey S. et al.* T-cell-depleted HLA non-identical bone marrow transplantation in the child: prevention of graft-versus-host reaction by administration of donor T lymphocyte alloreactive against the recipient // J Soc Biol.– 2001.– Vol. 195, N1.– P. 65-68.
17. *Das H., Imoto S. Murayama T. et al.* Kinetic analysis of cytokine gene expression in patients with GVHD after donor lymphocyte infusion // Bone Marrow Transplant.– 2001.– Vol. 27, N4.– P. 373-380.
18. *Ferrara J.L.M., Krenner W.* Role of cytokines in the immunopathophysiology of acute GVH Disease // Stem cells.– 1996.– Vol. 14, N5.– P. 473-489.
19. *Goltsev A.N., Ostankova L.V., Lutsenko E.D. et al.* Usage of cryopreservation as a proof of the role of cells monocytic-phagocytic system in modulation of myelotransplant's GVHR-
20. *Greenberg P., Baker S.* Immunologic selection of hemopoietic precursor cells utilising antibody-mediated plate binding (“penning”) // Blood.– 1985.– Vol. 65, N1.– P. 190-197.
21. *Harada M., Tanigaki S., Akashi K.* Cytokine monitoring after bone marrow transplantation // Exp. Hem.– 1990.– Vol. 18, N6.– P. 221-229.
22. *Hartwig U.F., Robbers M., Wickenhauser C., Huber C.* Murine acute graft-versus-host disease can be prevented by depletion of alloreactive T lymphocytes using activation-induced cell death // Blood.– 2002.– Vol. 99, N8.– P. 3041-3049.
23. *Holler E., Kolb H.J., Moller A. et al.* Increased serum levels of tumor necrosis factor alpha precede major complications of bone marrow transplantation // Blood.– 1990.– Vol. 75, N4.– P. 1011-1016.
24. *Irschick E.U., Hladik F., Niederwieser D. et al.* Studied of the mechanism of tolerance of graft-versus-host disease in allogeneic bone marrow recipients at the level of cytotoxic T-cell precursor frequencies // Blood.– 1979.– Vol. 76, N6.– P. 1622-1629.
25. *Klimpel G.R., Annable C.R., Cleveland M.G. et al.* Immunosuppression and lymphoid hypoplasia associated with chronic graft versus host disease is dependent upon IFN-gamma production // J. Immunol.– 1990.– Vol. 144, N1.– P. 84-93.
26. *Krenner W., Ferrara J.L.M.* Graft-versus-host disease and the Th1/Th2 // J. Immunol. Res.– 1996.– N15.– P. 50-73.
27. *Lin T.S., Zahrieh D., Weller E. et al.* Risk factors for cytomegalovirus reactivation after CD6+ T-cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation // Transplantation.– 2002.– Vol. 74, N1.– P. 49-54.
28. *Meijer E., Dekker A.W., Rozenberg-Arska M. et al.* Influence of cytomegalovirus seropositivity on outcome after T cell-

- activity // Abstr. of 38th Annual Meeting of the Society of Cryobiology.– Edinburgh, 2001.– P.158.
20. *Greenberg P., Baker S.* Immunologic selection of hemopoietic precursor cells utilising antibody-mediated plate binding ("penning") // *Blood.*– 1985.– Vol. 65, N1.– P. 190-197.
 21. *Harada M., Tanigaki S., Akashi K.* Cytokine monitoring after bone marrow transplantation // *Exp. Hem.*– 1990.– Vol. 18, N6.– P. 221-229.
 22. *Hartwig U.F., Robbers M., Wickenhauser C., Huber C.* Murine acute graft-versus-host disease can be prevented by depletion of alloreactive T lymphocytes using activation-induced cell death // *Blood.*– 2002.– Vol. 99, N8.– P. 3041-3049.
 23. *Holler E., Kolb H.J., Moller A. et al.* Increased serum levels of tumor necrosis factor alpha precede major complications of bone marrow transplantation // *Blood.*– 1990.– Vol. 75, N4.– P. 1011-1016.
 24. *Irschick E.U., Hladik F., Niederwieser D. et al.* Studied of the mechanism of tolerance of graft-versus-host disease in allogeneic bone marrow recipients at the level of cytotoxic T-cell precursor frequencies // *Blood.*– 1979.– Vol. 76, N6.– P. 1622-1629.
 25. *Klimpel G.R., Annable C.R., Cleveland M.G. et al.* Immunosuppression and lymphoid hypoplasia associated with chronic graft versus host disease is dependent upon IFN-gamma production // *J. Immunol.*– 1990.– Vol. 144, N1.– P. 84-93.
 26. *Kreuder W., Ferrara J.L.M.* Graft-versus-host disease and the Th1/Th2 // *J. Immunol. Res.*– 1996.– N15.– P. 50-73.
 27. *Lin T.S., Zahrieh D., Weller E. et al.* Risk factors for cytomegalovirus reactivation after CD6+ T-cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation // *Transplantation.* – 2002.– Vol. 74, N1.– P. 49-54.
 28. *Meijer E., Dekker A.W., Rozenberg-Arska M. et al.* Influence of cytomegalovirus seropositivity on outcome after T cell-depleted bone marrow transplantation: contrasting results between recipients of grafts from related and unrelated donors // *Clin Infect Dis.*– 2002.– Vol. 35, N6.– P. 703-712.
 29. *Nagler A., Bishara A., Brautbar C., Barak V.* Dysregulation of inflammatory cytokines in unrelated bone marrow transplantation // *Cytokines Cell Mol.*– Vol. 4, N3.– P. 161-167.
 30. *Oluwole S.F., Oluwole O.O., DePaz H.A. et al.* CD4 CD25 regulatory T cells mediate acquired transplant tolerance // *Transplant Immunology.*– 2003.– N11.– P. 287-293.
 31. *Pakkala I., Taskinen E., Pakkala S., Raisanen-Sokolowski A.* MC 1288, a vitamin D analog, prevents acute graft-versus-host disease in rat bone marrow transplantation // *Bone Marrow Transplant.*– 2001.– Vol. 8.– P. 863-867.
 32. *Rakozy C.K., Mohamed A.N., Vo T.D. et al.* CD56+/CD4+ lymphomas and morphologically, immunophenotypically, cytogenetically and clinically diverse // *J. Clin. Pathol.*– 2001.– Vol. 116, N2.– P.168-176.
 33. *Serodi J.S., Cooc D.N., Kirby S.L. et al.* T-lymphocytes incapable of producing macrophag inhibitory protein are impaired in causing graft-versus host disease across a class I but not class II major histocompatibility complex barrier // *Blood.*– 1999.– Vol. 93, N1.– P. 43-50.
 34. *Small T.N., Papadopoulos E.B., Boulad F. et al.* Comparison of immune reconstitution after unrelated and related T-cell-depleted bone marrow transplantation: effect of patient age and donor leukocyte infusion // *Blood.*– 1999.– Vol. 93, N2.– P. 467-480.
 35. *Till S.P., McCulloch E.A.* A direct measurement of radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells // *Radiat. Res.*– 1961, N14.– P. 213-222.
 36. *Venkataraman M.* Cryopreservation-induced enhancement of interlekin-2 production human peripheral blood mononuclear cells // *Cryobiology.*– 1992.– Vol. 29, N2.– P.165-175.

Accepted in 22.02.2005

Поступила 22.02.2005