

УДК 616.381-002.092.4:618.393.018.82:615.014.41

**РОЛЬ НАТУРАЛЬНЫХ Т-РЕГУЛЯТОРНЫХ КЛЕТОК В ПАТОГЕНЕЗЕ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АЛЛЕРГИЧЕСКОГО ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТА
И ВОЗМОЖНЫЕ ПУТИ КОРРЕКЦИИ ДАННОЙ ПАТОЛОГИИ
КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫМИ ФЕТАЛЬНЫМИ НЕРВНЫМИ КЛЕТКАМИ**

*ГОЛЬЦЕВ А.Н., ПОРОЖАН Е.А., ОСТАНКОВ М.В., ДУБРАВА Т.Г.,
БАБЕНКО Н.Н., ГАЕВСКАЯ Ю.А., БОНДАРОВИЧ Н.А.*

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

Рассеянный склероз (РС) является аутоиммунным заболеванием (АИЗ) центральной нервной системы (ЦНС) [1]. В сложных каскадных механизмах развития РС, течение которого сопровождается хроническим воспалением, первичной демиелинизацией, аксональным повреждением, основная роль отводится Т-клеткам [2]. Нарушение иммунной толерантности к антигенам ЦНС на фоне развития дисрегуляторного состояния Т-системы иммунитета у людей с генетической предрасположенностью является ключевым звеном патогенеза РС. Как известно, центральная толерантность, формируемая в тимусе в процессе положительной и отрицательной селекции, иногда является неполной, что приводит к появлению аутореактивных Т-клеток [3]. Дополнительным этапом их элиминации и минимизации проявления активности является реализация периферической толерантности, которая управляет аутореактивными Т-клетками и поддерживает тонкий баланс между иммунными реакциями на чужеродные и аутоантигены в течение жизни человека [4]. Получены убедительные данные о том, что при РС наблюдается срыв не только центральной, но и периферической толерантности [5]. В качестве причины аутоиммунного воспаления в ЦНС рассматривают нарушение равновесия между клетками, вызывающими тканевое повреждение, и как следствие, демиелинизацию (активированные Т-эффекторные клетки), и клетками, которые способны регулировать (супрессировать) функцию аутореактивных Т-клеток (Т-регуляторные – Трег) [3]. В общем пуле клеток с такого рода активностью выделяют натуральные Трег (нТрег) клетки, которые формируются в тимусе, и индуцированные (иТрег), формируемые на периферии в процессе активации наивных CD4⁺ Т-лимфоцитов [6]. Имеется достаточно данных, свидетельствующих о снижении, как количества, так и функциональной активности Трег клеток на периферии при экспериментальном аллергическом энцефаломиелите (ЭАЭ), как аналога РС [7]. В работе [8] указывается на то, что причинами нарушения формирования и функциональной активности иТрег клеток может быть изменение состояния тимуса.

При этом указывается на возможное участие в этом процессе дендритных клеток (ДК) тимуса [5].

В ряде исследований акцентируется внимание на том, что восстановление или повышение функциональной активности Трег клеток должно лежать в основе терапии РС [6]. На сегодняшний день в лечении РС достаточно хорошо зарекомендовали себя препараты клеточной и тканевой терапии, а именно, фетальные нервные клетки (ФНК) [8]. При этом подчеркивается, что применение такого вида терапии в клинической практике связано с необходимостью хранения биоматериала на протяжении различного времени. Очевидно, что наиболее приемлемым методом хранения биообъектов является криоконсервирование [9]. Вместе с тем, до настоящего времени нет убедительных данных о влиянии криоконсервированных ФНК (кФНК) на состояние тимуса, а именно, на содержание в нем Трег клеток при развитии ЭАЭ, что и явилось целью данного исследования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе были использованы беспородные белые крысы массой 150-190 г, содержащиеся в стандартных условиях вивария Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины. Исследования проводили в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными III Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2007) и согласованными с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или других научных целей» (Страсбург, 1985г.).

Для индукции ЭАЭ [10] использовали гомогенат гомологичной спинномозговой ткани (50 мг) с полным адьювантом Фрейнда, содержащим 2-4 мг/мл *Mycobacterium tuberculosis* [11]. Контрольной группе животных вводили физиологический раствор в аналогичном объеме. Тяжесть клинической картины заболевания оценивали по пятибалльной шкале [10].

Мононуклеары периферической крови получали центрифугированием взвеси клеток в градиенте фиколл-верографина (d=1,077).

Тимус извлекали из загрудинного пространства, отмывали от крови физиологическим раствором. Массу органа определяли на электронных весах AxisR AD50 (Польша) после удаления жидкости на фильтровальной бумаге.

Суспензию клеток тимуса готовили путем гомогенизации органа в растворе Хенкса. Суспензию фильтровали через капроновый фильтр и центрифугировали 10 минут при 1000 об/мин. Подсчет количества клеток осуществляли в камере Горяева.

Имунофенотип клеток тимуса и мононуклеаров периферической крови оценивали на проточном цитофлуориметре (FACS Calibur, BD, США) с помощью моноклональных антикрысиных антител (МАТ). Использовали МАТ (BD Pharmingen™, США) к CD25, меченные Fluorescein isothiocyanate (FITC) и CD4, меченные phycoerythrin (PE). Общую популяцию дендритных клеток тимуса оценивали с помощью МАТ к DC. В качестве контроля использовали пробы с добавлением неиммунных меченных FITC МАТ того же изотипа, что и антитела против исследуемого маркера.

Для каждого антигена была проанализирована средняя интенсивность флуоресценции (СИФ), которую выражали в условных единицах (у.е.), соответствующих среднему каналу максимального свечения маркера.

Учет и анализ результатов осуществляли с помощью программы WinMDI 2.9.

Полученные данные FACS-анализа исследуемых популяций клеток тимуса были пересчитаны на абсолютное количество клеток в органе и выражены в процентном соотношении от показателей контрольной группы, значения которой были приняты за 100%.

Для получения суспензии ФНК ткань мозга эмбрионов крыс 11 суток гестации гомогенизировали в 3 мл бесцветного раствора Хенкса, содержащего 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС). Все манипуляции проводили на холоду при +4°C.

ФНК замораживали на программном замораживателе УОП-6 (СКТБ с ОП ИПКиК НАН Украины г. Харьков) в пластиковых ампулах Nunc (Германия), объемом 1,8 мл с концентрацией 5×10^6 /мл по 2 режимам [12, 13] с криопротектором диметилсульфоксидом (ДМСО) в конечной концентрации 7% (режим 1) и 10% (режим 2). В качестве среды криоконсервирования использовали раствор Хенкса с добавлением 0,6% глюкозы, 10% ЭТС, 0,2 Ед/мл инсулина [12].

Отогрев образцов проводили на водяной бане при температуре 37°C.

Размороженные ФНК вводили на 14-е сутки развития ЭАЭ [14] внутривентриально в дозе 5×10^6 клеток на 100г массы тела животного. В качестве сравнения в той же концентрации вво-

дили нативные ФНК (нФНК); контролем служили взрослые нервные клетки (ВНК), введенные в те же сроки и в аналогичной концентрации.

Статистический анализ проведен с использованием программы статистической обработки данных BioStat 2008 Professional версия 5.2.5.0. на персональном компьютере с использованием U-критерия Манна – Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Идентификацию Трег клеток можно проводить по ряду рецепторных структур, а именно, CD4, CD25, GITR, CD152 (CTLA4), CD39, CD73, CD101, CD103, CD127 и FR4 [15]. Тем не менее, общепризнанным маркером Трег клеток является внутриклеточный белок Foxp3. Именно с ним связывают супрессорный потенциал этих клеток [16]. Для идентификации Трег клеток в большинстве случаев используют метод двойного маркирования по CD4 и CD25 структурам [15]. Экспрессия Foxp3 сопровождается повышенной экспрессией CD25 маркера. Поэтому, клетки с фенотипом CD4⁺CD25^{hi} обладают супрессорной функцией и их относят к Трег. Однако, это касается лишь индуцированных на периферии Трег клеток. Для сформированных в тимусе нТрег клеток повышенная экспрессия CD25 маркера не обязательна. Проведенные нами исследования показали (рис.1), что в тимусе содержание CD4⁺CD25⁺ клеток совпадает с содержанием CD4⁺Foxp3⁺ клеток.

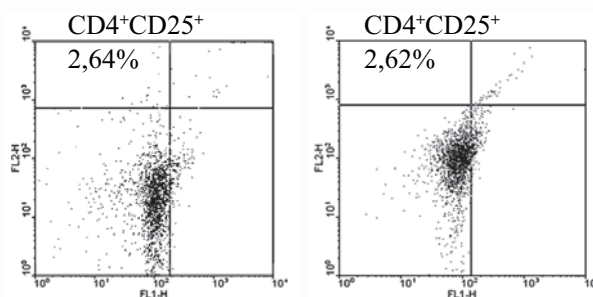


Рис.1 Содержание CD4⁺CD25⁺ и CD4⁺Foxp3⁺ клеток в тимусе здоровых крыс

Это согласуется с данными литературы [17], свидетельствующими о том, что 94% CD4⁺CD25⁺ тимических клеток экспрессируют белок Foxp3 и продуцируют ТФР-β и ИЛ-10. То есть, тимические CD4⁺CD25⁺ клетки потенциально обладают супрессорной функцией и являются нТрег клетками.

Как видно из рис.2, при развитии ЭАЭ содержание этих клеток существенно меняется по мере развития патологии. В частности, продемонстрировано выраженное волнообразное изменение содержания CD4⁺CD25⁺ клеток. Так, достоверное снижение их содержания на 7-е сутки свидетельствует о нарушении формирова-

ния данного пула клеток уже на начальных этапах развития патологии. Снижение содержания Трег клеток при развитии ЭАЭ было отмечено в этот срок и на периферии (рис.3), что совпадает с данными, полученными [15]. По мнению [18], причиной этому может быть нарушение продукции тимусного стромального лимфопоэтина (ТСЛП), влияющего на формирование Трег клеток. Не исключаются также нарушения в различных ко-стимуляторных сигнальных каскадах, опосредованных молекулами CD28, ИЛ-2R, рецептором к ТСЛП, CD154, GITR, STAT5, которые также могут нарушать формирование нТрег клеток [19].

С 14-х суток развития патологии количество CD4⁺CD25⁺ клеток существенно повышалось (в

3,5±0,13 раза) и хотя в дальнейшем их содержание снижалось, оставалось все же на более высоком уровне, чем в контроле (рис.2). Удивительно, но на периферии содержание CD4⁺CD25^{hi} клеток на 14-е сутки снижалось почти в 30 раз по сравнению с контролем (рис.3). Это совпадает с данными литературы [18] о нарушении экспортной функции тимуса при ЭАЭ. Возможно, что формируемые в тимусе Т-клетки, включая и нТрег, являются недостаточно зрелыми для выхода на периферию. После положительной селекции тимоциты имеют «полузрелый» клеточный фенотип (Qa-2^{low}CD62L^{low}HSA^{high}CD69^{high}), что связано с чувствительностью их к апоптотическим сигналам [17].

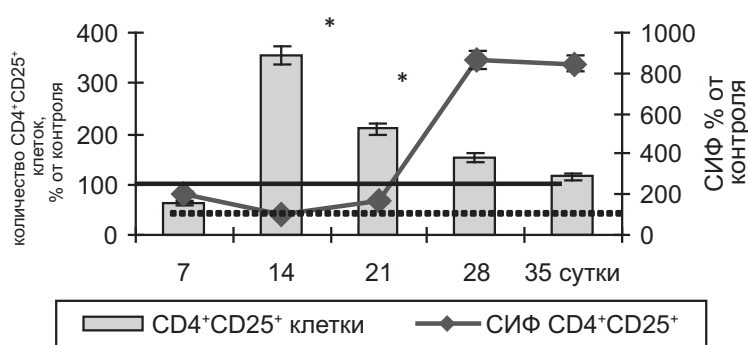


Рис.2. Содержание CD4⁺CD25⁺ клеток и их СИФ в тимусе крыс при ЭАЭ

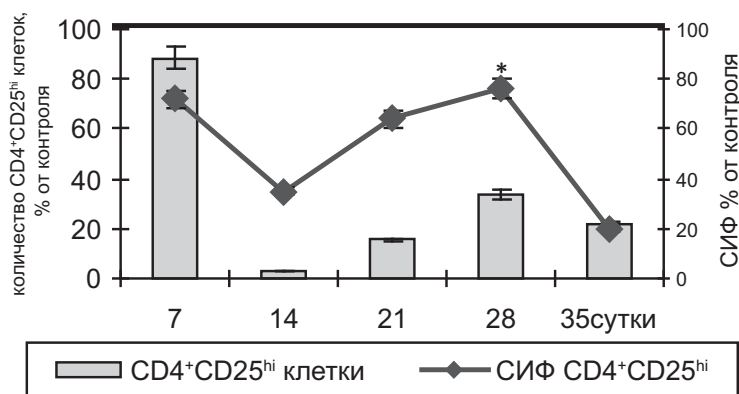


Рис.3. Содержание CD4⁺CD25^{hi} клеток и их СИФ в периферической крови крыс с ЭАЭ

Зрелый поверхностный фенотип Qa-2^{high}CD62L^{high}HSA^{low}CD69^{low} имеют тимоциты, мигрирующие на периферию. Снижение экспрессии CD69 маркера как правило наблюдается на фоне повышения уровня его антагониста S1P (sphingosine-1-phosphate). Именно S1P контролирует эмиграцию тимоцитов и его экспрессия снижается при развитии ЭАЭ. Непосредственно экспрессию S1P и тимическую эмиграцию контролирует транскрипционный фактор KLF2 (Kruppel-like factor 2) [17]. То есть причиной нарушения эмиграции нТрег клеток является отсутствие

либо низкий уровень транскрипции фактора KLF2. Важно заметить, что и в нашей работе тимоциты с фенотипом CD4⁺CD25⁺, судя по СИФ, имеют достоверно более высокий уровень экспрессии CD25 маркера в сравнении с контролем на протяжении всего периода наблюдения.

Известно [16], что с помощью CD4 и CD25 рецепторов клетки контролируют силу и продолжительность иммунного ответа. Они синергично с ДК ингибируют активацию и функции Т-эффекторных клеток [5]. При помощи CD25 — рецептора к ИЛ-2 происходит захват ИЛ-2 и сек-

вестрация рецептора у эффекторных Т-клеток, что препятствует их активации после связывания с антигеном главного комплекса гистосовместимости (ГКГ) [19]. Поэтому, существенное изменение степени экспрессии CD25 маркера (определяемое по СИФ) на этих клетках по мере развития ЭАЭ, видимо, действительно имеет особое значение. Несмотря на то, что содержание CD4⁺CD25⁺ клеток на 7-е сутки развития патологии было достоверно снижено, однако по СИФ (рис.2), экспрессия CD25 маркера в 2 раза превышала контрольные значения в эти сроки наблюдения. Удивительно, даже сформировавшиеся на 14-е сутки в значительно большем количестве, чем в контроле, CD4⁺CD25⁺ клетки имели СИФ на уровне контроля. Не менее интересным является и тот факт, что на 28- и 35-е сутки даже на фоне близкого к контролю содержания CD4⁺CD25⁺ клеток в тимусе и существенно повышенной их СИФ, содержание периферических CD4⁺CD25^{hi} Трег клеток и их СИФ значительно уступали показателям контроля. Данный факт свидетельствует о том, что в условиях развития ЭАЭ, формируемая в тимусе субпопуляция CD4⁺CD25⁺ клеток, на каждом исследуемом этапе патологии имеет не только количественные, но и качественные различия в сравнении с контролем. Более того, динамика изменения СИФ тимических CD4⁺CD25⁺ клеток говорит о том, что на 28-е и 35-е сутки они находятся в состоянии гиперактивности. Вполне вероятно, что такое их состояние обуславливает при ЭАЭ нарушение их экспорта на периферию, что и подтверждается данными, представленными на рис.3.

Механизмы формирования Трег клеток в тимусе и их эмиграция на периферию изучены недостаточно и на сегодняшний день этот вопрос является особенно актуальным. Установлено, что в формировании и созревании Трег клеток в тимусе участвуют тельца Гассала [16]. Долгое время функция этих тимических телец оставалась невыясненной. На данный момент известно, что они продуцируют ТСЛП, который, влияя на тимические ДК, индуцирует дифференцировку наивных Т-клеток в Трег [5]. Нарушение экспорта зрелых CD4⁺CD25⁺ клеток из тимуса может быть связано с ингибцией секреции ТСЛП, наблюдаемой при ЭАЭ [21]. Кроме того, было показано, что ДК в тимусе способны стимулировать дифференцировку нТрег клеток [22]. Однако не все тимические ДК обладают подобной функциональной активностью. В тимусе присутствуют как миелоидные ДК (мДК), так и плазматоцитидные ДК (пДК) [23]. Основной популяцией ДК в тимусе являются мДК, которые преимущественно продуцируют цитокины Тх1 типа: ИЛ-6, ИЛ-12, ФНО-α и ИНФ-γ. Минорной популяцией в тимусе являются пДК, которые секретируют в больших количествах ИНФ-α и -β, а также ИЛ-4 и ИЛ-10,

которые переключают дифференцировку Тх0 в Тх2.

В условиях *in vitro* показано, что тимические пДК, активированные лигандом CD40 (CD40L) и ИЛ-3, ориентируют дифференцировку тимоцитов в CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Трег клетки [5]. Предшественники этих нТрег клеток были обнаружены среди CD4⁺CD8⁺ тимоцитов, которые прошли положительную селекцию и имели фенотип CD69^{hi}TCR^{hi} [21]. Этими же авторами показана основная значимость CD40-CD40L пути в пДК-индуцированной генерации Трег клеток. Показано, что положительно отобранные CD4⁺CD8⁺ прогениторы специфически транскрибируют *cd40l* *in vivo* и повышают экспрессию CD40L, связанную с Т-клеточным рецептором, таким образом, активируя пДК. Эти процессы нарушаются при развитии ЭАЭ [18]. Натуральные Трег клетки, в формировании которых участвуют пДК, экспрессируют супрессорные цитокины (ИЛ-10, ТФР-β) в противоположность Трег клеткам, сформированными под влиянием мДК, продуцирующими оппозитные по активности медиаторы [5, 22]. Это функциональное отличие подчеркивает толерогенную роль тимических пДК [21].

Необходимо учитывать и такие важные свойства ДК как секреция ИЛ-1 и простагландина E₂ (ПГЕ₂), участвующих в стимуляции пролиферации и дифференцировки тимоцитов в зрелые клетки медуллярной зоны тимуса [16]. Экспрессия на своей поверхности молекул ГКГ II класса выдвигает тимические ДК на ведущую роль в отрицательной селекции тимоцитов [23]. В физиологических условиях ДК периферических структур лимфо-гемопозитического комплекса и кровеносного русла в малых количествах непрерывно мигрируют в тимус, осуществляя перенос широкого спектра антигенных структур организма для реализации сложного механизма становления центральной толерантности [21]. Учитывая такую исключительную роль ДК в формировании естественной толерантности (ЕТ) [8], становится очевидной необходимость изучения функционального состояния ДК при ЭАЭ для выяснения патогенетических звеньев развития данной патологии.

Как видно из рис.4, процессы формирования общей популяции ДК в тимусе животных с ЭАЭ на 7- и 14-е сутки во многом синхронизированы с поведением нТрег клеток. Данный факт подтверждает непосредственное участие тимических ДК в формировании нТрег клеток. Указывается на возможность либо повышенной миграции ДК в тимус из КМ или периферии, либо активации пролиферации непосредственно тимических ДК [23]. Важно также, что в дальнейшем, а именно, с 21-х суток и до конца срока наблюдения содержание данных клеток в тимусе животных с ЭАЭ было на уровне контроля.

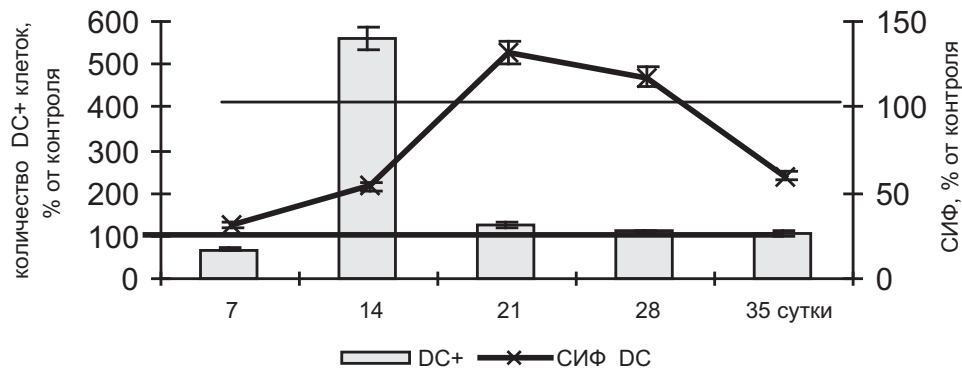


Рис.4 Содержание общей популяции ДК и их СИФ в тимусе крыс при ЭАЭ

Более того, СИФ ДК (рис.4) на 21- и 28-е сутки достигала своего максимума и даже превышала контрольные значения, после чего значительно снижалась (на 40% ниже контроля) к 35-м суткам наблюдения. То есть, ДК, судя по СИФ, на 21- и 28-е сутки пребывали в гиперактивизированном состоянии, то есть в фазе функционального овершута. Стоит обратить внимание, что такого рода их активность отразилась и на гиперэкспрессии CD25 маркера нТрег клеток в последующем, то есть на 28- и 35-е сутки и повышении экспрессии этого же маркера у иТрег клеток на 21- и 28-е сутки (рис.2 и 3 соответственно). К концу срока наблюдения, на фоне нормального количественного содержания ДК, их функциональная активность, судя по СИФ, снижалась почти в 2 раза по сравнению с контролем, что может отражаться дефектами в дальнейшем процессе селекции в тимусе и становлении центральной толерантности. Подтверждением этому являются результаты оценки состояния иТрег клеток (рис.3), а также многочисленные данные литературы о том, что при ЭАЭ, патологии, имеющей, казалось бы, все признаки самовыздоровления, восстановления профиля регуляторных иммунокомпетентных клеток не наблюдается [2,6].

Известно, что развитие ЭАЭ сопровождается нарушениями в нейроиммуноэндокринном блоке (НИЭБ) [14]. Исходя из этого, терапия данной патологии должна быть направлена на коррекцию состояния каждой из систем НИЭБ [24]. В качестве препарата-корректора данной патологии используют ФНК. Предпосылкой этому является многовекторное действие ФНК на многие системы организма. Во-первых, эти клетки имеют высокий уровень продукции нейротрофических факторов (NGF, BDNF, FGF-7, FGF-10, NT-3) и экспрессии молекул адгезии (ICAM-1, LFA-1, LFA-3, ламинин, фибронектин $\alpha 2$, $\alpha 6$ и $\beta 1$ интегринов) [25], которые могут проникать в тимус и принимать участие в регуляции

функциональной активности его стромы, без которой невозможна нормальная дифференцировка Т-клеток и селективный их отбор [26]. Во-вторых, в работе [27] показано наличие на ФНК ЦНС-специфических адгезивных молекулярных рецепторов к хемоаттрактивным цитокинам-хемокинам (CCR3, CCR6, CCR7, CCR9, CXCR3, CCR4, CCR5 и CXCR4), что может обеспечивать миграцию этих клеток в тимус. Хемоаттрактивными сигналами для данного процесса служат ТСЛП, MCP-1, CCL2, а также взаимодействия VLA-4 с его лигандом VCAM-1, pertussis toxin – чувствительный хемоаттрактант [28]. Указывается на способность и возможность проникать через гематотимический барьер не только молекул цитокинов, но и стволовых клеточных элементов костномозгового происхождения, из которых затем формируется широкий спектр Т-клеток тимического происхождения [29]. ФНК продуцируют широкий спектр цитокинов: ИЛ-1, ИЛ -1R α , ИЛ -2, ИЛ -3, ИЛ -6, ИЛ -8, ИЛ -12, ФНО- α , интерфероны, М-CSF, CSF-1, ТФР- β , α -фетопротеин, которые могут дополнять работу тимических медиаторов [25]. Поэтому, есть все предпосылки к использованию ФНК с целью коррекции состояния тимуса при ЭАЭ, в том числе и содержания Трег клеток.

Результаты данного раздела исследований показали, что через 7 суток после введения животным с ЭАЭ кФНК (21-е сутки ЭАЭ) количество CD4⁺CD25⁺ клеток в тимусе существенно снизилось по сравнению с животными, не получавшими лечения, причем в разной степени в зависимости от вида материала. Так, после введения кФНК-2 их уровень достигал контрольных значений (рис.5). Данный факт может быть объяснен гармонизацией внутритимического профиля регуляторных медиаторов под влиянием продуцируемых ФНК упоминаемых выше биоактивных субстанций, включая восстановление экспортной функции тимуса за счет повышения экспрессии упоминаемого выше S1P, имеющего

непосредственное отношение к этому процессу [17]. Подтверждением этому является повышение содержания Трег клеток ($CD4^+CD25^{hi}$) на периферии, где они непосредственно реализуют

свое супрессорное действие [6]. Как видно (рис.6), эффект был присущ именно фетальному материалу, так как ВНК не оказывали подобного действия.

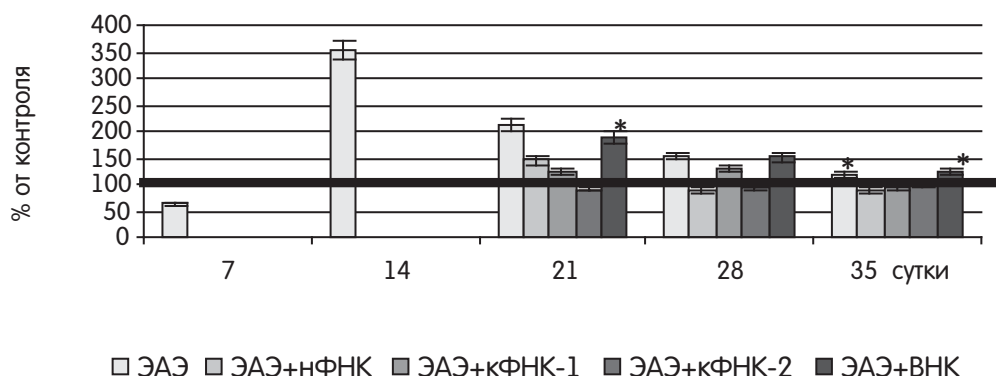


Рис.5 Содержание $CD4^+CD25^+$ клеток в тимусе при ЭАЭ до и после лечения ФНК

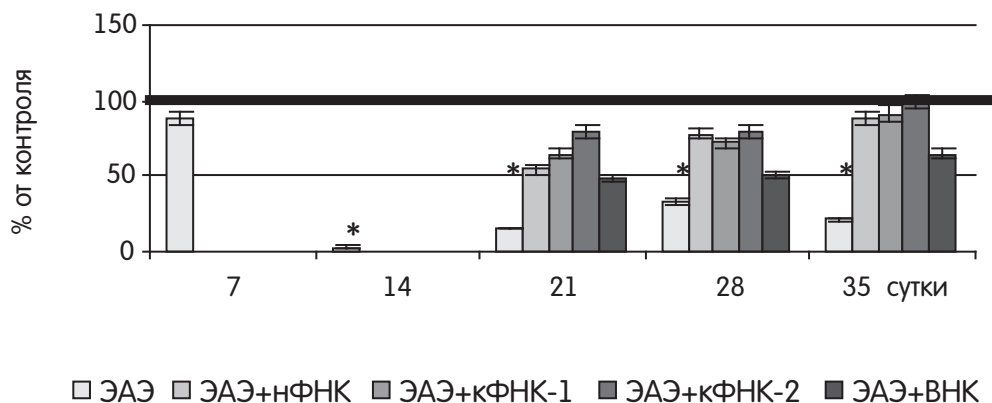


Рис.6 Содержание $CD4^+CD25^{hi}$ клеток в периферической крови при ЭАЭ до и после лечения ФНК

Наши данные находятся в соответствии с результатами [17], которые показали, что формирование иТрег клеток на периферии обусловлено именно восстановлением экспортной функции тимуса. Важно заметить, что и в данном случае показатель содержания иТрег клеток приближался к контрольному уровню в большей степени в группе животных с введением кФНК-2.

Обращает на себя внимание весьма интересный факт. Корректирующий эффект ФНК в отношении иТрег $CD4^+CD25^+$ клеток на разные сутки после их применения проявлялся в разной степени в зависимости от их вида. Как уже упоминалось, на 21-е сутки «лидером» были кФНК-1. К 28-м суткам нормализовали содержание в тимусе $CD4^+CD25^+$ Т-клеток в разной степени как нФНК, так и кФНК-1 (рис.5), и повышали количество иТрег клеток на периферии (рис.6). К 35-м суткам наблюдения данный материал любого вида нормализовал этот по-

казатель (рис.5). Интересная ситуация была отмечена при оценке содержания $CD4^+CD25^{hi}$ (иТрег) клеток на периферии (рис.6). Характер корректирующего эффекта этих клеток был четко синхронизирован с таковыми для $CD4^+CD25^+$ практически во все сроки наблюдения. Однако в данном случае к контрольному уровню показатели приближались только к 35-м суткам, причем только в группах с кФНК они достоверно не отличались от контроля. Данный факт говорит о том, что first-step этапом восстановления состояния Трег клеток в тимусе является именно коррекция Т-клеток с фенотипом $CD4^+CD25^+$, для которых еще как минимум необходим период в одну неделю для созревания и трансформации на периферии в иТрег ($CD4^+CD25^{hi}$) клетки.

Что касается особенностей реализации корректирующего эффекта кФНК, то в предыдущих наших работах мы неоднократно отмечали возможные причины проявления «суперактивности» кФНК в сравнении с нативными [14,24].

Кроме того, известно, что этому может способствовать и этап отогрева кФНК, который, как известно, способствует усилению синтеза белков теплового шока [30]. Эти белки выходят из ФНК и в свою очередь стимулируют образование зрелых CD4⁺CD25⁺ Т-клеток. Так, у пациентов с ревматоидным артритом, принимавших dpαP1 - эпитопспецифический пептид белка теплового шока, отмечено значительное снижение Т-клеточной пролиферации, продукции провоспалительных цитокинов (ИЛ-2, ИФН-γ, ФНОα) и увеличение синтеза супрессорных цитокинов (ИЛ-10 ИЛ-4) [31]. Другими словами есть все предпосылки к тому, что криоконсервированный материал потенциально имеет предпосылки реализации большего терапевтического потенциала по сравнению с нативным. Кроме того, различие между коррегирующей активностью ФНК, криоконсервированных по разным режимам, открывает возможность ис-

пользования процесса криоконсервирования, как инструмента управления функциональным состоянием биообъекта, на чем акцентировалось внимание в работах [14,24].

Механизм коррегирующего эффекта ФНК в отношении состояния тимуса при ЭАЭ может реализоваться многовекторно. Установлено, например, что в этом могут участвовать вводимые в составе ФНК нейрональные стволовые клетки, которые могут ослаблять активацию мДК и дифференцировку CD14⁺ мДК в незрелые CD1a⁺ и функциональные антиген-презентирующие ДК [25]. Кроме того, ФНК препятствуют экспрессии на ДК костимуляторных молекул CD80, CD86 и антигенов ГКГ II класса.

Очевидным остается установленный в работе факт существенного изменения содержания количества ДК в тимусе. Так, уже через неделю после введения как нативных, так и кФНК (рис. 7) имело место резкое снижения их содержания.

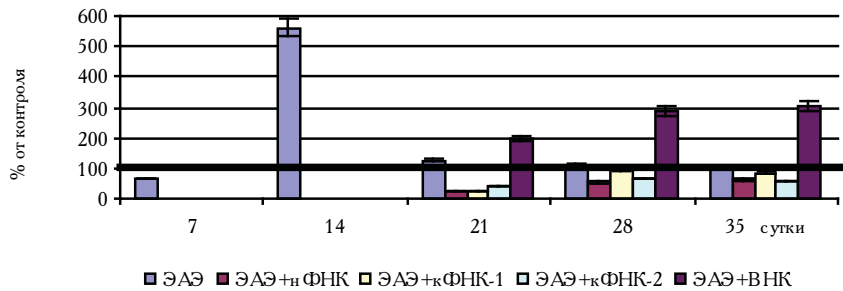


Рис. 7. Содержание общей популяции ДК в тимусе при ЭАЭ до и после лечения ФНК

Тот факт, что к этому времени было отмечено также и резкое изменение количественного содержания клеток в тимусе может говорить о временном «шоковом» влиянии медиаторов вводимых ФНК на фенотипический репертуар ДК. Действительно, этот показатель возростал к 28-м суткам развития ЭАЭ, достигая уровня контроля в группе с введением кФНК-1. К 35-м суткам наблюдения, когда практически имело место спонтанная нормализация содержания ДК, в группах с введением ФНК (натив и крио) содержание ДК в тимусе оставалось ниже контрольных значений. Очевидно, что такого рода модулирующая активность была присуща именно ФНК, поскольку ВНК, среди которых стволовклеточные элементы присутствуют лишь спорадически [25], не изменяли количества тимических ДК на протяжении всего периода наблюдения.

На фоне этих результатов в некоторой степени остается необъясненной ситуация нормализации содержания как тимических, так и иТрег клеток во всех группах с введением терапевтического материала на фоне сниженного содержания ДК. Зависимость формирования Трег клеток лишь от определенного типа ДК известна [21]. Исходя из полученных нами данных, можно предположить, что вводимые ФНК «выключают» лишь мДК и активируют пДК тимуса, от которых и зависит формирование генерации нТрег клеток. Вероятно, на фоне общего снижения содержания ДК в тимусе после введения ФНК увеличивается количество пДК, что достаточно для полноценной индукции формирования нТрег клеток. В общем, очевидно, что терапевтический эффект ФНК в отношении тимуса, который они проявляют при развитии ЭАЭ, реализуется многовекторно через коррек-

цію состояния клеточно-тканевых субстратов этого органа. Характер их изменения определяет особенности акцепции регуляторных медиаторов, продуцирующих ФНК, что и манифестируется особенностями изучения того или иного определяемого показателя. Существенным при этом является профиль регуляторных медиаторов ФНК, который, как свидетельствуют данные, может быть различным в разном виде ФНК. Судя по всему, кФНК-2 в большей степени влияют на содержание пДК, а следовательно на нТрег клетки и, соответственно, иТрег клетки.

Подтверждением того, что именно Трег клетки тимуса могут выступать в качестве мишеней

терапевтической активности ФНК являются изменения клинических признаков манифестации ЭАЭ (рис.8). Этот показатель интегрально подтверждает наиболее выраженный коррегирующий эффект у животных после введения именно кФНК-2. Наиболее важным, с нашей точки зрения, является тот факт, что этот материал не только максимально снижал манифестные признаки ЭАЭ, но и начинал проявлять эффект раньше других. Этим подтверждается, что криоконсервирование в определенных режимах способно оптимизировать терапевтический эффект ФНК.

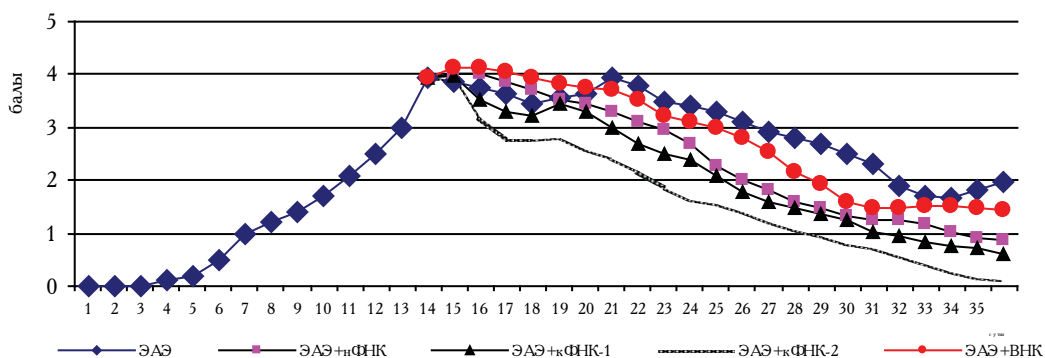


Рис.8. Клинические признаки ЭАЭ до и после лечения ФНК

Итак, можно сделать следующие выводы:

1. Клиническая манифестация ЭАЭ (14-е сутки) сопровождалась увеличением содержания нТрег клеток в тимусе и снижением CD4⁺CD25^{hi} в периферической крови.
2. Выявлена однонаправленная динамика изменения содержания Трег и ДК тимуса животных в динамике развития ЭАЭ.
3. Отмечено снижение клинических признаков ЭАЭ на фоне восстановления до уровня контроля содержания тимических CD4⁺CD25⁺клеток и экспортной функции тимуса.
4. ФНК, криоконсервированные по режиму 2 обладали максимальным терапевтическим эффектом за счет снижения содержания CD4⁺CD25⁺клеток в тимусе и повышения CD4⁺CD25^{hi} клеток в периферической крови, что сопровождалось снижением клинических признаков ЭАЭ.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Frohman E.M.* Multiple sclerosis – the plaque and its pathogenesis/ E.M.Frohman, M.K.Racke, C.S.Raine //N. Engl. J. Med.–2006.– Vol.354, №9.–P.942-955.

2. *Fletcher J.M.* T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis/ J.M.Fletcher, S.J. Lalor, C.M. Sweeney, N. Tubridy, K.H. Mills// Clin. Exp. Immunol.– 2010.– Vol.162, №1.–P. 1-11.
3. *Zhou H.T.* Progress of study on ex vivo expansion of CD4(+) CD25(+) T regulatory cells/ H.T. Zhou, Z.G.Yang// Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.- 2011.- Vol.19, № 1.-P260-268.
4. *Biegler B.W.* Clonal composition of neuroantigen-specific CD8+ and CD4+ T-cells in multiple sclerosis/ B.W.Biegler, S.X. Yan, S.B. Ortega, D.K. Tennakoon, M.K.Racke, N.J. Karandikar// J Neuroimmunol.– 2011.– Vol.234, № 1-2.– P.131-140.
5. *Zozulya A.L.* The role of dendritic cells in CNS autoimmunity/ A.L.Zozulya, B.D.Clarkson, S.Ortler, Z.Fabry, H.Wiendl //J. Mol. Med. (Berl). –2010.– Vol.88, № 6.–P. 535-544.
6. *Baecher-Allan C.M.* CD2 costimulation reveals defective activity by human CD4+CD25(hi) regulatory cells in patients with multiple sclerosis/ C.M.Baecher-Allan, C.M.Costantino, G.L.Cvetanovich, C.W.Ashley, G.Beriou, M.Dominguez-Villar, D.A.Hafner// J.Immunol.– 2011.– Vol.186, № 6. – P. 3317-3326.

7. *Mohajeri M.* FOXP3 Gene Expression in Multiple Sclerosis Patients Pre- and Post Mesenchymal Stem Cell Therapy/ M.Mohajeri, A.Farazmand, B.M.Mohyeddin, B.Nikbin, A.Minagar// Iran J. Allergy Asthma Immunol. – 2011. – Vol.10, №3. – P.155-161.
8. *Pithadia A.* Pathogenesis and treatment of multiple sclerosis (MS) / A. Pithadia, S.Jain, A.Navale // The Int. J. of Neurology. – 2009. – Vol.10, №2. – P. 34-42.
9. *Гольцев А.Н.* Крiобиологические технологии как компонент оптимизированных методов лечения аутоиммунных заболеваний / А.Н.Гольцев, Т.Г. Дубрава, Ю.А. Гаевская, Л.В. Останкова, Е.Д. Луценко, М.В. Останков Е.А. Порожан // Клінічна імунологія. Алергологія. Інфектологія. – 2009. – №1-2 (20-21). – С.46-51.
10. *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
11. *Жаботинский Ю.М.* Экспериментальные аллергические демиелинизирующие заболевания нервной системы / Ю.М.Жаботинский, В.И. Иоффе //– Л.: Медицина.– 1975.-264с.
12. Патент №4523 Україна, МПК7, А01N1/02. Спосіб крiоконсервування суспензії клітин ембріональної нервової тканини / Грищенко В.І., Гольцев А.М., Гурина Т.М., Бабенко Н.М.; Заявитель і патентодавець Харк. Ін-т пробл. біол. і мед. – Заявл. 24.05.2004.; опублік.17.01.2005, бюл. №1, с. 3.12
13. Патент №59206 Україна, МПК51, А01N1/02. Спосіб крiоконсервування суспензії фетальних нервових клітин /Гольцев А.М., Порожан Є.О., Бабенко Н.М., Останков М.В.; Заявитель і патентодавець Харк. Ін-т пробл. біол. і мед. – Заявл. 04.10.2010.; опублік.10.05.2011, бюл. №9, с. 2.11
14. *Грищенко В.И.* Экспериментальный аллергический энцефаломиелит как возможная модель изучения механизма действия продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса при лечении аутоиммунных заболеваний /В.И.Грищенко, А.Н.Гольцев, Н.Н.Бабенко // Пробл. крiобиол.– 2002.– №2. – С.34-43.
15. *Costantino C.M.* Multiple sclerosis and regulatory T cells/ C.M.Costantino, C.Baecher-Allan, D.A.Hafler// J. Clin. Immunol.– 2008.– Vol.28, №6.– P.697-706.
16. *Bettini M.L.* Development of thymically derived natural regulatory T cells /M.L. Bettini, D.A.A. Vignali// Ann. N.Y. Acad. Sci. – 2010. – Vol.1183.– P. 1–12.
17. *Weinreich M.A.* Hogquist Thymic Emigration: When and How T Cells Leave Home/ M.A. Weinreich, K.A. Hogquist// J. Immunol. – 2008. – Vol.181. – P. 2265-2270.
18. *Chen X.* Thymic regulation of autoimmune disease by accelerated differentiation of Foxp3+ regulatory T cells through IL-7 signaling pathway/ X.Chen, L.Fang, S.Song, T.B.Guo, A.Liu, J.Z.Zhang// J. Immunol. – 2009. – Vol.183, №10. – P. 6135-44.
19. *Fransson M.* T regulatory cells lacking CD25 are increased in MS during relapse/ M.Fransson, J.Burman, C.Lindqvist, C.Atterby, J.Fagius, A.Loskog// Autoimmunity. – 2010. – Vol.43, №8. – P. 590-597.
20. *Saresella M.* CD4+CD25+FoxP3+PD1-regulatory T cells in acute and stable relapsing-remitting multiple sclerosis and their modulation by therapy/ M.Saresella, I.Marventano, R.Longhi, F.Lissoni, D.Trabattoni, L.Mendozzi, D.Caputo, M.Clerici// FASEB J. – 2008. – Vol.22, №10. – P. 3500-3508.
21. *Hanabuchi S.* Thymic stromal lymphopoietin-activated plasmacytoid dendritic cells induce the generation of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus/ S.Hanabuchi, T.Ito, W.R.Park, N.Watanabe, J.L.Shaw, E.Roman, K.Arima, Y.H.Wang, K.S.Voo, W.Cao, Y.J.Liu// J. Immunol. – 2010. – Vol.184, №6. – P. 2999-3007.
22. *Rojas J.I.* Role of T-regulatory cells in multiple sclerosis/ J.I.Rojas, S.J. González, L.Patrucco, E.Cristiano // Medicina (B Aires) – 2010. – Vol.70, №1. – P.79-86.
23. *Krueger A.* A missing link in thymic dendritic cell development/ A. Krueger// Eur. J. Immunol. – 2011. – Vol.41, №8. – P. 2145-2147.
24. *Гольцев А.Н.* Апоптотические процессы в тимусе и головном мозге при развитии экспериментального аллергического энцефаломиелита до и после лечения фетальными нервными клетками/А.Н.Гольцев, Е.А.Порожан, Н.Н.Бабенко, М.В.Останков// Патология.– 2011.–Т.8.– №2.–С. 69-71.
25. *Bifari F.* Immunological properties of embryonic and adult stem cells/ F.Bifari, L.Pacelli, M.Krampera // World J Stem Cells.– 2010.– Vol. 2, №3. – P.50-60.
26. *Zlotoff D. A.* Hematopoietic progenitor migration to the adult thymus/ D.A.Zlotoff, A.Bhandoola// Annals of the New York Academy of Sciences.– 2011. – Vol.1217. – P. 122–138.
27. *Hess D.C.* Stem cells and neurological diseases/ D.C.Hess, C.V.Borlongan// Cell Prolif. – 2008.– Vol. 41, № 1. – P. 94-114.
28. *Bubanovic V.* Failure of blood–thymus barrier as a mechanism of tumor and trophoblast escape/

- V. Bubanovic// Medical Hypotheses. – 2003. – Vol. 60, №3. – P. 315–320.
29. Gossens K. Thymic progenitor homing and lymphocyte homeostasis are linked via S1P-controlled expression of thymic P-selectin/ CCL25/ K.Gossens, S.Naus, S.Y.Corbil, S.Lin, F.M.Rossi, J.Kast, H.J.Ziltener// J. Exp Med.– 2009. – Vol.206, №4. – P. 761-778.
30. Фуллер Б. Охлаждение, криоконсервирование и экспрессия генов в клетках млекопитающих/Б.Фуллер, К.Грин, В.И. Грищенко//Пробл. Кробиологии. – 2004. – № 3. – С. 58-71.
31. Быковская С.Н. Роль дефектов иммуносупрессии в развитии аутоиммунных заболеваний/ С.Н.Быковская, Е.Л.Насонов// Научн. практ. ревматол. – 2005. – №4. – С. 81-84.

РЕЗЮМЕ

РОЛЬ НАТУРАЛЬНИХ Т-РЕГУЛЯТОРНИХ КЛІТИН В ПАТОГЕНЕЗІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АЛЕРГІЧНОГО ЕНЦЕФАЛОМІЄЛИТУ І МОЖЛИВІ ШЛЯХИ КОРЕКЦІЇ ЦЬОЇ ПАТОЛОГІЇ КРИОКОНСЕРВІРОВАННИМИ ФЕТАЛЬНИМИ НЕРВОВИМИ КЛІТИНАМИ

Гольцев А.Н., Порожан Е.А., Останків М.В., Діброва Т.Г., Бабенко Н.Н., Гаевская Ю.А., Бондарович Н.А.

Інститут проблем кробиології і криомедицини НАН України, Україна, г.Харків, вул.Переяславська, 23

В роботі проведена оцінка вмісту клітин з фенотипом CD4⁺CD25⁺ (nTreg) в тимусі і CD4⁺CD25^{hi} (iTreg) у периферичній крові щурів при розвитку нейродегенеративного захворювання аутоімунної природи – експериментального алергічного енцефаломієліту (ЕАЕ), аналога розсіяного склерозу. Показано збільшення кількості nTreg клітин в тимусі і зниження Treg клітин у

периферичній крові тварин з ЕАЕ. Встановлено односпрямована динаміка зміни кількості Treg і дендритних клітин (ДК) тимуса. Показано, що застосування криоконсервованих фетальних нервових клітин (кФНК) знижувало підвищений при патології вміст у тимусі як CD4⁺CD25⁺, так і ДК, нормалізуючи дані показники до кінця 3-го тижня, що призводило до збільшення кількості Treg клітин на периферії і супроводжувалося мінімізацією клінічних проявів ЕАЕ.

SUMMARY

THE ROLE OF NATURAL T-REGULATORY CELLS IN THE PATHOGENESIS OF EXPERIMENTAL ALLERGIC ENCEPHALOMYELITIS AND POSSIBLE WAYS TO CORRECT THE PATHOLOGY WITH CRYOPRESERVED FETAL NEURAL CELLS

Porozhan Ye.A., Goltsev A.N., Ostankov M. V., Dubrava T.G., Babenko N.N., Gayevskaya Yu.A., Bondarovich N.A.

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

In this paper we evaluated the content of cells with CD4⁺CD25⁺ phenotype (nTreg) in the thymus and CD4⁺CD25^{hi} cells (iTreg) in the peripheral blood of rats during the development of neurodegenerative disease of autoimmune nature – experimental allergic encephalomyelitis (EAE), an analogue of multiple sclerosis. An increase in number of nTreg cells in the thymus and decrease in Treg cells in the peripheral blood of animals with EAE has been shown. Unidirectional evolution of Treg and dendritic cell (DC) content in the thymus has been established. It has been shown that application of cryopreserved fetal neural cells (cFNC) reduced the increased pathological content in the thymus of CD4⁺CD25⁺ and DC with normalization of these parameters by the end of the third week which led to the restoration of the export function of the thymus, to an increase in the number of Treg cells on the periphery, and was accompanied by minimization of EAE clinical manifestation.

УДК:576.3/.4:616-006.484:616.15:616.831-006.484

ОСОБЛИВОСТІ ЦИТОТОКСИЧНОЇ ДІЇ ГАЛАВІТУ НА КЛІТИНИ ГЛІОМ ТА МОНО-НУКЛЕАРИ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ХВОРИХ З ГЛІОМАМИ IN VITRO

ЛЮБИЧ Л.Д., ЛІСЯНИЙ М.І., СЕМЕНОВА В.М., ГЛАВАЦЬКИЙ О.Я., ЛІСЯНИЙ О.М., СТАЙНО Л.П.

ДУ «Інститут нейрохірургії ім.акад.А.П.Ромоданова НАМН України»

Лікування хворих із злоякісними гліомами головного мозку залишається однією з невирішених і актуальних проблем сучасної нейроонкології. Одним з напрямків, що активно розробляється для оптимізації лікування цих хворих, є пошук препаратів, спрямованих на стимуляцію протипухлинного імунітету та гальмування проліферації пухлин. До таких препаратів відносять лікарський засіб галавіт (5-аміно-1,2,3,4-тетрагідрофалазин-1,4- дієнонатрієва сіль), дозволений для клінічного застосування нака-

зом МЗ РФ від 31.03.1997 р. як протизапальний та імуномодуючий препарат, який використовується у загальній онкології [1,2] та при інфекційно-запальних процесах [3-5].

Встановлено, що галавіт впливає на проліферативну функцію Т- і В-лімфоцитів, антитілогенез, цитотоксичну активність природних кілерів та фагоцитарну активність нейтрофілів периферичної крові, практично не впливає на нормально функціонуючі клітини, але пригнічує гіперактивовані клітини [1]. Препарат зворотно інгібує