

A. Dranitsina, PhD., K. Dvorchshenko, DSc, O. Morgaienko, PhD., L. Ostapchenko, DSc.
Taras Shevchenko national university of Kyiv, Kyiv, Ukraine

EXPRESSION OF *TLR2* GENE IN RAT DUODENAL UPON LONG-TERM GASTRIC HYPOCHLORHYDRIA AND WITH ADMINISTRATION OF MULTIPROBIOTIC SYMBITER

The increasing of Tlr2 gene's expression in rat duodenal villus and crypt epithelial cells upon gastric hypoacidic conditions was shown. The level of Tlr2 expression both in villus and crypt epitheliocytes approached to the control value upon the treatment of hypoacidic rats with multiprobiotic "Symbiter".

Key words: gastric hypoacidity, duodenal, *Tlr2* gene expression, multiprobiotic.

УДК 611.018.83:615.373]-092.4

Н. Храновська, канд. біол. наук, О. Скачкова, канд. біол. наук, О. Горбач, мол. наук. співр.
Національний інститут раку, Київ,
Г. Потебня, д-р мед. наук, проф.,
Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології імені Р.Є.Кавецького НАН України, Київ,
Р. Сидор, асп.
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ФЕНОТИПОВІ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ ГЕНЕРОВАНИХ ДЕНДРИТНИХ КЛІТИН ЛЮДИНИ ПІСЛЯ ОБРОБКИ ЦИТОТОКСИЧНИМИ ЛЕКТИНАМИ *B. subtilis* B-7025

*Розглянуто фенотипові та функціональні властивості генерованих дендритних клітин людини після обробки цитотоксичними лектинами *B. subtilis* B-7025.*

Ключові слова: дендритні клітини, цитотоксичні лектини, *B. subtilis* B-7025, фенотипові та функціональні властивості.

Вступ. Відомо, що найбільш потужні антигенпрезентуючі клітини імунної системи – дендритні клітини (ДК) відрізняються високою пластичністю, та, в залежності від умов мікрооточення, можуть досягати функціонального дозрівання та набувати імуногенності. Так, залежно від складу середовища, умов культивування клітин-попередників, факторів дозрівання та ін. можна отримати ДК з різними властивостями. Одні з них будуть індукувати імунну відповідь за Тх1 / Тх2 типом, інші, навпаки, активувати регуляторні Т-лімфоцити (Трег) і призводити до імуносупресії (толерогенні ДК). Відомо, що фактори дозрівання, які додають до ДК при інкубації з антигеном, істотно впливають на їх здатність до міграції в лімфатичні вузли та презентації антигенів Т-лімфоцитам [1]. Дозрівання ДК індукують різноманітні стимули, наприклад, прозапальні цитокіни, с-KitL та FLT3L (ліганди тирозин-кіназного рецептора), зв'язування рецептора CD40, взаємодія певних макромолекул вірусів та бактерій (двуспіральна РНК, ДНК, ліпополісахарид (ЛПС), простагландин E2 (PGE2) та CpG послідовності ДНК бактерій з певними рецепторами сімейства Toll Like (TLR) [2,3].

Разом з тим, слід зазначити, що найбільш оптимальні комбінації індукторів дозрівання та способи навантаження пухлинними антигенами для використання ДК в імунотерапії раку не встановлені, а протоколи одержання функціонально зрілих ДК не стандартизовані, тому пошук найбільш оптимальних поєднань факторів для одержання функціонально зрілих ДК, придатних для використання у складі протипухлинних вакцин, залишається актуальною проблемою [4].

Відомо, що бактеріальні штами продукують поверхневі лектини. Показано, що бактерії *B. subtilis* B-7025 (штам депонований в Інституті мікробіології і вірусології Національної академії наук України) мають підвищену здатність синтезувати позаклітинні цитотоксичні лектини (ЦЛ) з унікальними властивостями. За хімічною природою ці лектини є глікопротеїнами, молекулами, що складаються з трьох поліпептидних ланцюгів з MM 8300 Da, утворюючи конгломерати. ЦЛ мають імуномодулюючу та протипухлинну активність. Вони здатні вибірково стимулювати Т- і В-лімфоцити, стимулювати продукцію інтерферонів (IFN) в різних біологічних системах. Ці ЦЛ використовують в якості компонента в протипухлинних вакцинах. Лізати пухлинних клітин, одержані за допомогою ЦЛ, були використані нами для

навантаження ДК при створенні протипухлинної вакцини на основі цих клітин [5]. Разом з тим, ефекти ЦЛ на фенотипові та функціональні властивості генерованих ДК людини не досліджені.

Мета роботи полягала у дослідженні фенотипових та функціональних властивостей генерованих дендритних клітин людини після обробки цитотоксичними лектинами *B. subtilis* B-7025.

Матеріали і методи. Для генерації ДК були використані мононуклеарні клітини периферичної крові 10 практично здорових людей. Клітини в концентрації 1×10^6 кл / мл поміщали в 24-лункові планшети для культивування протягом 2 годин в 3 мл повного живильного середовища RPMI-1640, 100 мкг/мл гентаміцину і 5% ембріональної телячої сироватки. Фракцію клітин, що не прилипали, видаляли, а ті, що залишилися, інкубували в повному культуральному середовищі в присутності 40нг / мл гранулоцит-макрофаг колоніє стимулюючого фактору (GM-CSF) протягом 6 діб при 37° С в CO₂-інкубаторі при 5% CO₂. Після 6 діб культивування до незрілих ДК додавали ЦЛ *B. subtilis* B-7025 в концентраціях 0,04, 0,1 або 0,4 мг/мл та інкубували ще протягом 24 години.

Фенотиповий аналіз генерованих ДК проводили за допомогою методу проточної цитофлуориметрії за експресією поверхневих маркерів: CD83, CD86, HLA-DR. Рівень експресії генів інтерлейкін (IL)-12p40, IL-12p35, фактор некрозу пухлини (TNF)(α), IL-10, трансформуючий фактор росту (TGF)- β визначали за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР) з детекцією результатів в режимі реального часу з використанням специфічних праймерів, TaqMan зондів або флуорохромів SYBRGreen. Рівні експресії генів-мішеней оцінювали за допомогою методу $\Delta\Delta Ct$ з нормуванням щодо експресії ендогенного контролю.

З метою дослідження активності ДК в реакції змішаної культури лейкоцитів (ЗКЛ), їх інкубували з аутологічними лімфоцитами протягом 20 діб. Після закінчення інкубації визначали кількість CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ та CD4⁺IFN- γ ⁺, CD4⁺IL-4⁺, CD8⁺IFN- γ ⁺ – лімфоцитів в культурі.

Статистичну обробку даних проводили з використанням програмного пакету Statistica 6.1. Достовірність відмінностей між групами оцінювали за допомогою методів параметричної (t – критерій Стюдента) і непараметричної статистики (критерій Вілкоксона-Манна-Уїтні). Відмінності вважали статистично достовірними при $p < 0,05$.

Результати та обговорення. На сьогоднішній день цитокіновий "коктейль" TNF- α , IL-1- β , IL-6 і PGE2 прийнятий в якості "золотого стандарту" для стимуляції дозрівання ДК. Однак, він характеризується істотним недоліком – нездатністю посилювати продукцію ДК IL-12p70 та інших Th1-поляризуючих цитокінів, які мають важливе значення для індукції ефективної протипухлинної імунної відповіді, опосередкованої Th1 і цитотоксичними Т-лімфоцитами (ЦТЛ) [6]. Тому подальший пошук полягає у використанні альтернативних цитокі-

нових коктейлів, що включають замість PGE2 ліганди TLR, зокрема, LPS або Poly I: C [6,7,8].

Як показали результати досліджень, ЦЛ у найменшій із досліджуваних концентрацій (0,04 мг/мл) сприяють посиленню експресії на генерованих ДК молекул CD86 та HLA-DR, які відповідають за презентацію антигенів (рис. 1). Рівень експресії молекул перевищував такий у ДК, генерованих в присутності LPS. Разом з тим, ця концентрація ЦЛ не вплинула на експресію молекули CD83, яка характеризує ступінь зрілості ДК. Найбільш ефективними щодо підвищення рівня експресії молекули CD83 були ЦЛ в концентрації 0,1 мг/мл та LPS.

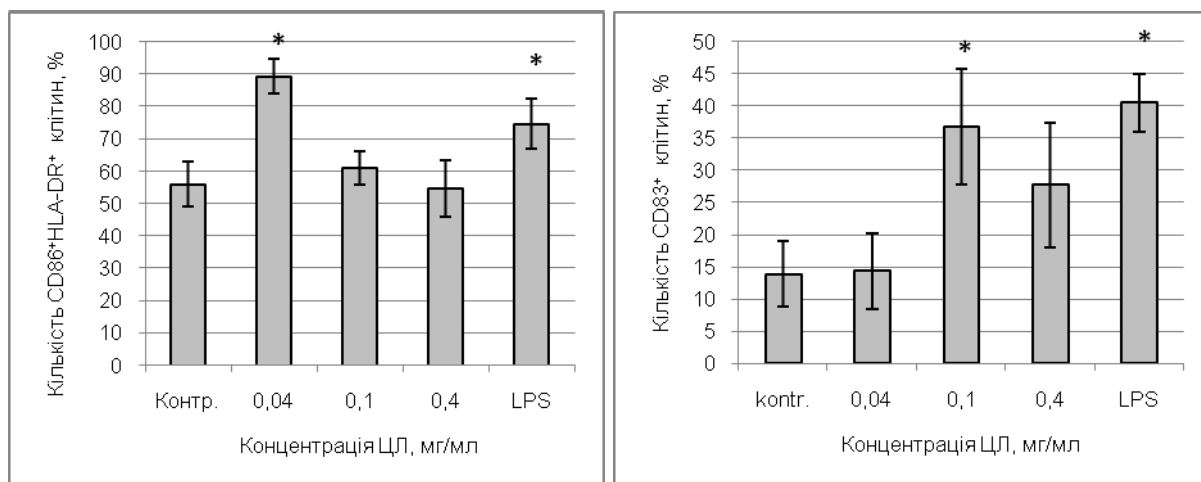


Рис. 1. Фенотипова характеристика ДК, оброблених ЦЛ *B. subtilis* B-7025

Результати наступного дослідження показали, що ЦЛ сприяють змінам функціональної активності генерованих ДК, при цьому найбільший вплив зареєстровано від застосування ЦЛ в концентрації 0,1 мг/мл (рис. 2). Так, рівні мРНК Th1-поляризуючих цитокінів IL-12p35, IL-12p40 та TNF- α в ДК зростали в 3-5 разів у разі інкубації з ЦЛ в цій концентрації порівняно з контролем. Разом з тим, відмічено зростання в декілька разів і рівня мРНК імуносупресорного цитокіна IL-10 з одночасним пригніченням активності гена TGF- β . Слід зазначити, що спрямованість змін в цитокіновому профілі генерованих ДК під дією ЦЛ та LPS практично співпадали.

Виходячи із встановленого факту активації гена імуносупресорного цитокіна IL-10, який сприяє активації Трег, було проведено дослідження толерогенної активності генерованих ДК у реакції ЗКЛ. Для цього ДК, одержані у присутності ЦЛ *B. subtilis* B-7025, довготривало

культивували з аутологічними лімфоцитами та визначали кількість CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, CD4⁺IFN- γ ⁺, CD4⁺IL-4⁺ та CD8⁺IFN- γ ⁺ – клітин в культурі лімфоцитів. Оскільки доза ЦЛ 0,4 мг/мл виявилася токсичною для ДК, в наступних дослідженнях ми її не застосовували.

Як показали результати досліджень, ДК, оброблені ЦЛ *B. subtilis* B-7025 в концентрації 0,1 мг/мл, практично не впливали на кількість Трег клітин з фенотипом CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ в культурі, але сприяли деякому збільшенню кількості CD4⁺IFN- γ ⁺-клітин та суттєвому збільшенню кількості CD8⁺IFN- γ ⁺-лімфоцитів (рис. 3 та рис. 4). Це свідчить про важливість балансу між прозапальними та протизапальними та імуносупресорними цитокінами, що продукують ДК, який багато в чому визначає наступну форму імунної відповіді або сприяє розвитку толерантності.

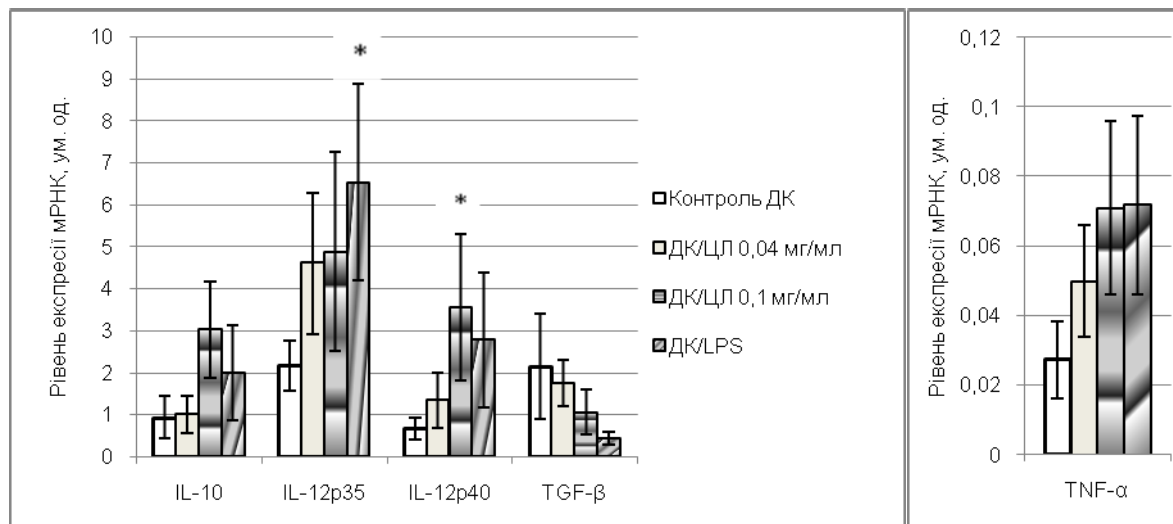


Рис.2. Рівень експресії мРНК цитокінів в ДК моноцитарного походження, оброблених ЦЛ *B. subtilis* B-7025

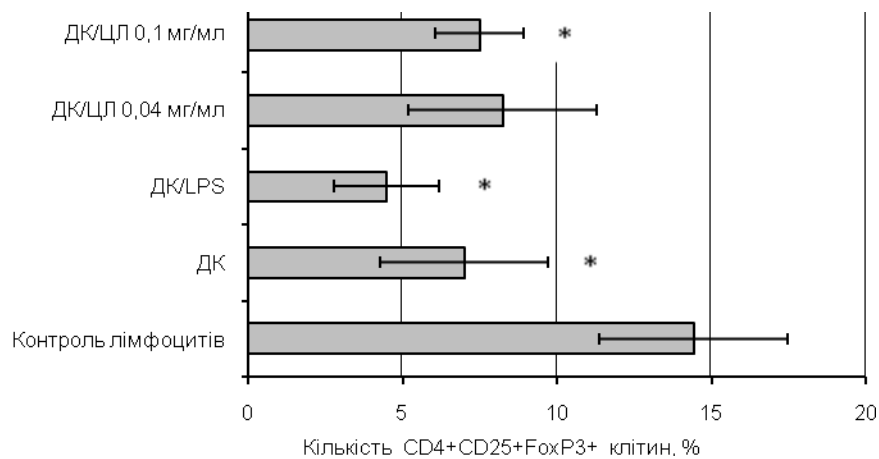


Рис. 3. Кількість Трег після інкубації з ДК, обробленими цитотоксичними лектинами *B. subtilis* B-7025

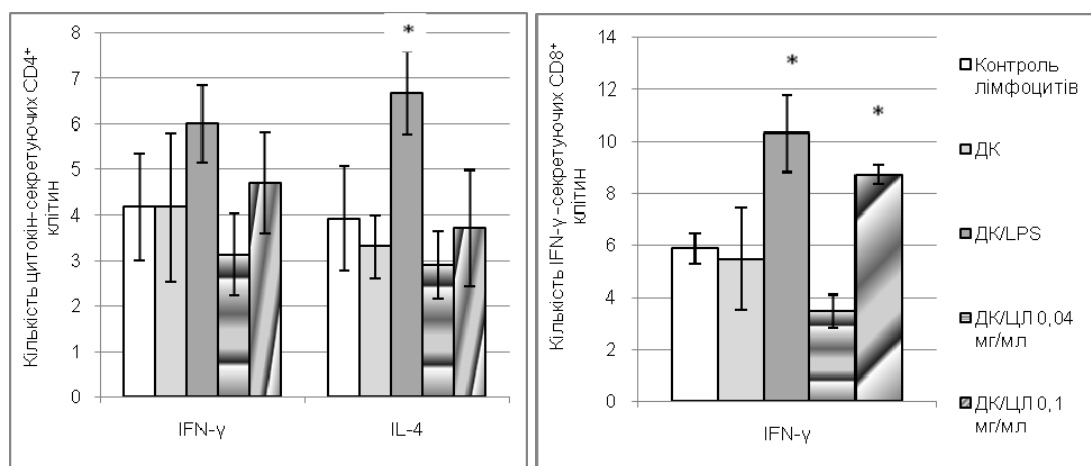


Рис. 4. Кількість цитокін-продуруючих CD4+ та CD8+ клітин після інкубації з ДК, обробленими цитотоксичними лектинами *B. subtilis* B-7025

Найбільш виражений вплив щодо пригнічення Трег та активації цитокінсекреторної активності Т-лімфоцитів зареєстровано під дією ДК, оброблених LPS, що свідчить про доцільність його застосування з метою індукції функціонального дозрівання генерованих ДК.

Механізми, за рахунок яких ЦЛ активують ДК, досі не зрозумілі. Разом з тим, припускається, що їхня дія опосередковується зв'язуванням з TLR або лектиновими рецепторами на ДК та активацією відповідних сигнальних шляхів.

Висновки. Одержані результати свідчать, що ЦЛ *B. subtilis* B-7025 сприяють Тх1 – поляризації генерованих ДК людини, не індукуючи при цьому їхні толерогенні властивості. У концентрації 0,04 мг/мл ЦЛ сприяють посиленню експресії на генерованих ДК молекул CD86 та HLA-DR, які відповідають за презентацію антигенів. У концентрації 0,1 мг/мл ЦЛ сприяють підвищенню рівня експресії молекули CD83 в 3-5 разів та зростанню рівнів мРНК Тх1-поляризуючих цитокінів IL-12p35, IL-12p40 та TNF-α. Таким чином, одержані дані обґрунтовують доцільність використання ЦЛ *B. subtilis* B-7025 у протоколах генерації Тх1-поляризуючих ДК.

Список використаних джерел

- Schmidt S. V. Regulatory dendritic cells: there is more than just immune activation / S. V. Schmidt, A. C. Nino-Castro, J. L. Schultze // *Frontiers in Immunology / Antigen Presenting Cell Biology*. – 2012. – Vol. 3.

– P. 1–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3432880/>

- Synergistic effect of microbe-associated molecules on human monocyte-derived dendritic cell maturation in vitro / L. M. Skivka, Yu. V. Shevts, N. M. Khramovskaya et. al. // *Biopolymers & Cell*. – 2012. – № 1. – P. 50–55.

- Kalinski P. Dendritic cells in cancer immunotherapy: vaccines and combination immunotherapies / P. Kalinski, R. Muthuswamy, J. Urban // *Expert Rev. Vaccines*. – 2013. – 12(3). – P. 285–295. Available from: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1586/erv.13.22>

- Clinical use of dendritic cells for cancer therapy / S. Anguille, E. L. Smits, E. Lion et. al. // *Lancet Oncol*. – 2014. – N 15. – P. e257–267. Available from: [http://www.thelancet.com/pdfs/journals/lanonc/PIIS1470-2045\(13\)70585-0.pdf](http://www.thelancet.com/pdfs/journals/lanonc/PIIS1470-2045(13)70585-0.pdf)

- Влияние дендритноклеточной аутовакцины на эффективность лечения больных раком яичника / Н. Н. Храмовская, Ю. А. Гриневич, Г. П. Потебня [и др.] // *Вопр. онкологии*. – 2012. – № 6. – P. 781–786.

- Kalinskia P. Polarized dendritic cells as cancer vaccines: Directing effector-type T cells to tumors / P. Kalinskia, H. Okada // *Seminars in Immunology*. – 2010. – Vol. 22. – P. 173–182. Available from: www.elsevier.com/locate/ysmim

- Comparison of α-Type-1 polarizing and standard dendritic cell cytokine cocktail for maturation of therapeutic monocyte-derived dendritic cell preparations from cancer patients / R. Trepiakas, A. E. Pedersen, M. H. Hansenc et. al. // *Vaccine*. – 2008. – Vol. 26. – P. 2824–2832. Available from: www.elsevier.com/locate/vaccine

- Differential effect of monophosphoryl lipid A and cytokine cocktail as maturation stimuli of immunogenic and tolerogenic dendritic cells for immunotherapy / D. Raich-Regue, M. Naranjo-Gomez, L. Grau-Lopez et. al. // *Vaccine*. – 2012. – Vol. 30. – P. 378–387. Available from: www.elsevier.com/locate/vaccine

Н. Храновская, канд. биол. наук, О. Скачкова, канд. биол. наук, Н. Свергун, канд. биол. наук, О. Горбач, млад. науч. сотр.
Национальный институт рака, Киев, Украина,
Г. Потебня, д-р мед. наук, проф.
Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии имени Р.Е. Кавецкого НАН Украины, Киев, Украина,
Р. Сидор, асп.
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ГЕНЕРИРУЕМЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ПОСЛЕ ОБРАБОТКИ ЦИТОТОКСИЧЕСКИМИ ЛЕКТИНАМИ *B. subtilis* B-7025

Рассмотрены фенотипические и функциональные свойства генерируемых дендритных клеток человека после обработки цитотоксическими лектинами B. subtilis B-7025.

Ключевые слова: дендритные клетки, цитотоксические лектины, B. subtilis B-7025, фенотипические и функциональные свойства.

N. Khranovska, PhD., O. Skachkova, PhD, N. Svergun, PhD, O. Gorbach, Junior Researcher
National Cancer Institute, Ukraine, Kyiv, Ukraine,
G. Potebnya, MD, Prof.
RE Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology NAS of Ukraine, Kyiv Ukraine,
R. Sydor, PhD stud.
Taras Shevchenko National University of Kiev, Kyiv, Ukraine

THE PHENOTYPIC AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF THE GENERATED HUMAN DENDRITIC CELLS AFTER TREATMENT WITH CYTOTOXIC LECTINS *B. subtilis* B-7025

The article describes the phenotypic and functional properties of human dendritic cells generated after treatment with cytotoxic lectins B. subtilis B-7025.

Keywords: dendritic cells, cytotoxic lectins, B. subtilis B-7025, phenotypic and functional properties.

UDC УДК 591.33:57.086.13

O. Shtapenko, PhD.
Institute of Animal Biology NAAS, Lviv,
A. Madich, D. Sc., Ph.D.,
Human Genome Campus, Wellcome Trust Sanger Institute, Cambridge University, UK.

VITRIFICATION OF PRONUCLEAR-STAGE MOUSE EMBRYOS USING DIFFERENT CRYOPROTECTANTS AND THEIR SUBSEQUENT DEVELOPMENT IN VITRO WITH OR WITHOUT OVIDUCT EPITHELIAL CELLS TO THE BLASTOCYST STAGE

The results of experimental researches on vitrification of PN mice embryos on solid surface with use of different cryoprotectants and evaluation their viability and subsequent development in vitro after vitrified-warmed are resulted in this article.

Key words: vitrification, pronuclear stage mouse embryos, oviduct epithelial cells.

Introduction. Cryopreservation of mouse embryos is a cost-effective approach for the maintenance of scientifically important stocks, strains, and lines [15]. Vitrification as an ultra rapid cooling technique has been used in cryopreservation of embryo at low temperatures by creating a completely vitreous (glass-like) state [19]. Improvements in ice formation have been made by selecting the most appropriate cryoprotectants (CPAs) and using a mixture of CPAs, macromolecules and nonpermeating agents [14].

Ethylene glycol, a permeating compound, has an important function in stabilizing the cellular membrane during freezing, though it also has some harmful effects on embryo development [18]. In the use of PVP for 2-cell stage mouse embryos, Kim C.G. *et al.* [10] reported that addition of PVP macromolecules significantly reduced the incidence of zona and cellular damage, but exposure of embryos to PVP was deleterious to their subsequent development.

Cryopreservation causes morphological and biochemical alterations including damages to membranes and mitochondrial [4], cytoplasmic disorganizations [1], and DNA fragmentation [6], which in turn may decrease development and implantation capabilities of embryos. An alternative way of improving the developmental ability of embryos at the pronuclear stage after cryopreservation may be their *in vitro* cultivation to avoid the stresses caused by inappropriate vitrification conditions by the prevention of stresses that arise during vitrification. Several culture systems have been used for improve *in vitro* embryo development and most of them include somatic cells such as granulosa cells [16], oviductal cells [21], uterine cells,

Vero cells [11], as the co-culture support [7]. Based on these observations and our recent finding that co-culture with oviduct epithelial cells enhances the *in vitro* development of the embryos [8], it seems that improvement in the post warming culture conditions by using oviduct epithelial cells can affect the embryo development and the quality of resulting blastocysts.

The purpose of this study was to evaluate the effects of cryoprotectant treatment of the pronuclear stage on the developmental ability of vitrified mouse zygotes, its developmental ability to the blastocyst stage. We compared various components vitrification solutions to find a more suitable composition for vitrification of PN embryos. Finally, in a series of experiments we investigated the developmental competence of vitrified-warmed pronuclear-stage mouse zygotes in co-culture system using oviduct epithelial cells.

Materials and methods. Animals and embryo collection Eight to twelve weeks old female C57BL/6 mice were superovulated by an intraperitoneally injection of 5IU PMSG (Sigma) followed 48 h later by 5 IU hCG (Pregnyl, Organon, Netherlands). Females were placed with the same strain males immediately after hCG administration. Females were checked up for mating by the presence of vaginal plugs 16 h later. Approximately 19-20 h post-hCG injection oviducts were excised and pronuclear-stage embryos with the rest of cumulus cells were flushed from oviduct ampoules with M2. Zygotes have been collected and transferred into M2 medium supplemented with a hyaluronidase (80 IU/ml) for 3 min. Embryos have been rinsed three times into few M2 medium droplets and classified as pronuclear-stage embryos (PN embryos),