



УДК 611.018.1-085.275.4:612.017.1

А. М. Гольцев, Т. Г. Дубрава, О. Д. Луценко, Є. О. Порожан,  
Н. М. Бабенко, Ю. О. Гаєвська, О. Ю. Дімітров

## МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ ІМУНОКОРИГУВАЛЬНОЇ ДІЇ ПРЕПАРАТІВ ФЕТОПЛАЦЕНТАРНОГО КОМПЛЕКСУ В УМОВАХ РОЗВИТКУ АВТОІМУННИХ ЗАХВОРЮВАНЬ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, Україна

УДК 611.018.1-085.275.4:612.017.1

А. Н. Гольцев, Т. Г. Дубрава, Е. Д. Луценко, Е. А. Порожан, Н. Н. Бабенко, Ю. А. Гаевская, А. Ю. Димитров

### МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИММУНОКОРРИГИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТОВ ФЕТОПЛАЦЕНТАРНОГО КОМПЛЕКСА В УСЛОВИЯХ РАЗВИТИЯ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

*Институт проблем кробиологии и кримицины НАН Украины, Харьков, Украина*

Проведена сравнительная оценка на молекулярном уровне иммунокорригирующего действия криоконсервированных продуктов фетоплацентарного комплекса в отношении Т-регуляторного звена иммунитета при аутоиммунных заболеваниях. Применяемые для лечения аутоиммунных заболеваний продукты фетоплацентарного комплекса (плацента, фетальная печень, фетальные нервные клетки) способны повышать количество Трег-клеток, причем криоконсервированные в большей степени. Предполагается, что стимуляция Т-регуляторного звена иммунитета животных с аутоиммунными заболеваниями осуществляется по ИДО-зависимому механизму.

**Ключевые слова:** аутоиммунные заболевания, Трег-клетки, ген *идо*, продукты фетоплацентарного комплекса.

UDC 611.018.1-085.275.4:612.017.1

A. M. Goltsev, T. G. Dubrava, O. D. Lutsenko, Ye. O. Porozhan, N. M. Babenko, Yu. O. Gaevska, O. Yu. Dimitrov

### MOLECULAR MECHANISMS OF IMMUNE CORRECTING EFFECT OF CELL THERAPY UNDER DEVELOPMENT OF AUTOIMMUNE DISEASES

*Institute for Cryology and Cryomedicine Problems NAMS of Ukraine, Kharkiv, Ukraine*

One of suppressor mechanisms controlling the tolerance during autoimmune diseases (AIDs) is the functioning of T-regulatory cells (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>). Rise in the content of Treg-cells in a recipient's organism when treating AIDs is possible by triggering the molecular mechanisms with participation of cells producing indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) enzyme. Fetoplacental complex products (FPCP): placental cell suspension (PCS), fetal liver cells (FLCs) and fetal neuronal cells (FNCs) are the potential products of IDO. When using cryopreserved FPCP the change in metabolic processes of cells and proteins with immune modulating properties after freeze-thawing should be taken into account.

The research **aim** is comparative assessment of immune correcting effect of cryopreserved FPCP in respect of T-regulatory link of immunity at various AIDs.

The studies were performed in animals with the induction of adjuvant arthritis, experimental allergic encephalomyelitis and acute graft versus host reaction with following introduction of cryopreserved PCS, FLCs and FNCs, correspondingly. The number of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells in spleen of the animals with AIDs prior to and after introduction of corresponding FPCP was examined with flow cytometer FACS Calibur. Content of *ido* gene transcripts in cryopreserved FPCP was examined by RT-PCR.

It has been shown that FPCP are capable of increasing the number of Treg-cells in a recipient's body with AIDs, moreover the cryopreserved ones are doing in bigger extent. It is supposed that T-regulatory link of immunity of the animals with AIDs is stimulated according to IDO-dependent mechanism.

**Key words:** autoimmune diseases, Treg-cells, *ido* gene, products of fetoplacental complex.

Розвиток автоімунних захворювань (АІЗ) пов'язаний з порушенням супресорних механізмів, які контролюють толерантність Т- і В-лімфоцитів до

автоантигенів [1; 2]. Підтримка імунологічної толерантності здійснюється за рахунок кількох механізмів: делецією автоактивних клонів у тимусі [3]

й анергією периферичних клонів автореактивних Т-лімфоцитів [4]. Ідентифіковано ще один механізм за участі Т-регуляторних клітин (Трег), які здатні



пригнічувати автоантигенспецифічну проліферацію й ефективні функції автореактивних лімфоцитів [5]. Трег-клітини, що мають фенотип CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, вперше були ідентифіковані в 1995 р. [1]. Сьогодні механізм дії CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-клітин розшифрований не повністю, але відомо, що для реалізації їхньої супресорної функції необхідні як безпосередні міжклітинні контакти, так і гуморальні фактори, які вони продукують (ІЛ-10, ТРФ-β) [6].

Керування станом CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-клітин є найперспективнішим завданням у загальному спектрі методів імуномодулюючої терапії. Відомо, що супресорний ефект Трег-клітин може здійснюватися за рахунок продукції ферменту індоламін-2,3-діоксигенази (ІДО) [7; 8], висока активність якого притаманна продуктам фетоплацентарного комплексу (ПФПК), а саме: клітинам плаценти, фетальної печінки та фетальним нервовим клітинам [9–11]. Неодноразово зазначалося, що у загальному технологічному процесі застосування ПФПК у клінічній практиці обов'язковим компонентом є їхнє кріоконсервування [11; 12]. Це, насамперед, зумовлено необхідністю зберігання матеріалу і його застосування у міру затребуваності, а також обов'язкової сертифікації та стерильності. Крім того, передбачається здатність кріоконсервування як стресорного фактора до модуляції метаболічних процесів клітини, у тому числі й білків з імуномодулюючими властивостями [11].

**Мета** роботи — провести порівняльну оцінку імунокоригувальної дії кріоконсервованих продуктів фетоплацентарного комплексу щодо Т-регуляторної ланки імунітету при різних формах експериментальних АІЗ.

## Матеріали та методи дослідження

Дослідження проводили відповідно до «Загальних принципів експериментів на тваринах», схвалених III Національним конгресом з біоетики (Київ, 2007) та узгоджених з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985).

Індукцію ад'ювантного артриту (АА) у мишей лінії СВА/Н здійснювали субплантарним введенням повного ад'юванту Фрейнда [13]. Набряк суглоба оцінювали як відношення діаметра дослідного суглоба до інтактного і визначали у вигляді індексу артриту (ІА).

Кріоконсервування суспензії клітин плаценти (СКП) 18-ї доби гестації проводили під захистом 10 % диметилсульфоксиду (ДМСО) [12]. Нативну та кріоконсервовану СКП вводили внутрішньовенно на 7-му добу розвитку АА дозою 1·10<sup>6</sup> клітин на мишу.

Індукцію експериментального алергічного енцефаломієліту (ЕАЕ) у щурів проводили введенням гомогенату гомологічної спинномозкової тканини (50 мг) з повним ад'ювантом Фрейнда [14]. Тяжкість клінічної картини захворювання оцінювали за п'ятибальною шкалою Ю. М. Жаботинського (1975).

Фетальні нервові клітини (ФНК) мозку ембріонів щурів 11-ї доби гестації заморожували під захистом 10 % ДМСО [15] та вводили на 14-ту добу розвитку ЕАЕ внутрішньочеревинно дозою 5·10<sup>6</sup> клітин на 100 г маси тіла тварини.

Для індукції гострої реакції «трансплантат проти хазяїна» (ХТПХ) летально опроміненим мишам (СВА/НхС57В1) F<sub>1</sub> внутрішньовенно вводили 5·10<sup>6</sup> клі-

тин КМ (СВА/Н) на мишу без клітин або з клітинами лімфовузлів (що становлять 30 % від клітин КМ). Інтенсивність розвитку ХТПХ оцінювали на 14-ту добу за індексом селезінки (ІС) [16].

Клітини фетальної печінки (КФП) 18-ї доби гестації мишей лінії СВА/Н були кріоконсервовані під захистом 10 % ДМСО [11]. Для оцінки терапевтичної ефективності нативні та кріоконсервовані КФП вводили внутрішньовенно дозою 5·10<sup>5</sup> клітин на мишу одразу після індукції патології.

Вміст транскриптів гена *ідо* в нативних і кріоконсервованих ПФПК (СКП, ФНК та КФП), що вводили реципієнтам з АІЗ, оцінювали методом полімеразної ланцюгової реакції з етапом зворотної транскрипції [17]. Результати були нормовані стосовно показника експресії гена *beta actin* (housekeeping gene).

Оцінку вмісту Трег-клітин (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) у селезінці тварин з індукцією експериментальних АІЗ до та після введення ПФПК проводили на проточному цитофлуориметрі FACS Calibur (Becton Dickinson, USA) з використанням відповідних моноклональних антитіл — МАТ (BD Pharmingen, Abcam). Середня інтенсивність флуоресценції (СІФ), яку виражали в умовних одиницях (ум. од.), була визначена за маркером CD25, що має пріоритетну значущість для Трег-клітин.

Статистичну обробку отриманих даних проводили за допомогою u-критерію Манна — Уїтні.

## Результати дослідження та їх обговорення

Розвиток автоімунних процесів більшою чи меншою мірою пов'язаний з недостатньою функціональною активністю Трег-клітин, які повинні супресувати активність автоспеци-



фічних Т-ефекторних клітин. Тому терапевтичні засоби повинні бути спрямовані на активацію й індукцію проліферації Трег-клітин як локально у вогнищах інфекції і запалення, так і системно — у вторинних лімфоїдних органах.

Проведені дослідження свідчать про значні порушення структури і функції Трег-клітин ( $CD4^+CD25^+$ ) у селезінці в динаміці розвитку АІЗ у різних модельних системах. Так, показано зниження їх кількості на 7-му добу розвитку АА на тлі збільшення набряку суглобів у тварин (рис. 1, а). Однак подальше збільшення Трег-клітин з максимумом на 21-шу добу розвитку АА не тільки не супроводжувалося покращанням клінічної картини захворювання, але й підвищенням індексу набряку суглобів. Це може бути пов'язане із втратою супресорної активності Трег-клітин у стані проліферації в присутності ІЛ-2, який продукують ефекторні клітини та який має здатність регулювати імунну відповідь за принципом зворотного зв'язку [1].

Розвиток ЕАЕ супроводжувався суттєвим зниженням кількості Трег-клітин (рис. 1, б), починаючи з 7-ї доби індукції патології, що клінічно виражалося посиленням набряку, парезами кінцівок і порушенням руху тварин. Суттєво, що, на відміну від АА, на 21-шу добу клінічні прояви ЕАЕ досягали максимуму на тлі найбільшого зниження кількості Трег-клітин (у 10 разів) у цьому періоді.

Установлено, що розвиток ХТПХ починається з 7-ї доби після індукції патології, судячи зі збільшення ІС в 1,2 разу та зниження вмісту Трег-клітин в 1,7 разу (рис. 2, а) від інтактного контролю. Однак прогресивна загибель тварин почалася з 14-ї доби на тлі максимального підвищення ІС (в 1,4 разу) та зниження вмісту Трег-клітин (у 2,7 разу).

Цілеспрямоване збільшення вмісту Трег-клітин в організмі реципієнта при лікуванні АІЗ ПФПК можливе шляхом запуску молекулярних механізмів за участі клітин-продуцентів ферменту ІДО — мезенхімальних стовбурових клітин (КФП, пла-

цента), мікроглії (ФНК) та клітин синцитіотрофобласта (плацента) [9–11]. Активація експресії ІДО здійснюється під впливом прозапальних цитокінів: інтерферонів, ліпополісахаридів тощо. Зокрема, промотор гена *ido* містить елементи ISRE та GAS, чутливі до інтерферону- $\gamma$  [7]. Завдяки роботі ферменту ІДО здійснюється киснева деградація триптофану в кінуренін з подальшим утворенням продуктів його розпаду у вигляді кінуренінової, піколінової, квінолінової тощо кислот, що реалізують безпосередній шлях імуносупресії. Наприклад, кінуренін є проапоптотичним метаболітом, який пригнічує активацію ефекторних Т-клітин [5]. Також відомо, що кінуренін у мікромолярних дозах здатний ініціювати FAS-незалежні шляхи апоптозу, пов'язані з активацією каспази-8, та виходу цитохрому С з мітохондрій [18].

Крім того, ПФПК можуть продукувати інгібіторні цитокіни (ІЛ-10, ТРФ- $\beta$ ), здатні до реалізації клітинно-контактної (за участі в міжклітинній взає-

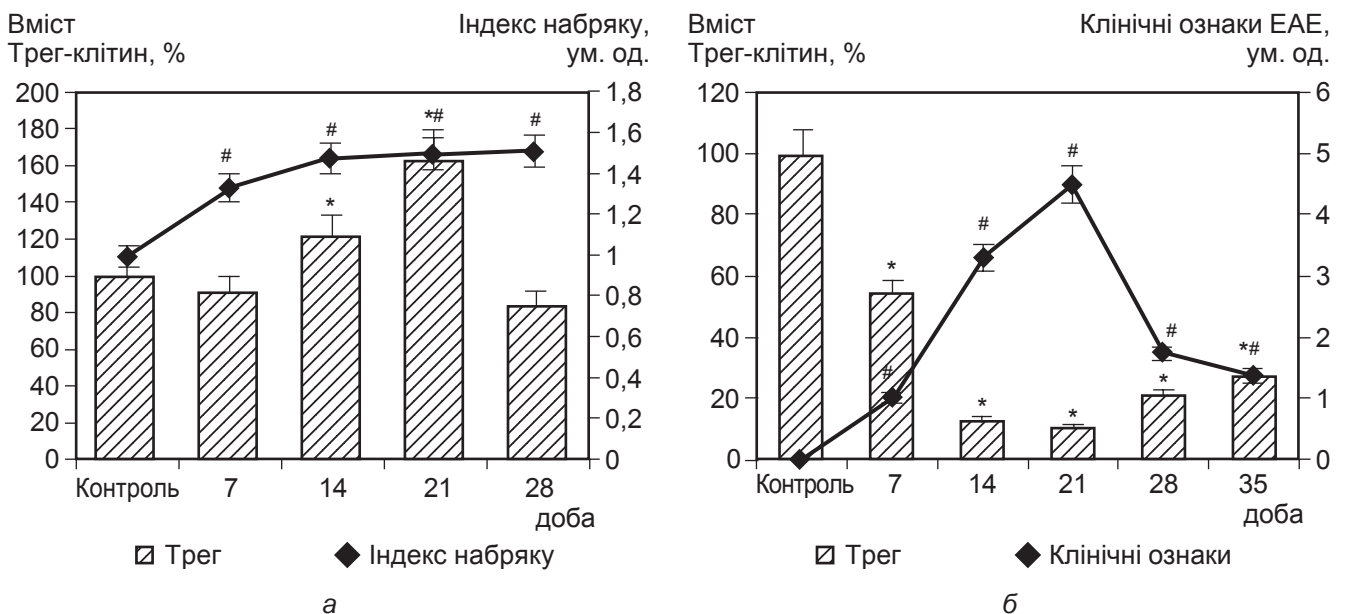


Рис. 1. Вміст Трег-клітин ( $CD4^+CD25^+$ ) та клінічні ознаки патології в динаміці розвитку АА (а) й ЕАЕ (б). На рис. 1 і 2: за 100 % прийнята кількість Трег-клітин у інтактних тварин (контроль); \*, # — результати достовірні відносно відповідного контролю ( $p < 0,05$ )



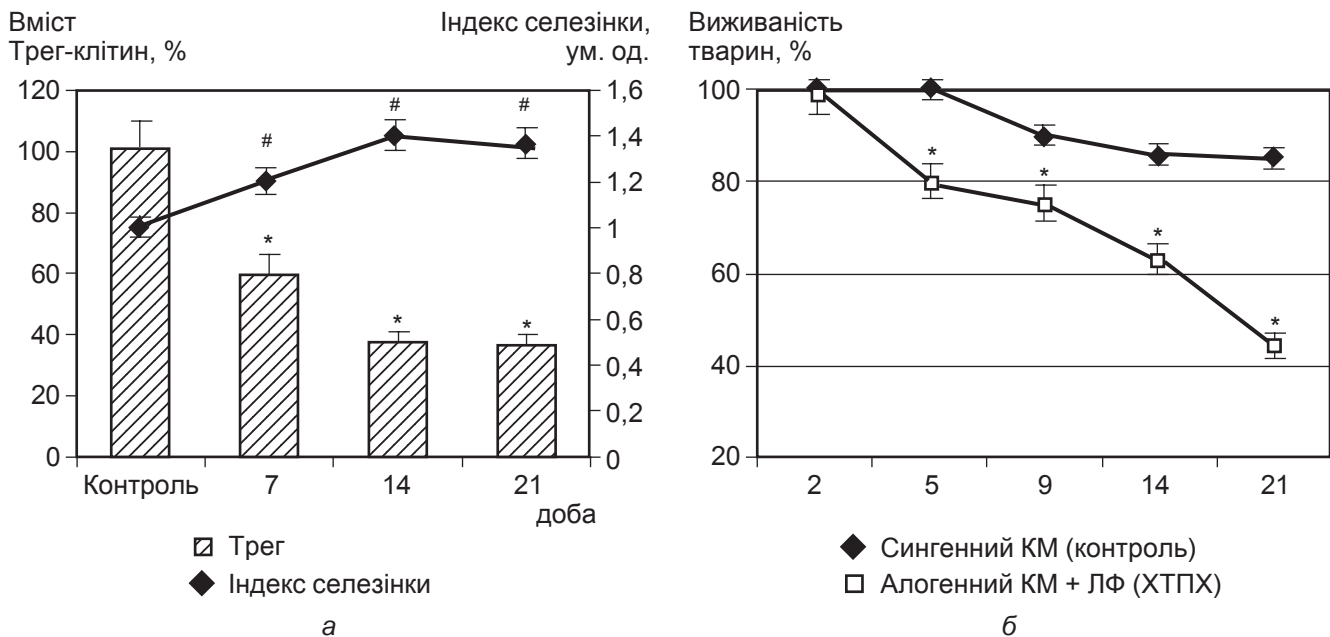


Рис. 2. Вміст Трег-клітин (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) та клінічні ознаки патології ХТПХ: а — індекс селезінки та вміст Трег-клітин; б — виживаність тварин

модії CTLA4/B7, LAG3, TGFβ, цАМФ, гранзимів) та медіаторно-опосередкованої супресії (ТРФ-β, ІЛ-10, ІЛ-35) [5].

Як показано на рис. 3, усі види ПФПК були здатні до певної фонові продукції ферменту ІДО, про що свідчить наявність транскриптів гена, відповідального за його продукцію. Кріоконсервування приводило до активації експресії гена *ido* в ПФПК, але різною мірою (див. рис. 3), а саме: у КФП — у 2,5 рази, у СКП — удвічі і ФНК — у 1,5 рази. Це може бути пов'язане як з перерозподілом клітинних субпопуляцій під впливом низьких температур, так і з якісно новим станом клітин на всіх рівнях організації — від транскрипційно-трансляційного рівня до модифікації синтезу білкових структур [11]. Таким чином, кріоконсервовані ПФПК з підвищеним ступенем експресії гена *ido*, порівняно з нативними, можуть характеризуватися значним потенціалом активації Т-регуляторної ланки імунітету в терапії АІЗ.

Дійсно, усі види ПФПК, що вводилися тваринам з АІЗ, про-

демонстрували явно виражений стимулювальний потенціал щодо Трег-клітин (табл. 1). При лікуванні АА встановлено, що кріоконсервована СКП мала кращий терапевтичний потенціал, ніж нативна, істотно підвищуючи кількість Трег-клітин (в 1,91 та 1,54 рази відповідно). Проте СІФ у тварин після введення кСКП мав нижче значення, ніж при введенні нСКП (78,93±6,70 та 109,50±9,44;  $p < 0,05$  відповідно). Кращий терапевтичний ефект кріоконсервованої СКП також може бути пов'язаний з раніше встановленим фактом [12] перерозпо-

ділу субпопуляційного складу суспензії у бік підвищення кількості клітин цитотрофобласта та рівня експресії гена *ido* в них.

Нативні та кріоконсервовані ФНК як препарати лікування ЕАЕ сприяли збільшенню кількості Трег-клітин (у 3,63 та 3,72 рази відповідно), але не показали достовірних відмінностей щодо ефективності прояву свого терапевтичного потенціалу. Однак більш функціонально активними були CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> клітини у групі з введенням кФНК, судячи за їхньою СІФ.

Застосування КФП у моделі ХТПХ також показало біль-

Вміст транскриптів гена *ido* щодо *beta-actin*, відн. од.

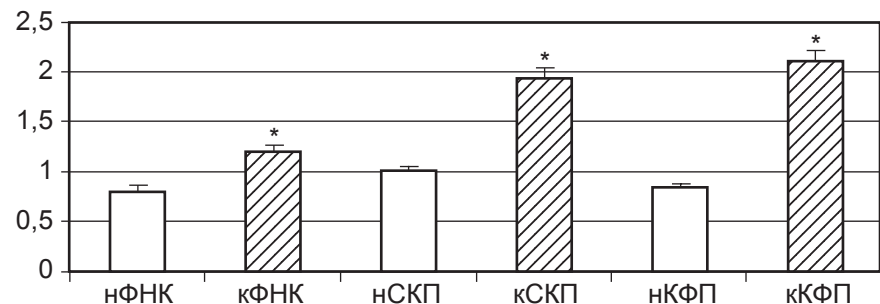


Рис. 3. Вміст транскриптів гена *ido* в нативних і кріоконсервованих клітинах ПФПК: \* — результати достовірні щодо відповідного показника нативного матеріалу ( $p < 0,05$ )

**Вміст Трег-клітин та їхня середня інтенсивність флуоресценції у селезінці реципієнтів з автоімунними захворюваннями до та після введення нативних і кріоконсервованих продуктів фетоплацентарного комплексу**

Патологія	Терапевтичний матеріал	Вид матеріалу, що вводиться	Т-регуляторні клітини		
			Вміст, % від інтактного контролю	Кратність збільшення, рази	СІФ, % від інтактного контролю
АА	Без лікування	—	<b>27,40±1,82</b>	—	<b>119,70±7,98</b>
	Суспензія клітин плаценти (СКП)	Нативна Кріо	42,31±3,65* 52,30±4,78*&	1,54 1,91	109,50±9,44 78,93±6,70*&
ЕАЕ	Без лікування	—	<b>21,53±3,32</b>	—	<b>70,16±5,33</b>
	Фетальні нервові клітини (ФНК)	Нативні Кріо	78,22±6,34* 80,07±5,23*	3,63 3,72	43,00±3,21* 79,00±5,50*&
ХТПХ	Без лікування	—	<b>31,03±2,45</b>	—	<b>54,94±3,53</b>
	Клітини фетальної печінки (КФП)	Нативні Кріо	62,07±4,50* 75,86±3,72*&	2,00 2,44	66,61±4,00 56,66±4,78

*Примітка.* За 100 % прийняті показники інтактних (здорових тварин). АА — матеріал вводили на 7-му добу, атестація через 21 добу; ЕАЕ — матеріал вводили на 14-ту добу, атестація через 14 діб; ХТПХ — матеріал вводили на 7-му добу, атестація через 14 діб; \* — результати достовірні щодо групи без лікування кожної патології; & — результати достовірні щодо групи при лікуванні нативними клітинами ( $p < 0,05$ ).

шу ефективність кріоконсервованого матеріалу щодо стимуляції вмісту Трег-клітин (у 2,44 разу). Однак показник СІФ CD25-маркера не мав достовірних відмінностей у групах із введенням нативних і кріоконсервованих КФП, що свідчить про схожий структурно-функціональний стан Трег-клітин.

Таким чином, усі види ПФПК здатні суттєво впливати на процес формування Трег-клітин за рахунок підвищення їхньої кількості та притаманної їм супресорної активності. Слід зазначити, що кріоконсервовані ПФПК характеризувалися більш виразним стимулювальним потенціалом щодо Трег-клітин. Проведені дослідження дають підставу вважати, що стимуляція Т-регуляторної ланки імунітету у тварин з експериментальними АІЗ має ІДО-залежний механізм дії. Це підтверджується результатами досліджень, у яких проводили лікування ХТПХ нативними КФП і КФП після інкубації в розчині специфічного інгібітора ІДО —

1-метилтриптофану. Введення КФП із заінгібованим ІДО значно знижувало терапевтичну ефективність використання даного матеріалу, а клінічні ознаки ХТПХ наближувалися до показників тварин, яким не проводили лікування зазначеного АІЗ [8].

Слід наголосити, що підвищення вмісту Трег-клітин після введення нативних і кріоконсервованих ПФПК корелювало зі зниженням клінічних ознак усіх вивчених автоімунних патологій (дані не наведені).

### Висновки

1. Установлено, що Трег-клітини відіграють важливу роль у контролі розвитку АІЗ, зниження вмісту цієї клітинної популяції підсилює клінічні симптоми автоімунної патології.

2. Здатність ПФПК як терапевтичного матеріалу продукувати *ідо* істотно зростала після кріоконсервування, що зумовило стимуляцію Трег-клітин у тварин з АІЗ.

3. Підтверджено ІДО-залежний молекулярний механізм

імунокоригувальної дії кріоконсервованих СКП і КФП щодо Т-регуляторної ланки імунітету при АА і ХТПХ відповідно. При ЕАЕ введення кріоконсервованих ФНК з низьким, порівняно з дослідженими ПФПК, рівнем експресії гена *ідо*, спостерігалося майже чотирикратне збільшення вмісту Трег-клітин, що може свідчити про інший механізм, окрім ІДО-залежного, стимуляції цієї субпопуляції клітин.

### ЛІТЕРАТУРА

1. *Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases* / S. Sakaguchi, N. Sakaguchi, M. Asano [et al.] // *J. Immunol.* – 1995. – Vol. 155, N 3. – P. 1151–1164.
2. *Bolon B. Cellular and molecular mechanisms of autoimmune diseases* / B. Bolon // *Toxicol. Pathol.* – 2012. – Vol. 40, N 2. – P. 216–229.
3. *Sprint J. The thymus and negative selection* / J. Sprint, H. Kishimoto // *Immunol. Rev.* – 2002. – Vol. 185, N 2. – P. 126–135.
4. *Schwartz R. H. T cell anergy* / R. H. Schwartz // *Annu. Rev. Immunol.* – 2003. – Vol. 21, N 3. – P. 305–334.



5. Shevach E. M. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression / E. M. Shevach // *Immunity*. – 2009. – Vol. 30, N 5. – P. 636–645.

6. Toda A. Development and function of naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells / A. Toda, C. A. Piccirillo // *J. Leukoc. Biol.* – 2006. – Vol. 80, N 3. – P. 458–470.

7. King N. J. Molecules in focus: indoleamine 2,3-dioxygenase / N. J. King, S. R. Thomas // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* – 2007. – Vol. 39, N 12. – P. 2167–2172.

8. Дослідження IDO-залежного механізму імунорегулюючої дії клітин фетальної печінки мишей / О. Ю. Дімітров, О. В. Сафранчук, Т. Г. Дубрава [та ін.] // Молодь та поступ біології : 9-та Міжнар. наук. конф. Львів, 16–19 квітня 2013 р. : збірник тез. – Львів, 2013. – С. 410.

9. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) expression in invasive extravillous trophoblast supports role of the enzyme for materno-fetal tolerance / A. Honig, L. Rieger, M. Kapp [et al.] // *J. Reprod. Immunol.* – 2004. – Vol. 61, N 2. – P. 79–86.

10. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and production of quinolinic acid by human microglia, astrocytes and neurons / G. J. Guillemin, G. Smythe, O. Takikawa, B. J. Brew // *Glia*. – 2005. – Vol. 49, N 1. – P. 15–23.

11. Peculiarities of functional state modulation of genetic apparatus of fetal liver cells with stemness characteristics after cryopreservation / A. N. Goltsev, E. D. Lutsenko, A. Yu. Dimitrov [et al.] // *Cryoletters*. – 2011. – Vol. 32, N 6. – P. 543–544.

12. Гольцев А. Н. Действие различных режимов криоконсервирования на проявление иммуномодулирующей активности плаценты при развитии адьювантного артрита / А. Н. Гольцев, Е. Д. Луценко, М. В. Останков // *Проблемы криобиологии*. – 2008. – № 4. – С. 456–459.

13. Міщенко О. Я. Фармакологічна ефективність емульсії анальбену на моделі ад'ювантного артриту у щурів / О. Я. Міщенко, А. А. Котвіцька // *Вісник фармації*. – 2001. – № 3. – С. 124–125.

14. Давыдова Г. С. Применение адьюванта с различным количеством БЦЖ для воспроизведения ЭАЭ у крыс / Г. С. Давыдова // *Острый энцефаломиелит в эксперименте и клинике*. – Минск : Наука и техника, 1969. – С. 32–37.

15. Пат. 59206 Україна, МПК, А01N1/02 Спосіб криоконсервування суспензії фетальних нервових клітин / Гольцев А. М., Порожан Є. О., Бабенко Н. М., Останков М. В. ; заявник і патентовласник Ін-т пробл. криобіол. і криомед. НАН України. – Заявл. 04.10.2010 ; опубл. 10.05.2011, Бюл. № 9.

16. Шевелев А. С. Реакция «трансплантат против хозяина» и трансплантационная болезнь / А. С. Шевелев. – М. : Медицина, 1976. – 237 с.

17. Херрингтон С. Молекулярная клиническая диагностика. Методы / С. Херрингтон, Дж. Макги. – М. : Мир, 1999. – 558 с.

18. Fallarino F. T cell apoptosis by tryptophan catabolism / F. Fallarino, U. Grohmann, C. Vacca // *Cell. Death Differ.* – 2002. – Vol. 9, N 10. – P. 1069–1077.

#### REFERENCES

1. Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M. et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 1995; 155 (3): 1151-1164.

2. Bolon B. Cellular and molecular mechanisms of autoimmune disease *Toxicol. Pathol* 2012; 40 (2): 216-229.

3. Sprint J., Kishimoto H. The thymus and negative selection. *Immunol. Rev* 2002; 185 (2): 126-135.

4. Schwartz R.H. T cell anergy *Annu. Rev. Immunol.* 2003; 21 (3): 305-334.

5. Shevach E.M. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 2009; 30 (5): 636-645.

6. Toda A., Piccirillo C.A. Development and function of naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *J. Leukoc. Biol* 2006; 80 (3): 458-470.

7. King N.J., Thomas S.R. Molecules in focus: indoleamine 2,3-dioxygenase. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2007; 39 (12): 2167-172.

8. Dimitrov O.Yu., Safranchuk O.V., Dubrava T.G. et al. Study of IDO-dependent mechanism of immune correcting effect of cells of mice fetal liver Youth and progress in biology. IX International Scientific Conference: Proc. of the Conference. Lviv, 2013: 410.

9. Honig A., Rieger L., Kapp M. et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) expression in invasive extravillous trophoblast supports role of the enzyme

for materno-fetal tolerance. *J. Reprod. Immunol* 2004; 61 (2): 79-86.

10. Guillemin G.J., Smythe G., Takikawa O., Brew B.J. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and production of quinolinic acid by human microglia, astrocytes and neurons. *Glia* 2005; 49 (1): 15-23.

11. Goltsev A.N., Lutsenko E.D., Dimitrov A.Yu. et al. Peculiarities of functional state modulation of genetic apparatus of fetal liver cells with stemness characteristics after cryopreservation. *Cryoletters* 2011; 32 (6): 543-544.

12. Goltsev A.N., Lutsenko E.D., Ostankov M.V. Effect of different cryopreservation regimens on manifestation of immune modulating activity of placenta at adjuvant arthritis. *Problemy Kriobiologii* 2008; 4: 456-459.

13. Mischenko O.Ya., Kotvitska A.A. Pharmacological efficiency of analben emulsion in the model of adjuvant arthritis in rats. *Visnyk Farmatsii* 2001; 3: 124-125.

14. Davydova G.S. Application of adjuvant with different amount of BCG to reproduce EAE in rats. Acute encephalomyelitis in experiment and clinic. Minsk, Nauka i Tekhnika. 1969: 32-37.

15. Patent N 59206 Ukraine IPC A01N1 02 Method of cryopreservation of fetal neuronal cell suspension Goltsev A.M., Porozhan Ye.O., Babenko N.M., Ostankov M.V.; Appl. 04.10.2010; Publ. 10.05.2011, Bul. N 9.

16. Shevelev A.S. Graft versus host reaction and transplantational disease. Moscow, Meditsyna, 1976, 237 p.

17. Herrington S., McGee J. Molecular clinical diagnostics. Methods. Moscow, Mir. 1999, 558 p.

18. Fallarino F., Grohmann U., Vacca C. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell. Death Differ* 2002; 9 (10): 1069-1077.

Надійшла 23.05.2013

