

А.Н. Гольцев, Е.А. Порожан, Н.Н. Бабенко, М.В. Останков

## Апоптотические процессы в тимусе и головном мозге при развитии экспериментального аллергического энцефаломиелимита до и после лечения фетальными нервными клетками

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

**Ключевые слова:** апоптоз, тимус, головной мозг.

Представлены экспериментальные данные о содержании p53<sup>+</sup>клеток в тимусе и головном мозге у животных с экспериментальным аллергическим энцефаломиелимитом. Показано иммуномодулирующее влияние криоконсервированных фетальных нервных клеток на апоптотические процессы, что коррелировало со снижением манифестных признаков патологии.

### Апоптотичні процеси в тимусі та головному мозку при розвитку експериментального алергійного енцефаломієліту до та після лікування фетальними нервовими клітинами

А.М. Гольцев, Є.О. Порожан, Н.М. Бабенко, М.В. Останков

Представлено експериментальні дані про зміст p53<sup>+</sup>клітин у тимусі та головному мозку тварин з експериментальним алергійним енцефаломієлітом. Показано імуномодулюючий вплив криоконсервованих фетальних нервових клітин на апоптотичні процеси, що корелювало зі зниженням манифестних ознак патології.

**Ключові слова:** апоптоз, тимус, головний мозок.

*Патологія.* – 2011. – Т.8, №2. – С. 69–72

### Apoptotic processes in thymus and brain during experimental allergic encephalomyelitis development before and after treatment with fetal neural cells

A.N. Goltsev, Ye.A. Porozhan, N.N. Babenko, M.V. Ostankov

The experimental data about p53<sup>+</sup> cell content in thymus and brain of animals with experimental allergic encephalomyelitis is presented. Immunomodulating influence of cryopreserved fetal neural cells on apoptotic processes is demonstrated which correlated with a decrease in pathology manifestation.

**Key words:** apoptosis, thymus, brain.

*Pathologia.* 2011; 8(2): 69–72

В последние годы ученые сосредоточили внимание на изучении процессов апоптоза при развитии рассеянного склероза (РС) – нейродегенеративного заболевания аутоиммунной природы [1]. При данной патологии аутореактивные Т-клетки, сенсibilизированные основным белком миелина (ОБМ), проникают в мозг и инициируют воспалительный процесс, следствием которого является апоптоз клеток центральной нервной системы (ЦНС), демиелинизация и разрушение аксонов. Причиной данной феноменологии может быть ускользание от апоптоза аутореактивных к ОБМ клеток в процессе клональной селекции в тимусе [2].

В большинстве случаев для лечения РС сегодня используют глюкокортикостероидную терапию, которая оказывает противовоспалительное и иммуносупрессивное действие. Введение глюкокортикоидов в высоких дозах стабилизирует состояние гематоэнцефалического барьера и ограничивает аутоиммунные процессы [3]. К сожалению, подобные методы лекарственной терапии не всегда эффективны у пациентов с прогрессирующим течением РС [4]. В связи с этим, в последние годы при лечении РС все чаще применяют принципиально новый подход – иммуномодулирующую терапию с использованием фетальных нервных клеток (ФНК) [5]. Однако практически отсутствуют данные о влиянии ФНК на апоптотические процессы в ЦНС и тимусе при РС и его аналоге, экспериментальном аллергическом энцефаломиелите (ЭАЭ).

#### Цель работы

Изучить апоптоз в клетках тимуса и головного мозга при ЭАЭ до и после применения ФНК.

#### Материалы и методы исследования

Эксперименты на животных проведены 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 в других научных целях» (Страсбург, 1985 г.). В работе использованы беспородные белые крысы массой 150–200 г, содержащиеся в стандартных условиях вивария ИПКиК НАН Украины.

Суспензию ФНК получали методом щадящей механической диссоциации фрагментов мозга эмбрионов крыс 11 суток гестации и криоконсервировали на программном замораживателе УОП-6 (СКТБ с ОП ИПКиК НАН Украины, Харьков).

Использованы следующие режимы (Р) криоконсервирования:

- Р1: охлаждение со скоростью 1°/мин до -5°С с последующей инициацией кристаллообразования в течение 5 мин, затем охлаждение со скоростью 2°/мин до -60°С и погружение в жидкий азот [6].
- Р2: охлаждение со скоростью 1°/мин до -9°С, температурная остановка в течении 10 мин, затем охлаждение со скоростью 1°/мин до -25°С, 10°/мин до -60°С и погружение в жидкий азот [7].

© А.Н. Гольцев, Е.А. Порожан, Н.Н. Бабенко, М.В. Останков, 2011

Патологія, 2011, Т.8, №2

Отогрев образцов проводили на водяной бане при температуре +37°C в течение 50 с при постоянном шутелировании ампул.

ЭАЭ индуцировали у крыс по методу Давыдовой (1969) введением гомогената гомологичной спинномозговой ткани (50 мг) с полным адьювантом Фрейнда. Значения исследуемых показателей контрольной группы были приняты за 100%.

Тяжесть клинической картины заболевания оценивали по шкале [8]: 1+ – сниженный тонус хвоста; 2+ – слабость или легкий паралич задних конечностей; 3+ – тяжелый паралич задних или всех конечностей; 4+ – предсмертное состояние; 5+ – смерть.

Введение ФНК проводили на 14 сутки развития ЭАЭ внутрибрюшинно в дозе  $5 \times 10^6$  клеток на 100 г веса животного. Контролем служили животные, которым вводили нативные ФНК (нФНК) и взрослые нервные клетки (ВНК).

Для оценки содержания в тимусе и ЦНС крыс клеток, экспрессирующих фенотипические маркеры апоптоза, применяли метод проточной цитофлуориметрии (FACS Calibur, BD, США) с использованием антикрысиных моноклональных антител (Abscam, Великобритания) к р53. Учет данных осуществляли с помощью программы WinMDI 2.8. Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия Манна-Уитни и пакета программ Excel.

### Результаты и их обсуждение

Активировать гены, участвующие в индукции клеточной смерти за счет своей транскрипционной функции способен белок р53 [9]. При этом белок р53 принимает непосредственное участие в индукции митохондриального пути апоптоза. Показано, что повреждение ДНК способствует накоплению р53, который, в свою очередь, блокирует прогрессию клеточного цикла в фазе G1, препятствуя репликации ДНК до репарации повреждения [10]. Если репарация повреждения невозможна, то белок р53 запускает механизм апоптоза [9]. Учитывая важность влияния изменений уровня белка р53 в регуляции интенсивности апоптоза тимоцитов, определяли уровень этого белка в тимусе животных с ЭАЭ.

В доманифестационный период развития ЭАЭ (7сутки) достоверного снижения абсолютного количества р53<sup>+</sup>клеток не выявлено (рис. 1). Постепенное уменьшение содержания данных клеток в тимусе (7–28 сутки развития ЭАЭ) может свидетельствовать о нарушении отрицательной селекции, осуществляемой путем апоптоза тканеспецифических аутореактивных Т-клеток. На 28 сутки развития патологии количество р53<sup>+</sup> клеток было снижено в 2 раза, по сравнению с контролем. Причиной подобной динамики может быть «дефект» экспрессии основных костимуляторных молекул – CD80 (B7.1) и CD86 (B7.2) на антигенпрезентирующих клетках (АПК) и CD28, CTLA-4, ICOS на тимоцитах, что обуславливает снижение выраженности процесса костимуляции при ЭАЭ [2,11]. Существенное увеличение содержания р53<sup>+</sup>клеток (в 3 раза) зафиксировано на 35 сутки ЭАЭ, когда манифестные признаки патологии были нивелированы.

Введение ФНК обеспечивало снижение абсолютного количества р53<sup>+</sup>клеток в тимусе крыс на 21 сутки развития ЭАЭ. Данный показатель достоверно не отличался в группах с введением нФНК и кФНК-2. Важно отметить, что после введения криоконсервированного материала количество р53<sup>+</sup> клеток увеличивалось уже с 28 суток наблюдения, однако контрольных значений данный показатель достигал на 35 сутки развития ЭАЭ и достоверно не отличался у животных, которым вводили кФНК-1 и кФНК-2. Предположительно, ФНК могут активировать апоптоз тимоцитов через Fas-рецептор, продукцией ФНО и ИЛ-10, повышая уровень костимуляции [2], хотя точные механизмы не известны.

Анализ интенсивности апоптотических процессов в головном мозге как непосредственном очаге воспалительного процесса при ЭАЭ показал, что начиная с 7 суток развития патологического процесса отмечается увеличение содержания р53<sup>+</sup> клеток (рис. 2). Развернутая картина клинических признаков проявления патологии (21 сутки) сопровождалась максимальным количеством клеток в состоянии апоптоза с дальнейшим снижением интенсивности апоптотических процессов до величин, характерных для интактного организма, что совпадало с затуханием патологического процесса.

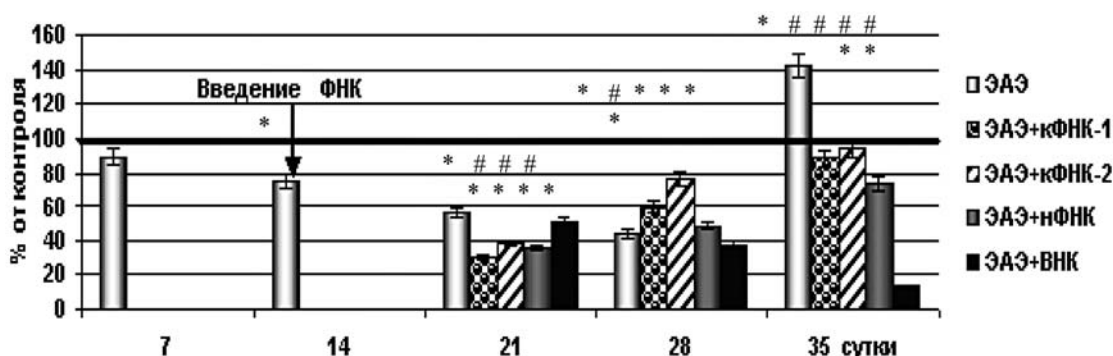


Рис. 1. Содержание р53<sup>+</sup>клеток в тимусе крыс при ЭАЭ до и после лечения. Примечание: различия статистически достоверны (p<0,05) по сравнению: \* – с контролем; # – с ЭАЭ.

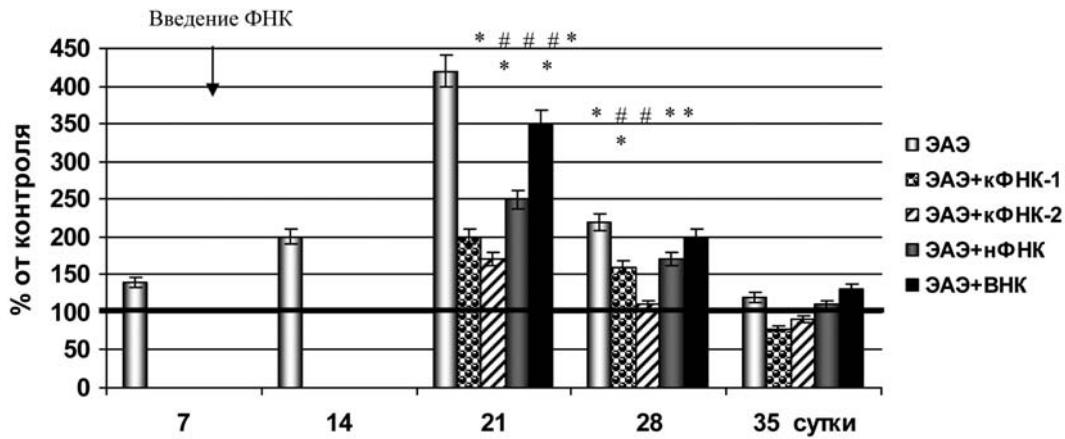


Рис. 2. Содержание p53<sup>+</sup>клеток в головном мозге крыс при ЭАЭ до и после лечения.  
Примечание: различия статистически достоверны (p<0,05) по сравнению: \* – с контролем; # – с ЭАЭ.

Отмечено, что введение как нативного, так и криоконсервированного материала существенно снижало количество p53<sup>+</sup>клеток в течение всего срока наблюдения (21–35 сутки). При этом криоконсервированный материал обладал преимуществами в реализации своего терапевтического эффекта и снижал апоптотические процессы в ЦНС в 2 раза уже через 7 дней после введения. Это совпадало с более ранним и интенсивным снижением манифестных признаков ЭАЭ. Возможно, введенные ФНК усиливают апоптоз аутореактивных Т-клеток за счет активации костимуляторных молекул на АПК, тем самым снижая апоптотические процессы в головном мозге.

Описанная выше динамика апоптотических процессов в тимусе и головном мозге коррелирует с изменением клиничко-неврологического статуса животных с ЭАЭ, который является интегральным показателем тяжести патологического процесса. Так, установлено, что первые клинические признаки ЭАЭ, выражающиеся потерей массы животных (рис. 3) и нарастанием явлений отека лап в местах введения энцефалитогенной смеси, наблюдались у крыс между 8 и 10 днем после индукции патологии. Максимальное развитие патологии регистри-

ровали на 14 сутки, когда уже в 2 раза было повышено содержание p53<sup>+</sup>клеток в головном мозге и снижено в тимусе. Применяемая клеточная терапия существенно нивелировала развитие патологического процесса, что коррелировало с повышением содержания p53<sup>+</sup>клеток в тимусе (на 28 сутки развития ЭАЭ) и снижением их количества в головном мозге (уже на 21 сутки). Более выраженный лечебный эффект наблюдали у животных после введения кФНК-2. Этот материал начинал действовать раньше и максимально снижал манифестные признаки ЭАЭ.

**Выводы**

Проведенные исследования показали, что при ЭАЭ в фазе обострения значительно увеличивается содержание p53<sup>+</sup>клеток в ЦНС и одновременно снижается их количество в тимусе. Введение ФНК интенсивно модулирует апоптоз как в тимусе, так и головном мозге, тем самым влияя одновременно и на причину, и на следствие развития ЭАЭ. Криоконсервированный материал, в частности кФНК-2, обладал более выраженным терапевтическим потенциалом. Раскрытие механизмов подобного рода действия кФНК является актуальным и приоритетным направлением.

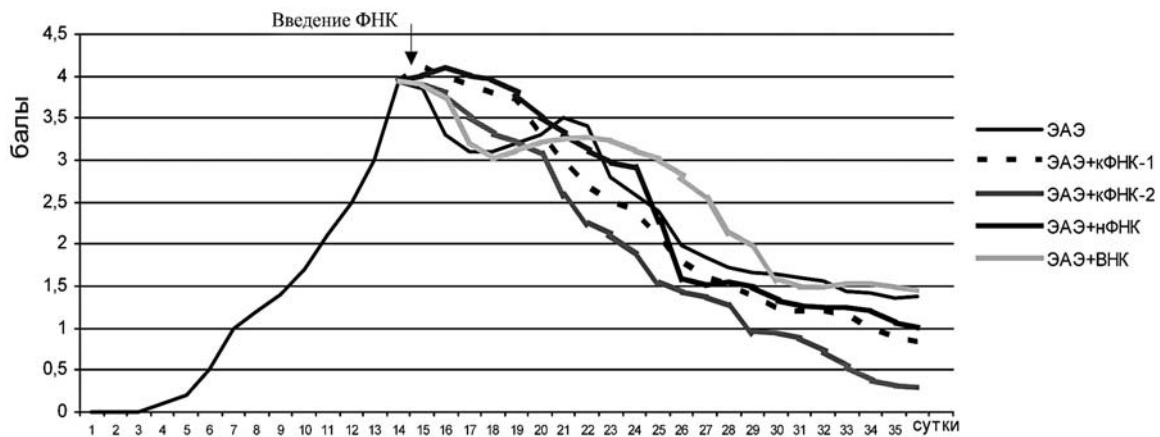


Рис. 3. Клинический статус крыс с ЭАЭ до и после лечения.

## Литература

1. 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.
2. Maniati E. Control of apoptosis in autoimmunity/ E. Maniati, P. Potter., N.J. Rogers // J. Pathol. – 2008. – Vol. 214. – P. 190–198.
3. Трифонова О.В. Современные методы патогенетической терапии рассеянного склероза / О.В. Трифонова, И.А. Завалишин // Фарматека. – 2009. – №7. – С. 51–54.
4. Zipp F. Apoptosis in multiple sclerosis / Zipp F. // Cell Tissue Res. – 2000. – Vol. 30, №1. – P. 163–171.
5. 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. криобиологии. – 2002. – №2. – С. 34–43.
6. Пат. №4523 Україна, МПК7, А01N1/02. Спосіб кріоконсервування суспензії клітин ембріональної нервової тканини / Грищенко В.І., Гольцев А.М., Гуріна 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
7. Пат. №59206 Україна, МПК51, А01N1/02. Спосіб кріоконсервування 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
8. Жаботинский Ю.М. Экспериментальные аллергические демиелинизирующие заболевания нервной системы / Жаботинский Ю.М., Иоффе В.И. – Л.: Медицина, 1975. – 264 с.
9. Чумаков П.М. Белок p53 и его универсальные функции в многоклеточном организме / Чумаков П.М. // Успехи биологической химии. – 2007. – №47. – С. 52–53.
10. Braithwaite A. Some p53-binding proteins that can function as arbiters of life and death / A. Braithwaite, X. Lu // Cell death and differentiation. – 2006. – Vol. 13. – P. 984–993.
11. 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.

## Сведения об авторах:

Гольцев А.Н., Академик НАН Украины, директор Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины.

Порожан Е.А., аспирант отдела криопатофизиологии и иммунологии Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины.

Бабенко Н.Н., к. биол. н., ст. научный сотрудник отдела криопатофизиологии и иммунологии Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины.

Останков М.В., к. биол. н., ст. научный сотрудник отдела криопатофизиологии и иммунологии Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины.

## Адрес для переписки:

Порожан Евгения Александровна, г. Харьков, ул. Переяславская, 23, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины. Тел.: (068) 617 01 57.

УДК 616.12:577.152.34

Є.І. Дубовик, В.Ю. Гарбузова

## Вивчення зв'язку деяких факторів ризику гострого коронарного синдрому з поліморфізмом $G^{-7} \rightarrow A$ гена матричного Gla-протеїну (MGP)

Сумський державний університет

**Ключові слова:** гострий коронарний синдром, фактори ризику.

Гострий коронарний синдром (ГКС) – мультифакторне захворювання, розвиток якого визначається поєднаним впливом генетичних факторів і чинників зовнішнього середовища.

**Мета роботи:** оцінка факторів ризику ( $AT_{\text{сист.}}$ ,  $AT_{\text{діаст.}}$ , ІМТ, ЧСС, паління) у хворих з ГКС, які мають різні генотипи.

У дослідженні використано венозну кров 118 хворих з ГКС. Поліморфізм  $G^{-7} \rightarrow A$  визначали методом полімеразної ланцюгової реакції з наступним аналізом довжини рестрикційних фрагментів. Результати опрацьовували статистично з використанням програми Excel 2000. Достовірність відмінностей визначали за  $\chi^2$  та t-критеріями. У результаті дослідження доведено, що у пацієнтів гомозигот за мінорним алелем (генотип А/А)  $AT_{\text{сист.}}$  був достовірно вищим, ніж у представників G/G та G/A генотипів. Величина  $AT_{\text{діаст.}}$  виявилась достовірно вищою у представників А/А генотипу чоловічої статі

( $P < 0,05$ ). Розподіл алельних варіантів промотора гена MGP достовірно відрізнявся у пацієнтів з  $AT_{\text{сист.}}$  вище та нижче 140 мм рт. ст.: G/G – 30,77%, G/A – 45,23%, A/A – 20% проти 45,28%, 49,65 і 5,66% відповідно, а також  $AT_{\text{діаст.}}$  вище та нижче 90 мм рт. ст.: G/G – 38,46%, G/A – 43,08%, A/A – 18,48% проти 45,28%, 49,06% та 5,66% відповідно ( $P < 0,05$ ). У пацієнтів з генотипом А/А ІМТ був достовірно вищим, ніж у представників G/G та G/A генотипів:  $32,28 \pm 1,75$  проти  $29,09 \pm 0,86$  та  $28,07 \pm 0,63$  відповідно ( $P < 0,05$ ). Статистично значущої різниці в розподілі алельних варіантів гена MGP серед чоловіків і жінок, курців і пацієнтів, які не палять, не виявлено ( $P > 0,05$ ). Показник ЧСС у представників різних генотипів достовірно не відрізнявся ( $P > 0,05$ ).

**Висновки:** А/А варіант  $G^{-7} \rightarrow A$  поліморфізму гена MGP асоційований з підвищеними  $AT_{\text{сист.}}$ ,  $AT_{\text{діаст.}}$ , ІМТ.