

Функциональные характеристики моноцитарно-фагоцитарной системы в динамике развития иммунновоспалительного процесса при адьювантном артрите после применения клеток эмбриональной печени

Е.Е. ЯМПОЛЬСКАЯ, Н.А. БОНДАРОВИЧ, А.Н. ГОЛЬЦЕВ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Functional Characteristics of Monocyte-Phagocyte System in Developmental Dynamics of Immune Inflammatory Process at Adjuvant Arthritis after Embryonic Liver Cell Application

E.YE. YAMPOLSKAYA, N.A. BONDAROVICH, A.N. GOLTSEV

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Аутоиммунные заболевания (АИЗ), в частности ревматоидный артрит (РА), представляют собой мультифакториальную патологию, в инициации и поддержании которой принимает участие широчайший спектр клеточных популяций организма. Длительное время объектом внимания исследователей, занимающихся данной проблемой, были иммунокомпетентные клетки и, прежде всего, Т-лимфоциты. По мере освоения молекулярных основ инициации и развития АИЗ стало очевидно, что важное место в этом сложном каскадно развивающемся процессе занимают субстраты моноцитарно-фагоцитарной системы (МФС), которые формируют цитокиновый профиль и реализуют эффекторные функции.

Цель исследования – изучение структурно-функциональных характеристик клеток МФС при экспериментальном аналоге РА – адьювантном артрите (АА), а также возможности их коррекции клетками эмбриональной печени (КЭП).

Эксперименты выполнены на 7-месячных мышках-самцах линии СВА массой 20–25 г. Адьювантный артрит индуцировали субплантарным введением полного адьюванта Фрейнда. Одновременно с инициацией АА однократно внутривенно вводили как нативные, так и криоконсервированные КЭП в дозе 5×10^6 на мышь. Криоконсервированные КЭП проводили под защитой 10%-го диметилсульфоксида со скоростью замораживания $1^\circ\text{C}/\text{мин}$ до -20°C с последующим погружением ампул в жидкий азот. Суспензию отогревали на водяной бане при температуре $39-40^\circ\text{C}$ в течение 1 мин. Популяцию адгезивных клеток перитонеальной полости (ПП) выделяли инкубированием в пластиковых чашках при температуре 37°C в течение 45 мин. Концентрацию циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в сыворотке крови определяли методом преципитации с 3%-м и 4%-м растворами полиэтиленгликоля. Содержание Ia^+ -клеток в популяции МФС определяли методом люминесцентной микроскопии с использованием антимышиных моноклональных антител фирмы Caltag (США). Оценку апоптотических процессов в исследуемых клетках осуществляли методом пульс-электрофореза в 1%-м агарозном геле. Для визуализации ядер апоптотических клеток использовали ДНК-тропный краситель Хехст-33342. Статистическую обработку данных производили с помощью программы MS Excel.

Установлено изменение спектра функциональных показателей клеток МФС при развитии АА у экспериментальных животных. Так, наряду с гиперактивацией МФС было отмечено увеличение содержания как общего количества клеток в ПП, так и клеток с адгезивной

Аутоиммунные заболевания (АИЗ) in particular rheumatoid arthritis (RA) represent multi-factor pathology in initiation and maintaining of which a wide spectrum of organism cell population takes part. For a long time the attention of researchers dealing with this task has been paid to immune competent cells and first of all to T-lymphocytes. With making progress in molecular grounds of initiation and development of AIDs it became apparent that an important place in this complicated process with cascade-like development was taken by substrates of monocyte-phagocyte system (MPhS) forming cytokine profile and realizing effector functions.

The research aim was to study structural and functional characteristics of MPhS cells at adjuvant arthritis (AA), being RA experimental analogue, as well as possibility of their correction by embryonic liver cells (ELCs).

Experiments were performed in 7 months' CBA male rats of 20–25g. AA was induced by subplantar injection of complete Freund's adjuvant. Simultaneously with AA initiation there were intravenously injected both native and cryopreserved ELCs in a dose 5×10^6 per mouse. ELCs were cryopreserved under protection of 10% dimethylsulphoxide with freezing rate of $1^\circ\text{C}/\text{min}$ down to -20°C with following immersion into liquid nitrogen. Suspension was thawed on water bath at $39-40^\circ\text{C}$ for 1 min. Population of adhesive cells of peritoneal cavity (PC) was incubated in plastic plates at 37°C for 45 min. Concentration of circulating immune complexes (CICs) in blood serum was found by precipitation with 3 and 4% polyethylene glycol solutions. Content of Ia^+ -cells in MPhS population was examined by luminescent microscopy using anti-mouse monoclonal antibodies (Caltag, USA). Assessment of apoptotic processes in studied cells was made by pulse-electrophoresis in 1% agarous gel. To visualize the nuclei of apoptotic cells there were used DNA-tropic dye, Hoechst-33342. Data were processed with MS Excel software.

Change in spectrum of functional indices of MPhS cells at AA development has been established in experimental animals. Moreover, in addition to hyperactivation of MPhS there were noted an increase of the content of both total number of cells in PC and those with adhesive activity in it, a rise in CICs concentration in blood serum and two-fold increase of Ia^+ -cells in PC. Therapeutic application of both native and cryopreserved ELCs contributed to a reduction practically down to control level of the percentage of adhesive cells in PC, CICs concentration in blood serum and normalization of Ia^+ -cell expression level within the period of both acute and chronic development of immune inflammatory process. In addition, it has been established that ELCs may realize their therapeutic effect via triggering the

активностью в ней, возрастание концентрации ЦИК в сыворотке крови и двукратное увеличение Ia^+ -клеток в ПП. Применение в качестве терапевтического препарата как нативных, так и криоконсервированных КЭП способствовало снижению практически до уровня контроля процента адгезивных клеток в ПП, концентрации ЦИК в сыворотке крови и нормализации уровня экспрессии Ia^+ -клеток в период как острого, так и хронического развития иммуновоспалительного процесса. Кроме того, было установлено, что КЭП могут реализовывать свой терапевтический эффект через включение механизмов коррекции апоптотических процессов в клетках МФС при АА, что выражалось в повышении содержания в них Хехст⁺-клеток. Отмечен позитивный эффект использования криоконсервированных КЭП, который проявлялся в усилении апоптотических процессов в организме животных после их введения.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о разбалансировке структурно-функционального состояния субстратов МФС при развитии АА и о корригирующем воздействии на них как нативных, так и криоконсервированных КЭП.

mechanisms of correction of apoptotic processes in cells of MPhS at AA, that was manifested in a rise in the content of Hoechst cells in them. There was found positive effect of using ELCs which was manifested in strengthening of apoptotic processes in an organism of animals after their injection.

Thus the obtained data testify to a misbalance of structural and functional state of MPhS substrates at AA development and to correcting effect on them both of native and cryopreserved ELCs.

Механизмы образования АТФ при краткосрочном гипотермическом хранении печени крыс, подвергшихся предобработке

Е.Н. ТКАЧЁВА, А.Ю. ПЕТРЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Mechanisms of ATP Generation during Short-Term Liver Hypothermic Storage after Rat Preconditioning

E.N. TKACHYOVA, A.YU. PETRENKO

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Сохранение уровня АТФ в ходе гипотермического хранения – общепризнанный показатель функциональной полноценности органа и его пригодности для трансплантации.

Ранее в нашей лаборатории было показано, что после предобработки животных эмбриоспецифическими факторами (ЭСФ) содержание АТФ в печени после часа гипотермического хранения органа достоверно повышается. Однако механизмы, лежащие в основе данного эффекта, к настоящему времени не изучены.

Цель данной работы – исследование влияния предварительной обработки животных эмбриоспецифическими факторами на возможные пути генерации АТФ при краткосрочном гипотермическом хранении печени крыс.

Для моделирования гипотермического хранения использовали белых беспородных крыс-самок массой 200-250 г, которые были разделены на 2 группы – контрольную и опытную. Опытной группе за 4 ч до изоляции печени вводили в бедренную вену 0,3 мл/100 г массы “Фетотек” (цитозоль эмбриональных тканей человека), контрольной – равный объем физиологического раствора. Печень извлекали, отмывали от крови, помещали в сахарозосодержащий раствор, разработанный в ИПКиК, и хранили на протяжении 1 ч в бытовом холодильнике при температуре 4°C. Затем печень гомогенизировали и выделяли митохондрии

ATP level maintenance during hypothermic storage is generally recognized index of organ functional activity and its convenience for transplantation.

Previously in our research there was shown that after animal preconditioning with embryospecific factors (ESFs) the ATP content in liver after 1 h organ hypothermic storage was significantly increased. However, the mechanisms underlying the given effect to the present time remain unclear.

The purpose of this study was to investigate the influence of animal preconditioning with ESF on the possible way of ATP generation during short-term hypothermic storage of isolated rat liver.

To model hypothermic storage we used 200-250 g white outbred female rats which were divided into two groups: control and experiment. Experimental group 4 hours prior to liver isolation there was injected 0.3 ml of ‘Fetotek’ (human embryonic tissue cytosol) per 100 g into rat femoral vein. Control group received an equal volume of physiological solution; liver was washed-out of blood and saturated *per v. porta* with sucrose-based solution (SBS), developed at the Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine and stored for 1 hr in a domestic freezer at 4°C. Afterwards liver was homogenized and isolated mitochondria were obtained using differential centrifugation. Respiratory and oxidative phosphorylation parameters of isolated mitochondria were