

Проявление иммунокорригирующего эффекта криоконсервированных клеток фетальной печени разных сроков гестации в условиях развития экспериментальной модели реакции «трансплантат против хозяина»

А.Н. Гольцев, Т.Г. Дубрава, Е.Д. Луценко, Л.В. Останкова, И.Ю. Мацевитая, М.В. Останков, М.А. Сироус, Е.А. Порожан, К.А. Гольцев, А.Ю. Димитров

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков

Manifestation of immune correcting effect of cryopreserved cells of fetal liver of different gestation terms under development conditions of experimental model of graft versus host reaction

A.N. Goltsev, T.G. Dubrava, E.D. Lutsenko, L.V. Ostankova, I.Yu Matsevitaya, M.V. Ostankov, M.A. Sirous, E.A. Porozhan, K.A. Goltsev, A.Yu. Dimitrov

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

В работе проведена сравнительная оценка иммунокорригирующей активности криоконсервированных и нативных клеток фетальной печени (КФП) разных сроков гестации в экспериментальной модели локальной реакции «трансплантат против хозяина» (лРТПХ). Индукцию лРТПХ проводили на мышах линии C57Bl/6 путем подкожного введения в подушечку задней лапы клеток лимфоузлов (ЛУ) линии CBA/H. Через 1 сут. после инициации лРТПХ мышам внутривенно вводили нативные (нКФП) или криоконсервированные (кКФП) КФП 14-х или 18-х сут. гестации мышей линии CBA. На 5-е сут. после инициации патологии оценивали следующие показатели: индекс РТПХ, содержание Treg (FoxP3⁺, CD4⁺CD25⁺ клеток) лимфоузлов (ЛУ) на проточном цитофлуориметре FACS Calibur (Becton Dickinson, США), экспрессию гена *tgf-β* — методом ПЦР; содержание ИЛ-2, ИЛ-10, ФНО-α в сыворотке крови животных — иммуноферментным методом на анализаторе Stat Fax 2100 (США). Установлено, что при индукции лРТПХ манифестируются признаки, характерные для заболеваний аутоиммунного генеза. В условиях развития лРТПХ, КФП минимизируют клинические признаки патологии и интенсивность развития иммуновоспалительной реакции. Терапевтическая активность КФП в большей степени коррелировала с содержанием в ЛУ FOXP3⁺ клеток и экспрессией гена *tgf-β*, но не содержанием CD4⁺CD25⁺ клеток и степенью их флуоресценции. По мере увеличения срока гестации с 14 пкд к 18 пкд иммунокорригирующая активность КФП снижалась. Однако после криоконсервирования КФП-18 приобретали иммунокорригирующую активность нКФП-14.

Ключевые слова: РТПХ, клетки фетальной печени, иммунокоррекция, Treg.

Трансплантация аллогенного костного мозга (КМ) обременена одной из серьезных проблем — развитием иммунного конфликта в виде болезни «трансплантат против хозяина» [1]. Данная патология имеет ряд признаков аутоиммунного заболевания (АИЗ) и ассоциируется с появлением в организме аутореактивного клона иммунокомпетентных клеток (ИКК), формируемого из донорских стволовых кроветворных клеток (СКК) [2]. Экспериментальным аналогом данного системного АИЗ является локальная реакция «трансплантат против хозяина» (лРТПХ), которую индуцируют введением аллогенных лимфоидных клеток в региональном к месту их введения лимфоузле (ЛУ) [3].

e-mail: cryopato@rambler.ru

In the research there has been estimated an immune correcting activity of cryopreserved and native fetal liver cells (FLCs) of different gestation terms in experimental model of local GVHR (IGVHR). IGVHR was induced in C57Bl/6 mice by means of subcutaneous introduction of CBA/H lymph nodes (LN) cells into the hindpaw pad. In 24 hrs after initiation of IGVHR the mice were intravenously injected with either native (nFLCs) or cryopreserved FLCs (cFLCs) of the 14th and 18th gestation days of CBA mice. To the 5th day after initiation of pathology the following indices were estimated: GVHR index, content of T_{reg} (FoxP3⁺, CD4⁺CD25⁺ cells) of LNs with flow cytometer FACS Calibur (Becton Dickinson, USA), the expression of *tgf-beta* gene by means of PCR; content of IL-2, IL-10, TNF-alpha in blood serum of animals by means of immune enzyme method with analyzer Stat Fax 2100 (USA). It has been established that during induction of IGVHR there are manifested the signs characteristics for the pathologies of immune genesis. Under development of GVHR, FLCs minimize clinical signs of pathologies and intensity of development of immune inflammatory reaction. Therapeutic activity of FLCs in greater extent correlated to the content in LNs of FOXP3⁺ cells and expression of *tgf-beta* gene, but not to the content of CD4⁺CD25⁺ cells and rate of their fluorescence. With the increasing of gestation terms from 14 post-coital days to 18 ones immune correcting activity of FLCs reduced. However after cryopreservation the FLCs-18 gained immune correcting activity of nFLC-14.

Key words: GVHR, fetal liver cells, immune correction, Treg.

Одной из основных причин развития АИЗ является разбалансировка состояния субпопуляций ИКК с регуляторной активностью [4, 5]. Факт причастности к развитию АИЗ нарушения гемопоэза [2, 6] определил необходимость применения при их лечении препаратов, обладающих способностью комплексно корригировать состояние иммунокомпетентной сферы и гемопоэтического плацдарма [2]. Коррекция иммунокомпетентной сферы при аутоиммунной агрессии предусматривает необходимость подавления эффекторного и (или) активации регуляторного звена ИКК с супрессорной активностью, как основного гаранта обеспечения естественной толерантности. Неоднократно отмечалась

уникальная способность мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) оказывать гемато- и иммунокорригирующий эффект [7]. Для таких целей используют ММСК, полученные из КМ путем серийных пассажей *in vitro* [8]. Однако указанная способность ММСК снижается уже через 24–48 ч культивирования, что обусловлено нарушением их метаболических характеристик, появлением признаков старения и (или) апоптоза [9]. Потенциально гемато- и иммунокорригирующей активностью и, соответственно, возможностью применения для лечения РТПХ, обладает фетальная печень (ФП), в которой СКК и ММСК являются основными структурными компонентами [2]. Вместе с тем известно, что по мере пролонгации сроков гестации изменяется как компонентный состав, так и функциональный статус клеток фетальной печени (КФП) [10, 11], а, следовательно, вполне реальна возможность изменения и их терапевтического потенциала, в том числе при лечении АИЗ.

Неоднократно отмечалось, что в общем технологическом процессе аппликации фетальных тканей в клинической практике обязательным компонентом является их криоконсервирование [12]. Это, прежде всего, обусловлено необходимостью хранения материала и его применения по мере востребованности, а также обязательной сертификации качественных его характеристик и стерильности. При этом известно, что эффективность криоконсервирования биообъекта определяется его исходным структурно-функциональным состоянием [11]. То есть КФП разных сроков гестации, априори имея разный исходный статус и различную криочувствительность, по-разному могут изменять и терапевтический потенциал. Такого рода предположения могут найти подтверждения либо опровержения в экспериментальных исследованиях, включая моделирование различных форм АИЗ.

На основании сказанного, целью исследования была оценка особенностей модуляции субпопуляций регуляторных Т-клеток и в целом иммунокомпетентной сферы животных с лРТПХ после применения нативных и криоконсервированных КФП разных сроков гестации.

Материал и методы

Эксперименты проводили на мышах линий С57В1/6, СВА/Н 3-месячного возраста, массой 22–24 г в соответствии с Международными принципами «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1985).

Выделение КФП 14-го (КФП-14) и 18-го (КФП-18) посткоитального дня (пкд), а также клеток взрослой печени (КВП) проводили на рабочей среде 199 с 10% эмбриональной сывороткой коров и 2% цитратом натрия; криоконсервировали по ранее описанной методике [11]. Клетки ЛУ выделяли путем их гомогенизации на той же среде.

Локальную РТПХ (лРТПХ) индуцировали у мышей линии С57В1/6 путем подкожного введения им 2×10^7 клеток ЛУ мышей линии СВА/Н в объеме 0,1 мл (в рабочей среде) в подушечку задней лапы по общепринятой методике [3]. Контрольным мышам линии С57В1/6 вводили физиологический раствор.

Определение основных показателей лРТПХ: количества клеток в опытном (региональном к месту введения) и контрольном ЛУ, индекса РТПХ (Инд.РТПХ) — отношение количества клеток в опытном ЛУ к конт-

рольному проводили на 5 сут. после инициации патологии [3].

Введение КФП: нативные (нКФП) или криоконсервированные (кКФП) КФП разных сроков гестации (КФП-14 или КФП-18) мышей линии СВА вводили внутривенно в количестве 5×10^6 кл/мышь через 1 сут. после инициации лРТПХ. В качестве контроля вводили КВП в той же дозе.

Фенотипические характеристики клеток ЛУ определяли на проточном цитофлуориметре FACS Calibur (Becton Dickinson, США) с использованием флуорохромных (FITC или PE) конъюгатов моноклональных антител (BD Bioscience, США) к FoxP3, CD4, CD25 структурам согласно инструкции фирмы-производителя. Помимо процентного содержания FoxP3⁺, CD4⁺CD25⁺ клеток оценивали степень экспрессии этих молекул по средней интенсивности флуоресценции (СИФ).

Экспрессию гена *tgf-β* определяли методом ОТ-ПЦР. Праймер гена *tgf-β* был сконструирован на основе базы данных на сайте «GenBank» NCBI BLAST, США и синтезирован в АОЗТ «Медбиосервис» (Киев). Амплификацию фрагментов ДНК проводили в термостате «Терцик» ЗАО «НПФ ДНК-технология» (Россия). Последующие этапы реакции выполняли согласно общепринятым рекомендациям [13]. Детекцию продуктов амплификации и количественный анализ проводили методом капиллярного электрофореза в чип-анализаторе «Agilent 2100» (США). По наличию специфического фрагмента амплификации размером 200–350 пар нуклеотидов судили о присутствии искомого продукта в анализируемом материале. Маркер молекулярных весов, вносимый в отдельную лунку, служил контролем для определения размера фрагментов ПЦР.

Содержание цитокинов: ИЛ-2, ИЛ-10, ФНО-α в сыворотке крови животных с лРТПХ определяли иммуноферментным методом на анализаторе Stat Fax 2100 (США) с помощью наборов реагентов фирмы BD Pharmingen по прилагаемым протоколам.

Индекс суммарной степени отклонения (ССО) [14] использовали для интегральной оценки иммунокорригирующей способности КФП. Индекс выражается в условных единицах и представляет собой сумму значений отклонений исследуемых показателей в процентах от контроля, деленную на 100. Наименьшее значение ССО характеризует лучший эффект КФП при лечении патологии.

Полученные данные статистически обрабатывали по методу Стьюдента с применением компьютерной программы MS Excel.

Результаты и обсуждение

Известно, что в экспериментальной модели лРТПХ, манифестируемая ответная реакция ЛУ на введение аллогенных лимфоцитов является обоюдно направленной реакцией донорских и клеток реципиента. Выраженность инд. РТПХ более 1,5 считается четким свидетельством развития этой реакции [1]. То есть, установленное нами двукратное увеличение инд. РТПХ в сравнении с контролем подтверждает развитие этой реакции. В условиях развития лРТПХ более, чем в три раза снижалась концентрация FOXP3⁺ клеток (табл.), которые характеризуются как Treg [15]. Оценка СИФ FOXP3⁺ клеток продемонстрировала снижение содержания в них FoxP3 белка, концентрация которого, коррелирует с активностью FOXP3⁺ клеток [15].

Сравнительная оценка показателей, характеризующих развитие ЛРТПХ.

Группы животных	Исследуемый показатель								
	Инд. РТПХ	FOXP3+ клетки		CD4+/CD25+ клетки		Уровень экспрессии гена <i>tgf-β</i> , % от контроля	Уровень цитокинов, % от контроля		
		%	СИФ	%	СИФ		ИЛ-2	ФНО-α	ИЛ-10
Контроль (интакт.)	1,0±0,1	2,16±0,3	3774±247,7	2,61±0,2	1232,2±98,3	100	100	100	100
лРТПХ	2,04±0,3*	0,65±0,04*	1790±189,5*	1,47±0,1*	755,8±72,3*	39±0,3*	140,0±1,3*	130,0±1,1*	86,9±0,9*

Примечание: * — статистически достоверные отличия от контроля ($P < 0,05$); СИФ — средняя интенсивность флуоресценции.

На протяжении длительного времени дискутируется вопрос по поводу идентичности пула FOXP3⁺ и CD4⁺CD25⁺ клеток, проявления их иммуносупрессивной активности и соподчиненности понятию Т-регуляторные (Treg) клетки [5]. Как видно, в контроле показатели процентного содержания этих субпопуляций в ЛУ были достаточно близки. Вместе с тем, оценка СИФ по маркеру CD25, имеющему приоритетную значимость для включения этих клеток в категорию Treg, показала, что она в 3 раза уступала СИФ FOXP3⁺ клеток. При этом видно, что при ЛРТПХ эти показатели снижались в 1,6 и 2,1 раза для CD4⁺CD25⁺, FOXP3⁺ клеток соответственно.

Известно, что в реализации супрессорной функции Treg активное участие принимает трансформирующий ростовой фактор-β (TGF-β) [16]. Этот медиатор индуцирует экспрессию рецептора ИЛ-2 (CD25) и гена белка FoxP3 в CD4⁺/CD25⁺ Т-хелперах, переводя их в категорию Treg. Полученные нами результаты показали снижение в условиях развития ЛРТПХ степени экспрессии гена *tgf-β* в клетках ЛУ в 2,5 раза в сравнении с контролем.

Как и для многих АИЗ, в том числе и системных [17], при ЛРТПХ было отмечено перераспределение цитокинового профиля организма (см. табл.). Так, повышался уровень воспалительных цитокинов ФНО-α, ИЛ-2 и снижался уровень противовоспалительного ИЛ-10.

КФП, как препарат лечения ЛРТПХ, оказывали выраженный корректирующий эффект в отношении всех исследуемых показателей. Как следует из рис. 1, инд. РТПХ в наибольшей степени приближался к уровню контроля у животных после применения нКФП-14 и кКФП-18. Интересно, что до криоконсервирования КФП-18 проявляли более низкий корректирующий эффект, тогда как КФП-14 после криоконсервирования теряли его.

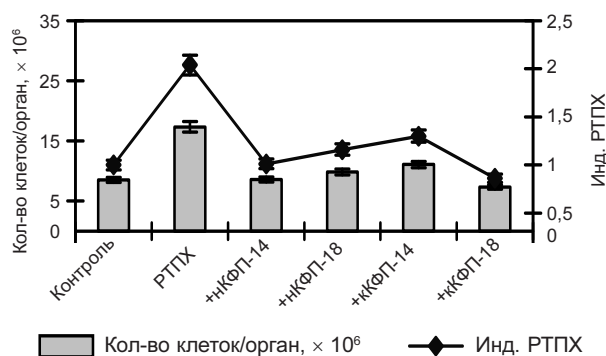


Рис. 1. Инд. РТПХ и количество клеток в региональном ЛУ у животных с ЛРТПХ до и после применения КФП разного вида и срока гестации

Насколько изменение клинических признаков ЛРТПХ в виде инд. РТПХ коррелирует с изменением показателей иммунокомпетентной сферы организма реципиентов? Результаты показали, что максимальная коррекция процентного содержания FOXP3⁺ клеток наблюдалась также после введения нКФП-14 и кКФП-18 (рис. 2А). Однако обращает на себя внимание тот факт, что после применения кКФП-18 СИФ в FOXP3⁺ клетках была почти в 1,5 раза ниже, чем после введения нКФП-14. Бесспорно, что кКФП-18 активируют формирование Treg, которые идентифицируются цитофлуориметрически как FOXP3⁺ клетки, но с более низкой концентрацией скурфина [5]. Еще более удивительными оказались результаты оценки «индуцибельного» потенциала в отношении этих показателей нКФП-18. Корректирующий их эффект был минимальным, судя по процентному содержанию FOXP3⁺ клеток, однако по СИФ он имел максимальную выраженность.

Иная картина наблюдалась при анализе содержания CD4⁺CD25⁺ Т-лимфоцитов (рис. 2Б). Известно, что эти клетки предупреждают развитие заболеваний аутоиммунного генеза, в системе *in vitro* ингибируют эффекторные клетки, проявляют ряд других иммуносупрессивных эффектов и также входят в когорту Treg [5, 15]. Однако в условиях развития ЛРТПХ и применения КФП их поведение существенно отличалось от FOXP3⁺ клеток. Во-первых, не было обнаружено, как для FOXP3⁺ клеток, «синхронизированного» проявления корректирующего эффекта нКФП-14 и кКФП-18. Кроме того, была очевидной превалирующая «индуцибельность» в отношении повышения концентрации CD4⁺CD25⁺ клеток криоконсервированных КФП. Такого рода феноменология могла быть обусловлена имеющимися в некоторых случаях место изменениями после криоконсервирования иммуногенных характеристик аллогенного материала [2] и возможной активации субпопуляции клеток реципиента с низким профилем экспрессии рецептора ИЛ-2 (CD4⁺CD25^{low}), которые функционально не являются Treg [5]. Однако, СИФ этих клеток по CD25 маркеру в группах животных с введением криоконсервированных КФП не существенно отличался от его уровня у контрольных (интактных) мышей. Более того, мы наблюдали почти такой же эффект и после введения сингенных криоконсервированных кКФП-14 и кКФП-18 (данные не представлены). Как приведено в работе [5], формирование CD4⁺CD25⁺ регуляторных клеток в периферическом отделе ИС может реализоваться путем «периферической дифференцировки» CD4⁺CD25⁺ клеток в Treg с фенотипом CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺. В таком случае, потенциал индукции экспрессии маркера ИЛ-2 у КФП (вне зависимости от срока гестации) после криоконсервирования становится более выраженным.

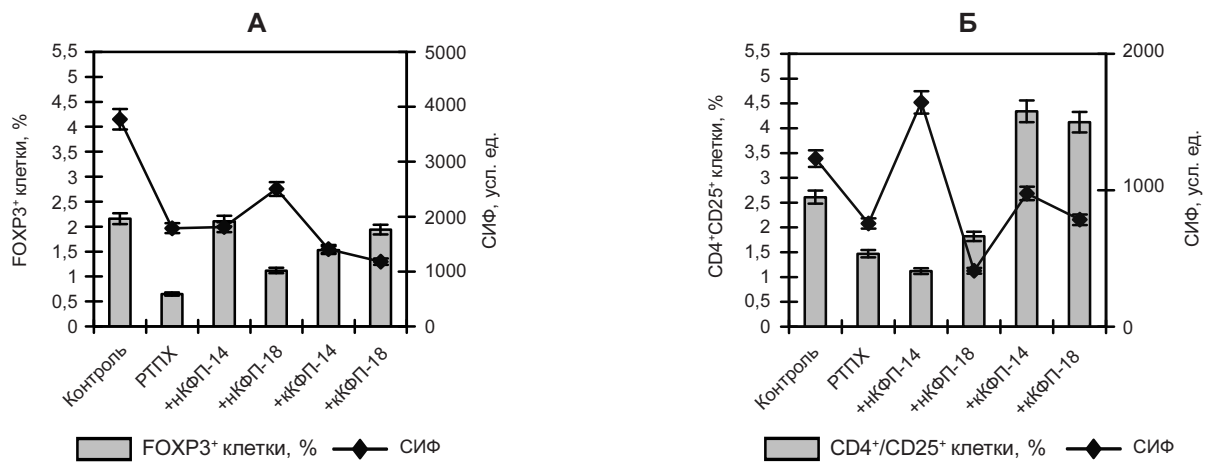


Рис. 2. Содержание FOXP3⁺ (А) и CD4⁺CD25⁺ клеток (Б) в региональном ЛУ у животных с лРТПХ до и после применения КФП разного вида и срока гестации

Весьма интригующими оказались данные оценки степени экспрессии гена *tgf-β*, которая, как видно из рис. 3, в большей мере коррелировала с характером восстановления содержания не CD4⁺CD25⁺ клеток, а FOXP3⁺ Treg. Как известно, TGF-β играет важную роль в развитии и реализации супрессивной функции Treg в периферическом компартменте ИС [16] и представляет собой один из основных триггеров экспрессии ИЛ-2R. Эту активность TGF-β реализует в тесной кооперации с незрелыми дендритными и некоторыми другими клетками, для которых он является и аутокринным фактором [16]. Особую значимость, при этом, играют элементы стволового компартмента стромы, прежде всего, упоминавшиеся выше ММСК [7]. Архиважным компонентом иммуномодулирующей активности ММСК является вырабатываемый ими уникальный по своему потенциалу фермент индоламин 2, 3-диоксигеназа (ИДО), которому принадлежит ключевая роль в активации супрессорного звена ИС [18]. Ранее мы отмечали, что после криоконсервирования такого рода активность ММСК в КФП может изменяться, и приводили возможные предположения такого рода изменений [12]. Недавно нами была подтверждена активация гена ИДО в ФП мышей 18 сут. гестации после криоконсервирования (работа в печати). Похоже, что различный характер модификации содержания в ЛУ FOXP3⁺, CD4⁺CD25⁺ клеток после применения кКФП разных сроков гестации подтверждает возможность реализации событий по такому вектору. Эти данные также говорят о том, что криоконсервирование в одном и том же режиме в зависимости от срока гестации КФП может индуцировать либо экспрессию новых, либо ингибировать действие уже имеющихся активных начал, точкой приложения которых могут быть сигнальные пути наработки FoxP3 белка и (или) ИЛ-2R.

Не удивительно, что модификация состояния субпопуляций регуляторных клеток после применения КФП находит свое отражение и в изменении цитокинового профиля организма *in general* (рис. 4). Представленные на этом рисунке данные позволяют получить информацию об интегральном ответе иммунокомпетентной сферы мышей с лРТПХ на КФП и оценить, какие из этих показателей в наибольшей мере коррелируют с улучшением клинического статуса животных. Итак, в очередной раз подтверждено, что максимально выраженный эффект коррекции оцененных показателей

наблюдается после применения нКФП-14 и кКФП-18. Очевидно, что интегральный корректирующий эффект присущ именно фетальному материалу, так как введенные в качестве контроля клетки взрослой печени (КВП) не обладали такой активностью.

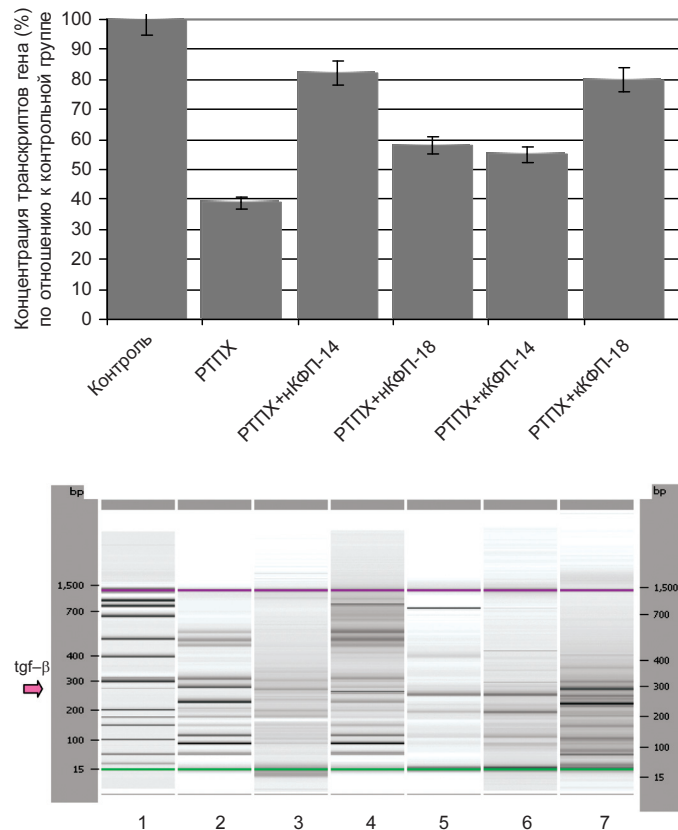


Рис. 3. Степень экспрессии клетками ЛУ реципиентов с лРТПХ гена *tgf-β*. На электрофореграмме: первая дорожка – молекулярный маркер фрагментов; 2–7 дорожки – исследуемые группы. Длина фрагмента транскрипции гена *tgf-β* 200–350 п.н.

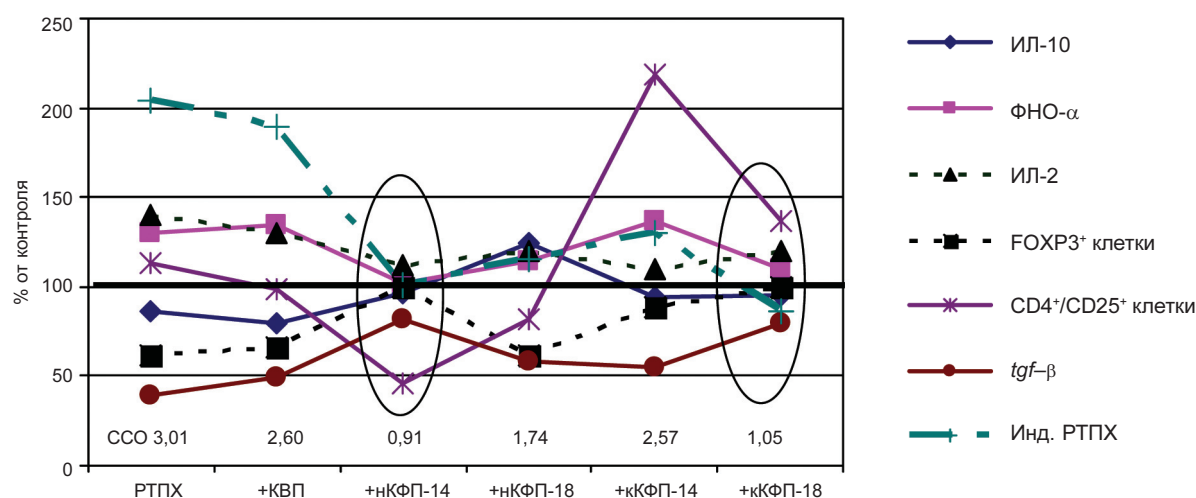


Рис. 4. Интегральная оценка исследуемых показателей (% от контроля) в экспериментальной модели лРТПХ до и после лечения КФП разного вида и срока гестации. Минимальный показатель ССО соответствует максимальному корригирующему эффекту КФП

Выводы

Установлено, что при индукции лРТПХ манифестируются признаки изменения состояния иммунокомпетентной сферы организма, характерные для заболеваний аутоиммунного генеза. Очевидно, что лечебный эффект КФП, сопровождающийся минимизацией клинических признаков данной патологии и интенсивности развития иммуновоспалительной реакции, реализуется через коррекцию состояния субпопуляций ИКК с ре-

гуляторной активностью (Treg). Терапевтическая активность КФП в большей степени коррелировала с восстановлением количественного содержания в ЛУ FOXP3+ клеток и экспрессией гена *tgf-β*, но не содержанием CD4+CD25+ клеток и степенью их флуоресценции. По мере увеличения срока гестации с 14 пкд к 18 пкд иммунотоксическая активность КФП снижалась. Однако после криоконсервирования КФП-18 приобретали иммунотоксическую активность нКФП-14.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Шевелев А.С. Реакция «трансплантат против хозяина» и трансплантационная болезнь. Москва: Медицина; 1976: 237.
2. Грищенко В.И., Гольцев А.Н. Трансплантация продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса. От понимания механизма действия к повышению эффективности применения. Пробл. криобиологии 2002; (1): 54–84.
3. Кудрина Г.П., Алтынбаева Р.Ф., Буров Ю.В. Методические рекомендации по оценке иммуноотоксических свойств фармакологических средств. Москва; 1992: 39.
4. Belkaid Y., Piccirillo C.A., Mendez S. et al. CD4+CD25+ regulatory T cells control Leishmania major persistence and immunity. Nature 2002; 420(2): 502–7.
5. Ярилин А.А. Естественные регуляторные Т-клетки и фактор FOXP3. Иммунология 2006; (3): 176–88.
6. Hirohata S., Yanagida T., Hashimoto H. et al. Suppressive influences of methotrexate on the generation of CD14+ monocytelineage cells from bone marrow of patients with rheumatoid arthritis. Clin. Immunol. Immunopathol. 1999; 91(1): 84–9.
7. Djouad F., Plence P., Bony C. et al. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. Blood 2003; 102: 3837–44.
8. Le Blanc K., Tammik L., Sundberg B. et al. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. Scand. J. Immunol. 2003; 57: 11–20.
9. Cognet P.A., Minguell J.J. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. J. Cell Physiol. 1999; 181: 67–73.

10. Marcos M.A.R., Morales-Alcay S., Godin J.E. et al. Antigenic phenotype and gene expression pattern of lymphohemopoietic progenitors during early mouse ontogeny. J. Immunol. 1997; 158: 2627–37.
11. Гольцев А.Н., Дубрава Т.Г., Останкова Л.В. и др. Особенности влияния криоконсервирования на функциональный потенциал стволовых кроветворных клеток фетальной печени разных сроков гестации. Пробл. криобиологии 2009; 19(2): 186–99.
12. Goltsev A.N., Grisichenko V.I., Sirous M.A. et al. Cryopreservation: an optimizing factor for therapeutic potential of fetoplacental complex products Biopreservation and biobanking 2009; 7(1): 29–38.
13. Молекулярная клиническая диагностика. Под ред. С. Херрингтона и Дж. Макги. Москва: Мир; 1999: 558.
14. Пат. № 2004031694 Украина, МПК А61В5/00. Спосіб порівняльної оцінки ефективності лікування. Гольцев А.М., Останкова Л.В., Луценко О.Д. и др. Заявлено 09.03.04; Пул. 15.12.2004. Бюл.(12): 3.12.
15. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. Nat. Immunol. 2005; 6: 345–52.
16. Sugita S., Futagami Y., Hori S., Mochizuki M. Transforming growth factor producing FoxP3+CD4+CD25+ T cells by iris pigment epithelial cells display regulatory phenotype and acquire regulatory functions. Exp. Eye Res. 2007; 85(5): 626–36.
17. Sakaguchi S. Animal models of autoimmunity and their relevance to human diseases. Curr. Opin. Immunol. 2000; 12: 684–90.
18. Mellor A.L., Chandler Ph., Lee G.K. et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase, immunosuppression and pregnancy. J. Reproductive Immunol. 2002; 57: 143–50.

Поступила 05.07.2010