

УДК 612.017.1.084:616.72-002.77:618.46-085.451.16

© М.А. Кравченко, О.В. Сафранчук, А.Н. Гольцев, 2012.

КОРРЕКЦИЯ СОСТОЯНИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ КРЫС С АДЬЮВАНТНЫМ АРТРИТОМ ВВЕДЕНИЕМ ЛИПИДНОЙ ФРАКЦИИ ПЛАЦЕНТЫ

М.А. Кравченко, О.В. Сафранчук, А.Н. Гольцев*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, отдел криопатофизиологии и иммунологии (руководитель – акад. А.Н. Гольцев), г. Харьков.*

CORRECTION OF IMMUNE SYSTEM'S STATE IN RATS WITH ADJUVANT ARTHRITIS BY INJECTION OF PLACENTAL LIPID FRACTION

M.A. Kravchenko, O.V. Safranchuk, A.N. Goltsev

SUMMARY

Injection of placental lipid fraction obtained by cryogenic molecular fractionation method on the background of adjuvant arthritis development has a correcting influence in relation to both content and functional activity of regulatory T-cells of regional lymph nodes which leads to a decrease in intensity of clinical signs of the disease.

КОРЕКЦІЯ СТАНУ ІМУННОЇ СИСТЕМИ ЩУРІВ З АД'ЮВАНТНИМ АРТРИТОМ ВВЕДЕННЯМ ЛІПІДНОЇ ФРАКЦІЇ ПЛАЦЕНТИ

М.О. Кравченко, О.В. Сафранчук, А.М. Гольцев

РЕЗЮМЕ

Введення ліпідної фракції плаценти, отриманої методом криогенного молекулярного фракціонування, на фоні розвитку ад'ювантного артриту оказує корегуючий вплив у відношенні як вмісту, так і функціональної активності регуляторних Т-клітин регіональних лімфовузлів, що призводить до зниження інтенсивності клінічних ознак захворювання.

Ключевые слова: липидная фракция плаценты, адьювантный артрит, регуляторные Т-клетки.

Ревматоидный артрит представляет собой аутоиммунное заболевание, причиной которого является снижение толерантности к собственным антигенам организма [4]. Основным методом его лечения является снижение иммунной реактивности организма посредством использования иммуносупрессорных лекарственных средств. Однако такого рода препараты вызывают генерализованную иммуносупрессию, что повышает риск развития инфекционных и онкологических заболеваний [6]. Поэтому новые терапевтические подходы к лечению данного заболевания должны быть нацелены на супрессию воспаления и восстановлению толерантности к артритогенным антигенам, не компрометируя иммунную систему пациента в целом [6]. Иммунологическая толерантность организма поддерживается преимущественно двумя механизмами: механизмом центральной толерантности, благодаря которому в тимусе происходит элиминация «запрещенных» клонов лимфоцитов, распознающих собственные антигены организма [4], и механизмом периферической толерантности, за которую отвечает особый пул Т-клеток с фенотипом CD4⁺CD25⁺, обладающих супрессорной активностью и именуемых как регуляторные Т-клетки [9]. Известно, что в процессах периферического образования регуляторных Т-клеток определенная роль отводится пероксисом

пролифератор-активирующим рецепторам, которые представляют собой лиганд-зависимые транскрипционные факторы и являются членами семейства ядерных гормональных рецепторов [10]. К эндогенным агонистам данных рецепторов относятся субстанции липидной природы, в частности, полиненасыщенные жирные кислоты, что лежит в основе одного из механизмов реализации их иммуномодулирующей активности [11]. В свете данной концепции актуальной является разработка технологий получения такого рода биоматериала из биологически активного тканевого сырья, в частности тканей плаценты, способных к интенсивному синтезу полиненасыщенных жирных кислот *de novo* [7]. На базе Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины разработан специализированный комплекс криогенного молекулярного фракционирования биологического сырья, позволяющий минимизировать влияние на него ряда повреждающих факторов, а также дифференцированно выделить из тканей плаценты липидную фракцию [3]. Целью данной работы было изучить содержание и функциональную активность CD4⁺CD25⁺ Т-клеток региональных (подколенных) лимфоузлов крыс с адьювантным артритом, который является экспериментальной моделью ревматоидного артрита, до и после введения липидной фракции плаценты, полученной методом

криогенного молекулярного фракционирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент выполнен в соответствии с Международными принципами Европейской конвенции о защите позвоночных животных (Страсбург, 1985) на 3-х месячных крысах-самцах линии Wistar массой 180-200г. Адьювантный артрит индуцировался субплантарным введением в правую заднюю лапу полного адьюванта Фрейнда по методу Пирсона [8]. Индекс отека лап вычислялся по формуле: $x = a/b$, где x = индекс отека лап, a = среднее значение диаметра задней правой лапы крыс с артритом для группы, b = среднее значение диаметра задней правой лапы крыс для группы до введения адьюванта. Индекс отека лап для интактных животных был принят за 1. Липидную фракцию плаценты получали из тканей плаценты свиньи методом криогенного молекулярного фракционирования, описанным в [3]. В качестве липофильной среды для приготовления инъекционной формы липидной фракции плаценты использовали стерильное растительное масло. Липидную фракцию плаценты животным вводили с 14-х по 28-е сутки развития артрита через день (всего 7 инъекций) внутримышечно в дозе 100 мг/кг массы тела в объеме 0,1 мл. Дизайн эксперимента включал в себя следующие группы животных: (1) интактные животные, (2) животные с артритом без лечения (группа артрита), (3) животные с артритом, получавшие только инъекции растительного масла по аналогичной схеме и в том же объеме (группа отрицательного контроля), и (4) животные с артритом, получавшие липидную фракцию плаценты (группа лечения). Животных выводили из эксперимента на 14-е, 21-е, 28-е сутки после индукции артрита путем декапитации под эфирным наркозом. Выделенные подколенные лимфоузлы диссоциировали в гомогенизаторе Поттера с добавлением среды Хэнкса, ресуспендировали и пропускали через капроновый фильтр. Содержание $CD4^+CD25^+$ клеток

определяли методом прямой иммунофлюоресценции на проточном цитофлюориметре FACSCalibur® (BD Pharmingen, США), с использованием моноклональных антител (BD Pharmingen, США) к мембранным структурам $CD4$, меченных фикоэритрином (анти- $CD4$ -PE), и $CD25$, меченных флюоресцинизиотиоцианатом (анти- $CD25$ -FITC), согласно инструкции фирмы-производителя. При учете результатов регистрировали процент клеток, экспрессирующих данные маркеры, и процент $CD4^+$ -клеток, характеризующихся высокой степенью экспрессии маркера $CD25$ ($CD4^+CD25^{high}$ -клетки). Для маркера $CD25$ регистрировали также показатель средней интенсивности флюоресценции в популяции $CD4^+CD25^{high}$ -клеток, который выражали в условных единицах (у.е.), отражающий плотность экспрессии молекул на клеточной мембране. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием критерия Манна-Уитни и пакета программ Excel [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

После индукции артрита у животных наблюдали развитие прогрессирующего отека сустава, при этом индекс отека к 21-м суткам достигал значения $2,19 \pm 0,11$ и к 42-м суткам сохранялся на уровне $1,8 \pm 0,09$ (Рис.1). Введение животным липидной фракции плаценты уже через 7 суток после начала лечения приводило к стойкому снижению выраженности отека (на 21-е сутки $1,63 \pm 0,08$ по сравнению с $2,19 \pm 0,11$ в группе артрита, $p < 0,05$), степень которого к 42-м суткам снижалась до значения $1,28 \pm 0,06$ (по сравнению с $1,8 \pm 0,09$ в группе артрита, $p < 0,05$). Введение животным только растительного масла (отрицательный контроль) незначительно снижало выраженность отека на 21-е сутки ($1,79 \pm 0,09$ по сравнению с $2,19 \pm 0,11$ в группе артрита), причем к 42-м суткам индекс отека в этой группе достигал практически уровня группы артрита ($1,7 \pm 0,09$ по сравнению с $1,8 \pm 0,09$ в группе артрита).

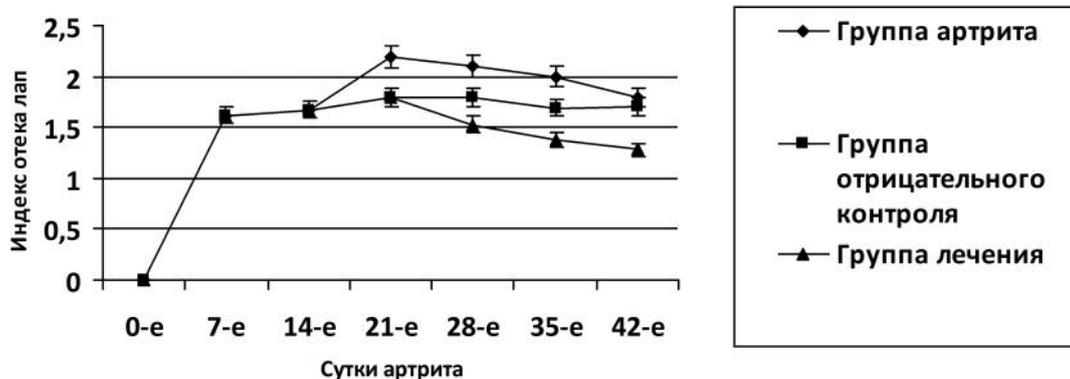


Рис. 1. Динамика отека лап у крыс с адьювантным артритом.

На фоне развития артрита изменение содержания CD4⁺CD25⁺ Т-клеток в региональных лимфоузлах крыс носило волнообразный характер (таб.1). Интересно, что наблюдаемое на 14-е сутки значительное повышение содержания CD4⁺CD25⁺ Т-клеток в группе артрита, превышающее показатели интактных животных (2,25±0,45% по сравнению с 0,849±0,17% в группе интакта), не обеспечивало купирования клинических признаков заболевания, которые, напротив, продолжали агравировать (Рис.1). Данный факт может объясняться функциональной несостоятельностью данной вновь сформированной популяции у нелеченных животных, которая хотя по фенотипическим характеристикам и относится к CD4⁺CD25⁺ клеткам, но не реализует своего иммуносупрессорного эффекта. В пользу этого свидетельствует отсутствие в этом сроке CD4⁺CD25⁺ Т-клеток, характеризующихся высокой степенью экспрессии молекулы CD25 (CD4⁺CD25^{high} Т-клетки), что является одним из фенотипических маркеров их функциональной состоятельности [5]. Отмеченный нами существенный подъем содержания CD4⁺CD25⁺ Т-клеток на 14-е сутки может быть ни чем иным как ответом наивных CD4⁺CD25⁻ Т-клеток на происходящие в этом периоде развития артрита изменения цитокинового профиля организма, а именно, повышение уровня ИЛ-2, который, собственно, и инициирует экспрессию CD25 молекулы [2]. В дальнейшем наблюдалось максимальное снижение содержания CD4⁺CD25⁺ Т-

клеток (0,09±0,018% на 21-е сутки по сравнению с 0,849±0,17% в группе интакта), при этом CD4⁺CD25^{high} Т-клетки по-прежнему отсутствовали, что клинически сопровождалось наибольшей выраженностью отека. Введение животным липидной фракции плаценты уже через 7 суток приводило не только к выраженной экспансии популяции CD4⁺CD25⁺ Т-клеток (0,965±0,193% в группе лечения по сравнению с 0,09±0,018% в группе артрита, p<0,05), но и к повышению степени экспрессии ими молекулы CD25. При этом содержание CD4⁺CD25^{high} Т-клеток на фоне лечения приближалось к значениям интактных животных (0,09±0,018% в группе лечения по сравнению с 0,098±0,02% в группе интакта). Клинически это сопровождалось началом стабильного снижения выраженности отека лап. Введение животным только растительного масла хотя и оказывало определенные эффекты в отношении содержания CD4⁺CD25⁺ Т-клеток в региональных лимфоузлах, однако, как отмечалось выше, снижение выраженности отека сустава в данном случае было кратковременным и не имело общей значимой клинической эффективности. К тому же, низкое содержание CD4⁺CD25^{high} Т-клеток (0,01±0,002% по сравнению с 0,098±0,02% в группе интакта), подтверждает, что достигаемый эффект является недостаточным для полноценной реализации данными клетками их супрессорной активности.

Таблица 1

Содержание CD4⁺CD25⁺ и CD4⁺CD25^{high} Т-клеток в региональных лимфоузлах

Группа	14-е сутки артрита		21-е сутки артрита		28-е сутки артрита	
	CD4 ⁺ 25 ⁺ , %	CD4 ⁺ 25 ^{high} , %	CD4 ⁺ 25 ⁺ , %	CD4 ⁺ 25 ^{high} , %	CD4 ⁺ 25 ⁺ , %	CD4 ⁺ 25 ^{high} , %
Интакт	0,849 ± 0,17	0,098 ± 0,02	0,849 ± 0,17	0,098 ± 0,02	0,849 ± 0,17	0,098 ± 0,02
Артрит	2,25 ± 0,45	0,00	0,09 ± 0,018	0,00	0,405 ± 0,081	0,02 ± 0,004
Отрицательный контроль			0,675 ± 0,135*	0,01 ± 0,002	0,405 ± 0,081	0,01 ± 0,002
Лечение			0,965 ± 0,193*	0,09 ± 0,018**	0,44 ± 0,088	0,09 ± 0,018*#

Примечание: * - p<0,05 по сравнению с группой артрита; # - p<0,05 по сравнению с группой отрицательного контроля.

Интересен тот факт, что и в группе артрита, и в группе отрицательного контроля количество молекул CD25 на мембране малочисленной популяции CD4⁺CD25^{high}-клеток было повышено (средняя интенсивность флуоресценции составляла соответственно 9910±214 у.е. и 9910±214 у.е. по сравнению с 9091±196 у.е. в группе интактных животных) (Таб.2), что может объясняться компенсаторным повышением количества

рецепторов к ИЛ-2 в условиях низкого содержания регуляторных Т-клеток, вырабатывающих данный медиатор. При этом у животных из группы лечения плотность экспрессии CD25 маркера Т-клетками, имеющими фенотип CD4⁺CD25^{high}, приближалась к уровню интактных животных и достоверно отличалась от показателей в группе АА и отрицательного контроля.

Таблица 2

Средняя интенсивность флюоресценции по маркеру CD25 популяции CD4⁺CD25^{high}-клеток, у.е.

Группа	14-е сутки артрита	21-е сутки артрита	28-е сутки артрита
Интакт	9091 ± 196	9091 ± 196	9091 ± 196
Артрит	-	-	9735 ± 210
Отрицательный контроль		9910 ± 214*	9910 ± 214
Лечение		9318 ± 201*#	9207 ± 199*#

Примечание: * - $p < 0,05$ по сравнению с группой артрита; # - $p < 0,05$ по сравнению с группой отрицательного контроля.

ВЫВОДЫ

В данной работе показано, что липидная фракция плаценты, полученная методом криогенного молекулярного фракционирования, обладает корректирующей активностью в отношении как содержания, так и функциональной активности CD4⁺CD25⁺ Т-клеток. Введение липидной фракции плаценты на фоне адьювантного артрита приводило к снижению выраженности клинических признаков заболевания. Полученные результаты говорят о перспективности дальнейшего изучения иммуномодулирующих свойств липидной фракции плаценты, получаемой данным методом, с целью оценки возможности ее клинического применения для лечения аутоиммунных заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лапач С.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel/ С.Н.Лапач, А.В.Чубенко, Л.Н.Бабич.-К.: МОРИОН.-2001.-408 с.
2. Луценко Е.Д. Мониторинг состояния пула Т-регуляторных клеток при адьювантном артрите после применения криоконсервированных клеток плаценты/ Е.Д.Луценко, А.Н.Гольцев// Ліки-людині. Матеріали XXVII наук.-прак. Конференції.-Харків: Вид-во НФаУ, 2010.-С.325-332.
3. Осецкий А.И. Криогенные технологии в производстве фармацевтических, косметических, агротехнических препаратов и биологически активных пищевых добавок/ А.И. Осецкий, В.И. Грищенко, А.Н. Гольцев, М.А. Кравченко, Е.В. Стрючкова// Пробл. криобиол.-2009.-Т.19, №4.-С.488-499.

4. Andersson A. Recent developments in the immunobiology of rheumatoid arthritis/ A.Andersson, C.Li, F.M.Brennan// Arth.Res.&Ther.-2008.- Vol.204.- P.198-207.

5. Baecher-Allan C. Supressor T cells in human diseases/ C.Baecher-Allan, D.A.Hafler// J.Exp.Med.-2004.-Vol.200.-P.273-276.

6. Flores-Borja F. Restoring the balance: hamessing regulatory T cells for therapy in rheumatoid arthritis/ F.Flores-Borja, C.Mauri, M.R.Ehrenstein// Eur.J.Immunol.-2008.-Vol.38.-P.934-937.

7. Martin R. Placental development and fatty acid metabolism in pigs fed ad libitum or restricted during gestation/ R. Martin, G. Hausman// Proc.Soc.Exp.Biol.Med.-1981.-Vol.166.-P.472-478.

8. Pearson C.M. Studies of arthritis and other lesions induced in rats by the injection of mycobacterial adjuvant/ C.M.Pearson, F.D.Wood // Am.J.Pharmacology.-1963.-Vol.42.-P.73-95.

9. Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases/ S. Sakaguchi, N. Sakaguchi, M. Assano, M. Itoh, M. Toda// J.Immunol.-1995.-Vol.155.-P.1151-1164.

10. Wohlfert E.A. Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) and immunoregulation: enhancement of regulatory T cells through PPAR γ -dependent and -independent mechanisms/ E.A.Wohlfert, F.C.Nichols, E.Nevius, R.B.Clark// J.Immunol.-2007.-Vol.178.-P.4129-4135.

11. Yaqoob P. Fatty acids and the immune system: from basic science to clinical applications/ P. Yaqoob// Proceed.Nutr.Society.-2004.-Vol.63.-P.89-104.