

УДК 615.361.441.014.41:616.379-008.64:57.085.23

Л.В. ОСТАНКОВА*¹, О.Н. ПОБЕЛЕНСКИЙ², М.В. ОСТАНКОВ¹, А.Н. ГОЛЬЦЕВ¹

Влияние криоконсервированной культуры микрофрагментов поджелудочной железы на иммунный статус крыс с развитием алоксанового диабета

UDC 615.361.441.014.41:616.379-008.64:57.085.23

L.V. OSTANKOVA*¹, O.N. POBELENSKY², M.V. OSTANKOV¹, A.N. GOLTSEV¹

Effect of Cryopreserved Culture of Pancreas Microfragments on Immune Status of Rats with Aloxane Diabetes Development

Исследовалось влияние криоконсервированной культуры микрофрагментов поджелудочной железы (ПЖ) новорожденных поросят на иммунный статус крыс в модели алоксанового диабета (АД), сходного с инсулинзависимым сахарным диабетом человека. Показано, что введение криоконсервированной культуры микрофрагментов ПЖ способствовало восстановлению клеточного и гуморального звена иммунитета. Наиболее выраженный эффект был получен после ее введения в парапанкреатическую клетчатку.

Ключевые слова: криоконсервированная культура, поджелудочная железа, иммунный статус, модель алоксанового диабета.

Досліджувався вплив криоконсервованої культури мікрофрагментів підшлункової залози (ПЗ) новонароджених поросят на імунний статус щурів у моделі алоксанового діабету, подібного до інсулінзалежного цукрового діабету людини. Показано, що введення в різні ділянки організму криоконсервованої культури мікрофрагментів ПЗ сприяють відновленню клітинної і гуморальної ланки імунітету. Найбільш виражений ефект було отримано після її введення у парапанкреатичну клітковину.

Ключові слова: криоконсервована культура, підшлункова залоза, імунний статус, модель алоксанового діабету.

The effect of cryopreserved culture of newborn piglet pancreas microfragments on rat's immune status in the model of aloxane diabetes (AD), similar to human insulin-dependent diabetes mellitus has been studied. Administration of pancreas microfragment cryopreserved culture was demonstrated as contributing to cell and humoral immunity link recovery. The most manifested effect was after its introduction into parapancratic fat.

Key-words: cryopreserved culture, pancreas, immune status, aloxane diabetes model.

Сахарный диабет (СД) – типичный пример патологии, относящейся к аутоиммунным заболеваниям (АИЗ) [19-22, 27, 30, 32]. Его развитие связано с особенностями взаимодействия иммунной и эндокринной сферы. Известно, что морфологической основой СД является воспаление [26], локализующееся в островках Лангерганса, приводящее к деструкции β -клеток [10, 29-31]. Нарушение эндокринной функции органа, особенно ее гормонопродуцирующей активности [12, 21], существенно сказывается на состоянии иммунной системы (ИС) всего организма [23]. При проведении исследований, направленных на изучение новых методов лечения СД 1-го типа, обязательна оценка показателей ИС [8]. Применение эмбриональных стволовых клеток [3-6] является новым

Diabetes mellitus (DM) is a typical example of pathology, relating to autoimmune diseases (AIDs) [19-22, 27, 30, 32]. Its development is associated to the peculiarities of immune and endocrine spheres interaction. The inflammation [26], locating in Langerhans islets, resulting in β -cells destruction [29-31] is known to be DM morphological base. Disorder in endocrine function of an organ, especially its hormone-producing activity [12, 21] significantly affects an immune system (IS) state of the whole organism [23]. The IS indices estimation is indispensable when performing researches, targeted to studying the novel therapies for I type DM treatment [8]. The application of embryonic stem cells [3-6] is a new direction in AIDs treatment. The aloxane diabetes (AD), being recently treated with xenotransplantation

¹Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

²Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Перейславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-57-91, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

²Kharkov National University, Kharkov, Ukraine

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 5791, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

направлением в лечении АИЗ. В эксперименте моделью СД является аллоксановый диабет (АД), для лечения которого в последние годы используют ксенотрансплантацию нативных [16] или криоконсервированных [14] β -клеток ПЖ.

Цель работы – изучить в сравнительном аспекте особенности изменения ИС крыс с индуцированным АД до и после введения криоконсервированной культуры микрофрагментов ПЖ новорожденных поросят.

Материалы и методы

В работе были использованы 175 половозрелых крыс-самцов линии Вистар массой 180-210 г. Исследования проводили в соответствии с “Общими этическими принципами экспериментов на животных” [7], которые согласуются с положениями “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей” (Страсбург, 1985). Для создания модели АД аллоксанмоногидрат (ICN Biomedical Inc.) вводили под кожу одноразово в дозе 130 мг/кг массы животного после предварительного 24-часового их голодания при свободном доступе к воде [13]. Крысы были разделены на группы по семь в каждой. Контрольная группа – интактные крысы. Опытные – с индукцией АД на 3, 7, 14, 28-е сутки, и опытные, которым на 14-е сутки развития АД вводили в дозе 0,5 г размороженной криоконсервированной культуры микрофрагментов ПЖ новорожденных поросят в паренхиму печени и селезенки, под капсулу почки, в парапанкреатическую клетчатку и внутримышечно в боковую поверхность бедра. На 3, 7, 14, 28-е сутки после лечения животных выводили из эксперимента декапитацией под эфирным наркозом.

Ткань ПЖ получали у новорожденных поросят по методу [16], криоконсервировали по методу [14], хранили при низкой температуре (-196°C) в течение года в герметически закрытых контейнерах. Размораживали на водяной бане при температуре $40-41^{\circ}\text{C}$.

Клеточное звено ИС исследовали у крыс с индукцией АД и после введения биоматериала методом прямой иммунофлуоресценции субпопуляций Т-лимфоцитов (CD4^{+} и CD-8^{+}) с использованием антикрысиных ФИТЦ меченых моноклональных антител (CALTAG, США) в люминесцентном микроскопе ЛЮМАМ по методу [17]. В гуморальном звене ИС циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК) крови определяли по методу [15]. Способность к адгезии клеток перитонеальной полости (ПП) оценивали по методу [9]. Состояние моноцитарно-фагоцитарной системы (МФС) клеток ПП, т.е. фагоцитарный индекс (ФИ) и фагоцитарное число (ФЧ), определяли по методу [2].

of either native [16] or cryopreserved [14] pancreatic β -cells served as DM model in the experiment.

This research was targeted to comparatively study the peculiarities of IS change in rats with induced AD prior to and after introducing cryopreserved culture of newborn piglet pancreas microfragments.

Material and methods

In research there were used 175 mature Wistar male rats of 180-210 g. The research was performed according to the “General ethical principles of experiments in animals” [7], conformed with the statements of the “European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes” (Strasbourg, 1985). To create AD model a single subcutaneous introduction of aloxane-monohydrate (ICN Biomedical Inc.) in 130 mg/kg of animal weight was done after preliminary 24-hrs starvation with free access to water [13]. Rats were divided into groups by 7 in each. The control group comprised intact rats. The experimental groups were as follows: rats with AD development to the 3rd, 7th, 14th, 28th days and those, administered under slight ether narcosis by 0.5 g of frozen-thawed cryopreserved culture of newborn piglet pancreas microfragments into liver and spleen parenchyma, kidney capsule, parapancreatic fat and intramuscularly into lateral femur surface to the 14th day of AD development. To the 3rd, 7th, 14th, 28th days after treatment the animals were removed out of experiment by decapitation under ether narcosis.

Pancreas tissue was derived from newborn piglets according to the method [16], cryopreserved as described [14] and stored at low temperature (-196°C) for year in hermetically sealed containers. Thawing was done on water bath at $40-41^{\circ}\text{C}$.

IS cell link was studied in rats with AD induction and after biomaterial administration with the method of direct immune fluorescence of T-lymphocyte (CD4^{+} and CD-8^{+}) subpopulations using anti-rat FITC of labelled monoclonal antibodies (CALTAG, USA) under LUMAM luminescent microscope according to the method [17]. Blood circulating immune complexes (CICs) were determined in IS humoral link according to the method [15]. Adhesive ability of peritoneal cavity (PC) cells was evaluated by the method [10]. State of monocyte-phagocyte system of PC cells, i.e. phagocyte index (PI) and phagocyte number (PN) were determined by the method [2].

The obtained experimental data were statistically processed with “Microsoft Excel 2000”.

Results and discussion

When estimating the IS changes, being pathogenetically important in DM development, of note is that among T-cell link components there is a change in CD4^{+} cell activity [25] at the background of a sharp

Полученные экспериментальные данные статистически обрабатывали в электронных таблицах "Microsoft Excel 2000".

Результаты и обсуждение

Оценивая патогенетически значимые в развитии СД изменения в ИС, следует отметить, что среди компонентов Т-клеточного звена изменяется активность CD4⁺ клеток [25] на фоне резкого снижения CD8⁺ клеток [23]. С этой концепцией согласуются и полученные нами результаты в модельной системе АД. Изменение содержания CD8⁺ клеток было более существенным, и максимальное значение отклонения от исходного в показателях иммунорегуляторного индекса (ИРИ) наблюдали на 14-е сутки в момент наиболее выраженного проявления патологии (табл. 1).

Такое нарушение содержания Т-клеток регуляторной супрессорной субпопуляции является характерным "маркером" изменения состояния ИС при АИЗ вообще [3, 4] и в частности СД [24, 25]. Поэтому вполне закономерно установленное нами разной степени, но достоверное на трех сроках из четырех (за исключением 7-х суток) повышение ИРИ после индукции АД (табл. 1).

Признаком нарушения гуморального звена иммунитета крыс с индукцией АД является избыточное содержание в крови мелкодисперсных циркулирующих иммунных комплексов (мЦИК). В [20] отмечается, что одним из первых признаков срыва иммунологической толерантности к антигенам β-клеток островков ПЖ является увеличение концентрации аутоантител в сыворотке крови. Показано [10], что основными типами антител (АТ), выявляемых в крови больных СД,

Таблица 1. Показатели клеточного звена ИС при развитии АД

Table 1. Indices of IS cell link at AD development

Показатели Indices	Контроль Control	Сутки после введения аллоксана Day after aloxane administration			
		3-и 3rd	7-е 7th	14-е 14th	28-е 28th
CD4 ⁺ клетки,% CD4 ⁺ cells,%	35,21±1,36	30,241±2,140*	22,062±1,262*	16,12±1,32*	15,081±1,403*
CD8 ⁺ клетки,% CD8 ⁺ cells,%	22,24±1,83	14,082±0,040*	12,941±1,340*	6,94±0,76*	7,160±0,680*
ИРИ IRI	1,583±0,581	2,147±0,201*	1,705±1,107*	2,232±0,318*	2,106±0,202*

Примечание:* – различия достоверны по сравнению с контролем, p < 0,05.

Notes:* – differences are statistically significant if compared with the control, p < 0.05.

CD8⁺ cell reduction [23]. Our results obtained in AD model system conform with this concept as well. Change in CD8⁺ cell content was more significant and the maximum deviation value from initial one in the immune regulatory index (IRI) was observed to the 14th day when pathology was the most manifested (Table 1).

This disorder of T-cell content of regulatory suppressor subpopulation is a typical "marker" for change in IS state at AIDs in general [3, 4] and DM, in particular [24, 25]. Therefore the established by us after AD induction the IRI augmentation of different extent but statistically significant at three stages of four ones (excluding 7th day) is quite regular (Table 1).

The sign of disorder in humoral component of immune system in AD-induced rats is a surplus content of small circulating immune complexes (sCIC). As reported in the paper [20], one of the first signs of failure in immunological tolerance to pancreas islet β-cells antigens is an increase in auto-antibody concentration in blood serum. As it was shown [10], the main antibodies (ABs) types, revealed in blood of DM patients are the ABs to β-cell cytoplasmic components: ICA. These ABs appear long before DM clinical signs, but their role in this pathology development has remained unclear.

Consequently, an increase in sCIC concentration stipulates pathological process development in different organ-tissue structures of organism [3]. Together with large CIC they are capable of activating the system of cells, being a part of MPS, by changing cytokine profile of an organism [3, 4] and aggravating the immune-inflammatory

Таблица 2. Содержание мЦИК в сыворотке крови крыс при развитии АД

Table 2. sCIC content in rat blood serum at AD development

Показатели Indices	Контроль Control	Сутки после введения аллоксана Day after aloxane introduction			
		3-и 3rd	7-е 7th	14-е 14th	28-е 28th
Мелкодисперсные ЦИК sCIC	14,012±0,620	18,624±1,704*	34,068±3,205*	78,524±4,540*	20,320±2,633*
Константа Constant	0,83±0,06	1,00±0,04*	1,02±0,06*	1,68±0,12*	1,250±0,050*

Примечание:* – различия достоверны по сравнению с контролем, p < 0,05.

Notes:* – differences are statistically significant if compared with the control, p < 0.05.

являются АТ к цитоплазматическим компонентам β-клеток – ІСА. Эти АТ появляются задолго до клинических проявлений СД, однако их роль в развитии данной патологии остается не до конца выясненной.

Следовательно, повышение концентрации мЦИК обуславливает развитие патологических процессов в различных органо-тканевых структурах организма [3]. Вместе с крупнодисперсными ЦИК они могут активировать систему клеток, входящих в МФС, изменяя цитокиновый профиль организма [3, 4], агравирова течение иммуновоспалительного процесса [26]. Так, у крыс с развитием АД наблюдались существенные изменения в гуморальном звене ИС по сравнению с контролем (табл. 2). Концентрация мЦИК в крови крыс достоверно повышалась уже с 3-х суток индукции АД. На 7-е сутки концентрация и суммарное количество ЦИК увеличивались в 2 раза, на 14-е сутки – в 14 раз, а к 28-м суткам хотя и наблюдали некоторое их снижение, однако по-прежнему значения оставались выше контрольных. Отмеченные изменения являются логическим откликом ИС на развитие хронического воспаления.

Изменение концентрации ЦИК при индукции АД четко взаимодействовало с активностью МФС. Достоверное снижение фагоцитарной активности клеток ПП наблюдали с 7-х по 14-е сутки (табл.3). Полученные данные подтверждаются работами [3, 4], в которых указывается на “заинтересованность” клеток МФС в развитии АИЗ и прежде всего у лиц с генетической предрасположенностью [32]. Макрофаги продуцируют в повышенной концентрации ИЛ-10, ИЛ-18 [18, 23, 28, 32], активирующие Тх1-клетки, которые являются основным фактором развития иммунного вектора СД [20]. Такие изменения связаны, по всей видимости, с ответом ИС на развивающийся патологический процесс и миграцией клеток в очаги воспаления [26]. На более поздних стадиях развития АД (28-е сутки) за счет увеличения

process course [26]. Thus, the significant changes in IS humoral link were observed in rats with AD development compared with the control (Table 2). Concentration of sCIC in rat blood statistically and significantly increased even from the 3rd day of AD induction. CIC concentration and total amount were twice increased to the 7th day, this was by 14 times to the 14th day but although their certain reduction was observed to the 28th day, the values have remained still higher than the control. The noted changes are reasonable IS response to chronic inflammation development.

Change in CIC concentration during AD induction interacted distinctly with MPS activity. A statistically significant reduction of PC cell phagocyte activity was observed since the 7th to 14th days (Table 3). The data obtained are confirmed by the researches [3, 4], where an “interest” of MPS cells in AID development and primarily in persons with genetic predisposition is shown [32]. Macrophages produce high concentrated IL-10, IL-18 [18, 23, 28, 32], activating Th1-cells, being the main factor for DM immune vector development [20]. These changes are apparently associated to IS response to a developing pathological process and cell migration into inflammation foci [26]. At later stages of AD development (the 28th day) due to an increase in Ig and CIC production, which are phagocytized by MPS cells, their function reduces and amount decreases, that resulted in cell exhausting. Their accumulation of an excessive amount of inflammatory cytokines [11], oxygen active forms prevents accomplishing functional physiological loading for MPS cells during AD development.

As mentioned above, during AID, which is DM [19-22], there is the pathology development of the whole organism, associated to a disorder in manifestation of adhesive properties in immune competent cells (ICCs). A two-fold decrease in PC cell amount compared with the control was observed since the 7th to 14th day of AD development (Table 4). This change in adhesive cell (AC) content in PC testifies to ICCs response to AD development and is accompanied with their migration into inflammation focus.

Taking into account that this ICCs function is associated to adhesion molecules of different classes and their expression extent being controlled by organism cytokines [18], the data obtained on a change in PC cell adhesion confirm the fact of cytokine profile alteration during AD development [30, 32]. Content of PC adhesive cells increased to the 28th day and corres-

Таблица 3. Фагоцитарная активность клеток ПП крыс при развитии АД
Table 3. Phagocyte activity of rat PC cells at AD development

Показатели Indices	Контроль Control	Сутки после введения алоксана Day after aloxane administration			
		3-и 3rd	7-е 7th	14-е 14th	28-е 28th
ФИ PI	38,17±1,18	34,012±2,416*	33,000±1,501*	30,30±2,20	28,126±1,642*
ФЧ PN	6,35±0,65	5,000±0,590*	5,000±0,601*	3,00±0,82*	3,670±0,450*

Примечание:* – различия достоверны по сравнению с контролем, p < 0,05.

Notes:* – differences are statistically significant if compared with the control, p < 0.05.

продукции Ig и ЦИК, которые фагоцитируются клетками МФС, их функция снижается и количество уменьшается, что является результатом истощения клеток. Нароботка ими чрезмерного количества воспалительных цитокинов [11], активных форм кислорода препятствует выполнению функциональных физиологических нагрузок клетками МФС при развитии АД.

Как отмечалось выше, при АИЗ, каким является СД [20-23], развивается патология всего организма и касается нарушения проявления свойств адгезии иммунокомпетентных клеток (ИКК). С 7-х по 14-е сутки развития АД наблюдали уменьшение количества клеток ПП в два раза по сравнению с контролем (табл. 4). Такое изменение в содержании адгезивных клеток (АК) в ПП свидетельствует об ответе ИКК на развитие АД и сопровождается их миграцией в очаг воспаления. Учитывая, что эта функция ИКК связана с различного класса молекулами адгезии и степень их экспрессии находится под контролем цитокинов организма [18, 24], полученные данные об изменении адгезии клеток ПП подтверждают факт изменения профиля цитокинов при развитии АД [30,32]. Содержание адгезивных клеток ПП увеличивалось к 28-м суткам и соответствовало данным, полученным на 3-и сутки, оставаясь достоверно ниже контрольных значений (табл.4).

Таким образом, анализ показателей ИС крыс с индукцией АД показывает существенные изменения в ней. Систематизация опубликованных работ по патогенезу СД свидетельствует о том, что в инициации развития и поддержания его течения принимают участие различные факторы внешней и внутренней среды организма, т.е. СД является мультифакторным заболеванием, при котором возможен отклик на ситуацию всех трех систем обеспечения гомеостаза, а именно нейроиммуноэндокринной сферы [1]. Следовательно, состояние организма при экспансии в нем каких-либо сопутствующих патологий вызывает дополнительную разбалансировку этих фундаментальных систем гомеостаза.

После введения криоконсервированной культуры микрофрагментов ПЖ абсолютное содержание СД 4⁺ клеток (Т-хелперов) возвратилось к исходным значениям. Несмотря на тенденцию к увеличению содержания CD8⁺ клеток (Т-супрессоров) у всех животных, которых лечили, достоверных изменений по сравнению с контрольной

Таблица 4. Способность клеток ПП к адгезии у крыс при развитии АД
Table 4. Adhesive ability of PC cells in rats at AD development

Показатели Indices	Контроль Control	Сутки после введения аллоксана Days after aloxane administration			
		3-и 3rd	7-е 7th	14-е 14th	28-е 28th
Количество клеток ПП 10 ⁶ /мл PI	15,14±1,62	12,02±1,40*	7,4±0,48*	6,77±0,62*	12,36±1,03*
АК ПП PC ACs	60,2±0,70	37,28±3,450*	35,15±2,605*	32,62±0,160*	49,20±5,121*

Примечание:* – различия достоверны по сравнению с контролем, p < 0,05.

Notes:* – differences are statistically significant if compared with the control, p < 0.05.

подпону до данных, полученных на 3-й день, оставаясь статистически и достоверно ниже контрольных значений (Таблица 4).

Таким образом, анализ ИС индексов у крыс с индуцированным АД показывает его значительные изменения. Сводение опубликованных данных о патогенезе СД свидетельствует о том, что различные факторы внутренней и внешней среды принимают участие в инициации развития и поддержания его течения, т.е. СД является мультифакторным заболеванием, при котором возможен отклик на ситуацию всех трех систем обеспечения гомеостаза, а именно нейроиммуноэндокринной сферы [1]. Следовательно, состояние организма при экспансии в нем каких-либо сопутствующих патологий вызывает дополнительную разбалансировку этих фундаментальных систем гомеостаза.

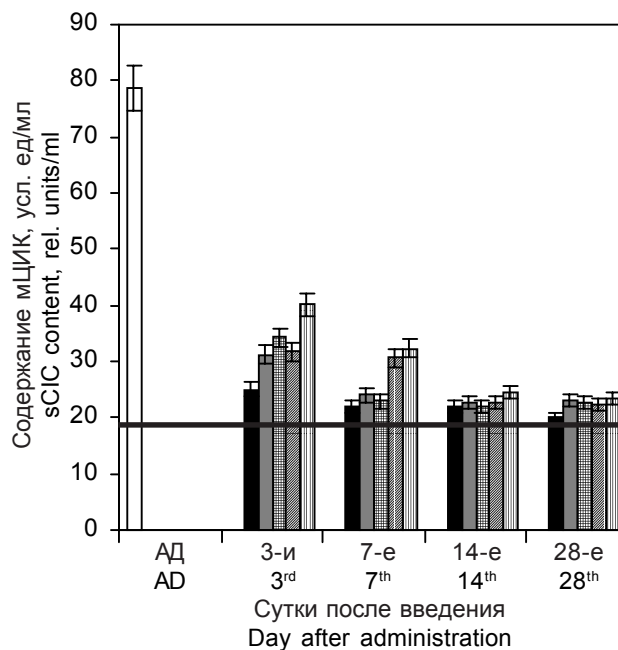


Рис.1. Содержание мЦИК в крови крыс до и после введения криоконсервированной культуры микрофрагментов ПЖ: ■ – в парапанкреатическую клетчатку; ■ – внутриселезеночно; ▨ – под капсулу почки; ▨ – внутривисцерально; □ – внутримышечно; □ – АД; — – интакт.

Fig. 1. sCIC content in rat blood prior to and after administering cryopreserved culture of pancreatic microfragments: ■ – intrahepatic; ■ – intraspleen; ▨ – under kidney capsule; ▨ – intrahepatic; □ – intramuscularly; □ – AD; — – intact.

Таблица 5. Относительное содержание Т-хелперов и Т-супрессоров у крыс с АД после введения криоконсервированной культуры микрофрагментов ПЖ
Table 5. Relative content of T-helpers and T-suppressors in rats with AD after administering cryopreserved culture of pancreatic microfragments

Место введения Administration way	Сутки после введения Days after administration											
	3-и 3rd			7-е 7th			14-е 14th			28-е 28th		
	CD4 ⁺ CD4 ⁺	CD8 ⁺ CD8 ⁺	ИРИ IRI	CD4 ⁺ CD4 ⁺	CD8 ⁺ CD8 ⁺	ИРИ IRI	CD4 ⁺ CD4 ⁺	CD8 ⁺ CD8 ⁺	ИРИ IRI	CD4 ⁺ CD4 ⁺	CD8 ⁺ CD8 ⁺	ИРИ IRI
Внутрипеченочно Intrahepatic	10,961±1,211	10,003±1,000	1,096±0,100	7,901±0,900	10,403±1,100	0,759±0,102	1,792±1,402	22,50±2,602	0,796±0,858	24,234±2,500	20,633±3,143	1,175±0,795
Внутриселезеночно Intraspleen	12,444±1,412	8,603±0,914	1,446±0,102	14,50±1,500	21,414±2,302	0,677±0,050	24,612±2,902	26,010±2,440	0,946±0,202	26,712±3,100	18,70±2,23	1,428±0,390
Под капсулу почки Under kidney capsule	10,832±1,901	5,215±0,600	2,077±0,200	10,117±1,200	12,20±1,316	0,829±0,080	25,110±2,800	7,633±0,902	3,289±0,104	22,823±2,803	15,600±1,900	1,463±0,475
В паранкреатическую клетчатку Into pancreascreatic fat	15,212±1,710	12,0±1,4	1,267±0,201	14,900±1,235	15,914±1,600	0,936±0,100	22,215±2,603	21,30±2,733	1,043±0,952	28,0±3,2	19,0±2,3	1,474±1,391
Внутримышечно Intramuscularly	14,654±1,614	4,201±0,510	3,488±0,440	14,212±1,502	7,933±0,904	1,792±0,402	25,215±3,200	19,402±1,602	1,299±0,998	22,623±2,302	12,600±1,016	1,795±0,076
АА AD	CD4 ⁺ – 15,02±1,320 CD8 ⁺ – 7,16±0,76 ИРИ/IRI – 2,088±0,318											
Интактные крысы Intact rats	CD4 ⁺ – 35,31±1,36 CD8 ⁺ – 22,24±1,83 ИРИ/IRI – 1,583±0,581											

Примечание:* – различия достоверны по сравнению с контролем, p<0,05.
Notes:* – differences are statistically significant if compared with the control, p<0.05.

группой достигнуто не было, это отражается в показателях ИРИ (табл. 5) и свидетельствует о разном отклике регуляторных субпопуляций Т-клеток на такой вид терапии.

Учитывая, что под контролем клеточного звена находится и гуморальное звено ИС, логичными являются положительные изменения в нем у крыс с введением криоконсервированной культуры микрофрагментов ПЖ на 14-е сутки. И хотя к этому сроку у всех животных после лечения количество мЦИК оставалось достоверно увеличенным, наблюдалась тенденция к их снижению. И только к 28-м суткам у крыс с введением биоматериала в парапанкреатическую клетчатку количество мЦИК и константа достигали уровня контрольных значений (рис.1).

Фагоцитарная активность клеток ПП крыс независимо от области введения криоконсервированной культуры микрофрагментов ПЖ восстанавливалась, начиная с 7-х суток. Эти показатели достигали исходных значений у всех крыс на 28-е сутки после лечения (рис. 2, а, б).

Количество клеток в ПП (рис.3,а) и их способность к адгезии (рис. 3, б) были несколько выше на 7-е сутки только у крыс, которым вводили криоконсервированную культуру микрофрагментов ПЖ в парапанкреатическую клетчатку. Следует отметить, что у этих животных данная функция восстанавливалась быстрее, чем другие показатели ИС. В то же время после введения био-

organism's state under expansion in it of any accompanying pathologies causes an additional dysbalance of these homeostasis basic systems.

After administering cryopreserved culture of pancreas microfragments the absolute content of CD4⁺ cells (T-helpers) get the initial values. As for CD8⁺ cells (T-suppressors) in spite of the tendency to their increase in all treated animals, no statistically significant changes in their content were achieved if compared with the control group, that was shown in IRI indices (Table 5) and testified to a different response of T-cells regulatory subpopulations to this therapy.

Taking into consideration that IS humoral link is controlled by a cell one as well, the positive changes in it for rats with administered cryopreserved culture of pancreatic microfragments to the 14th day are reasonable. Even though by this term the sCIC amount remained statistically and significantly increased in all animals after treatment, the tendency to their reduction was observed. Only to the 28th day in rats with administered biomaterial into parapancratic fat the sCIC amount and the constant reached the control values (Fig. 1).

Phagocyte activity of rat PC cells recovered since the 7th day independently on the area of applying pancreas microfragment cryopreserved culture. These indices reached the initial values in all rats to the 28th day after treatment (Fig. 2, a, b).

Cell number in PC (Fig. 3, a) and their adhesive capability (Fig. 3, b) were slightly higher to the 7th day

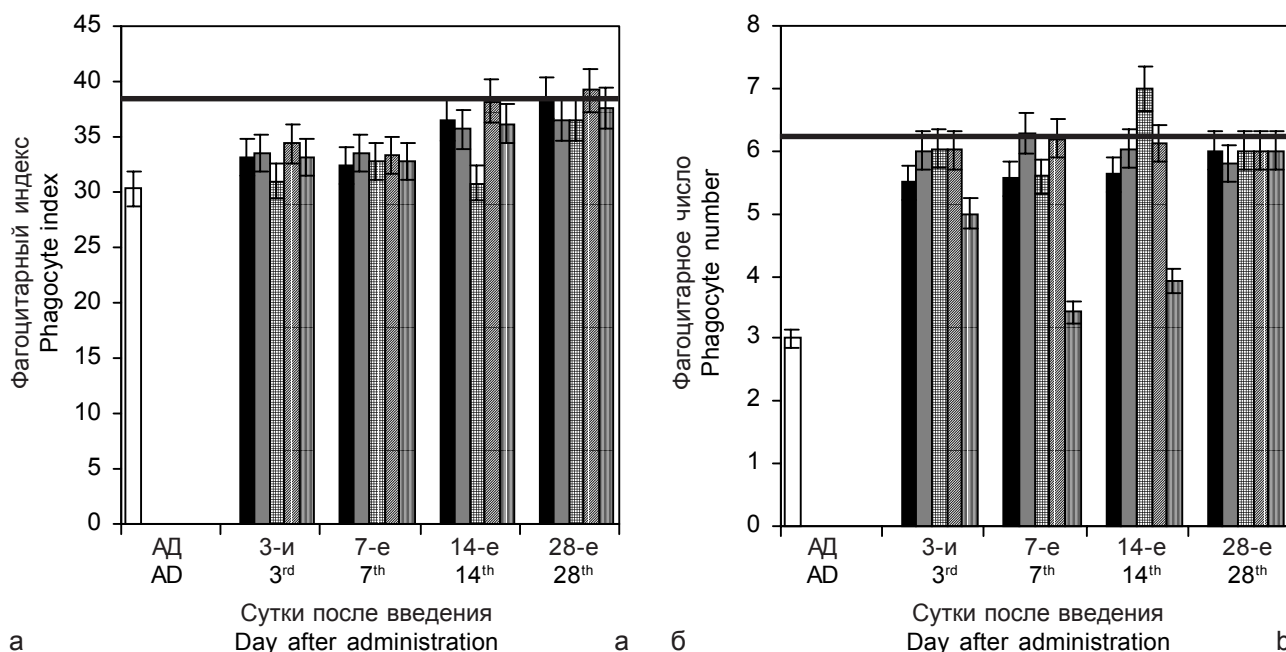


Рис. 2. Фагоцитарный индекс (а) и фагоцитарное число (б) клеток ПП крыс после введения криоконсервированной культуры микрофрагментов ПЖ: ■ – внутрипеченочно; ■ – внутриселезеночно; ▨ – под капсулу почки; ▩ – в парапанкреатическую клетчатку; □ – внутримышечно; □ – АД; — – интакт.

Fig. 2. Phagocyte index (a) and phagocyte number (b) of rat PC cells after applying cryopreserved culture of pancreatic microfragments: ■ – intrahepatic; ■ – intraspleen; ▨ – under kidney capsule; ▩ – into parapancratic fat; □ – intramuscularly; □ – AD; — – intact.

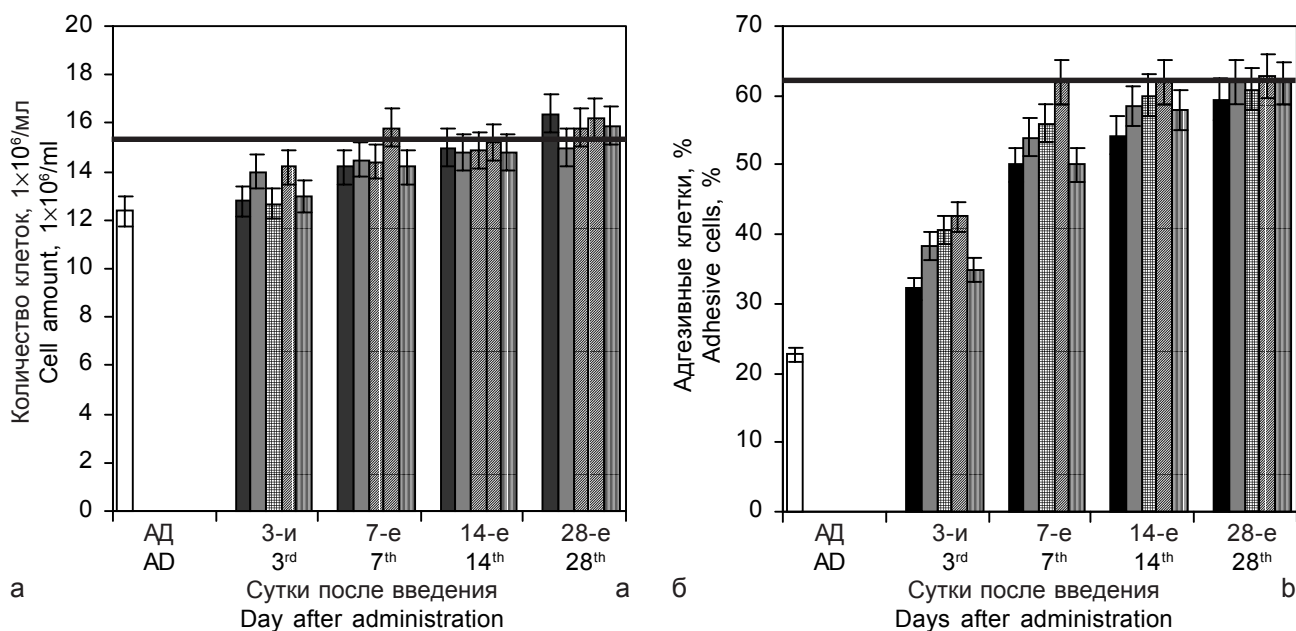


Рис. 3. Количество клеток в ПЖ (а) и их способность к адгезии (б) у крыс с развитием АД до и после введения криоконсервированной культуры микрофрагментов ПЖ: ■ – внутрипеченочно; ■ – внутриселезеночно; ▨ – под капсулу почки; ▩ – в парапанкреатическую клетчатку; ▪ – внутримышечно; □ – АД; — – интакт.

Fig. 3. Cells amount in PC (a) and their adhesive ability (b) in rats with AD development prior to and after applying cryopreserved culture of pancreatic microfragments: ■ – intrahepatic; ■ – intraspleen; ▨ – under kidney capsule; ▩ – into parapancreatic fat; ▪ – intramuscularly; □ – AD; — – intact.

материала в другие области у животных, начиная с 7-х суток, наблюдали восстановление количества клеток ПЖ. Однако их способность к адгезии соответствовала уровню контроля только на 14-е сутки. На 28-е сутки отмечали увеличение количества клеток в ПЖ и повышение их способности к адгезии по сравнению с контролем.

Выводы

Приведенные экспериментальные данные позволили установить, что терапия с использованием криоконсервированной культуры микрофрагментов ПЖ эффективно корректирует состояние всех звеньев ИС: клеточного, гуморального и МФС. Наиболее манифестно характеризуется состояние Т-звена иммунитета, в котором наблюдается восстановление их функционального статуса, т. е. степени экспрессии мембранных структур.

Более выраженный эффект восстановления ИС у крыс с индукцией АД был получен при введении криоконсервированной культуры микрофрагментов ПЖ в парапанкреатическую клетчатку.

Литература

1. *Абрамов В.В.* Взаимодействие иммунной и нервной систем. – Новосибирск: Наука, 1988. – 166 с.
2. *Александров М.Т., Кудрявицкий А.И., Румянцева Е.Г. и др.* Метод вычисления абсолютных показателей фагоцитоза // Лаб. дело. – 1988. – №9. – С. 30-36.
3. *Гольцев А.Н.* Возможные причины развития аутоиммунной патологии и поиск путей ее лечения // Пробл. мед.науки та освіти. – 2000. – №1. – С. 22-37.

only in rats with an administered cryopreserved culture of pancreatic microfragments into parapancreatic fat. Of note is that in these animals the present function recovered more rapidly, than other IS indices. At the same time, after administering biomaterial into other areas the recovery of PC cell number was observed in animals since the 7th day. However their adhesive ability corresponded to the control level only to the 14th day. An increase in cell amount in PC and their adhesive ability compared with the control was observed to the 28th day.

Conclusions

The shown experimental data enabled to establish the therapy with applying cryopreserved culture of pancreas microfragments as efficiently correcting the state of all IS links: cell, humoral and MPS ones. The most manifested is the state of immunity T-link, where recovery of their functional status, i.e. expression extent of membrane structures, is observed.

More manifested effect of IS recovery in rats with AD induction was obtained under administering cryopreserved culture of pancreas microfragments into parapancreatic fat.

References

1. *Abramov V.V.* Interaction of immune and nerve systems. – Novosibirsk: Nauka, 1998. – 166 p.
2. *Aleksandrova M.T., Kudryavitsky A.I., Rumyantseva E.G. et al.* Method of calculation of absolute indices of phagocytosis // Lab. Delo. – 1988. – N9. – P. 30-36.

4. *Гольцев А.М., Бабенко Н.М., Останкова Л.В. та ін.* Застосування кріоконсервованих продуктів ембріофетоплацентарного комплексу (ПЕФПК) як коректорів аутоімунних захворювань на моделі експериментального алергійного енцефаломієліту (ЕАЕ) // *Трансплантологія.*— 2003.— Т. 4, №1.— С. 207-209.
5. *Грищенко В.И.* Роль кріобіології в створенні біологічної кліткової і тканинної трансплантації // *Пробл. кріобіології.*— 2001.— №2.— С.7-9.
6. *Грищенко В.И., Гольцев А.Н.* Трансплантація продуктів ембріофетоплацентарного комплексу. От понимания механизма действия к повышению эффективности применения // *Пробл. кріобіології.*— 2002.— №1.— С. 54-87.
7. *Загальноетичні принципи експериментів на тваринах* // *Ендокринологія.*— 2003.— Т. 8, №1.— С. 142-145.
8. *Зверева Л.С., Дубинкин И.В., Зілов А.В. и др.* Иммунологические подходы к предикции инсулинзависимого сахарного диабета // *Пробл. ендокринології.*— 1999.— №6.— С. 3-6.
9. *Иммунология: Практикум* /Под ред. Е.И.Пастера и др.— Киев: Вища школа, 1989.— 304 с.
10. *Колесник Ю.М., Орловский М.А.* Панкреатические островки: некоторые аспекты морфологии, физиологии и процессов деструкции при сахарном диабете типа 1 // *Пробл. ендокринології.*— 2004.— Т. 50, №2.— С. 3-10.
11. *Малышев И.Ю., Кружлов С.В., Бантина Л.Ю. и др.* Стресс-ответ и апоптоз в про- и противовоспалительном фенотипе макрофагов // *Бюл. експерим. біології і медицини.*— 2004.— Т. 138, №8.— С. 162-165.
12. *Мельниченко А.Г., Фадеев В.В.* Аутоиммунный инсулиновый синдром как причина гипогликемического состояния // *Пробл. ендокринології.*— 1997.— №5.— С. 48-51.
13. *Садовникова Н.В., Кондратьев Л.Ю., Федотов В.П.* Моделирование сахарного диабета у крыс: латентная и манифестная формы // *Пробл. ендокринології.*— 1988.— №5.— С. 69-72.
14. *Сандомирский Б.П., Волкова Н.А., Гальченко С.Е., Белочкина И.В.* Влияние режимов кріоконсервирования на сохранность микрофрагментов поджелудочной железы поросят // *Пробл. кріобіології.*— 2000.— №2.— С.76-80.
15. *Стручков П.В., Константинова Н.А., Лаурентьев В.В. и др.* Скрининг-тест для оценки патогенных свойств иммунных комплексов // *Лаб. дело.*— 1985.— №7.— С. 410-413.
16. *Тронько М.Д., Турчин И.С., Ковальская И.А. и др.* Трансплантація культур β-кліток піджелудочної залози новонароджених поросят, хворих сахарним діабетом // *Матеріали І-го з'їзду трансплатологів України.*— Киев, 1995.— С.180-181.
17. *Шторх В., Эмрах И.* Определение клеточных маркеров методом мембранной иммуофлюоресценции. Иммунологические методы / Под ред. В.Фрилля.— М: Медицина, 1987.— С. 254-268.
18. *Balasa B., La Cava A., Van Gunst K. et al.* A mechanism for IL-10-mediated diabetes in the nonobese diabetic (NOD) mouse: ICAM-1 deficiency blocks accelerated diabetes // *J. Immunol.*— 2000.— Vol. 165, N12.— P. 7330-7337.
19. *Bertry-Coussot L., Lucas B., Danel C. et al.* Long-term reversal of established autoimmunity upon transient blockade of the LFA-1/intercellular adhesion molecule-1 pathway // *J. Immunol.*— 2002.— Vol. 168, N19.— P. 3641-3648.
20. *Chen C., Lee W. H., Yun P., Snow P., Liu Chin-Pin.* Induction of autoantigen-specific Th2 and Tr1 regulatory T cells and modulation of autoimmune diabetes // *J. Immunol.*— 2003.— Vol. 171, N2.— P. 733-744.
21. *Chen Y., Shi Du Yan S., Colgan J. et al.* Blockade of late stages of autoimmune diabetes by inhibition of the receptor for advanced glycation end products // *J. Immunol.*— 2004.— Vol. 173, N2.— P. 1399-1405.
22. *Goltsev A.N.* Possible causes of autoimmune pathology development and search for ways of its treatment // *Probl. med. nauki ta osvity.*— 2000.— N1.— P. 22-37.
23. *Goltsev A.M., Babenko N.M., Ostankova L.V et al.* Application of cryopreserved products of embryofetoplacental complex as correctors of autoimmune diseases in the model of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) // *Transplantologiya.*— 2003.— Vol. 4, N1.— P. 207-209.
24. *Grischenko V.I.* The role of cryobiology in creation of biotechnologies for cell and tissue transplantation // *Problems of Cryobiology.*— 2001.— N3.— P. 7-9.
25. *Grischenko V.I., Goltsev A.N.* Transplantation of the products of embryofetoplacental complex. From understanding of mechanism of the effect to increasing the efficiency of application // *Problems of Cryobiology.*— 2002.— N1.— P. 54-87.
26. *General-ethic principles of experiments in animals* // *Endokrinologiya.*— 2003.— Vol. 8, N1.— P. 142-145.
27. *Zvereva L.S., Dubinkin I.V., Zilov A.V. et al.* Immunological approaches to insulin-dependent Diabetes mellitus prediction // *Problemy endokrinologii.*— 1999.— N6.— P. 3-6.
28. *Immunology: Laboratory manual* / Ed. by E.I. Paster et al.— Kiev: Vyscha shkola, 1989.— 304 p.
29. *Kolesnik Yu.M., Orlovsky M.A.* Pancreatic islets: some aspects of morphology, physiology and destruction processes at Diabetes mellitus of I type // *Problemy endokrinologii.*— 2004.— Vol. 50, N2.— P. 3-10.
30. *Malyshev I.Yu., Kruglov S.V., Bantina L.Yu. et al.* Stress-response and apoptosis in pro- and anti-inflammatory phenotype of macrophages // *Bull. eksperim. biologii i meditsiny.*— 2004.— Vol. 138, N8.— P. 162-165.
31. *Melnichenko A.G., Fadeyev V.V.* Autoimmune insulin syndrome as the reason of hypoglycemic state // *Problemy endokrinologii.*— 1997.— N5.— P. 48-51.
32. *Sadovnikova N.V., Kondratyev K.Yu., Fedorov V.P.* Modelling of diabetes mellitus in rats: latent and manifested forms // *Problemy endokrinologii.*— 1988.— N5.— P. 69-75.
33. *Sandomirsky B.P., Volkova N.A., Galchenko S.E., Belochkina I.V.* The effect of cryopreservation regimens on the integrity of microfragments of piglets' pancreas // *Problems of Cryobiology.*— 2000.— N2.— P. 76-80.
34. *Struchkov P.V., Konstantinova N.A., Lavrentiev V.V. et al.* Screening-test to estimate pathogenic properties of immune complexes // *Laboratornoe delo.*— 1985.— N7.— P. 410-413.
35. *Tronko M.D., Turchin I.S., Kovalskaya I.A. et al.* Transplantation of β-cell cultures of newborn piglet pancreas to patients with Diabetes mellitus // *Materials of the 1st Congress of Transplantologists of Ukraine.*— Kiev, 1995.— P.180-181.
36. *Shtorkh V., Emmarkh I.* Determination of cell markers using the method of membrane immune fluorescence. Immunological methods / Ed. by V. Frill.— Moscow: Meditsina, 1987.— P.254-268.
37. *Balasa B., La Cava A., Van Gunst K. et al.* A mechanism for IL-10-mediated diabetes in the nonobese diabetic (NOD) mouse: ICAM-1 deficiency blocks accelerated diabetes // *J. Immunol.*— 2000.— Vol. 165, N12.— P. 7330-7337.
38. *Bertry-Coussot L., Lucas B., Danel C. et al.* Long-term reversal of established autoimmunity upon transient blockade of the LFA-1/intercellular adhesion molecule-1 pathway // *J. Immunol.*— 2002.— Vol. 168, N19.— P. 3641-3648.
39. *Chen C., Lee W. H., Yun P., Snow P., Liu Chin-Pin.* Induction of autoantigen-specific Th2 and Tr1 regulatory T cells and modulation of autoimmune diabetes // *J. Immunol.*— 2003.— Vol. 171, N2.— P. 733-744.
40. *Chen Y., Shi Du Yan S., Colgan J. et al.* Blockade of late stages of autoimmune diabetes by inhibition of the receptor for advanced glycation end products // *J. Immunol.*— 2004.— Vol. 173, N2.— P. 1399-1405.
41. *Chong M. M. W., Chen Y., Darwiche R. et al.* Suppressor of cytokine signaling-1 over expression protects pancreatic cells from CD8+ T cell-mediated autoimmune destruction // *J. Immunol.*— 2004.— Vol. 172, N9.— P. 5714-5721.

22. Chong M. M. W., Chen Y., Darwiche R. et al. Suppressor of cytokine signaling-1 over expression protects pancreatic cells from CD8⁺T cell-mediated autoimmune destruction // *J. Immunol.*— 2004.— Vol. 172, N9.— P. 5714-5721.
23. Ejrnaes M., Videbaek N., Christen U. et al. Different diabetogenic potential of autoaggressive CD8⁺ clones associated with IFN-inducible protein 10 (CXC chemokine ligand 10) production but not cytokine expression, cytolytic activity, or homing characteristics // *J. Immunol.*— 2005.— Vol. 174, N5.— P. 2746-2755.
24. Gregg K., Bell J., Lee H. et al. IL-10 diminishes CTLA-4 expression on islet-resident T-cells and sustains their activation rather than tolerance // *J. Immunology.*— 2005.— Vol. 174, N2.— P. 662-670.
25. Havari E., Lennon-Dumenil A. M., Klein L. et al. Expression of the B7.1 costimulatory molecule on pancreatic cells abrogates the requirement for CD4 T-cells in the development of type 1 diabetes // *J. Immunology.*— 2004.— Vol. 173, N2.— P. 787-796.
26. Larbi A., Grenier A., Frisch F. et al. Acute in vivo elevation of intravascular triacylglycerol lipolysis impairs peripheral T cell activation in humans // *Am. J. Clin. Nutr.*— 2005.— Vol. 82, N5.— P. 949-956.
27. Mallone R., Nepom G.T. Targeting T lymphocytes for immune monitoring and intervention in autoimmune diabetes // *Am. J. Therap.*— 2005.— Vol. 12, N6.— P. 534-550.
28. Oikawa Y., Shimada A., Kasuga A. et al. Systemic administration of IL-18 promotes diabetes development in young nonobese diabetic mice // *J. Immunol.*— 2003.— Vol. 171, N11.— P. 5865-5875.
29. Silva D. G., Petrovsky N., Socha L. et al. Mechanisms of accelerated immune-mediated diabetes resulting from islet cell expression of a Fas ligand transgene // *J. Immunol.*— 2003.— Vol. 170, N10.— P. 4996-5002.
30. Suk K., Kim S., Kim Y.H. et al. IFN- γ /TNF – synergism as the final effector in autoimmune diabetes: A key role for STAT1/IFN regulatory factor-1 pathway in pancreatic cell death // *J. Immunol.*— 2001.— Vol. 166, N7.— P. 4481-4489.
31. Wen L., Peng J., Li Z., Wong F. S. The effect of innate immunity on autoimmune diabetes and the expression of Toll-like receptors on pancreatic islets // *J. Immunol.*— 2004.— Vol. 172, N5.— P. 3173-3180.
32. Yang Z., Chen M., Wu R. et al. Suppression of autoimmune diabetes by viral IL-10 gene transfer // *J. Immunol.*— 2002.— Vol. 168, N12.— P. 6479-6485.
23. Ejrnaes M., Videbaek N., Christen U. et al. Different diabetogenic potential of autoaggressive CD8⁺ clones associated with IFN-inducible protein 10 (CXC chemokine ligand 10) production but not cytokine expression, cytolytic activity, or homing characteristics // *J. Immunol.*— 2005.— Vol. 174, N5.— P. 2746-2755.
24. Gregg K., Bell J., Lee H. et al. IL-10 diminishes CTLA-4 expression on islet-resident T-cells and sustains their activation rather than tolerance // *J. Immunol.*— 2005.— Vol. 174, N2.— P. 662-670.
25. Havari E., Lennon-Dumenil A. M., Klein L. et al. Expression of the B7.1 costimulatory molecule on pancreatic cells abrogates the requirement for CD4 T-cells in the development of type 1 diabetes // *J. Immunol.*— 2004.— Vol. 173, N2.— P. 787-796.
26. Larbi A., Grenier A., Frisch F. et al. Acute in vivo elevation of intravascular triacylglycerol lipolysis impairs peripheral T cell activation in humans // *Am. J. Clin. Nutr.*— 2005.— Vol. 82, N5.— P. 949-956.
27. Mallone R., Nepom G.T. Targeting T lymphocytes for immune monitoring and intervention in autoimmune diabetes // *Am. J. Therap.*— 2005.— Vol. 12, N6.— P. 534-550.
28. Oikawa Y., Shimada A., Kasuga A. et al. Systemic administration of IL-18 promotes diabetes development in young nonobese diabetic mice // *J. Immunol.*— 2003.— Vol. 171, N11.— P. 5865-5875.
29. Silva D. G., Petrovsky N., Socha L. et al. Mechanisms of accelerated immune-mediated diabetes resulting from islet cell expression of a Fas ligand transgene // *J. Immunol.*— 2003.— Vol. 170, N10.— P. 4996-5002.
30. Suk K., Kim S., Kim Y.H. et al. IFN- γ /TNF – synergism as the final effector in autoimmune diabetes: A key role for STAT1/IFN regulatory factor-1 pathway in pancreatic cell death // *J. Immunol.*— 2001.— Vol. 166, N7.— P. 4481-4489.
31. Wen L., Peng J., Li Z., Wong F. S. The effect of innate immunity on autoimmune diabetes and the expression of Toll-like receptors on pancreatic islets // *J. Immunol.*— 2004.— Vol. 172, N5.— P. 3173-3180.
32. Yang Z., Chen M., Wu R. et al. Suppression of autoimmune diabetes by viral IL-10 gene transfer // *J. Immunol.*— 2002.— Vol. 168, N12.— P. 6479-6485.

Accepted in 13.06.2007

Поступила 13.06.2007