

Действие различных режимов криоконсервирования на проявление иммуномодулирующей активности плаценты при развитии адъювантного артрита

UDC 615.361.018.46.014.41

A.N. GOLTSEV*, E.D. LUTSENKO, M.V. OSTANKOV

Effect of Different Cryopreservation Regimens on Manifestation of Immune Modulating Activity of Placenta at Development of Adjuvant Arthritis

Исследована динамика накопления CD4⁺CD25⁺ – Т-регуляторных клеток в лимфоузлах при развитии адъювантного артрита до и после введения клеток плаценты. Проведена оценка иммуномодулирующего эффекта клеток плаценты в зависимости от режима криоконсервирования суспензии.

Ключевые слова: криоконсервированные клетки плаценты, адъювантный артрит, CD4⁺CD25⁺ – Т-клетки.

Досліджена динаміка накопичення CD4⁺CD25⁺ – Т-регуляторних клітин в лімфовузлах при розвитку ад'ювантного артриту до і після введення клітин плаценти. Проведена оцінка імуномодулюючого ефекту клітин в залежності від режиму криоконсервування суспензії.

Ключові слова: криоконсервовані клітини плаценти, ад'ювантний артрит CD4⁺CD25⁺ – Т-клітини.

Dynamics of accumulation CD4⁺CD25⁺ T-regulatory cells in lymph nodes has been investigated at development of adjuvant arthritis before and after introduction of placenta cells. The estimation immunomodulatory effect of placenta cells depending on a cryopreservation mode is spent.

Key-words: cryopreserved placenta cells, adjuvant arthritis, CD4⁺CD25⁺ T-cells.

Возможность использования клеток плаценты (КП) в терапии ревматоидного артрита показана в экспериментальных и клинических работах. Эффективность применения криоконсервированных клеток может быть обусловлена различным характером изменений, которые происходят в КП при замораживании-отогреве биообъекта. Данные [1] свидетельствуют о том, что криоконсервирование оказывает различное действие на клеточные популяции, например в костном мозге, фетальной печени, нервной ткани и других тканях, что может иметь решающее значение в проявлении терапевтического эффекта используемого материала. До настоящего времени остается невыясненным вопрос влияния различных условий криоконсервирования КП на их иммуномодулирующую функцию в отношении CD4⁺CD25⁺ – Т-регуляторных клеток (Т-рег), играющих важнейшую роль в поддержании толерантности организма и предупреждении развития аутоиммунных заболеваний, включая адъювантный артрит (АА).

Цель работы – изучить влияние различных условий криоконсервирования на популяционный состав клеток в суспензии плаценты и проявление

ими иммуномодулирующей активности в отношении CD4⁺CD25⁺-клеток в лимфоидных органах мышей в динамике развития АА.

Материалы и методы

Индукцию АА осуществляли субплантарным введением полного адъюванта Фрейнда мышам СВА массой 16–18 г в дозе 0,05 мл/мышь. Клетки плаценты (18–19 сут гестации) криоконсервировали под защитой 10%-го диметилсульфоксида (ДМСО) (К-1) или 10%-го пропандиосахароля (ПДС) (К-2) на программном замораживателе УОП-1 (СКТБ с ОП ИПКиК НАН Украины) [2]. КП вводили в дозе 1×10⁶ клеток на мышь на 7-е сутки развития патологии. Морфологический учет клеток в суспензии клеток плаценты выполняли на мазках, окрашенных по Романовскому-Гимзе. Методом прямой иммунофлюоресценции с использованием моноклональных антител к мембранным структурам CD4 и CD25 (BD Pharmingen TM) определяли количество Т-регуляторных клеток на проточном цитофлюориметре (FACS Calibur, BD) в лимфоузлах животных с АА до и после введения КП на 7, 14, 21, 28-е сутки.

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-31-26, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

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

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereiaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3126, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Морфологический состав суспензии клеток плаценты до и после криоконсервирования

Номер образца	Суспензия клеток	Количество клеток в суспензии, %				
		Клетки цитотрофобласта	Макрофаги Кашенко Гофбауэра	Лимфоциты	Фибробласты	Гранулоциты
1	Нативная	78,4±4,8	11,5±1,1	3,1±1,1	2,45±1,1	3,1±1,8
2	Криоконсервированная в режиме К-1	82,7±1,6	5,6±2,8*	8,0±3,8*	5,2±3,1	—
3	Криоконсервированная в режиме К-2	84,08±2,6	16,8±2,4**	—	—	—

Примечание: * – различия достоверны при сравнении с первым образцом суспензии, $p < 0,05$, # - различия достоверны при сравнении второго и третьего образцов суспензий, $n=8$.

Полученные результаты статистически обрабатывали с использованием критерия Стьюдента-Фишера.

Результаты и обсуждение

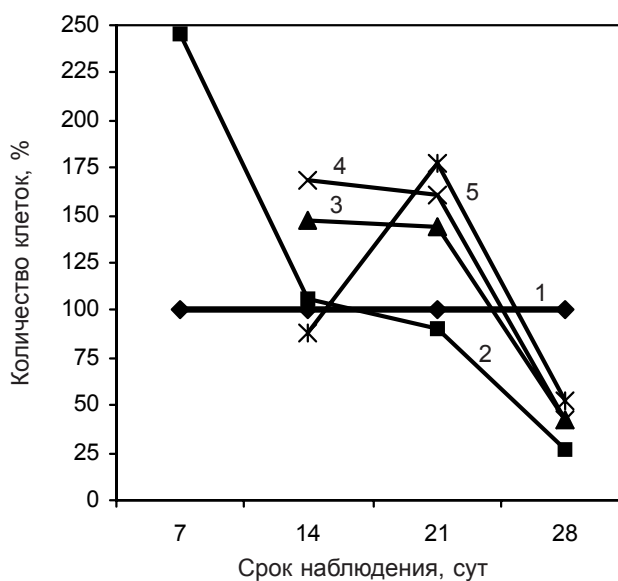
Криоконсервирование плаценты приводило к перераспределению популяционного состава в суспензии клеток (таблица). Так, при криоконсервировании с 10%-м ДМСО наблюдали снижение количества макрофагальных элементов, незначительное повышение количества клеток цитотрофобласта, лимфоцитов в сравнении с нативной суспензией. При использовании 10%-го ПДС, наоборот, количество макрофагальных элементов достоверно повышалось, но существенно снижалось количество лимфоцитов, фибробластов. Состав суспензий после криоконсервирования в режимах К-1 и К-2 различался по количеству клеток во всех отмеченных популяциях, кроме количества клеток цитотрофобласта.

$CD4^+CD25^+$ – Т-регуляторные клетки играют существенную роль в формировании толерантности и предотвращении развития аутоиммунных реакций. Функциональная дефектность и снижение содержания этой популяции обнаружены при многих аутоиммунных заболеваниях у человека. Регуляторная роль этих клеток в предотвращении развития ревматоидного артрита и его экспериментальной модели АА остается неоднозначной. Недостаточно изучен и вопрос возможности регуляции функционального состояния этих клеток продуктами фетоплацентарного комплекса (ПФПК), в частности криоконсервированными КП.

Как свидетельствуют полученные данные, при развитии АА на 7-е сутки наблюдалось существенное повышение количества Т-рег в лимфоузлах экспериментальных мышей (рисунок), что может быть результатом экспрессии $CD25$ структур в ответ на простагландин E_2 [4], который является одним из медиаторов острого воспаления, развиваю-

щегося в эти сроки, а также появление в дебюте заболевания цитокинов Тх1 типа, продуцирующих индукторы этих клеток (ИЛ-2, ИФНγ). По мере развития патологии количество исследованных клеток снижалось до уровня контроля на 14–21-е сутки и было достоверно ниже на 28-е сутки.

Использование КП при лечении АА обосновано продукцией медиаторов с мощным иммунорегуляторным потенциалом клетками цитотрофобласта, макрофагами Кашенко-Гофбауэра, стромальными элементами. Известно, что КП являются источником таких цитокинов, как ИЛ-2, ТФРβ, одних из ведущих регуляторов функциональной активности Т-рег [4]. Однако данные об участии различных популяций КП в регуляции $CD4^+CD25^+$ -клеток единичны. Известно, что клетки цитотрофобласта и их растворимые продукты в условиях *in vitro* не влияют на количество $CD25^+$ – Т-лимфоци-



Количество $CD4^+CD25^+$ -клеток в лимфоузлах мышей с АА до и после введения клеток плаценты; 1 – интактные; 2 – АА; 3 – АА + нативные КП; 4 – АА + КП К-1; 5 – АА + КП К-2

тов [3]. В работе [5] показано, что мезенхимальные стволовые клетки с фибробластоподобной структурой, полученные из плаценты человека, при сокультивировании в системе СКЛ (смешанной культуры лимфоцитов) существенно увеличивали количество клеток с фенотипом Т-рег – CD4⁺CD25^{high} и CD4⁺FOXP3⁺. Полученные нами результаты свидетельствуют, что на 14-е сутки развития патологии наблюдались достоверные отличия в модулирующем действии КП в отношении Т-рег, криоконсервированных в различных режимах. Введение плаценты, криоконсервированной в режиме К-1, привело к увеличению их количества, а в режиме К-2 – не изменяло содержания клеток исследуемой популяции в лимфоузлах. Возможно, изменение модулирующей активности криоконсервированной в этом режиме суспензии обусловлено именно изменением в суспензии количества макрофагов, лимфоцитов и фибробластов.

На 21-е сутки, независимо от выбранного режима криоконсервирования, вводимые КП в равной степени повышали количество CD4⁺CD25⁺-клеток по сравнению с показателем у мышей с АА и интактных животных. Более того, криоконсервированная в режиме К-2 плацента проявляла такого рода активность даже выше, чем нативный. К 28-м суткам развития патологии количество Т-рег снижалось во всех экспериментальных группах, однако, при введении как нативных, так и криоконсервированных КП снижение было менее выражено, чем у животных с АА.

Выводы

Динамика накопления CD4⁺CD25⁺-клеток в лимфоузлах свидетельствует о нарушении этого

регуляторного звена при АА и необходимости использования модуляторов для коррекции. КП проявляют иммуномодулирующий эффект в отношении популяции Т-рег, однако их активность зависела от выбранного режима криоконсервирования материала. Криоконсервирование КП с использованием как 10%-го ДМСО, так и 10%-го ПДС приводит к перераспределению популяционного состава в суспензии.

Литература

1. Грищенко В.И., Гольцев А.Н. Трансплантация продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса. От понимания механизма действия к повышению эффективности применения // Пробл. криобиологии.– 2002.– №1.– С. 54–84.
2. Грищенко В.И., Морозова Т.Ф., Воротилин О.М. Приготовление, зберігання та клінічне використання криоконсервованої суспензії плаценти / Метод. рекомендації.– Харків, 1997.– 10 с.
3. Талаев В.Ю., Бабайкина О.Н. Влияние клеток цитотрофобласта плаценты человека на пролиферацию Т-лимфоцитов // Иммунология.– 2004.– №6.– С. 324–329.
4. Ярилин А.А., Донецкова А.Д. Естественные регуляторные Т-клетки и фактор FOXP3 // Иммунология.– 2006.– №3.– С. 176–188.
5. Chang C.-J., Yen M.-L. Placenta-derived multipotent cells exhibit immunosuppressive properties that are enhanced in the presence of interferon- γ // Stem Cells.– 2006.– Vol. 24, N11.– P. 2466–2477.

Поступила 14.07.2008