

Частина низькомолекулярних пептидів не визначається в екстрактах після охолодження в режимі 3.

Ключові слова: водно-сольовий екстракт, білково-пептидний склад, хроматограма.

of low molecular peptides is not found in the extracts after cooling at regimen 3.

Key words: aqueous-saline extract, protein-peptide composition, chromatogram.

УДК 616.441-002

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ АУТОИММУННЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ – ПЛАЦДАРМ ОЦЕНКИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ПРОДУКТОВ ФЕТОПЛАЦЕНТАРНОГО КОМПЛЕКСА

Д.П. Гладких, А.Н. Голышев

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

На экспериментальной модели аутоиммунного тиреоидита продемонстрирована терапевтическая эффективность введения в организм больного животного нативных и криоконсервированных клеток фетальной печени. Обсуждены преимущества и возможные механизмы лечебного действия препаратов эмбриофетоплацентарного комплекса.

Ключевые слова: аутоиммунный тиреоидит, клетки фетальной печени.

В широком спектре патологических состояний организма человека особую значимость имеют аутоиммунные заболевания (АИЗ) [5]. Их развитие является причиной разбалансировки гармонического взаимодействия систем нейроиммуно-эндокринного блока [14]. Постулируется, что для коррекции функционального статуса нервной, иммунной и эндокринной систем, как и общего ансамбля этого блока, перспективными могут быть препараты не клональной, а надклональной системной регуляции, в частности, продукты фетоплацентарного комплекса (ПФПК) [14]. Целесообразность применения ПФПК обоснована идентификацией в них широкого спектра биологически активных субстанций, включая клетки стволового компартмента, а также различные медиаторы химической природы [14]. Однако остается очевидной необходимость проведения экспериментальных исследований по изучению механизма их влияния на организм. Предполагается, что полифункциональность ПФПК объясняется их способностью в условиях развития конкретной патологии отвечать на «запрос ситуации» [14]. Обладая мощным регуляторным потенциалом, клеточный компонент ПФПК в организме реципиента становится одновременно и регулируемым конкретным цитокиновым профилем [6]. Следовательно, способность ПФПК функционировать в организме реципиента в широком диапазоне активности при какой-либо патологии определяется потенциалом каждого компонента донорской гетерогенной клеточной популяции [8]. В полной мере этот тезис справедлив и в отношении одного из важнейших представителей ПФПК, в частности, фетальной печени (ФП). В ракурсе рассмотренной в данной работе темы, особую значимость имеет иммуномоделирующий потенциал клеток ФП (КФП), который продемонстрирован в различных системах и условиях [2,4,12,15].

Обязательным компонентом технологического процесса применения ПФПК в клинической практике является их криоконсервирование [9,10,20]. Известно, что процесс криоконсервирования оказывает многовекторное влияние на биообъект. Степень такого влияния определяется не только особенностями и спектром физико-химических факторов, реализуемых в процессе криоконсервирования, но и исходным состоянием биообъекта [18]. Для КФП, например, принципиально значима зависимость криоустойчивости от срока гестации [12], стадии дифференцировки стволовых кроветворных и некроветворных клеток (СКК, МСК), степени экспрессии тех или иных мембранных маркеров, стадии клеточного цикла и т.д. [11]. Другими словами, модификация каждой из этих структурно-функциональных характеристик ФП после криоконсервирования может менять терапевтический их потенциал при лечении различных форм АИЗ. Тем не менее, объективное подтверждение (либо несостоятельность) этого тезиса может быть получена при адекватном выборе моделей АИЗ и спектра оцениваемых показателей, всесторонне характеризующих состояние того или иного компонента НИЭБ.

Целью работы была сравнительная оценка терапевтического потенциала криоконсервированных и нативных КФП в экспериментальной модели аутоиммунного тиреоидита (АИТ).

Материал и методы исследования. Эксперименты выполнены на мышах-самках линии С57В1|6J 5-месячного возраста массой 20 г. Животные были получены из питомника РАМН «Столбовая» с последующим содержанием в стандартных условиях вивария ИПКиК НАНУ. Для иммунизации животных из ткани щитовидных желез (ЩЖ) готовили тиреоидный антиген путем мягкой механической деструкции органа в стеклянном гомогенизаторе Поттера с добавлением физиологического раствора из расчета 1 мл/100 мг с дальнейшей фильтрацией через капроновый фильтр и центрифугированием в течение 5 мин при 1000 об/мин. В полученной надосадочной жидкости определяли содержание общего белка при помощи биуретовой реакции [22].

ЭАИТ индуцировали введением тиреоидного антигена (1-1,5 мг/мл по общему белку) с полным адьювантом Фрейнда в соотношении 1:1 в дозе 0,1 мл/мышь подкожно у основания хвоста дважды с интервалом 14 суток [31]. Интенсивность образования аутоантител (ААТ) к ткани щитовидной железы в сыворотке крови мышей определяли реакцией пассивной гемагглютинации (РПГА) с бараными эритроцитами [25,23].

Определение свободного тироксина (сТ4) и свободного трийодтиронина (сТ3) в сыворотке крови животных определяли иммуноферментным методом с использованием наборов Тиреоид-ИФА-свободный Т4 («Алкор Био», Россия) и ИммуноФА-СвТ3 («НВО Иммунотех», Россия). Для оценки клеточного звена иммунитета – КЗИ в селезенке мышей опытных и контрольных групп определяли содержание клеток, экспрессирующих фенотипические маркеры CD3 (Т-общие лимфоциты), CD4 (Т-хелперы), CD8 (Т-супрессоры/цитотоксические), CD19 (В-лимфоциты). Для этих целей применяли метод проточной цитофлуорометрии (FACS Calibur, BD, США) с использованием моноклональных антител фирм Biolegend (США) и BD (США). Оценку КЗИ, содержание ААТ и гормонов ЩЖ проводили на 14, 21, 28, и 35-е сутки после повторной иммунизации животных. КФП были получены у мышей линии СВА/Н на 14-е сутки гестации. Выделенные в стерильных условиях эмбрионы трижды промывали в чашке Петри физиологическим раствором с канамицином (100 ЕД/мл). Выделенную ФП дезинтегрировали в гомогенизаторе Поттера с добавлением среды 199 (Sigma, St. Louis, MO), содержащей 3% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) и 2% цитрата натрия (рабочая среда), с последующим ресуспендированием шприцем через иглы уменьшающегося диаметра и пропускали через многослойный капроновый фильтр.

Криоконсервирующий раствор был приготовлен на основе среды 199, содержащей 20% диметилсульфоксида (ДМСО) (объем/объем), 10% ЭТС и 2% цитрата натрия.

КФП криоконсервировали в пластиковых ампулах Nunc (Германия) в объеме 1,8 мл с концентрацией 1×10^6 /мл на установке УОП-6 производства ИПКиК НАНУ по двухэтапной программе со скоростью замораживания $1^\circ\text{C}/\text{мин}$ до -25°C на I этапе и последующим погружением в жидкий азот (-196°C) в соответствии с ранее описанным методом [4]. Оттаивание образцов проводили на водяной бане при температуре $40-41^\circ\text{C}$ в течение 45-50 сек при постоянном шутелировании ампул [4]. Клетки отмывали от ДМСО медленным однократным добавлением равного объема рабочей среды с последующим центрифугированием (400g, 10 мин). Количественный учет содержания клеток в суспензии до и после криоконсервирования проводили в камере Горяева [22]. Сохранность КФП определяли методом суправитального окрашивания трипановым синим [22] и бромистым этидием (Sigma, США) [31]. КФП, сохранность которых при оценке экспресс-методами составляла не менее 80%, вводили мышам-реципиентам С57В1/6J в дозе 5×10^6 /мышь однократно внутривенно через 7 суток после окончания индукции АИТ. В качестве контроля использовали клетки взрослой печени (КВП) той же линии мышей, что и КФП и введенные в той же дозе. Животные были разделены на следующие группы:

- 1 группа – интактные животные (контроль 1) (n=10);
- 2 группа – животные после индукции АИТ без лечения (n=20);
- 3 группа – животные после индукции АИТ и введения нативных КФП (нКФП) (n=20);
- 4 группа - животные после индукции АИТ и введения криоконсервированных КФП (кКФП) (n=20);

5 группа - животные после индукции АИТ и введения КВП (контроль 2) (n=20).

Проведенные работы не противоречат «Общим принципам экспериментов на животных», одобренным Национальным конгрессом по биоэтике и согласуются с положениями «Европейской Конвенции о защите позвоночных животных...». Полученные экспериментальные данные статистически обработаны.

Результаты исследования и их обсуждение. Считается, что АИТ является типичным АИЗ, в основе которого лежит срыв естественной толерантности к собственным антигенам щитовидной железы - ЩЖ [16]. Мультифакториальность и спектр этиологических факторов АИТ распространяются от наследственной, генетической детерминированности к развитию данного заболевания, до аггравации его манифестации при наложении ряда неблагоприятных факторов. К ним можно отнести действие стрессиндуцибельных факторов, различные форы инфекции, ионизирующее излучение, отравление ядами и другими токсическими веществами [17].

Преимущественно речь идет о нарушении гематотиреоидного барьера и развитии аутоиммунной реакции на «секвестрированные» антигены ЩЖ [19]. Хотя иммуноиндуцибельный потенциал белков ЩЖ и, в первую очередь, тиреоглобулина, лежит в основе воспроизведения патологии аутоиммунного генеза ЩЖ в эксперименте [30], корректные подходы индукции АИТ, как и объективные методы его диагностики остаются проблематичными [24]. Перспективным представляется расширение спектра показателей, характеризующих морфофункциональное состояние не только щитовидной железы при АИТ, но и статуса систем, причастных к ее развитию. Такой подход позволяет к тому же объективно оценить эффективность применения продуктов ПФПК, а именно, КФП как лечебного препарата при данной патологии.

Итак, иммунизация мышей тиреоидным антигеном сопровождалась появлением в сыворотке крови всех животных ААТ, которые на 14-е сутки после последней иммунизации определялись в максимальном титре (идентификация в сыворотке крови в разведении 1:512) (табл. 1). На этом фоне существенно изменялась гормонпродуцирующая активность железы (табл. 2). Оценка содержания тироксина (T_4) и трийодтиронина (T_3) в периферической крови животных после индукции АИТ показала, что изменение концентрации этих гормонов носило волнообразный характер. Так, концентрация T_4 на 14-е сутки была достоверно ниже нормы, но уже к 21-м суткам превышала ее в два раза. К 28-м суткам снижалась до уровня нормы и снова достоверно повышалась к 35-м суткам. Концентрация T_3 на протяжении периода 14-28 сутки была достоверно ниже нормы и только к 35-м суткам приближалась к ее уровню. Эти данные подтверждают нарушение гормонпродуцирующей активности ЩЖ, что характерно для АИТ. Судя по продукции T_4 , развившееся гиперфункциональное состояние ЩЖ можно классифицировать как манифестация одного из главных признаков гипертиреоза. Существенно, что гиперпродукция T_4 отмечалась на 21-е и 35-е сутки, т.е. спустя 7 дней после наиболее выраженного накопления антител (на 14 и 28 сутки). Известно, что вырабатываемые ААТ при АИТ не являются первоначально цитотоксическими, так как направлены против внутриклеточных антигенов [1]. Однако в группу этих антител входят тиреоид-стимулирующие ААТ, которые связываются с рецепторами на тироцитах и стимулируют выработку тиреоидных гормонов (LATS-антитела), что является наиболее частой причиной развития гипертиреоза [3]. Считается, что в инициации и поддержании АИЗ вне зависимости от вида этиологических факторов принимают участие те же субстраты ИС, которые реализуют иммуновоспалительную реакцию в рамках «физиологического коридора» [32]. Подтверждением тому служат и результаты оценки КЗИ, а именно, содержания клеток Т-ряда (табл. 3). Характер изменения содержания общих Т-лимфоцитов ($CD3^+$) имел четкую тенденцию к снижению уже с 14-х суток, а на 21-е и 35-е сутки их концентрация была в 2 раза ниже нормы. Снижение концентрации общих Т-лимфоцитов ($CD3^+$) является характерным признаком манифестации многих видов АИЗ и подчеркивает дисфункциональное состояние ИС в условиях их развития [4]. На этом фоне после индукции АИТ происходило перераспределение субпопуляций регуляторных Т-хелперов ($CD4^+$) и Т-супрессоров/цитотоксических ($CD8^+$) лимфоцитов. На протяжении всего срока наблюдения отмечалось более выраженное, чем в норме превалирование содержания Т-хелперов ($CD4^+$) над Т-супрессорами ($CD8^+$). В результате иммунорегуляторный индекс – ИРИ,

отражающий соотношение T_x и T_c ($CD4^+/CD8^+$) во все сутки наблюдения существенно превышал контроль. При этом важно, что, несмотря на нормализацию к 35-м суткам уровня Т-хелперов, концентрация Т-супрессоров оставалась достоверно ниже контроля. Это соответствует одному из главных постулатов иммунологии о несостоятельности клеток-супрессоров при развитии АИЗ [17,19].

Таблица 1

Титры антитериоидных антител в сыворотке крови животных с АИТ

Группы животных	Количество суток после иммунизации			
	14	21	28	35
АИТ	1:512	1:128-1:256	1:256-1:512	1:128-1:256
АИТ+нКФП	1:32-1:64	1:4 – 1:8	1:32-1:64	1:32-1:64
АИТ+кКФП	1:32-1:64	1:32-1:64	1:64-1:128	1:64
АИТ+КВП	1:256-1:512	1:128-1:256	1:256-1:512	1:256-1:512

Примечание: указаны последние разведения сыворотки, при которых определяется активность антител.

Таблица 2

Содержание свободных Т3 и Т4 в сыворотке крови животных с АИТ

Содержание свободных тиреоидных гормонов, пмоль/л	Интактные	АИТ	АИТ+нКФП	АИТ+кКФП	АИТ+КВП
		14 сутки			
Т4	48,2±3,42	33,4±2,7	71,8±5,0	62,4±5,61	74,9±4,5
Т3	3,0±0,2	2,6±0,2	2,5±0,2	2,5±0,2	2,5±0,2
21 сутки					
Т4		94,2±8,5	62,7±4,4	74,9±4,5	79,9±6,4
Т3		2,0±0,2	3,4±0,2	3,4±0,3	2,8±0,2
28 сутки					
Т4		50,7±3,5	56,9±3,4	64,9±5,2	71,7±5,7
Т3		2,6±0,2	2,2±0,2	2,94±0,2	2,6±0,2
35 сутки					
Т4		64,7±6,3	40,3±5,8	47,5± 2,9	96,8±6,8
Т3		3,1±0,2	2,9±0,2	2,5±0,2	5,7±0,5

Факт развития многих АИЗ именно на фоне нарушения гармоничного состояния этих двух регуляторных субпопуляций Т-клеток является общепризнанным и для него характерно либо преобладание (в сравнении с контролем) Т-хелперов ($CD4^+$), либо снижение субпопуляции Т-супрессоров ($CD8^+$) [4]. Оценка состояния КЗИ мышей с АИТ (табл. 3) продемонстрировала также и другие особенности изменения ИС, имеющих отношение к проблеме корректной идентификации патогенетически значимых признаков развития данной патологии. Например, существенное изменение содержания $CD19^+$ клеток (В-лимфоцитов) в селезенке мышей с АИТ свидетельствует о явной «заинтересованности» этих клеток в реализации данной патологии. За исключением 14-х суток концентрация В-клеток ($CD19^+$) достоверно превышала норму. Не исключено существование взаимосвязи повышения содержания пула этих клеток и инфильтрации ЩЖ В-лимфоцитами, наблюдаемой при определенных формах тироидитов, например, хроническом лимфоцитарном тироидите Хашимото [26]. В общем, очевидно, что при индукции выбранным способом АИТ в организме развивается дисрегуляторное состояние иммунной системы и ее составных компонентов. Речь, прежде всего, идет о разбалансировке регуляторных субстанций Т-клеток и, на этом фоне, выраженном формировании аутоантител к антигенам ЩЖ с возможной их кооперации с В-лимфоцитами и агрессии в отношении ЩЖ. Интегрированным ответом органа-мишени является нарушение его гормонпродуцирующей функции. В условиях теснейшего взаимодействия систем НИЭБ создается «порочный» круг дисрегуляторного его состояния, что определяет необходимость лечения АИТ терапевтическими средствами с полифункциональной (надсистемной) активностью.

Полученные результаты показали, что КФП обладают такого рода активностью. После применения криоконсервированных КФП была отмечена ингибирование аутоиммунной агрессии в отношении ЩЖ, что выражалось существенным снижением продукции ААТ (табл.2) на протяжении всего срока наблюдения. При этом даже на 35-е сутки титр ААТ у животных опытных групп был в 4 раза ниже, чем у животных, не подвергавшихся лечению. В сравнительном аспекте представляет интерес тот факт, что на 21-е и 28-е сутки супрессорная активность нативных КФП была выше, чем криоконсервированных. Эти результаты находятся в соответствии с данными, полученными

в [13]. В модели экспериментальной АИГА авторы продемонстрировали способность КФП ингибировать продукцию ААТ против аутоэритроцитов. При этом криоконсервированные в аналогичных условиях КФП также снижали иммуносупрессивный потенциал в отношении продукции ААТ. Не вызывает сомнения, что иммуносупрессивный эффект КФП реализуется через ее способность влиять на Т-звено иммунитета реципиента и, прежде всего, регуляторные субпопуляции Т-лимфоцитов. Действительно, представленные в табл.3 данные свидетельствуют о выраженной коррекции состояния популяций и субпопуляций Т-клеток после применения КФП.

Судя по ИРИ, корригирующий эффект нативных КФП в отношении супрессорной субпопуляции (CD8⁺) начинал проявляться с 21-х суток. Для криоконсервированных КФП максимальная выраженность такого эффекта достигала в более поздние сроки. Характеру выраженности активации супрессорной субпопуляции Т-клеток после применения КФП была четко соподчинена и динамика снижения гиперпродукции В-лимфоцитов (CD19⁺). Нормализация этого показателя после введения нативных КФП была отмечена на 28-е сутки эксперимента, тогда как после введения криоконсервированных КФП только на 35-е сутки.

Корригирующий эффект КФП в отношении ИС животных с АИТ в итоге отражался и на характере изменения функционального статуса ЩЖ. При этом представленные в табл. 2 данные свидетельствуют о ряде особенностей изменения гормонпродуцирующей функции ЩЖ после введения КФП. Так, уровень тироксина (Т4) повышался на 14-е сутки после введения КФП в 1,5-2 раза в сравнении как с контролем, так и животными с АИТ, не подвергавшимися лечению. На 21-е и 28-е сутки сохранялась повышенная продукция гормона в сравнении с интактным контролем, но уже намечалась четкая тенденция лечебного эффекта при сравнении с группой не леченных животных, максимальная выраженность которого проявлялась к 35-м суткам. В более ранние сроки проявлялся корригирующий эффект КФП в отношении трийодтиронина (Т3). На 21-е сутки его уровень был даже несколько выше контрольных показателей (интактные животные). Дальнейшее волнообразное изменение концентрации Т3 характеризовало, видимо, как особенности изменения состояния функционального статуса ЩЖ при патологии, так и выраженность влияния каждой из форм КФП.

В общем, полученные данные свидетельствуют о том, что выбранная экспериментальная модель АИТ является адекватной для апробации терапевтического потенциала КФП с оценкой тех патогенетически значимых изменений состояния различных систем, которые собственно и характеризуют развитие данной патологии. Речь, прежде всего, идет об ААТ к антигену ЩЖ, развитию дисрегуляторного состояния пула Т-клеток и его регуляторных субпопуляций, а также гиперэкспансии В-лимфоцитов. Такого рода изменения состояния иммунокомпетентной сферы отражалось на структурно-функциональном статусе ЩЖ, а именно, существенном изменении ее гормонпродуцирующей активности.

Заключение

Полученные данные подчеркивают способность КФП выступать в роли корректора каждого из оцененных звеньев общей патогенетической цепи развития АИТ. Представленные результаты свидетельствуют о том, что лечебный эффект КФП сфокусирован на базовой структуре организма реципиента, а, именно – иммунной системе.

Это согласуется с данными наших предыдущих работ о способности КФП и в других модельных системах реализовать иммуномодулирующий потенциал широким спектром иммуотропных веществ [7,8]. В свете рассматриваемой в работе темы, наибольший интерес из них представляют активаторы супрессорного звена иммунитета. Одним из них является АФП, обладающий способностью индуцировать продукцию ранними предшественниками ФП ТРФ-β, одного из основных супрессоров активности иммунокомпетентных клеток.

Иммуномодулирующий потенциал ФП связан также со стволовыми мезенхимальными клетками – МСК. В системе *in vivo* показано, что МСК пролонгируют сроки приживления гистонесовместимого органа [29], а при сотрансплантации с аллогенным костным мозгом (КМ) минимизируют степень проявления иммунного конфликта в виде болезни трансплантат против хозяина. МСК даже в малой концентрации в общем пуле КФП способны реализовать иммуносупрессивный эффект в отношении как клеток индукторов, так

и эффекторов развития АИГА [13]. При многих АИЗ, вводимые клетки ФП попадают в условия с преимущественной экспансией воспалительных медиаторов (ФНО- α , ИЛ-2, γ -ИФ и др.) [5,14]. Именно они индуцируют в МСК экспрессию ряда ферментов (indolamin 2,3-дезоксигеназа - ИДО), активирующих клетки-супрессоры. Т.е. МСК ФП также могут выступать в роли супрессора как афферентного, так и эфферентного звеньев иммунных реакций с минимизацией степени проявления АИТ.

Как один из важнейших компонентов аппликации клеточной и тканевой терапии в клинической практике являются криобиологические технологии. Особый интерес представляет проблема выраженности изменений структурно-функциональных характеристик после криоконсервирования биообъектов клеточной и тканевой терапии, что определяет полноту их терапевтического эффекта. Например, известно, что, нелетальные повреждения кроветворных предшественников криоконсервированного КМ отрицательно сказываются на темпах восстановления гемопоэза в организме реципиента [5,28]. Вполне реально, что и состояние наиболее значимых субпопуляций КФП с иммуномоделирующими характеристиками (СКК, МСК, гепатобласты, ОК, ЭМТ-клетки и т.д.) также изменяются [36]. Речь может идти о разном характере изменений после криоконсервирования как компонентного состава КФП, так и спектра продуцируемых ими регуляторных медиаторов.

Криоконсервирование, как мультипотентный стрессиндуцибельный фактор, действительно может выступать в роли триггера нарушений метаболизма и экспрессии генов не только в клетках млекопитающих-гибернаторов, но и тех, которые эволюционно не развили такой «адаптивности» к холоду. Например, в фибробластах млекопитающих криоконсервирование индуцирует экспрессию транскриптов, ответственных за наработку васкулярного эндотелиального ростового фактора (vascular endothelial growth factor – VEGF) и тромбоцит-продуцируемого (platelet-derived growth factor – PDGF) фактора. Холодовая гипоксия и отогрев индуцировали позитивную регуляцию экспрессии мРНК ICAM-молекул в культивируемой линии взрослой печени [27]. В работе [21] показано, что замораживание-отогрев нейтрофилов приводила к усилению экспрессии LFA-1 структур, что сопровождалось усилением их адгезии к сосудистому эпителию. С этими данными совпадают результаты работы [11] демонстрируется усиление после криоконсервирования экспрессии интегринов на КФП. Подобные или другого характера изменения могут иметь место в КФП с наработкой такого протеинового профиля, который и обуславливает ту феноменологию их поведения, которая манифестируется у животных с АИТ. В общем, очевидно, что КФП обладают корригирующим потенциалом в отношении базовых систем «бодигомеостаза» при лечении АИТ и сохраняют это свойство после криоконсервирования.

Литература

1. Андросова Д.С. Патоморфологический и иммунологический анализ аутоиммунных процессов в щитовидной железе/Д.С. Андросова, М.Ю.Баракат, Ю.В. Пругло// БЭБиМ. – 2007. – Т.143, №6. – С.704-708.
2. Артемова Е.П. Иммунокоррекция экспериментального аутоиммунного тиреоидита с помощью трансплантации криоконсервированного тимуса/Е.П. Артемова, А.Р.Сирота, В.Ю. Мокрецов// Проблемы криобиологии. – 1993. - №2. – С.50-55.
3. Боднар П.М. Эндокринология/П.М. Боднар, О.М. Приступюк, О.В. Щербак.-К.:Здоровье, 2002.-512 с.
4. Мембранные структуры, определяющие фенотипические характеристики и функциональный статус кроветворных клеток; возможная модификация под действием факторов криоконсервирования. Часть II./А.Н. Гольцев, Е.Д.Луценко, Л.В. Останкова [и др.]//Проблемы криобиологии. – 1995. - №4. – С.19-28.
5. Гольцев А.Н. Возможные причины развития аутоиммунной патологии и поиск путей её лечения/А.Н. Гольцев//Проблеми мед. науки і освіти. – 2000. – № 1. – С. 22-37.
6. Гольцев А.Н. Ответ лимфогемопоэтической системы организма на введение продуктов фетоплацентарного комплекса/ А.Н. Гольцев, Л.В.Останкова, Е.Д. Луценко//Проблемы криобиологии. – 2000. - №2. – С.15-30.
7. Гольцев А.Н. Поиск альтернативных криоконсервированию путей модификации иммунореактивности алломиелотрансплантата/А.Н. Гольцев, Т.Г. Дубрава, Е.Д. Луценко//Проблемы криобиологии. – 2000. – №1. – С. 10–21.
8. Гольцев А.Н. Межклеточные взаимодействия в иммунокомпетент-ной сфере при ревматоидном артрите после применения гемопоэтических клеток эмбриональной печени/А.Н. Гольцев, И.В. Рассоха, Е.Д. Луценко //Проблемы криобиологии. – 2003. - №3. – С.45-53.

9. Гольцев А.Н. Криоконсервирование – фактор оптимизации терапевтического эффекта продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса (ПЭФПК). Часть I. Патология аутоиммунного генеза как модель оценки терапевтического эффекта применения ПЭФПК/ А.Н. Гольцев, К.Н. Попова, М.А. Сироус//Проблемы криобиологии. – 2006. – Т.16, №3. – С. 326-340.
10. Гольцев А.Н. Криоконсервирование – фактор оптимизации терапевтического эффекта продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса (ПЭФПК). Часть II. Коррекция состояния лимфогемопозитического комплекса экспериментальных животных с АИГА клетками фетальной печени/А.Н. Гольцев, К.Н. Попова, М.А. Сироус//Проблемы криобиологии. – 2006. – Т.16, №4. – С. 396-407.
11. Гольцев А.Н. Идентификация фенотипических характеристик и оценка влияния различных режимов криоконсервирования на функциональный потенциал клеток фетальной печени/А.Н. Гольцев, Е.Е. Ямпольская, Т.Г. Дубрава//Вісник ХНУ ім. В.Н. Каразіна. Серія: біологія. – 2006. – Вип..4, №748. – С. 121-127.
12. Гольцев А.Н. Особенности влияния криоконсервирования на функциональный потенциал стволовых кроветворных клеток фетальной печени разных сроков гестации/ А.Н. Гольцев, Т.Г. Дубрава, Л.В. Останкова // Проблемы криобиологии. – 2009. – Т.19, №2. – С.186-199.
13. Горская А.Ю. Особенности проявления модулирующей активности клеток эмбриональной печени на лимфогемопозитический комплекс мышей с аутоиммунной гемолитической анемией/А.Ю. Горская, Е.Д. Луценко, М.В. Останкова //Проблемы криобиологии. – 2003. – №2. – С. 31–37.
14. Грищенко В.И. Трансплантация продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса. От понимания механизма действия к повышению эффективности применения/В.И. Грищенко, А.Н. Гольцев// Проблемы криобиологии. – 2002. – № 1. – С. 54-85.
15. Грищенко В.И. Криоконсервирование как фактор модификации иммунологических характеристик тканевых трансплантатов / В.И. Грищенко, А.Н. Гольцев, Т.Н. Юрченко //Проблеми ендокринної патології. – 2005. – №4. – С.88-97.
16. Дедов И.И. Аутоиммунные заболевания щитовидной железы: состояние проблемы/И.И. Дедов, Е.А.Трошина, С.С. Антонова [и др.]//Проблемы эндокринологии. – 2002. – Т.48, №2. – С.6-13.
17. Каминский А.В. Хронический аутоиммунный тиреодит (этиология, патогенез, радиационные аспекты)/А.В. Каминский//Український медичний часопис. – 1999. - №1. – С.16-21.
18. Козлова Ю.А. Влияние изолированных физико-химических факторов криоконсервирования на клетки костного мозга с различным исходным структурно-функциональным статусом/Ю.А. Козлова, А.Н. Гольцев, М.В. Останков//Проблемы криобиологии. – 2003. – № 4. – С. 3-11.
19. Кузьменко А.П. Иммунологические факторы в патогенезе аутоиммунных заболеваний эндокринных желез/А.П. Кузьменко, Ю.П. Шорин // Проблемы эндокринологии. – 1991.- № . – С.59-63.
20. Перспективы применения криоконсервированных препаратов эмбриофетоплацентарного комплекса при тиреоидной патологии/Н.Г. Малова, Ю.И. Караченцев, Т.С. Божко [и др.]// Проблеми ендокринної патології. – 2006. - №3. – С.63-68.
21. Мацевитая И.Ю. Влияние факторов криоконсервирования на структурно- функциональные свойства клеток адгезивной фракции костного мозга / И.Ю. Мацевитая, А.Н. Гольцев, Е.Е. Ямпольская [и др.]// Проблемы криобиологии. – 2005. – Т.15, №3. – С.422-424.
22. Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования. Справочник/В.В. Меньшиков.– М.: Медицина, 1987. – 368 с.
23. Николаев А.И. Дальнейшие исследования агрессивности антитиреоидных антител /А.И. Николаев, Е.П. Артемова//Пробл. эндокринологии. – 1968. - №2. – С.82-85.
24. Петунина Н.А. Клиника, диагностика и лечение аутоиммунного тиреоидита/Н.А. Петунина// Проблемы эндокринологии. – 2002. – Т.48, №6. – С.16-21.
25. Справочник по клиническим лабораторным методам исследования/[Е.А. Костенко и др.], под ред. Е.А. Костенко. – М.: Медицина, 1968. – 437 с.
26. Старкова Н.Т. Клиническая эндокринология/Н.Т. Старкова.–М.: Медицина, 1991. -512 с.
27. Фуллер Б. Охлаждение, криоконсервирование и экспрессия генов в клетках млекопитающих/Б. Фуллер, К.Грин, В.И. Грищенко// Проблемы криобиологии. – 2004. - №3. – С.58-71.
28. Цуцаева А.А. «Хоминг» и пролиферация кроветворных клеток (КОЕ_С) криоконсервированного костного мозга в селезенке и костном мозге реципиентов/А.А. Цуцаева, А.Н.Гольцев// Криобиология.– 1987.-№4.–С.9-15.
29. Bartholomew A. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vitro/A. Bartholomew, C. Sturgeon, M. Siatskas [et al.]// Exp. Hematol. – 2002. – V.30, №1. – P.42-48.
30. Chen K. Induction of experimental autoimmune thyroiditis in IL-12^{-/-} mice/K. Chen, Y. Wei, G.C. Sharp [et al.]// The J. of Immunology. – 2001. – Vol. 167. – P. – 1720-1727.
31. Dankberg F. A test of granulocyte integrity and phagocytic function/F. Dankberg, M.D. Persidsky//Cryobiology.-1976.-Vol. 13.-P. 430-432.
32. Fistfalen M.E. Molecular Endocrinology. Basic Concepts and Clinical Correlation/M.E. Fistfalen, Z.J. de Groot.- New York: Weintraub, 1995. –P.319-370.

Реферати

**ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ АУТОІМУННІ
ЗАХВОРЮВАННЯ ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ –
ПЛАЦДАРМ ОЦІНКИ ТЕРАПЕВТИЧНОГО
ПОТЕНЦІАЛУ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ПРОДУКТІВ
ФЕТОПЛАЦЕНТАРНОГО КОМПЛЕКСУ**

Гладких Д.П., Гольцев А.Н.

На експериментальній моделі аутоімунного тиреоїдиту продемонстрована терапевтична ефективність введення в організм хворої тварини нативних та криоконсервованих клітин фетальної печінки. Обговорені переваги і можливі механізми лікувальної дії препаратів ембріофетоплацентарного комплексу.

Ключові слова: аутоімунний тиреоїдит, клітини фетальної печінки.

**EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE DISEASES OF
THYROID GLAND AS ESTIMATION FIELD OF
THERAPEUTIC POTENTIAL OF
CRYOPRESERVED PRODUCTS OF
FETOPLACENTAL COMPLEX**

Gladkih D.P., Goltsev A.N.

Basing on the experimental model of autoimmune thyroiditis the therapeutic efficiency of the introduction of native and cryopreserved fetal liver cells into animal organism is shown in this research. The advantages and possible mechanisms of therapeutic effect of preparations of embryo fetoplacental complex are discussed.

Key words: autoimmune thyroid, fetal liver cells.

УДК 519.463+616.681/.686-001-018

**ОСОБЛИВОСТІ СТРУКТУРНИХ ЗМІН В ЯЄЧКУ ПІСЛЯ ТИМЧАСОВОГО УТРИМУВАННЯ
СІМ'ЯНОГО КАНАТИКА У ТРИМАЛЦІ**

О.Я. Глодан

Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника, м. Івано-Франківськ

Експериментальні дослідження гістоструктурних змін у звивистих сім'яних трубочках та клітинах Лейдіга яєчка щурів у різні терміни після утримування сім'яного канатика у трималці, яке здійснювали під загальним ефірним наркозом, виявили певні коливання кількісних морфометричних показників, ступінь яких залежить від тривалості експерименту.

Ключові слова: яєчко, сперматогенез, тимчасова гіпоксія.

Публікація є фрагментом науково-дослідної роботи (номер держреєстрації 0150U009082).

Порушення сперматогенезу у чоловіків репродуктивного віку у 30-60% являються причиною неплідного шлюбу. До зниження сперматогенної та гормональної функції яєчка призводять гострі та хронічні розлади кровообігу в ньому [1]. Останні мають місце при наявності пахвинної грижі, вміст котрої тисне на кровеносні судини сім'яного канатика, а циркуляторна гіпоксія порушує сперматогенез [4]. Нерідко сама операція розсікання грижі негативно впливає на яєчко [3], бо супроводжується розладами кровообігу в кровеносних судинах сім'яного канатика (компресія судин та нервів при тісному зашиванні внутрішнього чи зовнішнього отвору пахвинного каналу, поранення і перев'язка кровеносних судин, їх втягування в післяопераційний рубець).

Однак переважна більшість робіт, присвячених пластиці пахвинного каналу, стосується надійності того чи іншого способу в плані зниження можливого рецидиву грижі [4], а таким ускладненням як часткова атрофія яєчка на стороні операції, не надається достатньої уваги. У доступній нам літературі ми не знайшли посилань на те, як впливає на сперматогенез такий фактор, як утримування сім'яного канатика у трималці під час пластики пахвинного каналу, що і послужило причиною для проведення нами експериментів.

Метою роботи було вивчити структурні зміни в яєчку після тимчасового утримування сім'яного канатика у трималці в експерименті.

Матеріал та методи дослідження. Дослідження проведено на 60-ти статевозрілих білих щурах самцях, у яких під ефірним наркозом моделювали герніотомію з утримуванням сім'яного канатика у трималці 3, 5 і 10 хв.. Через 1, 7, 30 і 90 діб від початку досліду тканини яєчка фіксували в розчині Буена. Зрізи з парафінових блоків забарвлювали гематоксиліном і