

Е.Е. Ямпольская, А.Н. Гольцев

Модуляция состояния моноцитарно-фагоцитарной системы животных с аутоиммунной патологией клетками фетальной печени

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Ключевые слова: адъювантный артрит, моноцитарно-фагоцитарная система, криоконсервирование, фетальная печень.

Сравнительная оценка содержания клеток МФС, экспрессирующих костимуляторные и адгезивные молекулы, показала, что более выраженный терапевтический эффект наблюдался после введения криоконсервированных клеток фетальной печени в острую фазу развития адъювантного артрита. Различная степень модификации исследуемых показателей является еще одним доказательством того, что криоконсервирование способно изменять структурно-функциональное состояние биообъекта в целом и клеток фетальной печени в частности.

Модуляція стану моноцитарно-фагоцитарної системи тварин з аутоімунною патологією клітинами фетальної печінки

К.С. Ямпольська, А.М. Гольцев

Порівняльна оцінка вмісту клітин МФС, що експресують костимуляторні й адгезивні молекули, показала, що більш виражений терапевтичний ефект спостерігали після введення криоконсервованих клітин фетальної печінки в гостру фазу розвитку ад'ювантного артриту. Різний ступінь модифікації досліджуваних показників є ще одним доказом того, що криоконсервування здатне змінювати структурно-функціональний стан біооб'єкту загалом і КФП зокрема.

Ключові слова: ад'ювантний артрит, моноцитарно-фагоцитарна система, криоконсервування, фетальна печінка.

Патологія. – 2011. – Т.8, №2. – С. 105–107

Modulation of the state of the monocyte-phagocyte system cells in animals with autoimmune pathology by fetal liver cells

Ye. Ye. Yampolskaya, A. N. Goltsev

Comparative evaluation of the content of the MFS cells, expressing costimulatory and adhesion molecules revealed that a more pronounced therapeutic effect was observed after the introduction of cryopreserved fetal liver cells (cFLCs) in the acute phase of adjuvant arthritis development. The different degrees of modification of the studied parameters is further evidence that cryopreservation can alter the structural and functional state of the biological object in general and FLCs in particular.

Key words: adjuvant arthritis, monocyte-phagocyte system, cryopreservation, fetal liver.

Pathologia. 2011; 8(2): 105–107

Ревматоидный артрит (РА) представляет собой аутоиммунное заболевание (АИЗ) мультифакториальной природы, в инициации и поддержании которого принимает участие широкий спектр клеточных популяций организма. Важное место среди иммунокомпетентных клеток (ИКК), участвующих в этом сложном каскадно развивающемся процессе, принадлежит клеткам моноцитарно-фагоцитарной системы (МФС), которые помимо формирования цитокинового профиля реализуют эффекторные функции. Являясь потенциальными антигенпрезентирующими клетками (АПК), они играют центральную роль в активации Т-хелперов, одного из основных участников индукции и поддержания органоспецифических АИЗ, включая РА [1].

На различных моделях АИЗ показано, что блокада кооперативных взаимодействий между Т-клеткой и АПК, включая костимуляторные лиганд-рецепторные каскады, а также подавление гиперпродукции адгезивных молекул на их поверхности предотвращает клинический рецидив заболевания [2,3]. Считается, что положительный терапевтический эффект может быть достигнут при помощи различных препаратов, блокирующих молекулы адгезии того или иного типа [4]. Как альтернатива, могут быть ис-

пользованы подходы ингибции степени их экспрессии на клетках МФС. Например, минимизация экспрессии CD80 структуры АПК с одновременным повышением секрецией ИЛ-10 обуславливают блокаду созревания фагоцитирующих клеток и ингибируют их антигенпрезентирующие функции [2].

Анализ биологически активных веществ (БАВ) с таким потенциалом показал, что некоторые из них присутствуют в клетках фетальной печени (КФП). Например, продуцируемые КФП α -фетопротейн и ИЛ-10 способны непосредственно ингибировать экспрессию ICAM-1 и Ia структур, тем самым препятствуя развитию начальных этапов иммунного распознавания антигена [5,6].

Применение КФП в терапевтических целях предусматривает использование технологий их криоконсервирования. Криоконсервирование в таких случаях может использоваться не только как метод долгосрочного хранения биообъекта, но и выступать в роли фактора, модифицирующего его структурно-функциональные характеристики [7].

Цель работы

Сравнительная оценка степени экспрессии костимуляторных и адгезивных молекул на клетках МФС у

животных с адьювантным артритом (АА) до и после применения криоконсервированных клеток фетальной печени (кКФП).

Материалы и методы исследования

Эксперименты выполнены на мышях линии С57В1/6J и СВА/Н 3-месячного возраста массой 20 г. Адьювантный артрит индуцировали у мышей СВА/Н субплантарным введением полного адьюванта Фрейнда в дозе 0,05 мл/на мышь [8]. Выбранная модель АА является адекватной моделью клинической формы РА, т. к. в данной дозе адьювант инициирует состояние, имеющее все морфофункциональные признаки анализируемой патологии [9].

Клетки МФС получали из перитонеального экссудата мышей СВА/Н методом адгезии [10]. Количество клеток МФС, экспрессирующих на поверхности CD54, CD 86 антигены, определяли на проточном цитофлуориметре Facs Calibur (Becton Dickinson) с использованием моноклональных антител фирмы Biologend (США): anti-CD 86 (В-7.2; FITC), anti-CD 54 (ICAM-1; FITC). В качестве контроля использовали клетки МФС здоровых животных.

КФП получены у мышей линии С57 В1/6J на 13 сутки гестации. Криоконсервирование осуществляли под защитой 5% ДМСО с концентрацией клеток 1×10^6 /мл на программном замораживателе «Сryoson» (Германия) по протоколу [11] в нашей модификации. Скорость охлаждения на первом этапе составляла 1°C/мин до -40°C, 10-минутная экспозиция на плато кристаллизации, затем со скоростью 10°C/мин до -80°C с последующим погружением образцов в жидкий азот. КФП, сохранность которых при оценке экспресс-методами составляла не менее 80%, вводили мышам-реципиентам СВА/Н однократно внутривенно в дозе 5×10^6 /мышь, в объеме 0,3 мл на 7 или 14 сутки после индукции АА. Оценка исследуемых показателей проводили через 7 и 14 суток после введения каждого из видов КФП.

Полученные экспериментальные данные статистически обрабатывали в электронных таблицах «Microsoft Excel 2000». Проведенные эксперименты не противоречат «Общим принципам экспериментов на животных», одобренным Национальным конгрессом по биоэтике (20.09.01 г. Киев, Украина) и согласуются с положениями «Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей» (Страсбург, 1985 г.).

Результаты и их обсуждение

В ходе исследования отмечено достоверное увеличение в сравнении с контролем количества CD 54⁺ и CD 86⁺ клеток в ПП. Данные показатели оставались на высоком уровне до 28 суток развития АА, подчеркивая активацию клеток МФС (рис. 1).

Введение кКФП на 7 сутки АА способствовало снижению количества CD 54⁺ (ICAM-1) клеток на 15% к 14 суткам АА по сравнению с не лечеными животными (рис. 2а), в то время как эффект нКФП был менее выраженным. Манифестация такого рода изменений может

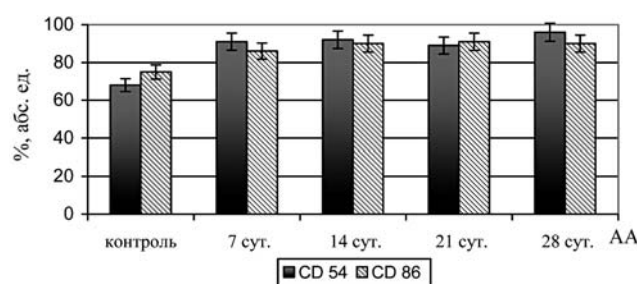


Рис. 1. Оценка содержания CD 54 и CD 80 среди клеток МФС на разных стадиях развития АА.

быть предвестником начавшегося позитивного эффекта в ответ на терапию кКФП в острую фазу развития иммуновоспалительного процесса (7 сутки АА). Интересно, что и на 21 сутки лучшие результаты при таком сроке введения КФП получены в группе с криоконсервированным материалом. Введение как кКФП, так и нКФП на 14 сутки АА (рис. 2б) не вызывало выраженного положительного эффекта, что согласуется с ранее установленным нами фактом проявления терапевтической активности КФП, в зависимости не только от их вида, но и времени введения после индукции АА [12].

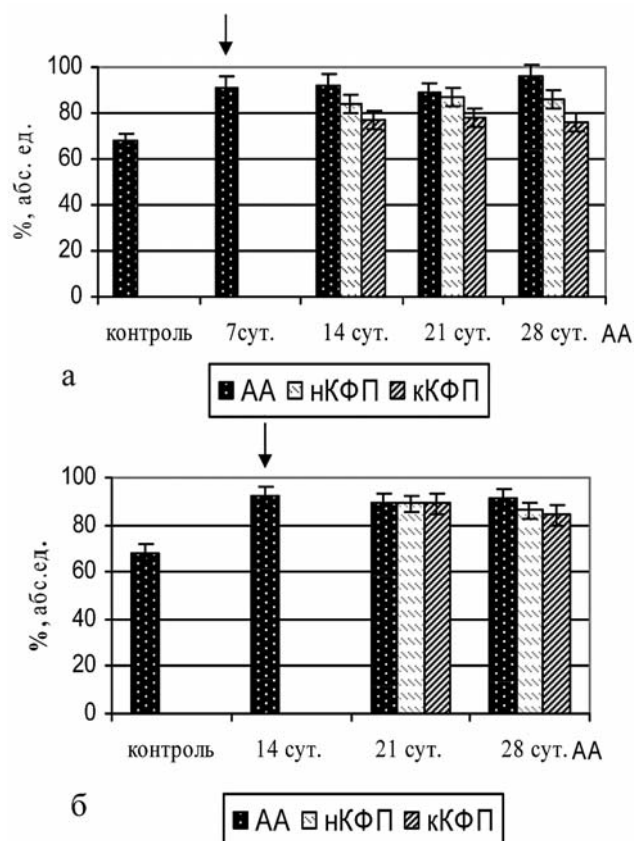


Рис. 2 (а, б). Оценка содержания CD 54⁺ (ICAM-1) среди клеток МФС до и после введения нКФП и кКФП. Стрелкой показаны сутки введения фетального материала.

Максимальный терапевтический эффект в отношении содержания CD 86⁺ (В-7.2) клеток также проявлялся при введении кКФП на 7 сутки развития патологии, причем манифестировался он нормализацией показателя только

к 21 суткам (рис. 3а). Данный факт еще раз подчеркивает значимость криоконсервирования как фактора управления состоянием биообъекта [7], выражающегося повышением его терапевтической эффективности. Удивительно, но терапия нКФП, в сравнении с кКФП, имела преимущество только при их введении в период начала хронизации иммуновоспалительного процесса (14 сутки развития АА), достоверно снижая количество CD 86⁺ клеток на 10% (рис. 3б).

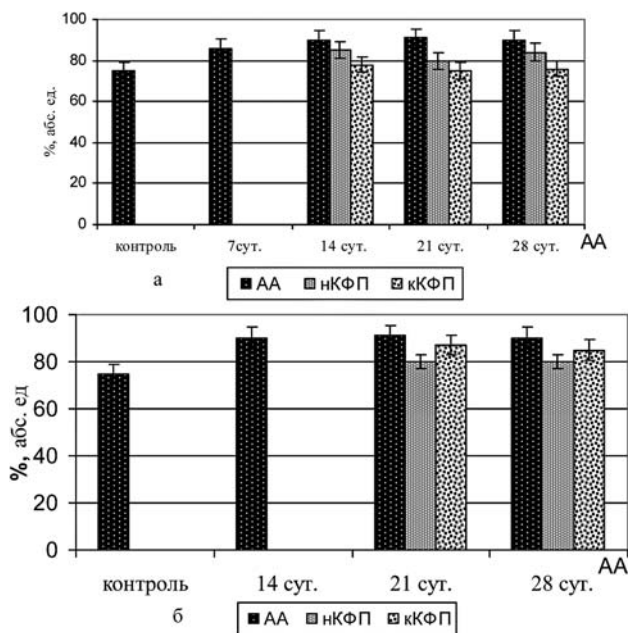


Рис. 3 (а, б). Оценка содержания CD 86⁺ (B-7.2) среди клеток МФС до и после введения нКФП и кКФП. Стрелкой показаны сутки введения фетального материала.

Выводы

Ранее полученные данные показали, что активность БАВ, присутствующих в КФП, может проявляться в различной степени, в зависимости от характера антигенной нагрузки на иммунную систему реципиента в конкретный период развития заболевания [12]. Полученные результаты подтверждают этот тезис, поскольку терапевтический эффект КФП напрямую зависел не только от вида вводимых клеток, но и срока их введения.

Используемые в одной и той же дозе нативные и криоконсервированные КФП реализовали свой функциональный потенциал по-разному в отношении клеток МФС, что может свидетельствовать о присутствии в них различных концентраций активных начал. Не исключе-

но, что криоконсервирование как стрессиндуцирующий фактор способно изменять профиль продуцируемых КФП медиаторов. Различная степень модификации исследуемых показателей ориентирует нас на необходимость применения КФП не только в определенные сроки развития патологии, но и в определенных концентрациях.

Литература

1. Stout R.D. T cell signaling of macrophage function in inflammatory disease / R. Stout, J. Suttles // *Frontiers in Bioscience*. – 1997. – №2. – P. 197–206.
2. Webb L.M. Prevention and amelioration of collagen-induced arthritis by blockade of the CD28 co-stimulatory pathway: requirement for both B7-1 and B7-2 / L. M. Webb, M.J. Walmsley, M. Feldmann // *Eur. J. Immunol.* – 1996. – №26. – P. 2320–2328.
3. Aoki S. Soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) antigen in patients with rheumatoid arthritis / S Aoki., K Imani., A. Yachi // *Scand. J. Immunol.* – 1993. – №38. – P. 485–490.
4. Системная энзимотерапия / Под. ред. В.И. Мазурова, А.М. Лиля. – СПб.: Наука, 1996. – 206 с.
5. Lu C.Y. Alpha-fetoprotein inhibits macrophage expression of Ia antigen / C.Y. Lu., P.S. Changelian, E.R. Unanue // *J. of Immunol.* – 1984. – Vol. 132. – №4. – P. 1722–1727.
6. Зубова С.Г. Роль молекул адгезии в процессе распознавания чужеродных и трансформированных клеток макрофагами млекопитающих / С.Г. Зубова, В.Б. Окулов // *Успехи современной биологии*. – 2001. – Т. 121, №1. – С. 59–65.
7. 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.
8. Pearson C.M. Studies of arthritis and other lesions induced in rats by injection of mycobacterial adjuvant / C.M. Pearson, F.D. Wood // *American. J. Pharmacology*. – 1963. – Vol. 42. – P. 73–95.
9. Саратиков А.С. Адьювантная болезнь (морфология, патогенез, экспериментальная терапия) / Саратиков А.С., Венгеровский А.И., Прищепт Т.П. – Томск: Изд-во Томск. Ун-та, 1983. – 101 с.
10. Лобасенко Н.П. Макрофагальные реакции при трансплантации нативной и деконсервированной кожи: Дис. ... канд. биол. наук: 14.00.36 / Н.П. Лобасенко – Х., 1999. – 171 с.
11. Jones D.R.E. Long-term storage of human haematopoietic progenitor cells and their subsequent reconstitution / D.R.E Jones, E.M. Anderson, A.A. Evans, D.T. Liu // *Bone Marrow Transplant.* – 1995. – №16. – P. 298–301.
12. Горская А.Ю. Особенности проявления модулирующей активности клеток эмбриональной печени на лимфогепоэтический комплекс мишей с аутоиммунной гемолитической анемией / А.Ю. Горская, Е.Д. Луценко, М.В. Останков и др. // *Проблемы криобиологии*. – 2003. – №2. – С. 31–37.

Сведения об авторах:

Ямпольская Е.Е., инженер I категории отд. криопатофизиологии и иммунологии Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины.

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

Адрес для переписки:

Гольцев Анатолий Николаевич, г. Харьков, ул. Переяславская, 23, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины.