

УДК 616-092:612.017.083.3

А. М. ГОЛЬЦЕВ, Т. Г. ДУБРАВА, Н. М. БАБЕНКО, Ю. О. ГАЄВСЬКА,
О. Д. ЛУЦЕНКО, М. В. ОСТАНКОВ*Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України*

ПАТОГЕНЕТИЧНІ ФАКТОРИ РОЗВИТКУ АУТОІМУННИХ ЗАХВОРЮВАНЬ. СУЧАСНІ ПІДХОДИ ДО ЇХ ЛІКУВАННЯ

На експериментальних моделях патологій аутоімунного генезу обґрунтована можливість і доведена ефективність застосування продуктів фетоплацентарного комплексу. Продемонстрована їхня здатність до активації Т-регуляторної ланки імунітету і нормалізації клінічних показників експериментальних тварин. Показано більш виражений імунорегулюючий потенціал кріоконсервованого матеріалу на клітинному і молекулярному рівнях.

Ключові слова: продукти фетоплацентарного комплексу; аутоімунні захворювання; Трег-клітини; ген *ido*

ВСТУП

Можливість використання експериментальних моделей, адекватних стану організму людини при розвитку аутоімунних захворювань (АІЗ), ґрунтується на існуванні загальних етіологічних факторів, що викликають вказані захворювання, механізмах їх розвитку, методах діагностики, терапевтичних підходах та ін. Не викликає сумніву мультифакторіальність розвитку АІЗ, але найбільш значущим патогенетичним фактором їхнього розвитку є порушення стану імунної системи, а саме, зрив її природної толерантності до власних антигенів. Фундаментальні розробки експериментальної імунології останніх 25-30 років продемонстрували, що ключовим фактором розвитку АІЗ є порушення процесу формування, зниження кількості та функціональної активності Т-регуляторних клітин (Трег) з фенотипічними маркерами CD4⁺, CD25⁺ і транскрипційним фактором FOXP3 [13]. Ці клітини володіють високою супресорною активністю щодо клітин, які індукують і підтримують імунозапальний процес. Розробка засобів управління станом CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺-клітин є найбільш перспективним підходом у загальному спектрі методів імуномодулюючої терапії АІЗ. Слід особливо підкреслити, що розвиток АІЗ викликає дисгармонію взаємодії систем нейро-імунно-ендокринного блоку. Виходячи з цього, при лікуванні АІЗ є очевидною необхідність використання препаратів надсистемної регуляції, тобто з поліфункціональною активністю. Повною мірою до таких можна віднести препарати клітинної і тканинної терапії, одним з векторів дії яких є імуномодельююча активність [1, 9].

Препарати клітинної та тканинної терапії, в тому числі і фетального походження, застосовуються при

лікуванні ряду патологічних станів організму людини. Проте до теперішнього часу залишається нез'ясованим ряд питань біоетичного профілю, що відносяться до юридичної бази їхнього використання. На думку багатьох лікарів-клініцистів, представників фундаментальної науки, служителів Феміди і т. п. «напруженість» у вирішенні багатьох з цих нез'ясованих питань може бути мінімізована переконливими результатами експериментальних досліджень.

Відомо, що в реалізації супресорного ефекту Трег-клітин бере участь фермент індоламін-2,3-діоксигеназа (ІДО) [12], який ініціює деградацію L-триптофану, катаболіти якого власне і активують ці клітини. Висока його активність властива продуктам фетоплацентарного комплексу (ПФПК), а саме – клітинам плаценти, фетальної печінки і фетальним нервовим клітинам [10, 11]. У загальному технологічному процесі застосування ПФПК у клінічній практиці обов'язковим компонентом є кріоконсервування [1, 9], яке здатне модифікувати, в тому числі й активувати метаболічні процеси у клітинах [9].

Виходячи з вищенаведеного, в цій роботі була проведена порівняльна оцінка імунокоригуючої дії кріоконсервованих ПФПК при різних формах експериментальних АІЗ з метою обґрунтування можливості їхнього застосування в клінічній практиці.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дослідження проводилися відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (European convention, Strasbourg, 1986), та схвалених I Національним конгресом України з біоетики (Київ, 2004).

Ад'ювантний артрит (АА) індукували у мишей лінії СВА/Н методом [5]. Набряк суглоба оцінювали

© Колектив авторів, 2016

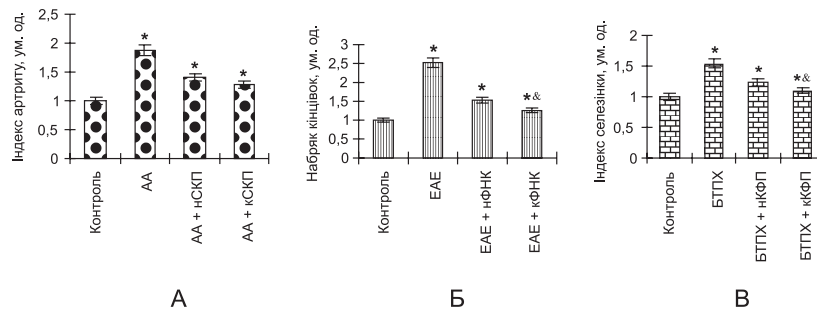


Рис. 1. Клінічні ознаки розвитку АІЗ до і після введення нативних або кріоконсервованих ПФПК: А – АА+ СКП; Б – ЕАЕ + ФНК; В – ХТПХ + КФП.

Примітка: за «1» прийняті клінічні ознаки здорових тварин (контроль); * – результати мають статистично значущі відмінності щодо групи без лікування кожної патології, & – щодо групи з введенням нативних клітин ($p < 0,05$).

як відношення діаметра досліджуваного суглоба до інтактного суглоба і визначали у вигляді індексу артриту (ІА). Суспензію клітин плаценти (СКП) отримували на 18-ту добу гестації і кріоконсервували її під захистом 10 % диметилсульфоксиду (ДМСО) [1] та вводили внутрішньовенно на 7 добу розвитку АА в дозі 1×10^6 клітин на мишу. Експериментальний алергічний енцефаломієліт (ЕАЕ) індукували у щурів методом [2]. Тяжкість клінічної картини захворювання оцінювали за п'ятибальною шкалою Жаботинського Ю. М. [4]. Фетальні нервові клітини (ФНК) мозку щурів ембріонів 11 днів гестації заморожували під захистом 10 % ДМСО [6] і вводили на 14 добу розвитку ЕАЕ внутрішньовенно в дозі 5×10^6 клітин на 100 г маси тіла тварини. Хворобу «трансплантат проти господаря» (ХТПХ) індукували у летально опромієних мишей (СВА/Н×С57В)F₁ внутрішньовенним введенням 5×10^6 на мишу напівалогенних відносно реципієнта клітин кісткового мозку (СВА/Н) разом з клітинами лімфовузлів мишей цієї ж лінії (3 : 1). Розвиток патології констатували за ознаками розвитку спленомегалії і її показником – індексом селезінки (ІС) на 14 добу після індукції ХТПХ [8]. Клітини фетальної печінки (КФП) 18-ої доби гестації мишей лінії СВА/Н кріоконсервували під захистом 10 % ДМСО [9] і вводили внутрішньовенно в дозі 5×10^5 клітин/мишу на наступну добу після індукції патології. Вміст транс-

криптів гена *ido* в нативних і кріоконсервованих ПФПК визначали методом ЗТ-ПЛР [7]. Результати співвідносили до показників експресії гена β -actin (ген house-keeping). Вміст Трег-клітин (CD4⁺CD25⁺ і FOXP3⁺) в селезінці тварин з АІЗ до і після введення ПФПК визначали на проточному цитофлуориметрі FACS Calibur (Becton Dickinson, США) з використанням відповідних моноклональних антитіл – МАТ (BD Pharmingen, Abcam). Введення ПФПК і атестацію їхнього терапевтичного потенціалу визначали в різний час в залежності від виду патології. Так, при АА введення СКП здійснювали на 7 добу розвитку патології, атестацію – на 28 добу; при ЕАЕ введення ФНК на 14 добу, атестацію – на 28 добу; при БТПХ введення КФП через 1 добу після індукції патології, атестацію – на 14 добу, що обґрунтовано специфікою розвитку кожної патології і особливостями дії фетальних препаратів. Статистичну обробку отриманих даних проводили за допомогою U-критерію Манна-Уїтні.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Пік розвитку експериментальних патологій супроводжувався збільшенням їхніх клінічних ознак при АА (7 доба) – у 1,87; при ЕАЕ (14 доба) – у 2,52; при БТПХ (14 доба) – у 1,54 рази в порівнянні з контролем (рис. 1), що корелювало зі зниженням вмісту Трег-клітин (рис. 2).

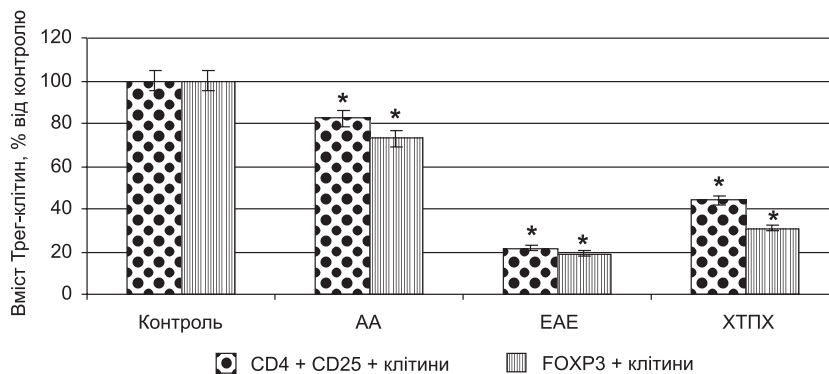


Рис. 2. Вміст Трег-клітин у селезінці тварин з АІЗ.

Примітка: за 100 % прийнято вміст Трег-клітин у здорових тварин (контроль); * – результати мають статистично значущі відмінності щодо групи здорових тварин (контроль).

ВМІСТ ТРЕГ-КЛІТИН У СЕЛЕЗИНЦІ РЕЦИПІЄНТІВ З АІЗ ДО І ПІСЛЯ ВВЕДЕННЯ НАТИВНИХ АБО КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ПФПК

Патологія	Терапевтичний матеріал	Вид матеріалу, який вводився	Вміст, CD4 ⁺ CD25 ⁺ -клітин, % від контролю (здорові тварини)	Кратність збільшення CD4 ⁺ CD25 ⁺ клітин	Вміст Foxp3 ⁺ -клітин, % від контролю (здорові тварини)	Кратність збільшення Foxp3 ⁺ -клітин	Кратність зниження клінічних ознак АІЗ
АА	Без лікування	–	83,22 ± 1,82	–	74,39 ± 2,83	–	–
	Суспензія клітин плаценти	натив	138,46 ± 3,65*	1,66	87,53 ± 6,8	1,18	1,1
кріо		95,8 ± 4,78*&	1,15	96,07 ± 4,44	1,29	1,2	
ЕАЕ	Без лікування	–	21,53 ± 3,32	–	19,08 ± 1,72	–	–
	Фетальні нервові клітини	натив	78,22 ± 6,34*	3,63	50,34 ± 4,45*	2,64	1,6
кріо		80,07 ± 5,23*	3,72	72,13 ± 5,34**	3,78	2,0	
ХТПХ	Без лікування	–	44,12 ± 3,6	–	31,03 ± 2,45	–	–
	Клітини фетальної печінки	натив	98,43 ± 5,8*	2,23	62,07 ± 4,50*	2,00	1,2
кріо		77,7 ± 6,20**&	1,76	75,86 ± 3,72**&	2,44	1,4	

Примітка: за 100 % прийнято вміст Трег-клітин у здорових тварин (контроль); * – результати мають статистично значущі відмінності щодо групи без лікування кожної патології; & – щодо групи при лікуванні нативними клітинами (p < 0,05).

Так, вміст CD4⁺CD25⁺ і FOXP3⁺-клітин на 28 добу розвитку АА знижувався в 1,2 і 1,34 рази відповідно в порівнянні з контролем. Розвиток ЕАЕ супроводжувався більш істотним зниженням кількості як CD4⁺CD25⁺, так і FOXP3⁺-клітин (в 4,6 і 5,3 рази відповідно) на 28 добу після індукції патології. На 14 добу розвитку ХТПХ відзначалося зниження вмісту CD4⁺CD25⁺ і FOXP3⁺ клітин в 2,3 і 3,2 рази відповідно в порівнянні з контролем.

Всі види ПФПК, які вводилися тваринам з АІЗ, продемонстрували виражений імуномодулюючий ефект щодо Трег-клітин з поліпшенням клінічних ознак розвитку патологій (рис. 1, таблиця). Показано, що кріоконсервовані матеріал володів більш вираженим стимулюючим потенціалом щодо Трег-клітин. Так, при використанні як нативної, так і кріоконсервованої СКП в терапії АА відзначено зниження індексу артриту в 1,1 і 1,2 рази при збільшенні вмісту як CD4⁺ CD25⁺, так і FOXP3⁺-клітин в 1,66 і 1,18 рази (нативСКП) і в 1,29 і 1,15 рази відповідно (кріоСКП) (таблиця). Засто-

сування нативних і кріоконсервованих ФНК при ЕАЕ сприяло зниженню клінічних ознак патології в 1,6 і 2,0 рази відповідно. Це обумовлено різким підвищенням вмісту Трег-клітин більш ніж в 3 рази після введення як нативних, так і кріоконсервованих ФНК. Аналогічну дію нативних і кріоконсервованих КФП відзначено в моделі ХТПХ, а саме, встановлено підвищення вмісту CD4⁺CD25⁺ і FOXP3⁺-клітин в середньому в 2 рази в порівнянні з контролем. Кріоконсервовані КФП сприяли максимальному поліпшенню клінічних ознак ХТПХ, судячи за зниженням показника індексу селезінки в 1,4 рази в порівнянні з відповідним показником у тварин без лікування.

Цілеспрямоване збільшення вмісту Трег-клітин в організмі реципієнта з АІЗ можливе завдяки наявності в ПФПК як клітин-продуцентів протизапальних цитокінів (ІЛ-10, ТРФ-β), так і ферменту ІДО (рис. 3). В якості таких продуцентів виступають мезенхімальні стовбурові клітини (КФП, плацента), клітини мікроглії

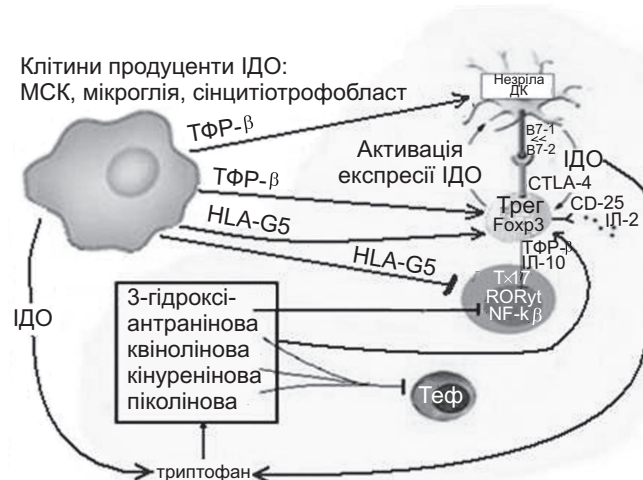


Рис. 3. Схема можливих механізмів активації Трег-клітин в організмі реципієнта після введення ПФПК.

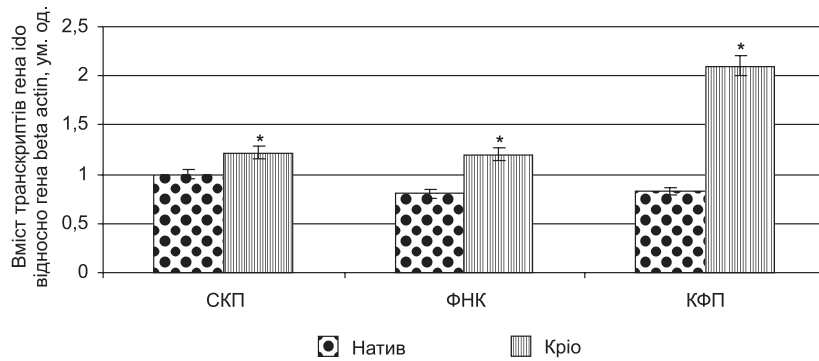


Рис. 4. Вміст транскриптів гена *ido* в нативних і кріоконсервованих клітинах ПФПК.

Примітка: * – результати мають статистично значущі відмінності щодо показника нативного матеріалу, $p < 0,05$.

(ФНК) і клітини синцитіотрофобласту (плацента) [9, 10, 11]. Активація експресії ІДО цими клітинами здійснюється під впливом прозапальних цитокінів, зокрема ІФ- γ [12].

Завдяки роботі ферменту ІДО відбувається киснева деградація триптофану з утворенням 3-гідроксіантранілової, кінуренинової, піколінової, квінолінової кислот, які безпосередньо стимулюють утворення Трег і вироблення ними ІЛ-10, ТРФ- β , що і визначає їхній імуносупресивний ефект [14]. Протизапальні цитокіни ІЛ-10, ТРФ- β здатні реалізувати клітинно-контактну (за участю в міжклітинній взаємодії СТЛА4 / В7, LAG3, TGF- β , цАМФ, гранзимів) і медіаторно-опосередковану супресію (ТРФ- β , ІЛ-10, ІЛ-35) [10].

Всі види ПФПК були здатні до певного фонового вмісту ферменту ІДО, про що свідчить наявність транскриптів гена *ido*, відповідального за його продукцію (рис. 4). Кріоконсервування призводило до активації його експресії в ПФПК, але різного ступеня, а саме: у СКП – в 1,2 рази, у ФНК – в 1,5 рази і у КФП – у 2,5 рази в порівнянні з нативом. Таким чином, можна припустити, що кріоконсервовані ПФПК з підвищеним ступенем експресії гена *ido* можуть володіти значним потенціалом активації Т-регуляторної ланки імунітету в терапії АІЗ.

Проведені дослідження дають підставу вважати, що стимуляція Т-регуляторної ланки імунітету у тварин з експериментальними АІЗ (АА, ЕАЕ і ХТПХ) після введення ПФПК здійснюється ІДО-залежним молекулярним механізмом. Даний факт підтверджено результатами представлених досліджень, в яких проводили лікування БТПХ введенням КФП, що передоброблялися специфічним інгібітором ІДО – 1-метилтриптофаном. При цьому, судячи з клінічних ознак ХТПХ, терапевтичний ефект такого матеріалу був відсутній [3].

ВИСНОВКИ

1. На експериментальних моделях патологій аутоімунного генезу, а саме АА, ЕАЕ, ХТПХ обґрунтована можливість і доведена ефективність застосування продуктів фетоплацентарного комплексу (СКП, ФНК, КФП) для їхнього лікування.

2. Результати проведених досліджень дають підстави вважати, що терапевтичний імуносупресивний ефект ПФПК при лікуванні експериментальних АІЗ (АА, ЕАЕ і ХТПХ) реалізується по молекулярному ІДО-залежному механізму.
3. Всі види ПФПК, які вводилися тваринам з АІЗ, продемонстрували можливість активації Т-регуляторної ланки імунітету, причому кріоконсервований матеріал мав більш виражений імунокоригуючий ефект.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Гольцев А. Н. Действие различных режимов криоконсервирования на проявление иммуномодулирующей активности плаценты при развитии адьювантного артрита / А. Н. Гольцев, Е. Д. Луценко, М. В. Останков // Пробл. криобиол. – 2008. – № 4. – С. 456-459.
2. Давыдова Г. С. Применение адьюванта с различным количеством БЦЖ для воспроизведения ЭАЭ у крыс / Острый энцефаломиелит в эксперименте и клинике. – Мн: Наука и техника, 1969. – С. 32-37.
3. Дімітров О. Ю. Дослідження ІДО-залежного механізму імунорегулюючої дії клітин фетальної печінки мишей / [О. Ю. Дімітров, О. В. Сафранчук, Т. Г. Дубрава та ін.] // Матер. міжнар. наук. конф.: [«Молодь та поступ біології»], 16-19 квітня 2013 р. – Львів. – С. 410.
4. Жаботинский Ю. М., Иоффе В. И. Экспериментальные аллергические демиелинизирующие заболевания нервной системы. – Л.: Медицина, 1975. – 150 с.
5. Міщенко О. Я. Фармакологічна ефективність емульсії анальбену на моделі ад'ювантного артриту у щурів / О. Я. Міщенко, А. А. Котвіцька // Вісник фармації. – 2001. – № 3. – С. 124-125.
6. Пат. № 59206, Україна, МПК А 01 N 1/02. Спосіб кріоконсервування суспензії фетальних нервових клітин / А. М. Гольцев, Є. О. Порожан, Н. М. Бабенко, М. В. Останков; Заявник: ІПКіК НАН України. – Заявл.: 04.10.2010. Опубл.: 10.05.2011. – Бюл. № 9.

7. Херрингтон С., Дж. Макги Молекулярная клиническая диагностика. Методы. – М.: Мир, 1999. – 558 с.
8. Шевелев А. С. Реакция «трансплантат против хозяина» и трансплантационная болезнь. – М.: Медицина, 1976. – 237 с.
9. Goltsev A. N. Peculiarities of functional state modulation of genetic apparatus of fetal liver cells with stemness characteristics after cryopreservation / [A. N. Goltsev, E. D. Lutsenko, A. Yu. Dimitrov et al.] // Cryolett. – 2011. – Vol. 32, № 6. – P. 543-544.
10. Guillemain G. J. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and production of quinolinic acid by human microglia, astrocytes and neurons / G. J. Guillemain, G. Smythe, O. Takikawa, B. J. Brew // Glia. – 2005. – Vol. 49, № 1. – P. 15-23.
11. Honig A. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) expression in invasive extravillous trophoblast supports role of the enzyme for materno-fetal tolerance / [A. Honig, L. Rieger, M. Kapp et al.] // J. Reprod. Immunol. – 2004. – Vol. 61, № 2. – P. 79-86.
12. King N. J. Molecules in focus: indoleamine 2,3-dioxygenase / N. J. King, S. R. Thomas // Int. J. Biochem. Cell. Biol. – 2007. – Vol. 39, № 12. – P. 2167-2172.
13. Sakaguchi S. Immiinologic 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. Asano et al.] // J. Immunol. – 1995. – Vol. 155, № 3. – P. 1151-1164.
14. Shevach E. M. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression // Immunity. – 2009. – Vol. 30, № 5. – P. 636-645.

УДК 616-092:612.017.083.3

А. Н. Гольцев, Т. Г. Дубрава, Н. Н. Бабенко, Ю. А. Гаевская, Е. Д. Луценко, М. В. Останков ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ РАЗВИТИЯ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ. СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ИХ ЛЕЧЕНИЮ

На экспериментальных моделях патологий аутоиммунного генеза обоснована возможность и доказана эффективность применения продуктов фетоплацентарного комплекса. Продемонстрирована их способность к активации Т-регуляторного звена иммунитета и нормализации клинических показателей экспериментальных животных. Показан более выраженный иммунокорректирующий потенциал криоконсервированного материала на клеточном и молекулярном уровнях.

Ключевые слова: продукты фетоплацентарного комплекса; аутоиммунные заболевания; Трег-клетки, ген *ido*

UDC 616-092:612.017.083.3

A. M. Goltsev, T. G. Dubrava, N. N. Babenko, Yu. A. Gaevskaia, E. D. Lutsenko, M. V. Ostankov PATHOGENETIC FACTORS OF DEVELOPMENT OF AUTOIMMUNE DISEASES. CURRENT APPROACHES TO THEIR TREATMENT

In experimental models of pathologies of autoimmune genesis, the possibility was grounded and the efficiency of using the products of fetoplacental complex was confirmed. Their ability to activate T-regulatory immunity link and normalize cell indices in experimental animals were tested. More pronounced immune correcting potential of cryopreserved material has been shown at cell and molecular levels.

Key words: fetoplacental complex products; autoimmune diseases; Treg-cells; *ido* gene

Адреса для листування:
61015, м. Харків, вул. Переяславська, 23.
Тел. (057) 373-41-43.
E-mail: anatoliy.goltsev@gmail.com.
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини
НАН України

Надійшла до редакції 20.04.2016 р.