

УДК 612.017:616.831-002-056.3-092.4:612.647.014.3.08

© Е.А. Порожан, Н.Н. Бабенко, А.Н. Гольцев, 2012.

СОДЕРЖАНИЕ В ТИМУСЕ ИЛ-10 И ПРОДУЦИРУЮЩИХ ЕГО КЛЕТОК В ДИНАМИКЕ РАЗВИТИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АЛЛЕРГИЧЕСКОГО ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТА ДО И ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ ФЕТАЛЬНЫМИ НЕРВНЫМИ КЛЕТКАМИ

Е.А. Порожан, Н.Н. Бабенко, А.Н. Гольцев*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, отдел криопатофизиологии и иммунологии (руководитель – академик НАНУ А.Н. Гольцев), г. Харьков.*

THYMIC CONTENT OF IL-10 AND IL-10-PRODUCING CELLS DURING DEVELOPMENT OF EXPERIMENTAL ALLERGIC ENCEPHALOMYELITIS BEFORE AND AFTER TREATMENT WITH FETAL NEURAL CELLS

E.A. Porozhan, N.N. Babenko, A.N. Goltsev

SUMMARY

In this work it has been shown that during development of experimental allergic encephalomyelitis in the thymus there is an increase of IL-10⁺ cells with decreased functional activity. It has been proved that it is possible to use mean fluorescence intensity parameter for the assessment of functional activity of the study cells.

ЗМІСТ В ТИМУСІ ІЛ-10 ТА ПРОДУКУЮЧИХ ЙОГО КЛІТИН В ДИНАМІЦІ РОЗВИТКУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АЛЛЕРГІЙНОГО ЕНЦЕФАЛОМІЄЛІТУ ДО ТА ПІСЛЯ ЛІКУВАННЯ ФЕТАЛЬНИМИ НЕРВОВИМИ КЛІТИНАМИ

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

РЕЗЮМЕ

В роботі показано, що при розвитку експериментального алергійного енцефаломієліту в тимусі підвищується зміст ІЛ-10⁺ клітин зі зниженою функціональною активністю. Доказується можливість використання показника середньої інтенсивності флюоресценції для оцінки функціональної активності досліджуваних клітин.

Ключевые слова: тимус, ИЛ-10, фетальные нервные клетки.

Успехи тимологии окончательно утвердили представление о тимусе, как о центральном органе иммунной системы – общем звене нейроэндокринной и иммунной регуляции [13]. Несмотря на всестороннее изучение роли цитокинов тимуса, многие вопросы остаются не выясненными.

Одним из медиаторов, составляющих «ядро» цитокиновой сети тимуса является ИЛ-10 [6]. Этот цитокин продуцируют CD4⁺ Т-хелперы 2-го типа, дендритные клетки, моноциты, макрофаги, натуральные Т-киллеры, обеспечивая его аутокринную регуляцию [12]. Многофункциональность ИЛ-10 заключается в ингибции пролиферативного потенциала Т-хелперы 1-го типа, подавлении антиген-специфической активации и пролиферации клонов Т-клеток посредством блокирования функции антигенпрезентирующих клеток [12] либо индукции анергии CD4⁺ клеток [7]. Кроме того ИЛ-10 обеспечивает формирование функционально-полноценных CD8⁺ клеток и повышает их пролиферацию [8]. Однако практически отсутствуют данные об изменении продукции ИЛ-10 в тимусе при развитии нейродегенеративных патологий аутоиммунной природы, например рассеянного склероза и его модельного аналога –

экспериментального аллергического энцефаломиелиита.

Развитие подобного рода заболеваний связывают со срывом естественной толерантности, формируемой в тимусе и определяемой многими факторами, включая продукцию им регуляторных цитокинов [7]. Предполагается, что терапевтический подход в данном случае должен базироваться на использовании комплексной коррекции фундаментальных систем обеспечения гомеостаза организма – нервной, иммунной и эндокринной [11]. На сегодняшний день в этом плане успешно зарекомендовали себя фетальные нервные клетки, являющиеся «полифункциональными» модуляторами надсистемного действия [2]. Обязательным этапом технологического процесса применения фетальных нервных клеток в клинической практике является криоконсервирование.

Исходя из вышесказанного, целью данной работы было изучение в тимусе содержания ИЛ-10 и продуцирующих его клеток в динамике развития экспериментального аллергического энцефаломиелиита до и после лечения криоконсервированными фетальными нервными клетками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили 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 других научных целей» (Страсбург, 1985г.). В работе были использованы беспородные белые крысы массой 150-190 г, содержащиеся в стандартных условиях вивария Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины.

Для индукции экспериментального аллергического энцефаломиелита использовали гомогенат гомологичной спинномозговой ткани (50 мг) с полным адьювантом Фрейнда, содержащим 2-4 мг/мл *Mycobacterium tuberculosis* [1]. Оценку показателей, характеризующих состояние тимуса, проводили до 35 суток развития патологии. Контрольной группе животных вводили физиологический раствор в аналогичном объеме.

Суспензию клеток тимуса получали путем гомогенизации органа в растворе Хенкса и фильтровали через капроновый фильтр. Содержание ИЛ-10⁺ клеток в органе определяли методом проточной цитофлуориметрии (FACS Calibur, BD, США) с использованием моноклональных антикрысиных антител к IL-10 (клон А5-4, кат. № 555088) (BD Pharmingen™, США) и предварительной пермеабиллизацией клеток. Степень экспрессии этих молекул определяли по средней интенсивности флуоресценции (СИФ), соответствующей среднему каналу максимального свечения маркера. В качестве изотип-контроля использовали пробы с добавлением IgG_{2b} (клон MPC-11C, кат. № 559529). Учет и анализ результатов осуществляли с помощью программы WinMDI 2.9.

Концентрацию ИЛ-10 определяли в надосадочной жидкости гомогената тимуса методом ELISA, используя моноклональные антитела к IL-10 (кат. № 555113) (BD Pharmingen™, США) согласно протоколу фирмы-производителя. Полученные данные выражены в процентном соотношении от показателей контрольной группы, значения которой были приняты за 100%.

Для получения суспензии фетальных нервных клеток ткань мозга крыс 11 суток гестации гомогенизировали в растворе Хенкса, содержащего 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Фетальные нервные клетки замораживали по 2-м режимам [4,5] на программном замораживателе УОП-6 (СКТБ с ОП ИПКиК НАН Украины г. Харьков). Отогрев образцов проводили на водяной бане при температуре 37°C.

Фетальные нервные клетки вводили на 14-е сутки развития ЭАЭ [2] внутрибрюшинно в дозе 5x10⁶ клеток на 100г массы тела животного. Для подтверждения или опровержения специфического влияния фетального материала на показатели тимуса животных с ЭАЭ, им вводили взрослые нервные клетки и клетки костного мозга в те же сроки и в аналогичной концентрации.

Статистический анализ проведен с использованием U-критерия Манна – Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Содержание ИЛ-10⁺ клеток в тимусе животных с экспериментальным аллергическим энцефаломиелитом увеличивалось в 2,4 раза на 14-е сутки после индукции патологии (рис.1). Это согласуется с данными [3], где содержание дендритных клеток, являющихся продуцентами ИЛ-10, также повышалось в тимусе животных с экспериментальным аллергическим энцефаломиелитом к этому сроку. В дальнейшем содержание ИЛ-10⁺ клеток постепенно снижалось, так и не достигая контрольного уровня до конца срока наблюдения.

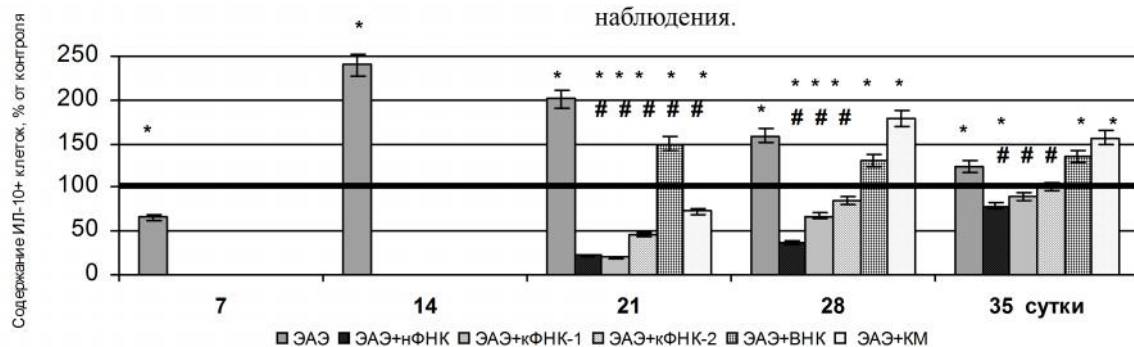


Рис.1. Содержание ИЛ-10⁺ клеток в тимусе крыс при экспериментальном аллергическом энцефаломиелите до и после применения ФНК; различия статистически достоверны (p<0,05) по сравнению: * - с контролем; # – с ЭАЭ.

Примечание: ЭАЭ – экспериментальный аллергический энцефаломиелит; нФНК, кФНК-1, кФНК-2 – нативные, кроконсервированные в 1-м и во 2-м режиме фетальные нервные клетки; ВНК – взрослые нервные клетки, КМ – костный мозг

На 14-е сутки развития экспериментального аллергического энцефаломиелита несмотря на повышенное содержание ИЛ-10⁺ клеток наблюдалось как снижение показателя СИФ этих клеток, так и концентрация самого ИЛ-10 (рис.2). Такая однонаправленная динамика изменения этих показателей подтверждает возможность оценки функциональной активности ИЛ-10⁺ клеток по их СИФ. Данный факт согласуется с результатами исследований других авторов [8], где указывается, что

низкое содержание ИЛ-10, которое было отмечено и нами на 14-е сутки развития экспериментального аллергического энцефаломиелита, приводит к дефициту функционально полноценных CD8⁺ клеток, и стимулирует формирование в тимусе Т-регуляторных CD4⁺CD25⁺ клеток [7,10]. Данный факт был подтвержден в наших исследованиях [3], где наблюдалось повышение содержания CD4⁺CD25⁺ клеток при экспериментальном аллергическом энцефаломиелите.

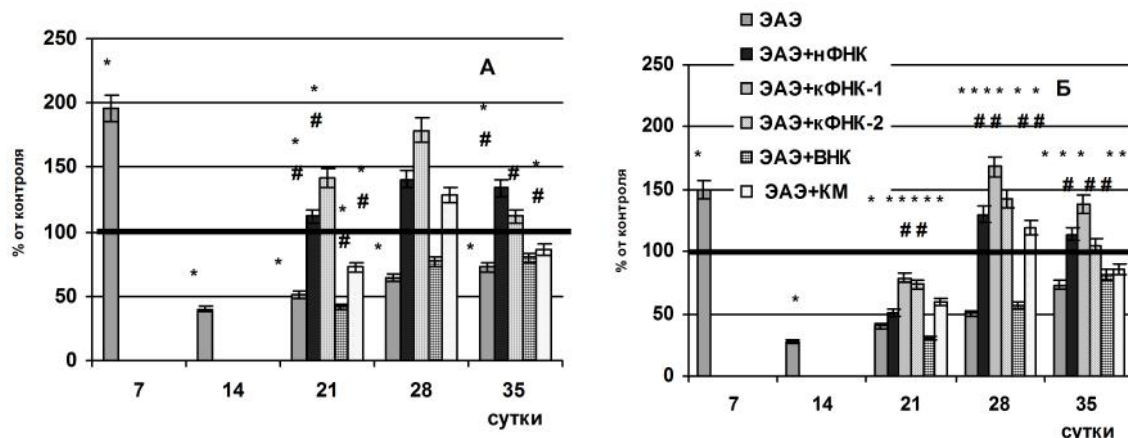


Рис. 2. А - СИФ ИЛ-10⁺ клеток; Б - концентрация ИЛ-10 в тимусе животных при экспериментальном аллергическом энцефаломиелите до и после применения ФНК; различия статистически достоверны ($p < 0,05$) по сравнению: * - с контролем; # - с ЭАЭ.

Примечание: ЭАЭ – экспериментальный аллергический энцефаломиелит; нФНК, кФНК-1, кФНК-2 – нативные, кроконсервированные в 1-м и во 2-м режиме фетальные нервные клетки; ВНК – взрослые нервные клетки, КМ – костный мозг.

Уже через неделю после введения животным с экспериментальным аллергическим энцефаломиелитом нативных или криоконсервированных фетальных нервных клеток количество ИЛ-10⁺ снижалось (рис.1), однако их СИФ и продукция ИЛ-10 повышались в разной степени в зависимости от вида вводимого материала (рис.2). Таким образом можно утверждать, что фетальный материал повышает функциональный потенциал ИЛ-10⁺ клеток тимуса у леченых животных. Следует отметить преимущество введения криоконсервированного фетального материала. В группе животных, которым вводили криоконсервированные в режиме 2 фетальные нервные клетки все исследуемые показатели приближались к контрольным к концу срока наблюдения (35 сутки). Такая феноменология свойственна именно фетальному материалу, поскольку ни нервные клетки взрослого мозга, ни костного мозга не обладали такой корректирующей активностью в отношении ИЛ-10⁺ клеток и продукции ими соответствующего медиатора.

Изменение содержания и функциональной активности ИЛ-10⁺ клеток в тимусе крыс с ЭАЭ, вызванное введением фетальных нервных клеток,

влияет на формирование, дифференцировку и пролиферацию Т-клеток, так как ИЛ-10 по типу обратной связи ингибирует ИЛ-7, необходимый для Т-клеточной дифференцировки и пролиферации; ИЛ-2, без которого невозможно формирование Т-регуляторных клеток; пролиферативный цитокин ИЛ-1 [6]. Учитывая, что ИЛ-10 отвечает за реализацию механизмов отрицательной селекции в тимусе [13], можно предположить, что нормализация не только количества, но и содержания ИЛ-10 в продуцирующих его клетках, говорит об иммуномодулирующей активности фетальных нервных клеток на функциональное состояние тимуса в целом. Подобного рода активность фетальных нервных клеток можно объяснить наличием в их составе высокого уровня нейротрофических факторов, медиаторов с супрессорной активностью и молекул адгезии [9], которые принимают участие в регуляции созревания тимических эпителиальных клеток, способных продуцировать ИЛ-10. Вероятно, вводимые фетальные нервные клетки опосредованно восстанавливают естественную толерантность, нормализуя процессы селекции в тимусе.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что при развитии экспериментального аллергического энцефаломиелита в тимусе повышается содержание ИЛ-10⁺ клеток, со сниженной функциональной активностью. Выявленная однонаправленная динамика изменения СИФ ИЛ-10⁺ клеток и концентрации ИЛ-10 в тимусе свидетельствует о возможности использования показателя СИФ для оценки функциональной активности этих клеток.

2. Максимальным иммунокорригирующим потенциалом в отношении центрального органа иммунитета - тимуса при развитии экспериментального аллергического энцефаломиелита обладали фетальные нервные клетки, криоконсервированные по режиму 2, что выражалось в нормализации как содержания ИЛ-10, так и количества продуцирующих его клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Давыдова Г.С. Применение адьюванта с различным количеством БЦЖ для воспроизведения ЭАЭ у крыс / Г.С. Давыдова. // Острый энцефаломиелит в эксперименте и клинике. - Минск: Наука и техника, 1969. - С.32-37

2. Гольцев А.Н. Экспериментальный аллергический энцефаломиелит как модельная патология изучения корригирующей активности эмбриональных нервных клеток/ А.Н.Гольцев, Н.Н.Бабенко, М.А.Сироус, Л.В. Останкова// Иммунологія та алергологія.-2005.- №3.-С.76-77.

3. Гольцев А.Н. Роль натуральных Т-регуляторных клеток в патогенезе экспериментального аллергического энцефаломиелита и возможные пути коррекции данной патологии криоконсервированными фетальными нервными клетками/ А.Н. Гольцев, Е.А. Порожан, М.В. Останков и др.//Иммунология и алергология.-2012.-№1.-с.12-21.

4. Патент №59206 Україна, МПК, А01N1/02. Спосіб кріоконсервування суспензії фетальних нервових клітин /Гольцев А.М., Порожан Є.О., Бабенко Н.М.,

Останков М.В.; Заявник: Ін. пробл. кріобіол. і кріомед. НАН України – Заявл. 04.10.2010; опубл.10.05.2011, бюл. №9.

5. Патент №4523 Україна, МПК, А01N1/02. Спосіб кріоконсервування суспензії клітин ембріональної нервової тканини / Грищенко В.І., Гольцев А.М., Гуріна Т.М., Бабенко Н.М.; Заявник: Ін. пробл. кріобіол. і кріомед. НАН України – Заявл. 24.05.2004; опубл.17.01.2005, бюл. №1.

6. Ярилин А.А. Структура тимуса и дифференцировка Т-лимфоцитов / А.А. Ярилин, В.Г. Пинчук, Ю.А. Гриневич // Ан. Украины Инст. проблем онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого. - Киев науч. Думка. – 1991. –243 с.

7. Bettini M.L. Development of thymically derived natural regulatory T cells /M.L. Bettini, D.A.A. Vignali/ /Ann. N.Y. Acad. Sci. -2010.- Vol.1183.-P.1–12.

8. Biegler B.W. Clonal composition of neuroantigen-specific CD8⁺ and CD4⁺ T-cells in multiple sclerosis/ B.W.Biegler, S.X. Yan, S.B. Ortega, D.K. Tennakoon, M.K.Racke, N.J. Karandikar// J Neuroimmunol.- 2011.- Vol.234, № 1-2.-P.131-140.

9. 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.

10. Delpoux A. Foxp3-independent loss of regulatory CD4(+) T-cell suppressive capacities induced by self-deprivation / A.Delpoux, M.Poitrasson-Riviere, A. Le Campion// Eur. J. Immunol.-2012.- Vol.42, №5.-P.1237-1249.

11. Pithadia A. Pathogenesis and treatment of multiple sclerosis (MS) / A. Pithadia, S.Jain, A.Navale / /The Int. J. ofNeurology.- 2009.-Vol.10, №2.-P. 34-42.

12. Rouleau M. IL-10 Transgenic Mice Present a Defect in T Cell Development Reminiscent to SCID Patients/ M. Rouleau, F. Cottrez, M. Bigler et al.// J Immunol.-1999.- №163.- P.1420-1427.

13. Savino W. Neuroendocrine Control of Thymus Physiology / W.Savino, M. Dardenne // Endocrine Reviews.-2000.- Vol.21, №4.-P. 412–443.