

УДК 615.361.018.46.014.41:611.018.83:577.322.23

А.М. Гольцев, Т.Г. Дубрава\*, О.Д. Луценко,  
Ю.О. Гаєвська, М.О. Бондарович, М.В. Останков

## Hsp70 як потенційний біомаркер толерогенізації дендритних клітин, отриманих із кріоконсервованих мононуклеарів кісткового мозку

UDC 615.361.018.46.014.41:611.018.83:577.322.23

A.M. Goltsev, T.G. Dubrava\*, O.D. Lutsenko,  
Yu.O. Gaevska, M.O. Bondarovich, M.V. Ostankov

## Hsp70 as a Potential Biomarker of Tolerization of Cryopreserved Mononuclear Cells-Derived Dendritic Cells

**Реферат:** У роботі досліджено вплив трьох режимів кріоконсервування мононуклеарних клітин (МНК) кісткового мозку мишей лінії СВА/Н під захистом 10%-го розчину диметилсульфоксиду з повільною швидкістю охолодження 1 град/хв: режим 1 — до  $-80^{\circ}\text{C}$ ; режим 2 — до  $-40^{\circ}\text{C}$ ; режим 3 — до  $-25^{\circ}\text{C}$  з наступним зануренням зразків у рідкий азот ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) на ступінь експресії білка теплового шоку з молекулярною масою 70 кДа (Hsp70) у МНК і отриманих з них *in vitro* дендритних клітинах (ДК). Толерогенний потенціал ДК було оцінено після їх використання в адаптивній терапії у мишей з ад'ювантним артритом за здатністю індукувати регуляторні Т-клітини (Treg) у селезінці та мінімізувати індекс артриту як клінічний показник розвитку патології. Доведена залежність рівня експресії Hsp70-білка у МНК від режиму заморожування, а також значущість вмісту цього білка у прояві толерогенного потенціалу ДК, що сформовані з них *in vitro*. Показано приваляючу здатність кріоконсервування за режимом 2 збільшувати вміст Hsp70 у МНК. Атестація функціонального потенціалу ДК, вирощених із кріоконсервованих за режимом 2 МНК, продемонструвала їх більш високу толерогенну активність порівняно з ДК, отриманими з нативних МНК або МНК, кріоконсервованих за режимами 1 і 3. Максимальний вміст Hsp70 у ДК при застосуванні режиму 2 узгоджувався з максимальною кількістю Treg, які формувалися у тварин з ад'ювантним артритом після їх введення, що супроводжувалося найбільш виразною нормалізацією клінічних ознак патології. Отримані результати демонструють здатність кріоконсервування регулювати рівень експресії Hsp70 і толерогенний потенціал ДК, що формуються з кріоконсервованих попередників, а також ефективність застосування ДК в адаптивній терапії аутоімунних захворювань.

**Ключові слова:** кріоконсервування, мононуклеари кісткового мозку, Hsp70, толерогенні дендритні клітини, регуляторні Т-клітини, ад'ювантний артрит.

**Abstract:** The work investigated the effect of three cryopreservation regimens of bone marrow mononuclear cells (MNCs) of CBA/H mice under the protection of a 10% dimethyl sulfoxide solution with a slow cooling rate of 1 deg / min: regimen 1 – to  $-80^{\circ}\text{C}$ ; regimen 2 – to  $-40^{\circ}\text{C}$ ; regimen 3 – to  $-25^{\circ}\text{C}$  with subsequent immersion of samples into liquid nitrogen ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) on the expression rate of heat shock protein with a molecular weight of 70 kDa (Hsp70) in MNCs and dendritic cells (DCs) obtained from them *in vitro*. The DCs tolerogenic potential was assessed after their use in adaptive therapy in mice with adjuvant arthritis by the ability to induce regulatory T cells (Treg) in spleen and minimize the arthritis index, as a clinical index of the pathology development. The dependence of expression rate of the Hsp70 protein in MNCs on the freezing mode was proven, as well as the significance of this protein content in the manifestation of tolerogenic potential of DCs formed from them *in vitro*. The ability of cryopreservation according to regimen 2 to increase the Hsp70 content in MNCs was shown. The functional potential of DCs grown from cryopreserved MNCs with regimen 2 demonstrated their higher tolerogenic activity compared to DCs derived from native MNCs and cryopreserved with the regimens 1 and 3 MNCs. The maximum content of Hsp70 in DCs when using regimen 2 was consistent with that of Treg formed in animals with adjuvant arthritis after the administration of these cells, as well as it was accompanied by the most pronounced normalization of clinical signs of pathology. The findings demonstrate the ability of cryopreservation to regulate the Hsp70 expression rate as well as tolerogenic potential of DCs formed from cryopreserved precursors, increasing their use effectiveness in adaptive therapy of autoimmune diseases.

**Key words:** cryopreservation, bone marrow mononuclear cells, Hsp70, tolerogenic dendritic cells, regulatory T cells, adjuvant arthritis.

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків, Україна

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

**\*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:**

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;  
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52  
електронна пошта: cryopato@gmail.com

**\*To whom correspondence should be addressed:**

23, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine 61016;  
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952  
e-mail: cryopato@gmail.com

Надійшла 29.07.2024  
Прийнята до друку 21.11.2024

Received July, 29, 2024  
Accepted November, 21, 2024

© Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, 2024  
© Publisher Publishing House 'Akadempriodyka' of the National Academy of Sciences of Ukraine, 2024

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

AA — ад'ювантний артрит  
ГМ-КСФ — гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор  
ДК — дендритні клітини  
ІА — індекс артриту  
ІЛ — інтерлейкін  
МНК — мононуклеарні клітини  
НатДК — нативні дендритні клітини, отримані з нативних мононуклеарів  
НатМНК — нативні мононуклеарні клітини  
КріодК — дендритні клітини, отримані з кріоконсервованих мононуклеарів  
КріоМНК — кріоконсервовані мононуклеарні клітини  
Режими 1, 2, 3 — R1, R2, R3  
СІФ — середня інтенсивність флюоресценції  
СПС — сумарний показник світлення  
ТолДК — толерогенні дендритні клітини  
ТПР — толл-подібні рецептори  
Трег — Т-регуляторні клітини  
HSP — білки теплового шоку  
Hsp70 — білок теплового шоку з молекулярною масою 70 кДа  
NF-κB — ядерний фактор-κB.

AA – adjuvant arthritis  
GM-CSF – granulocyte-macrophage colony-stimulating factor  
DC – dendritic cells  
AI – arthritis index  
IL – interleukin  
MNC – mononuclear cells  
NatDC – native dendritic cells derived from native mononuclears  
NatMNC – native mononuclear cells  
CryoDC – dendritic cells derived from cryopreserved mononuclears  
CryoMNC – cryopreserved mononuclear cells  
Regimens 1, 2, 3 – R1, R2, R3  
MFI – mean fluorescence intensity  
TLI – total light index  
ToIDC – tolerogenic dendritic cells  
TLR – toll-like receptors  
Treg – T-regulatory cells  
HSP – heat shock proteins  
Hsp70 – heat shock protein shock with a molecular weight of 70 kDa  
NF-κB – nuclear factor-κB.

На сьогодні клітинна терапія займає одне з провідних місць у лікуванні надширокого спектра патологій різного генезу [3, 4]. Такий попит у клінічній практиці цього біоматеріалу обумовив необхідність його кріоконсервування і довгострокового зберігання [3]. Відомо, що від умов кріоконсервування в різний спосіб змінюються як структурні, так і функціональні показники клітин, що може впливати на ефективність їх застосування в терапевтичних цілях [3]. Не є винятком і дендритні клітини (ДК) у цьому різноманітті клітинно-тканинного біоматеріалу [7, 20].

Існують дані, які свідчать про суттєві варіації кріочутливості як самих ДК, так і клітин-попередників, з яких їх отримують [25]. Наприклад, кріоконсервування мононуклеарних клітин (МНК) кісткового мозку супроводжується зміною рецепторного репертуару отриманих з них *in vitro* ДК, підтверджуючи можливість кріоконсервування виступати в ролі фактора, що індукує їх толерогенний потенціал [2]. Особлива увага в зміні функціонального стану ДК звертається на білки теплового шоку Hsp70 [6, 23].

Важливу роль у підтримці захисного запального процесу відіграють клітини вродженого імунітету, а саме: моноцити/макрофаги, ДК та гранулоцити. Ці клітини експресують на своїй поверхні толл-подібні рецептори (ТПР; ТПР2 та ТПР4), які виявляють асоційовані з патогенами різні мікробні компоненти, так звані патоген-асоційовані молекулярні патерни. Крім того, інші ТПР розпізнають молекули, що вивільняються власними клітинами в стані пошкодження або некрозу, які зазвичай називають молекулярними патернами, пов'язаними з пошкодженням.

Today, cell therapy occupies one of the leading places in treatment of an extremely wide range of pathologies of various geneses [1, 10]. Such demand in clinical practice for this biomaterial has led to the need for its cryopreservation and long-term storage [10]. Both structural and functional parameters of cells are known to change in different ways depending on the cryopreservation conditions, which may affect the effectiveness of their use for therapeutic purposes [10]. Dendritic cells (DCs) are no exception in this variety of cell-tissue biomaterial [4, 20].

There are the data indicating significant variations in cryosensitivity of both DCs themselves and the precursor cells which they are derived from [25]. For example, cryopreservation of bone marrow mononuclear cells (MNCs) is accompanied by a change in the receptor repertoire of DCs derived from them *in vitro*, confirming the possibility of cryopreservation as a factor inducing their tolerogenic potential [9]. Particular attention in changing the functional state of DCs is paid to the heat shock proteins Hsp70 [3, 23].

Innate immune cells, namely monocytes/macrophages, DCs and granulocytes, play an important role in maintaining the protective inflammatory process. These cells express on their surface toll-like receptors – TLRs (TLR2 and TLR4), which detect various microbial components associated with pathogens, the so-called pathogen-associated molecular patterns. In addition, other TLRs recognize molecules released by their own cells in a state of damage or necrosis, which are usually called damage-associated molecular patterns.

The usual triggering event for the development of the inflammation for TLRs is the activation of the nuclear factor NF-κB [15, 21]. It regulates

Зазвичай пусковою сигнальною подією розвитку запального процесу для ТПР є активація ядерного фактора NF-κB [15, 21]. Він регулює безліч компонент уроджених, а також адаптивних імунних функцій і проліферацію імункомпетентних клітин [15]. Важливо, що NF-κB грає ключову роль в індукції та підтримці запальних процесів аутоімунної природи, при яких його активність часто порушується. Білки Hsp70 здатні впливати на експресію NF-κB як головного месенджера запального процесу [22, 23]. Суттєво, що модуляція активації NF-κB залежить від рівня як внутрішньо-, так і позаклітинного Hsp70 [26]. Численні дані довели, що внутрішньоклітинний Hsp70 може пригнічувати активність NF-κB. Надмірна експресія Hsp70 блокує активацію NF-κB та ядерну транслокацію p50/p65 за допомогою інгібіції опосередкованого IκB-кіназним комплексом фосфорилювання інгібітора NF-κB [26].

Важливо, що протилежний ефект виникає, коли Hsp70 знаходиться в позаклітинному просторі. В цьому випадку змінюються ліганд-рецепторні взаємодії HSP, обумовлюючи їхні нові форми. Відомо, що позаклітинний Hsp70, який активно вивільняється при запальних станах, здатний взаємодіяти подібно пов'язаними з пошкодженням молекулярними патернами з ТПР2 та ТПР4, стимулюючи імунну відповідь у вигляді запалення [12].

Показано, що в культурах синовіоцитів, отриманих від пацієнтів з ревматоїдним артритом, позаклітинний Hsp70 інгібував сигнальний шлях NF-κB, що супроводжувалося пригніченням продукції інтерлейкінів (ІЛ)-6, ІЛ-8 [17]. Це узгоджується з результатами роботи E. Ferat-Osorio та співавт. [9], які показали інгібіцію позаклітинними Hsp70 продукції запальних цитокінів (фактора некрозу пухлини-альфа і ІЛ-6) моноцитами та ослаблення запальної реакції. Більш того, позаклітинна активність Hsp70 розповсюджується також на експансію CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> регуляторних Т-клітин (Трег), а саме посилює їх імуносупресивну функцію опосередковано через сигнальний шлях, що реалізується за участю ТПР2 [23]. Одним з можливих механізмів імуносупресорної дії позаклітинного Hsp70 є його взаємодія з ДК, мієлоїдними супресорними клітинами і моноцитами. Передбачається, що після ендцитозу Hsp70 антигенпрезентуючі клітини переформовують свій стан на толерогенний і, як наслідок, продукують базовий протизапальний цитокін ІЛ-10. Крім того, позаклітинний Hsp70 може інгібувати продукцію інтерферону-γ моноцитами [6], знижувати у ДК

numerous components of innate as well as adaptive immune functions and proliferation of immune competent cells [15]. Importantly, NF-κB plays a key role in the induction and maintenance of autoimmune inflammatory processes, in which its activity is often impaired. Hsp70 proteins are able to influence the expression of NF-κB as the main messenger of inflammation [22, 23]. Significantly, the modulation of NF-κB activation depends on the level of both intracellular and extracellular Hsp70 [26]. Numerous data have shown that intracellular Hsp70 can inhibit NF-κB activity. Overexpression of Hsp70 blocks NF-κB activation and nuclear translocation of p50/p65 by inhibiting the IκB kinase complex-mediated phosphorylation of the NF-κB inhibitor [26].

Importantly, the opposite effect occurs when Hsp70 is in the extracellular space. In this case, the ligand-receptor interactions of HSPs are altered, leading to their new forms. It is known that extracellular Hsp70, which is actively released during inflammation, is able to interact with similar damage-related molecular patterns with TLR2 and TLR4, stimulating the immune response as an inflammation [12].

It has been shown that in cultures of synovocytes obtained from the patients with rheumatoid arthritis, extracellular Hsp70 inhibited the NF-κB signaling pathway, which was accompanied by suppression of the production of interleukins (IL)-6, IL-8 [17]. This is consistent with the results of the research by E. Ferat-Osorio *et al.* [6], who showed that extracellular Hsp70 inhibited the production of inflammatory cytokines (tumor necrosis factor-alpha and IL-6) by monocytes and attenuated the inflammatory response. Moreover, the extracellular activity of Hsp70 also extends to the expansion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells (Treg), namely, it enhances their immune suppressive function indirectly through a signaling pathway involving TLR2 [23]. One of the possible mechanisms of the immune suppressive effect of extracellular Hsp70 is its interaction with DCs, myeloid suppressor cells and monocytes. It is assumed that after endocytosis of Hsp70, antigen-presenting cells reform their state to a tolerogenic one and, as a result, produce the basic anti-inflammatory cytokine IL-10. In addition, extracellular Hsp70 can inhibit the production of interferon-γ by monocytes [3], reduce the expression of CD86 and major histocompatibility complex class II molecules in DCs, which contributes to the inhibition of their synthesis of tumor necrosis factor-alpha.



експресію CD86 і молекул головного комплексу гістосумісності II класу, що сприяє пригніченню синтезу ними фактора некрозу пухлини-альфа.

Отримані результати дозволяють припустити, що Hsp70 може виконувати багатофункціональну роль у позаклітинному просторі. Це залежить не тільки від типу імунокомпетентних клітин, що взаємодіють з такими шаперонами, але і від їх стану на момент взаємодії з Hsp70, особливо в умовах розвитку різних захворювань. Збільшення вмісту внутрішньоклітинного Hsp70, що блокує активацію NF-κB як головного тригера запального процесу, обумовлює заборону диференціювання імунокомпетентних клітин, тобто сприяє їх толерогенізації, зокрема ДК, які використовують в імуносупресивній терапії аутоімунних захворювань [7, 11]. Як було доведено S. Tuckaj [23], механізм імуносупресивної дії Hsp70 реалізується опосередковано шляхом модуляції фенотипу і функції як попередників кісткового мозку, так і отриманих із них ДК, які набувають толерогенної активності. Перш за все, йдеться про здатність клітин з толерогенним потенціалом продукувати протизапальні цитокіни, як-от: IL-10 і трансформуючий фактор росту-β та індукувати формування Трег [23].

У надширокому спектрі стресіндукуючих факторів ультранизькі температури займають одне з провідних місць [11, 25]. Враховуючи, що ДК дуже вразливі до дії ультранизьких температур [20], на особливу увагу заслуговує стратегія кріоконсервування їх попередників — МНК кісткового мозку та їх довгострокове зберігання у низькотемпературному банку. В цьому випадку вкрай актуальним і прагматичним є відпрацювання методів кріоконсервування МНК з метою подальшого отримання з них *in vitro* толерогенних ДК (толДК) для лікування аутоімунних захворювань. Варіювання умовами кріоконсервування відкриває перспективи селективного відбору режимів заморожування з найбільшим ступенем активації експресії білків теплового шоку з відповідним функціональним потенціалом. Проте, механізм кріовпливу на МНК, що обумовлює формування з них незрілого фенотипу і толерогенної функції ДК, до кінця не з'ясований і вимагає подальшого експериментального дослідження.

Мета дослідження — вивчення впливу різних умов (режимів) кріоконсервування на вміст і ступінь експресії Hsp70-білка в мононуклеарних клітинах кісткового мозку тварин та отриманих із них *in vitro* дендритних клітинах,

The results obtained suggest that Hsp70 may perform a multifunctional role in the extracellular space. This depends not only on the type of immune competent cells interacting with such chaperones, but also on their state at the time of interaction with Hsp70, especially in the conditions of the development of various diseases. An increase in intracellular Hsp70, which blocks the activation of NF-κB, as the main trigger of the inflammation, causes the prohibition of differentiation of immune competent cells, i.e. promotes their tolerogenization, in particular DCs, which are used in immune suppressive therapy of autoimmune diseases [4, 8]. As S. Tuckaj [23] has proven the mechanism of immune suppression of Hsp70 is implemented indirectly by modulating the phenotype and function of both bone marrow precursors and DCs derived from them, which acquire tolerogenic activity. First of all, it is about the ability of cells with tolerogenic potential to produce anti-inflammatory cytokines such as IL-10 and transforming growth factor-β and induce Treg formation [23].

In the ultra-wide spectrum of stress-inducing factors, ultralow temperatures occupy one of the leading places [11, 25]. Considering that DCs are very vulnerable to the effects of ultralow temperatures [20], the strategy of cryopreservation of their precursors, *i. e.* bone marrow MNCs and their long-term storage at a low-temperature bank deserves special attention. In this case, it is extremely relevant and pragmatic to master the methods of cryopreservation of MNCs with the aim of further *in vitro* obtaining from them of tolerogenic DCs (tolDCs) for the treatment of autoimmune diseases. Variation in cryopreservation conditions opens up the prospects for selective selection of freezing regimens with the highest activation degree of heat shock protein expression with the corresponding functional potential. However, the mechanism of cryopreservation on MNCs, which causes the formation of an immature phenotype and tolDCs function, is not fully understood and requires further experimental studies.

The aim of this research was to study the influence of different cryopreservation conditions (regimens) on the content and expression rate of Hsp70 protein in mononuclear cells of the bone marrow of animals and dendritic cells obtained from them *in vitro*, with subsequent assessment of their tolerogenic potential in the adjuvant arthritis model.

## Materials and methods

The experiments were performed in CBA/H mice being 20 weeks old, weighing 24–26 g. The



з подальшою оцінкою їх толерогенного потенціалу в моделі ад'ювантного артрити.

### Матеріали і методи

Експерименти виконували на мишах лінії СВА/Н 20-тижневого віку масою 24–26 г. Тварин отримали з підприємства «Біомодельсервіс» (м. Київ) з наступним розведенням у стандартних умовах виварію Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (м. Харків). Усі маніпуляції з тваринами затверджені Комітетом з біоетики Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (Протокол № 5 від 26.11.2019) і відповідають основним положенням «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних і інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) та Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження».

Для отримання клітин кістковий мозок вивчали зі стегнових кісток мишей лінії СВА/Н середовищем RPMI-1640 (Biowest, Франція) з додаванням 3% ембріональної телячої сироватки (ETC) (Biowest) і 2% цитрату натрію (Sigma-Aldrich, США) (далі в тексті — робоче середовище). Суспензію клітин кісткового мозку пропускали через нейлоновий фільтр з діаметром пор 100 мкм (Falcon, США), центрифугували при 200g протягом 10 хв і ресуспендували отриманий осад у робочому середовищі.

Виділення МНК з кісткового мозку здійснювали центрифугуванням суспензії клітин у градієнті щільності (1,077 г/мл) препарату «Тразограф 76%» («Юнік Фармасьютикал Лабораторіз», Індія) [1].

Кріоконсервування МНК проводили за трьома режимами під захистом 10%-го розчину диметилсульфоксиду з повільною швидкістю охолодження 1 град/хв: режим 1 (P1) — охолодження до  $-80^{\circ}\text{C}$  (зразок КріоP1МНК); режим 2 (P2) — охолодження до  $-40^{\circ}\text{C}$  (зразок КріоP2МНК); режим 3 (P3) — охолодження до  $-25^{\circ}\text{C}$  (зразок КріоP3МНК) з наступним зануренням зразків у кожному випадку у рідкий азот ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) згідно з даними Н. Kysielova і співавт. [13].

Толерогенні ДК були отримані з нативних МНК (НатДК — контроль) або кріоконсервованих за різними режимами: P1 — КріоP1ДК, P2 — КріоP2ДК, P3 — КріоP3ДК.

Для отримання ДК кожний з видів МНК у концентрації  $3-5 \times 10^6$  кл/мл поміщали в пластикові чашки Петрі діаметром 3 см у середовищі «RPMI-1640» (Biowest) з додаванням 10% ETC (Biowest), 1%-го розчину антибіотиків (100 од./мл пеніциліну, 0,1 мг/мл стрептоміцину). Клітини

were obtained from the Biomodelservice enterprise (Kyiv, Ukraine) with subsequent breeding in standard conditions of the animals' house of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine (Kharkiv). All manipulations with animals were approved by the Bioethics Committee of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine (Protocol No. 5 dated of November 26th, 2019) and comply with the main provisions of the 'European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes' (Strasbourg, 1986) and the Law of Ukraine 'On the Protection of Animals Against Cruelty'.

To obtain cells, bone marrow was washed from the CBA/H mice femurs with RPMI-1640 (Biowest, France) supplemented with 3% fetal calf serum (FCS) (Biowest, France) and 2% sodium citrate (Sigma-Aldrich, USA) (hereinafter referred to as handling medium). The bone marrow cell suspension was passed through a nylon filter with a pore diameter of 100  $\mu\text{m}$  (Falcon, USA), centrifuged at 200g for 10 min, and the resulting precipitate was re-suspended in handling medium.

Bone marrow MNCs were isolated by centrifugation of the cell suspension in a density gradient (1.077 g/ml) of the drug 'Trazograf 76%' (Unique Pharmaceutical Laboratories, India) [8].

Cryopreservation of MNCs was carried out with three regimens under the protection of a 10% dimethyl sulfoxide solution with a slow cooling rate of 1 degree/min: regimen 1 (R1) – cooling to  $-80^{\circ}\text{C}$  (sample CryoR1MNC); regimen 2 (R2) – cooling to  $-40^{\circ}\text{C}$  (sample CryoR2MNC); regimen 3 (R3) – cooling to  $-25^{\circ}\text{C}$  (sample CryoR3MNC) in each case with subsequent immersion of the samples into liquid nitrogen ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) according to Kysielova H *et al.* [13].

Tolerogenic DCs were obtained from native MNCs (NatDC – control), or cryopreserved in different modes: R1 – CryoR1DC, R2 – CryoR2DC, R3 – CryoR3DC.

To obtain DCs, each type of MNC at a concentration of  $3-5 \times 10^6$  cells/ml was placed in plastic Petri dishes with a diameter of 3 cm in 'RPMI-1640' medium (Biowest) with the addition of 10% ETC (Biowest), 1% antibiotic solution (100 units/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin). The cells were cultured at  $37^{\circ}\text{C}$  in 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere. After 2 hrs' cultivation, the medium with unattached cells was removed. On days 0 and 3 of cultivation, fresh RPMI-1640 medium with 10% ETC and DC inducers were added: murine recombinant granulocyte



культивували при 37°C у атмосфері 5%-го CO<sub>2</sub>. Через 2 години культивування середовище з не-прикріпленими клітинами видаляли. На нульову та 3-ю доби культивування додавали свіже середовище «RPMI-1640» з 10% ЕТС та індукторами ДК: мишачими рекомбінантними гранулоцитарним колонієстимулюючим фактором (20 нг/мл) (Sigma-Aldrich, Велика Британія) та ІЛ-4 (5 нг/мл) (Sigma-Aldrich) і дексаметазоном (0,4 мкг/мл) (Sigma-Aldrich) [14]. На всіх етапах культивування ріст клітин контролювали за допомогою інвертованого мікроскопа «Axiovert 40C» (Zeiss, Німеччина) із здійсненням фотодокументації за допомогою світлового мікроскопа «Axio Observer Z1» (Zeiss).

На 7-у добу культивування неадгезивні та слабоадгезивні клітини видаляли з середовища і центрифугували при 200g протягом 10 хв. Після підрахування кількості клітин отриманий ресуспендований у робочому середовищі осад використовували як терапевтичний матеріал для лікування тварин з ад'ювантним артритом (АА).

Приналежність ДК до толерогенних була доведена експресією характерних фенотипових маркерів на протоковому цитофлуориметрі «FACS Calibur» (Becton Dickinson, США) з використанням моноклональних антимишачих антитіл: CD11b (FITC), CD14 (FITC), CD83 (PE), CD80 (FITC) і CD86 (FITC) (BD Biosciences, США) [13] та відповідних ізотипових контролів.

Кількість Hsp70<sup>+</sup>-клітин, вміст Hsp70-білка визначали на протоковому цитофлуориметрі «FACS Calibur» (Becton Dickinson) за допомогою FITC-мічених моноклональних антимишачих антитіл Hsp70 (Abcam, Велика Британія) у МНК відразу після їх заморожування-відтавання та ДК (CD11b<sup>+</sup>), що були генеровані з них *in vitro*.

В якості додаткового показника оцінки вмісту Hsp70-білка в клітинах був використаний показник середньої інтенсивності флуоресценції (СІФ), що свідчить про щільність експресії цього маркера на клітині. Крім того, оцінювали сумарний показник світлення (СПС), що є інтегральним показником експресії Hsp70-білка. Він розраховувався як кількість клітин, що експресують маркер, помножену на СІФ.

Ад'ювантний артрит індуквали у мишей лінії СВА/Н субплантарним введенням повного ад'юванта Фрейнда (Santa Cruz, США) у дозі 0,1 мл на мишу [1]. Розвиток та тяжкість перебігу АА у тварин оцінювали за допомогою індексу артриту (ІА), який є відношенням довжини окружності дослідного суглоба до окружності контрольного — контрлатерального. У інтактних тварин ІА було прийнято за одиницю.

colony-stimulating factor (20 ng/ml) (Sigma-Aldrich, UK) and IL-4 (5 ng/ml) (Sigma-Aldrich) and dexamethasone (0.4 µg/ml) (Sigma-Aldrich) [14]. At all stages of cultivation, cell growth was monitored using an inverted microscope 'Axiovert 40C' (Zeiss, Germany) with photodocumentation using a light microscope 'Axio Observer Z1' (Zeiss).

On day 7 of cultivation, non-adherent and slightly adherent cells were removed from the medium and centrifuged at 200g for 10 min. After counting the number of cells, the obtained sediment resuspended in the handling medium was used as a therapeutic material for the treatment of animals with adjuvant arthritis (AA).

The belonging of DC to tolerogenic was proven by the expression of characteristic phenotypic markers with a flow cytometer 'FACS Calibur' (Becton Dickinson, USA) using monoclonal anti-mouse antibodies: CD11b (FITC), CD14 (FITC), CD83 (PE), CD80 (FITC) and CD86 (FITC) (BD Biosciences, USA) [13] and appropriate isotype controls.

The number of Hsp70<sup>+</sup> cells and the content of Hsp70 protein were determined with a flow cytometer 'FACS Calibur' (Becton Dickinson) using FITC-labeled monoclonal anti-mouse Hsp70 antibodies (Abcam, Great Britain) in MNCs immediately after their freezing-thawing and DCs (CD11b<sup>+</sup>) generated from them *in vitro*.

As an additional index for assessing the content of Hsp70 protein in cells, the mean fluorescence intensity (MFI) was used, demonstrating the density of expression of this marker on the cell. In addition, the total light index (TLI), which is an integral index of Hsp70 protein expression, was evaluated. It was calculated as the number of cells expressing the marker multiplied by the MFI.

Adjuvant arthritis was induced in CBA/H mice by subplantar administration of Freund's complete adjuvant (Santa Cruz, USA) at a dose of 0.1 ml per mouse [8]. The development and severity of AA in animals were assessed using the arthritis index (AI), which is the ratio of the circumference of the test joint to the one of the control – contralateral. In intact animals, the AI was taken as a unit.

DCs grown *in vitro* from native or cryopreserved bone marrow MNCs under various regimens were injected intravenously at a dose of  $5 \times 10^5$  cells/mouse [13] in 0.2 ml handling medium on day 14 of AA development. Data obtained in animals injected with the drug 'Dexamethasone' (KRKA, Slovenia) at the rate of 0.022 mg/mouse in 0.2 ml saline (Yuria-Pharm, Ukraine) [9, 18] were used



Вирощені *in vitro* з нативних або кріоконсервованих за різними режимами МНК кісткового мозку ДК вводили внутрішньовенно у дозі  $5 \times 10^5$  кл/мишу [13] в 0,2 мл робочого середовища на 14-ту добу розвитку АА. В якості контролю використовували дані, отримані на тваринах, яким вводили препарат «Дексаметазон» (KRKA, Словенія) з розрахунку 0,022 мг/мишу в 0,2 мл фізіологічного розчину («Юрія-Фарм», Україна) [2, 18]. Толерогенну функцію ДК оцінювали через 7 діб після їх введення за показником ІА і кількістю Трег у селезінці тварин з АА.

Вміст Трег ( $CD4^+CD25^+$ ,  $FOXP3^+$ ) у селезінці тварин з АА оцінювали на протоковому цитофлуориметрі «FACS Calibur» (Becton Dickinson) за допомогою моноклональних антимишачих антитіл: CD4 (FITC), CD25 (PE), FOXP3 (PE) (BD Biosciences) згідно з інструкцією виробника. Ізотип-відповідні антитіла (BD Biosciences та Abcam) були використані як негативний контроль. Статистичний облік даних, отриманих при цитофлуориметричному аналізі, здійснювали за допомогою програми «WinMDi 2.8.» (Joseph Trotter, Scripps Institute, La Jolla, США).

Статистичну обробку даних проводили з використанням пакета програм Statistica 10.0 (StatSoft, Inc., США), а результати представлені як медіани з нижнім і верхнім квантилями (Me [LQ; UQ]). При множинних порівняннях незалежних вибірок використовували ранговий аналіз варіацій за Краскалом-Уоллісом. Відмінності вважалися значущими при  $p < 0,05$ . У разі отримання значущої різниці проводили попарне порівняння груп (у кожній групі  $n = 5$ ) з використанням тесту Манна-Уїтні з поправкою Бонферроні.

### Результати та обговорення

У табл. 1 представлені дані, що свідчать про суттєві зміни оцінених структурно-функціональних показників МНК після кріоконсервування за різних умов порівняно з НатМНК. Перш за все встановлено значні відмінності використання режимів кріоконсервування під час збереження абсолютної кількості МНК кісткового мозку з найбільшим значенням цього показника при Р2 (89,2%) і найменшим при Р3 (66,7%). Крім того, показано збільшення в різному ступені концентрації  $Hsp70^+$ -клітин серед КріоМНК за трьома режимами порівняно з НатМНК. При Р1, Р2 і Р3 на тлі зниження загального вмісту МНК на 15,1, 10,8 і 33,3% відповідно кількість  $Hsp70^+$ -клітин серед них збільшувалася в 1,8, 2,6 і 3,6 рази відповідно порівняно з НатМНК.

Показник СІФ  $Hsp70^+$ -МНК, навпаки, знижувався від Р1 до Р3. При цьому ступінь знижен-

as a control. The tolerogenic function of DCs was assessed 7 days after their injection by the AI and the number of Treg in spleen of animals with AA.

The content of Treg ( $CD4^+CD25^+$ ,  $FOXP3^+$ ) in spleen of animals with AA was assessed with a flow cytometer 'FACS Calibur' (Becton Dickinson) using monoclonal anti-mouse antibodies: CD4 (FITC), CD25 (PE), FOXP3 (PE) (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions. Isotype-matched antibodies (BD Biosciences and Abcam) were used as negative controls. The data obtained during cytofluorimetric analysis were statistically analyzed using 'WinMDi 2.8.' (Joseph Trotter, Scripps Institute, La Jolla, USA).

Statistical data processing was performed using the Statistica 10.0 software (StatSoft, Inc., USA), and the results are presented as medians with lower and upper quartiles (Me [LQ; UQ]). For multiple comparisons of independent samples, Kruskal-Wallis rank analysis of variance was applied. Differences were considered significant at  $p < 0.05$ . In the case of a significant difference, pairwise comparisons of groups ( $n = 5$  in each group) were performed using the Mann-Whitney test with Bonferroni correction.

### Results and Discussion

Table 1 presents the data indicating significant changes in the estimated structure and functions of MNCs after cryopreservation under different conditions compared to NatMNCs. First of all, significant differences in the use of cryopreservation regimens were found when preserving the absolute number of bone marrow MNCs, with the highest value of this index at R2 (89.2%) and the lowest at R3 (66.7%). In addition, an increased concentration of  $Hsp70^+$  cells among Cryo MNCs under three regimens compared to NatMNCs was shown to varying degrees. At R1, R2 and R3, against the background of a decreased total content of MNCs by 15.1, 10.8 and 33.3%, respectively, the number of  $Hsp70^+$  cells among them increased by 1.8, 2.6 and 3.6 times, respectively, compared to NatMNCs.

The MFI of  $Hsp70^+$ -MNCs, on the contrary, decreased from R1 to R3. At the same time, the degree of decrease in the MFI of cells was not proportional to the degree of increase in the content of  $Hsp70^+$ -MNC. As a result, the maximum TLI was determined after cryopreservation of MNCs at P2 (725.0 conditional units). This fact may be a predictor of the fact that R2 is able to activate the production of to IDCs *in vitro* with CryoP2MNCs to the highest extent compared to R1 and R3.



**Таблиця 1.** Показники, що характеризують стан МНК, кріоконсервованих за різними режимами ( $n = 5$ )

**Table 1.** Indices characterizing the state of MNCs cryopreserved under different regimens ( $n = 5$ )

МНК, кріоконсервовані за різними режимами MNCs cryopreserved under different regimens	Вміст Hsp70 <sup>+</sup> -клітин, % Hsp70 <sup>+</sup> cell content, %	СІФ, умов.од. MFI, arb.unit	СПС, умов.од. TLI, arb.unit	Вміст МНК, % Content of MNCs, %	Абсолютна кількість $\times 10^6$ клітин Absolute cell number $\times 10^6$
НатМНК (контроль) NatMNCs (control)	2,0 [1,9; 2,1]#	166,3 [165,6; 179,6]#	332,6 [314,6; 334,3]#	100,0	9,3 [8,1; 11,4]#
КріоР1МНК CryoR1MNCs	3,6 [3,4; 3,7] *#	151,7 [145,4; 153,2]#	537,9 [520,9; 546,1]*#	84,9*#	7,9 [6,4; 8,2]*
КріоР2МНК CryoR2MNCs	5,3 [4,5; 5,4] *	136,8 [131,9; 147,4] *	725,0 [663,3; 765,0]*	89,2*	8,3 [7,6; 9,6] *
КріоР3МНК CryoR3MNCs	7,1 [6,7; 7,4]*#	61,2 [59,6; 65,7]*#	440,2 [434,5; 488,7]*#	66,7*#	6,2 [5,9; 6,7]*#

**Примітки:** \* — показники значущі відносно контролю (НатМНК); # — показники значущі відносно КріоР2МНК ( $p < 0,01$ ).

**Notes:** \*- indices are significant relative to the control (NatMNCs); # – indices are significant relative to CryoR2MNCs ( $p < 0.01$ ).

ня показника СІФ клітин був не пропорційний ступеню зростання вмісту Hsp70<sup>+</sup>-МНК. Максимальний СПС визначався після кріоконсервування МНК за Р2 (725,0 умов. од.). Цей факт може бути предиктором того, що Р2 здатен активувати продукцію толДК *in vitro* з КріоР2МНК у найбільшій мірі порівняно з Р1 і Р3.

Дійсно, вміст Hsp70<sup>+</sup>-клітин серед ДК, отриманих з КріоР2МНК, порівняно з НатДК, перевищувала цей показник у 1,8 раза (5,1 і 2,8% відповідно) (табл. 2). Абсолютна кількість КріоР2ДК ( $6,7 \times 10^6$  кл) також перевищувала показник НатДК ( $5,6 \times 10^6$  кл), тоді як абсолютна кількість КріоР1ДК ( $5,1 \times 10^6$  кл) не відрізнялась від контролю, а КріоР3ДК — була нижче майже у 3 рази ( $1,9 \times 10^6$  кл).

Після культивування *in vitro* нативних і кріоконсервованих за різними режимами МНК, СІФ, отриманих з них Hsp70<sup>+</sup>-клітин як серед НатДК, так і КріоДК була в 10 разів більше (табл. 2), ніж Hsp70<sup>+</sup>-МНК (див. табл. 1). Це можна пояснити тим, що експресія білків теплового шоку, зокрема Hsp70, може підвищуватися не тільки під впливом кріоконсервування, але і під дією ростових факторів та інтерлейкінів [24],

Indeed, the content of Hsp70<sup>+</sup> cells among DCs obtained from CryoR2MNC compared to NatDCs exceeded this index by 1.8 times (5.1 and 2.8%, respectively) (Table 2). The absolute number of CryoR2DCs ( $6.7 \times 10^6$  cells) also exceeded that of NatDCs ( $5.6 \times 10^6$  cells), while the absolute number of CryoR1DCs ( $5.1 \times 10^6$  cells) did not differ from the control, and CryoR3DCs was lower by almost 3 times ( $1.9 \times 10^6$  cells).

After *in vitro* cultivation of native and cryopreserved MNCs, MFI under different regimens, the number of Hsp70<sup>+</sup> cells obtained from them among both NatDCs and CryoDCs was 10 times higher (Table 2) than Hsp70<sup>+</sup> MNCs (see Table 1). This can be explained by the fact that the expression of heat shock proteins, in particular Hsp70, can increase not only under the influence of cryopreservation, but also under the influence of growth factors and interleukins [24], which were present in the culture medium for DCs induction. The total light index of Hsp70<sup>+</sup> CryoR2DCs exceeded that of NatDCs, CryoR1DCs and even more so CryoR3DCs by 1.5, 1.3 and 3.6 times, respectively. In general, this indicates that Hsp70<sup>+</sup>CryoR2DCs acquire structural and functional characteristics with the highest tolerogenic potential.





**Таблиця 2.** Показники, що характеризують стан ДК, отриманих *in vitro* з криоконсервованих за різними режимами МНК ( $n = 5$ )

**Table 2.** Indices characterizing the state of DCs obtained *in vitro* from cryopreserved MNCs using different regimens ( $n = 5$ )

МНК, криоконсервовані за різними режимами DCs obtained from MNCs cryopreserved under different regimens	Вміст Hsp70 <sup>+</sup> -клітин, % Hsp70 <sup>+</sup> cell content, %	СІФ, умов.од. MFI, arb.unit	СПС, умов.од. TLI, arb.unit	Вміст МНК, % Content of DCs, %	Абсолютна кількість × 10 <sup>6</sup> клітин Absolute number of DCs × 10 <sup>6</sup> cells
НатМНК (контроль) NatDCs (control)	2,8 [2,5; 3,1]#	1893,4 [1886,2; 1914,7]#	5271,8 [4808,8 ; 5935,6]#	100	5,6 [5,4; 5,7] #
КріоР1МНК CryoR1DCs	3,9 [3,8; 4,2]* #	1473,7 [1463,5; 1493,6] **	5825,0 [5561,3; 6107,6]**	51,0*#	5,1 [4,8; 5,3]#
КріоР2МНК CryoR2DCs	5,1 [4,9; 5,2] *	1516,7 [1507,3; 1534,8]*	7758,9 [7385,8; 7890,7]*	67,0*	6,7 6,5; 6,8*
КріоР3МНК CryoR3DCs	2,1 [2,0; 2,2]*#	1024,5 [1013,5; 1035,4]**	2151,5 [2112,8; 2229,7]**	19,0*#	1,9 [1,8; 2,4]**

**Примітки:** \* — показники значущі відносно контролю (НатДК); # — показники значущі відносно КріоР2ДК ( $p < 0,01$ ).

**Notes:** \* – indices are significant relative to the control (NatDCs); # – indices are significant relative to CryoR2DCs ( $p < 0.01$ ).

які були присутні в культуральному середовищі для індукції ДК. Сумарний показник світлення Hsp70<sup>+</sup> КріоР2ДК перевищував такий показник НатДК, КріоР1ДК і тим більше КріоР3ДК у 1,5, 1,3 і 3,6 разів відповідно. Вцілому це свідчить про набування Hsp70<sup>+</sup>КріоР2ДК структурних і функціональних характеристик з найбільшим толерогенним потенціалом.

Відомо, що одним з критеріїв толерогенної здатності ДК є формування під їх впливом Трег (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>) [23], вміст і функція яких знижена при аутоімунних захворюваннях. Субпопуляція Трег утворюється з наївних CD4<sup>+</sup>-Т-клітин під час розвитку імунної відповіді, спрямованої на зупинку запальної реакції. У процесі запалення продукується ІЛ-2, який є ключовим цитокіном, що викликає експресію CD25-маркера ( $\alpha$ -ланцюг рецептора ІЛ-2, ІЛ-2R $\alpha$ ) на CD4<sup>+</sup>-клітинах [5], а FOXP3 є найбільш специфічним внутрішньоклітинним маркером Трег, який обумовлює їх супресорну функцію [16, 19].

Наступним етапом дослідження була оцінка толерогенного потенціалу ДК, які були отримані з криоконсервованих за різними режимами МНК, і мали різний вміст Hsp70-білка. Базовим критерієм толерогенного потенціалу ДК була їх здатність формувати Трег (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> і FOXP3<sup>+</sup>) у селезінці мишей з АА (рис. 1). Встановлено, що показники вмісту обох субпо-

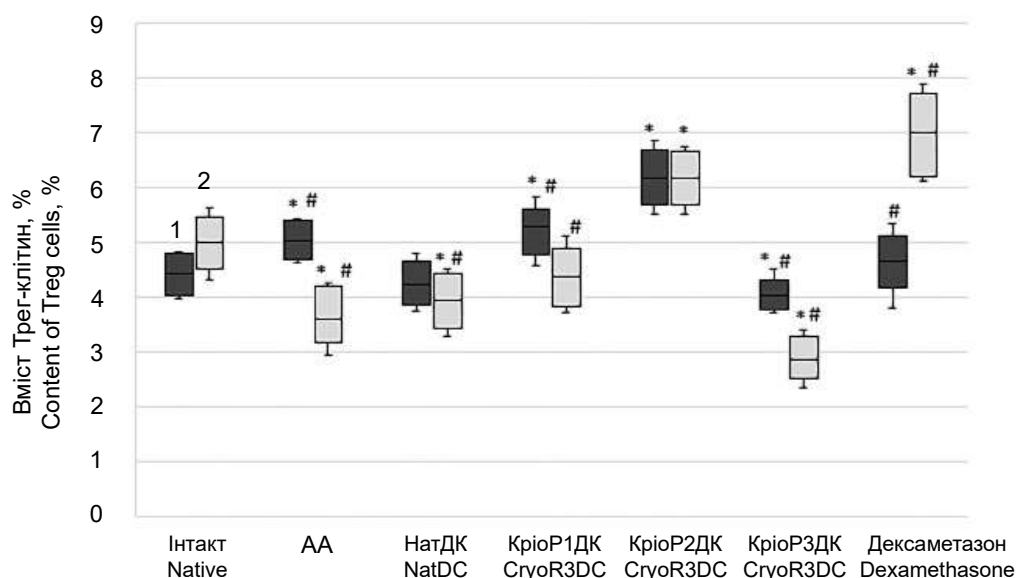
One of the criteria for the tolerogenic ability of DCs is known to be the formation of Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>) under their influence [23], the content and function of which are reduced in autoimmune diseases. Treg subpopulation is formed from naive CD4<sup>+</sup> T cells during the development of an immune response aimed at stopping the inflammatory reaction. During inflammation, IL-2 is produced, which is a key cytokine that induces the expression of the CD25 marker (IL-2 receptor  $\alpha$  chain, IL-2R $\alpha$ ) on CD4<sup>+</sup> cells [2], and FOXP3 is the most specific intracellular Treg marker that determines their suppressor function [16, 19].

The next stage of the study was to assess the tolerogenic potential of DCs obtained from cryopreserved MNCs using different modes and with different Hsp70 protein content. The basic criterion for the tolerogenic potential of DCs was their ability to form Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and FOXP3<sup>+</sup>) in the spleen of mice with AA (Fig. 1). It was found that the content of both subpopulations of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and FOXP3<sup>+</sup> cells did not have significant differences in intact animals ( $4.43 \pm 0.33\%$ ;  $4.99 \pm 0.37\%$ , respectively). Our data are consistent with the data of J. Fontenot *et al.* [7] regarding the concentration of these cells in intact animals. The balanced state of Treg, when all CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells expressed the FOXP3 marker in intact animals, changed significantly under the conditions of AA development (Fig. 1). That is, there is an obvious



пуляцій CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>- і FOXP3<sup>+</sup>-клітин не мали значущих відмінностей у інтактних тварин (4,43 ± 0,33%; 4,99 ± 0,37% відповідно). Наші дані узгоджуються з даними J. Fontenot і співавт. [10] щодо концентрації цих клітин у інтактних тварин, коли їх кількість збігається. Збалансований стан Трег, коли усі CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-клітини експресували FOXP3-маркер у інтактних тварин, суттєво змінювався в умовах розвитку АА (рис. 1). Тобто, очевидно розбалансування «гармонізованого» співвідношення CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>- і клітин, що були FOXP3-позитивними під час розвитку патології. Дійсно, розвиток АА супроводжувався більш потужною проліферацією CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-клітин на тлі зниження рівня (у 1,4 рази) FOXP3-білка порівняно з інтактним контролем, що обумовлює зниження їхньої функціональної активності (рис. 1) [10].

Введення ДК, що отримані з НатМНК, мишам із АА у певній мірі, хоча і не досягало рівня показників CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> і FOXP3<sup>+</sup>-клітин інтактного контролю, але «гармонізувало» їх співвідношення. У той же час ДК, отримані з кріоконсервованих за різними режимами МНК, викликали різну зміну оцінених субпопуляцій Трег не тільки порівняно з НатДК, але і між собою (рис. 1). Так, КріоР1ДК і КріоР2ДК з більшим вмістом і рівнем експресії Hsp70, порівняно з НатДК, приводили до збільшення як CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-, так і FOXP3<sup>+</sup>-клітин. Важливо, що під час введення КріоР2ДК зростання відсотка CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>- і FOXP3<sup>+</sup>-клітин абсолютно співпадало. Цей факт свідчить про те, що після таких умов кріоконсервування (за Р2) усі сформовані CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-клітини були FOXP3-позитивними з притаманною їм супресорною функцією [16]. Суттєво, що ДК, отримані з КріоР2МНК, мали найбільший відсоток Hsp70<sup>+</sup>-клітин (5,1 ± 0,1%) і СПС (7758,9 ± 131,8 умов. од.) порівняно як з НатДК, так і КріоР1ДК і КріоР3ДК (табл. 2).



**Рис. 1.** Вміст Трег-клітин (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (1) і FOXP3<sup>+</sup> (2) в селезінці тварин з АА після введення НатДК, КріоР1ДК, КріоР2ДК, КріоР3ДК (n = 5). Введення НатДК, КріоДК та дексаметазону у якості контролю, на 14-у добу розвитку АА, атестація на 21-у добу; показники значущі відносно Інтакт (\*) та КріоР2ДК (#); p < 0,01.

**Fig. 1.** Content of Treg cells (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (1) and FOXP3<sup>+</sup> (2) in the spleen of animals with AA after administration of NatDC, CryoR1DC, CryoR2DC, CryoR3DC (n = 5). Administration of NatDC, CryoDC and dexamethasone as a control, on the 14<sup>th</sup> day of AA development, certification on the 21<sup>st</sup> day; indices are significant relative to Intact (\*) and CryoR2DC (#); p < 0.01.

imbalance of the ‘harmonized’ ratio of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and cells that were FOXP3-positive during the development of pathology. Indeed, the AA development was accompanied by a more powerful proliferation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells against the background of a decrease (by 1.4 times) in the level of FOXP3 protein compared to the intact control, which causes a decrease in their functional activity (Fig. 1) [7].

The introduction of DCs derived from NatMNCs to mice with AA to a certain extent, although it did not reach the level of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and FOXP3<sup>+</sup>-cells of intact control, ‘harmonized’ their ratio. At the same time, DCs derived from cryopreserved MNCs according to various regimens caused different changes in the assessed Treg subpopulations not only in comparison with NatDCs, but also among themselves (Fig. 1). Thus, CryoR1- and CryoR2DCs with a higher content and rate of Hsp70 expression, compared with NatDCs, led to an increase in both CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>- and FOXP3<sup>+</sup>-cells. It is important that during the introduction of CryoR2DCs, the increase in the percentage of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>- and FOXP3<sup>+</sup>-cells was absolutely identical. This fact indicates that after such cryopreservation conditions (at R2), all generated CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells were FOXP3-positive with their inherent suppressor function [16].

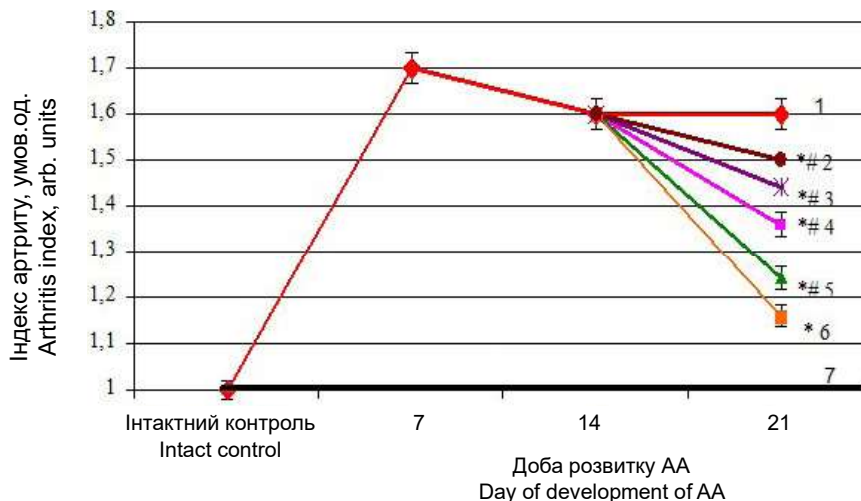
Введення тваринам з АА КріоРЗДК з низьким вмістом Hsp70<sup>+</sup>-клітин і рівнем експресії Hsp70-білка не призвело до стимулювання Трег.

Застосування для лікування АА дексаметазону як одного з представників базової глюкокортикоїдної терапії подібних захворювань у клінічній практиці в незначній мірі змінювало порівняно з АА концентрацію CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-клітин на тлі суттєвого зростання у порівнянні з інтактним контролем відсотка FOXP3<sup>+</sup>-клітин. Тобто, дексаметазон істотно не коригував порушення згаданої вище «гармонізації» співвідношення обох субпопуляцій імункомпетентних клітин, що забезпечують їх статус-кво в імунній системі здорового організму ссавців [10]. Схоже, що зростання вмісту FOXP3<sup>+</sup>-клітин при тих чи тих дисбалансах імунної системи ще не свідчить про їх здатність реалізувати супресивний ефект. Наприклад, є повідомлення про те, що FOXP3-білок можуть експресувати і ефекторні Т-клітини після активації [8]. Наведені приклади корелюють з результатами наших досліджень про те, що після введення дексаметазону тваринам з АА, коли вміст клітин, що експресують FOXP3-білок у 1,5 раза, перевищував вміст CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Трег.

Результати оцінки клінічного статусу тварин за ІА є підтвердженням толерогенного ефекту застосування КріоР1ДК і КріоР2ДК з підвищеним вмістом Hsp70<sup>+</sup>-клітин і ступенем експресії Hsp70-білка в них (рис. 2). При введенні КріоР1ДК і КріоР2ДК індекс артриту становив 1,24 і 1,16 відповідно, на відміну від цього показника у тварин з АА без лікування (1,6).

Введення КріоР1ДК і КріоР2ДК переважали НатДК за здатністю мінімізувати ІА. Найбільшою мірою ІА знижувався і наближався до показника інтактних здорових тварин після введення КріоР2ДК (1,0 і 1,16 відповідно; рис. 2). При цьому інтегральний показник СПС Hsp70<sup>+</sup>КріоР2ДК був найбільшим.

Отримані результати можуть бути корисні для застосування ДК з підвищеним толерогенним потенціалом у терапії аутоімунних захворювань.



**Рис. 2.** Індекс артриту у мишей з АА до та після введення толДК, отриманих з КріоМНК ( $n = 5$ ); у здорових тварин ІА було прийнято за 1,0; введення НатДК, КріоДК та дексаметазону на 14-у добу розвитку АА, атестація на 21-у добу; показники значущі відносно АА (\*) та КріоР2ДК (#); 1 — АА; 2 — Дексаметазон; 3 — КріоР3ДК; 4 — НатДК; 5 — КріоР1ДК; 6 — КріоР2ДК; 7 — Інтактний контроль;  $p < 0,01$ .

**Fig. 2.** Arthritis index in mice with AA before and after administration of tolDCs obtained from CryoMNCs ( $n = 5$ ); in healthy animals, IA was assumed as 1.0; administration of NatDCs, CryoDCs and dexamethasone on day 14 of AA development, certification on the 21st day; indicators are significant relative to AA (\*) and CryoR2DCs (#); 1 — AA; 2 — Dexamethasone; 3 — CryoR3DCs; 4 — NatDCs; 5 — CryoR1DCs; 6 — CryoR2DCs; 7 — Intact control;  $p < 0.01$ .

Significantly, DCs derived from CryoR2 MNCs had the highest percentage of Hsp70<sup>+</sup> cells ( $5.1 \pm 0.1\%$ ) and ATP ( $7758.9 \pm 131.8$  conditional units) compared to both NatDCs and CryoR1- and CryoP3DCs (Table 2).

Administration of CryoR3DCs with a low content of Hsp70<sup>+</sup> cells and a low expression rate of Hsp70 protein to animals with AA did not lead to Treg stimulation.

The use of dexamethasone for the treatment of AA as one of the representatives of the basic glucocorticoid therapy for similar diseases in clinical practice, to a small extent changed the concentration of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells compared to AA with strong rise in the percentage of FOXP3<sup>+</sup> cells compared to the intact control. That is, dexamethasone did not significantly correct the disorder of the above-mentioned 'harmonization' of the ratio of both subpopulations of immune competent cells, which ensure their status quo in the immune system of a healthy mammalian organism [7]. It seems that the increase in the content of FOXP3<sup>+</sup> cells with certain imbalances of the immune system does not yet indicate their ability to implement a suppressive effect. For example, there are reports that FOXP3 protein can also be expressed by effector T cells



## Висновки

Таким чином, доведена здатність кріоконсервування підвищувати рівень експресії Hsp70-білка в МНК кісткового мозку, що обумовлює формування з них *in vitro* ДК з незрілим фенотипом і толерогенними властивостями.

Показано, що толерогенний потенціал ДК можна змінювати умовами кріоконсервування МНК, з яких їх отримують. Визначено режим кріоконсервування (P2), який забезпечує максимальне збільшення Hsp70<sup>+</sup>МНК і сформованих з них *in vitro* Hsp70<sup>+</sup>ДК з толерогенною активністю.

Отримані *in vitro* ДК з кріоконсервованих за P2 мононуклеарних клітин кісткового мозку з підвищеним вмістом Hsp70 продемонстрували збільшення кількості Трег у тварин з АА і нормалізації їх клінічного статусу.

## Література

1. Гольцев АМ, Дубрава ТГ, Ямпольська КЄ, та ін. Оптимізація методу одержання незрілих дендритних клітин для терапевтичного застосування. *Фізіол журн.* 2018; 64 (6): 32–9.
2. Гольцев АМ, Дубрава ТГ, Ямпольська КЄ, та ін. Обґрунтування адоптивного застосування толерогенних дендритних клітин в терапії ревматоїдного артриту у мишей. *Клітинна та органна трансплантологія.* 2019; 7(2): 125–31.
3. Гольцев АН, Останкова ЛВ, Дубрава ТГ, и др. Криоконсервирование как фактор модификации структурно-функционального состояния и механизма реализации лечебного эффекта клеток стволового компартмента в условиях развития патологий аутоиммунного генеза. В: Гольцев АН, редактор. *Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины.* Харьков: ИПКиК НАНУ; 2012. с. 501–612.
4. Abbasi M, Mousavi MJ, Jamalzahi S, et al. Strategies toward rheumatoid arthritis therapy; the old and the new. *J Cell Physiol.* 2019; 234(7): 10018–31.
5. Bettini M, Vignali DA. Regulatory T cells and inhibitory cytokines in autoimmunity. *Curr Opin Immunol.* 2009; 21(6): 612–8.
6. Borges TJ, Wieten L, van Herwijnen MJ, et al. The anti-inflammatory mechanisms of Hsp70. *Front Immunol* [Internet]. 2012 May 4 [cited 2024 May 25]; 3: 95. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2012.00095/full>
7. Cauwels A, Tavernier J. Tolerizing strategies for the treatment of autoimmune diseases: from ex vivo to in vivo strategies. *Front Immunol* [Internet]. 2020 May 14 [cited 2024 May 25]; 11: 674. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2020.00674/full>
8. Dominguez-Villar M, Hafler DA. Regulatory T cells in autoimmune disease. *Nat Immunol.* 2018; 19(7): 665–73.
9. Ferat-Osorio E, Sánchez-Anaya A, Gutiérrez-Mendoza M, et al. Heat shock protein 70 down-regulates the production of toll-like receptor-induced pro-inflammatory cytokines by a heat shock factor-1/constitutive heat shock element-binding factor-

after activation [5]. These examples correlate with those of our studies when after the administration of dexamethasone to animals with AA, the content of cells expressing FOXR3 protein exceeded the content of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Treg by 1.5 times.

The results of the assessment of the clinical status in animals with AI confirm the tolerogenic effect of the use of CryoR1DCs and CryoR2DCs with an increased content of Hsp70<sup>+</sup> cells and the expression rate of Hsp70 protein in them (Fig. 2). When administered CryoR1DCs and CryoR2DCs, the arthritis index was 1.24 and 1.16, respectively, in contrast to this index in animals with AA without treatment (1.6).

Administration of CryoR1- and CryoR2DCs was superior to NatDCs in terms of the ability to minimize AI. It critically decreased and approached the value of intact healthy animals upon administration of CryoR2DC (1.0 and 1.16, respectively; Fig. 2). At the same time, the integral index of the TLI of Hsp70<sup>+</sup>CryoR2DC was the highest.

Our findings may be helpful to use the DCs with increased tolerogenic potential in the treatment of autoimmune diseases.

## Conclusions

Thus, the possibility of cryopreservation to increase the rate of Hsp70 protein expression in bone marrow MNCs has been proven. All this causes the formation of DCs with an immature phenotype and tolerogenic properties from them *in vitro*.

Tolerogenic potential of DCs has been shown to be changed by the cryopreservation conditions of MNCs from which they were derived. There has been determined the cryopreservation regimen (R2), providing the maximum increase in Hsp70<sup>+</sup>MNCs and Hsp70<sup>+</sup>DCs *in vitro* formed from them with tolerogenic activity.

DCs *in vitro* obtained from cryopreserved R2 bone marrow mononuclear cells with an increased content of Hsp70 demonstrated significantly higher tolerogenic activity, as assessed by the increase in Treg formation in animals with AA and their clinical status normalization.

## References

1. Abbasi M, Mousavi MJ, Jamalzahi S, et al. Strategies toward rheumatoid arthritis therapy; the old and the new. *J Cell Physiol.* 2019; 234(7): 10018–31.
2. Bettini M, Vignali DA. Regulatory T cells and inhibitory cytokines in autoimmunity. *Curr Opin Immunol.* 2009; 21(6): 612–8.



- dependent mechanism. *J Inflamm* [Internet]. 2014 Jul 12 [cited 2024 May 25]; 11: 19. Available from: <https://journal-inflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-9255-11-19>
10. Fontenot JD, Rudensky AY. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol*. 2005; 6(4): 331–7.
  11. Goltsev A, Yampolska K, Kisielova H, et al. Cryopreservation as biotechnological application of dendritic cells in clinical practice. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2021; 31(4): 289–303.
  12. Hulina A, Grdić Rajković M, Jakšić Despot D, et al. Extracellular Hsp70 induces inflammation and modulates LPS/LTA-stimulated inflammatory response in THP-1 cells. *Cell Stress Chaperones*. 2018; 23(3): 373–84.
  13. Kysielova H, Yampolska K, Dubrava T, et al. Improvement of bone marrow mononuclear cells cryopreservation methods to increase the efficiency of dendritic cell production. *Cryobiology*. 2022; 106(2022): 122–30.
  14. Lee J-H, Park C-S, Jang S, et al. Tolerogenic dendritic cells are efficiently generated using minocycline and dexamethasone. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Nov 8 [cited 2024 May 22]; 7(1): 15087. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-15569-1>
  15. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther* [Internet]. 2017 July 14 [cited 2024 May 22]; 2:17023. Available from: <https://www.nature.com/articles/sigtrans201723#citeas> doi: 10.1038/sigtrans.2017.23.
  16. Lu L, Barbi J, Pan F. The regulation of immune tolerance by FOXP3. *Nat Rev Immunol*. 2017; 17(11): 703–17.
  17. Luo X, Zuo X, Zhou Y, et al. Extracellular heat shock protein 70 inhibits tumour necrosis factor- $\alpha$  induced proinflammatory mediator production in fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Res Ther* [Internet]. 2008 April 14 [cited 2024 May 22]; 10(2): R41. Available from: <https://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/ar2399#citeas>
  18. Oxenkrug GF, McIntyre IM, Stanley M, Gershon S. Dexamethasone suppression test: experimental model in rats, and effect of age. *Biol Psychiatry*. 1984; 19(3): 413–6.
  19. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol*. 2010; 10(7): 490–500.
  20. Silveira GF, Wowk PF, Machado AMB, et al. Immature dendritic cells generated from cryopreserved human monocytes show impaired ability to respond to LPS and to induce allogeneic lymphocyte proliferation. *PLoS One* [Internet]. 2013 Jul 31 [cited 2023 March 2]; 8(7): e71291. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0101291>
  21. Somensi N, Brum PO, De Miranda Ramos V, et al. Extracellular HSP70 activates ERK1/2, NF- $\kappa$ B and pro-inflammatory gene transcription through binding with RAGE in A549 human lung cancer cells. *Cell Physiol Biochem*. 2017; 42 (6): 2507–22.
  22. Stocki P, Dickinson AM. The immunosuppressive activity of heat shock protein 70. *Autoimmune Dis* [Internet]. 2012 Dec 17 [cited 2024 May 7]; 2012: 617213. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/ad/2012/617213>.
  23. Tukaj S. Heat shock protein 70 as a double agent acting inside and outside the cell: insights into autoimmunity. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 July 26 [cited 2024 May 7]; 21(15): 5298. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/15/5298> doi: 10.3390/ijms21155298
  24. Tukaj S, Kaminski M. Heat shock proteins in the therapy of autoimmune diseases: too simple to be true? *Cell Stress Chaperones*. 2019; 24(3): 475–9.
  25. Usero L, Miralles L, Esteban I, et al. Feasibility of using monocyte-derived dendritic cells obtained from cryopreserved cells for DC-based vaccines. *J Immunol Methods* [Internet]. 2021 Nov [cited 2024 May 7]; 498: 113133. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022175921001782>
  26. Wang CH, Chou PC, Chung FT, et al. Heat shock protein70 is implicated in modulating NF- $\kappa$ B activation in alveolar
  3. Borges TJ, Wieten L, van Herwijnen MJ, et al. The anti-inflammatory mechanisms of Hsp70. *Front Immunol* [Internet]. 2012 May 4 [cited 2024 May 25]; 3: 95. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2012.00095/full>
  4. Cauwels A, Tavernier J. Tolerizing strategies for the treatment of autoimmune diseases: from *ex vivo* to *in vivo* strategies. *Front Immunol* [Internet]. 2020 May 14 [cited 2024 May 25]; 11: 674. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2020.00674/full>
  5. Dominguez-Villar M, Hafler DA. Regulatory T cells in autoimmune disease. *Nat Immunol*. 2018; 19(7): 665–73.
  6. Ferat-Osorio E, Sánchez-Anaya A, Gutiérrez-Mendoza M, et al. Heat shock protein 70 down-regulates the production of toll-like receptor-induced pro-inflammatory cytokines by a heat shock factor-1/constitutive heat shock element-binding factor-dependent mechanism. *J Inflamm* [Internet]. 2014 Jul 12 [cited 2024 May 25]; 11: 19. Available from: <https://journal-inflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-9255-11-19>
  7. Fontenot JD, Rudensky AY. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol*. 2005; 6(4): 331–7.
  8. Goltsev AN, Dubrava TG, Yampolskaya EE, et al. The optimization method of isolation of immature dendritic cells. *Fiziol Zh*. 2018; 64(6): 32–9. doi: 10.15407/fz64.06.032 [Ukrainian].
  9. Goltsev AM, Dubrava TG, Yampolska KE, et al. Rationale for the adoptive use of tolerogenic dendritic cells in the treatment of rheumatoid arthritis in mice. *Cell and Organ Transplantation*. 2019; 7(2): 125–31.
  10. Goltsev AN, Ostankova LV, Dubrava TG et al. [Cryopreservation as a factor of modification of structural and functional state and realization mechanism of therapeutic effect of compartment stem cells under autoimmune genesis the pathology development]. In Goltsev AN, editor [Current problems of cryobiology and cryomedicine]. Kharkov, 2012. p. 501–612. [Russian].
  11. Goltsev A, Yampolska K, Kisielova H, et al. Cryopreservation as biotechnological application of dendritic cells in clinical practice. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2021; 31(4): 289–303.
  12. Hulina A, Grdić Rajković M, Jakšić Despot D, et al. Extracellular Hsp70 induces inflammation and modulates LPS/LTA-stimulated inflammatory response in THP-1 cells. *Cell Stress Chaperones*. 2018; 23(3): 373–84.
  13. Kysielova H, Yampolska K, Dubrava T, et al. Improvement of bone marrow mononuclear cells cryopreservation methods to increase the efficiency of dendritic cell production. *Cryobiology*. 2022; 106(2022): 122–30.
  14. Lee J-H, Park C-S, Jang S, et al. Tolerogenic dendritic cells are efficiently generated using minocycline and dexamethasone. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Nov 8 [cited 2024 May 22]; 7(1): 15087. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-15569-1>
  15. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther* [Internet]. 2017 July 14 [cited 2024 May 22]; 2:17023. Available from: <https://www.nature.com/articles/sigtrans201723#citeas>
  16. Lu L, Barbi J, Pan F. The regulation of immune tolerance by FOXP3. *Nat Rev Immunol*. 2017; 17(11): 703–17.
  17. Luo X, Zuo X, Zhou Y, et al. Extracellular heat shock protein 70 inhibits tumour necrosis factor- $\alpha$  induced proinflammatory mediator production in fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Res Ther* [Internet]. 2008 April 14 [cited 2024 May 22]; 10(2): R41. Available from: <https://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/ar2399#citeas>
  18. Oxenkrug GF, McIntyre IM, Stanley M, Gershon S. Dexamethasone suppression test: experimental model in rats, and effect of age. *Biol Psychiatry*. 1984; 19(3): 413–6.



macrophages of patients with active pulmonary tuberculosis. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Apr 27 [cited 2024 May 7]; 7(1): 1214. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-01405-z>

19. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol*. 2010; 10(7): 490–500.
20. Silveira GF, Wowk PF, Machado AMB, et al. Immature dendritic cells generated from cryopreserved human monocytes show impaired ability to respond to LPS and to induce allogeneic lymphocyte proliferation. *PLoS One* [Internet]. 2013 Jul 31 [cited 2023 March 2]; 8(7): e71291. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0071291>.
21. Somensi N, Brum PO, De Miranda Ramos V, et al. Extracellular HSP70 activates ERK1/2, NF- $\kappa$ B and pro-inflammatory gene transcription through binding with RAGE in A549 human lung cancer cells. *Cell Physiol Biochem*. 2017; 42 (6): 2507–22.
22. Stocki P, Dickinson AM. The immunosuppressive activity of heat shock protein 70. *Autoimmune Dis* [Internet]. 2012 Dec 17 [cited 2024 May 7]; 2012: 617213. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/ad/2012/617213>.
23. Tukaj S. Heat shock protein 70 as a double agent acting inside and outside the cell: insights into autoimmunity. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 July 26 [cited 2024 May 7]; 21(15): 5298. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/15/5298>
24. Tukaj S, Kaminski M. Heat shock proteins in the therapy of autoimmune diseases: too simple to be true? *Cell Stress Chaperones*. 2019; 24(3): 475–9.
25. Usero L, Miralles L, Esteban I, et al. Feasibility of using monocyte-derived dendritic cells obtained from cryopreserved cells for DC-based vaccines. *J Immunol Methods* [Internet]. 2021 Nov [cited 2024 May 7]; 498: 113133. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022175921001782>
26. Wang CH, Chou PC, Chung FT, et al. Heat shock protein70 is implicated in modulating NF- $\kappa$ B activation in alveolar macrophages of patients with active pulmonary tuberculosis. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Apr 27 [cited 2024 May 7]; 7(1): 1214. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-01405-z>

