

МЕХАНИЗМЫ АПОПТОЗА В МОНОЦИТАРНО-ФАГОЦИТАРНОЙ СИСТЕМЕ ПРИ РАЗВИТИИ АДЬЮВАНТНОГО АРТРИТА ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ КЛЕТОК ФЕТАЛЬНОЙ ПЕЧЕНИ

Е. Е. Ямпольская
О. М. Шатнева
Н. А. Бондарович
А. Н. Гольцев

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, Харьков

E-mail: yampi@ukr.net

Получено 26.07.2012

Проведена сравнительная оценка апоптотических процессов в клетках моноцитарно-фагоцитарной системы в условиях развития адьювантного артрита до и после применения криоконсервированных и нативных клеток фетальной печени. С использованием вестерн-блот-анализа было показано, что в условиях развития адьювантного артрита клетки моноцитарно-фагоцитарной системы проявляют устойчивость к апоптозу. Установлен проапоптотический эффект клеток фетальной печени после введения их реципиентам с адьювантным артритом, который был более выраженным у криоконсервированных клеток фетальной печени. Проявление апоптоз-индуцибельного потенциала клеток фетальной печени непосредственно зависело как от вида препаратов, так и сроков их введения. Особенности экспрессии протеинов CD95-каскада в клетках моноцитарно-фагоцитарной системы после применения клеток фетальной печени доказывают значимость влияния криоконсервирования на функциональный статус биообъекта. Криоконсервирование в данном случае может выступать фактором активации протеинов проапоптотического каскада. Отмечено, что механизм действия клеток фетальной печени в отношении модуляции апоптотических каскадов в клетках моноцитарно-фагоцитарной системы животных с патологией принципиально отличается от действия глюкокортикоидов, применяемых при лечении ревматоидного артрита, экспериментальной моделью которого является адьювантный артрит. Полученные результаты могут служить экспериментальным обоснованием возможности использования клеток фетальной печени при лечении больных ревматоидным артритом.

Ключевые слова: апоптоз, моноцитарно-фагоцитарная система, адьювантный артрит, клетки фетальной печени, криоконсервирование.

Ревматоидный артрит (РА) является достаточно распространенным заболеванием, которым в Украине страдает более 120 тыс. человек [1]. Причины возникновения РА до конца не выяснены, как и не существует эффективных способов профилактики и полного излечения заболевания. Для РА характерно многолетнее прогрессирующее воспаление, которое выражается в разрушении структур суставов и поражении около-суставных тканей. Наличие *locus minoris resistentiae* не исключает очевидности того, что РА — патология, проявляющаяся во многих органах и системах организма [2]. Активация клеток моноцитарно-фагоцитарной системы (МФС), в частности макрофагов (МФ), является одним из наиболее универсальных звеньев патогенеза РА [3–5].

В связи с этим существует несколько факторов, дающих основание рассматривать МФ как возможную мишень для терапевтических воздействий.

Не исключено, что аутоиммунный процесс может возникнуть в результате дефектов элиминации апоптотических клеток фагоцитами [6, 7]. В этом плане представляет интерес возможность фармакологического воздействия на МФ для усиления очищения тканей от апоптотических клеток [8]. Следует учитывать, что процесс элиминации апоптотических клеток *a priori* индуцирует мощный иммуносупрессивный ответ в виде продукции трансформирующего ростового фактора в (ТРФ-в), интерлейкина-10 (ИЛ-10) и простагландинов, которые оказывают прямое аутокринное и паракринное

воздействие на синтез провоспалительных цитокинов иммунокомпетентными клетками (ИКК) [9]. Однако одного лишь нарушения в отдельном звене фагоцитоза апоптотических клеток недостаточно для инициации и поддержания аутоиммунного процесса. Показано, что мыши, у которых отсутствует маннозосвязывающий лектин, демонстрируют дефекты макрофагального клиренса апоптотических клеток без развития аутоиммунного процесса [10].

Существенным моментом при РА является установленный факт нарушения реализации в ИКК процессов пролиферации и апоптоза [11]. МФ также проявляют устойчивость к апоптозу, способствуя тем самым пролонгации иммуновоспалительного процесса [12, 13]. Невосприимчивость МФ к апоптозу может определяться особенностями их секреторной активности и участием в реализации иммуновоспалительных реакций [14]. Таким образом, одной из составляющих стратегии ограничения чрезмерного воспалительного ответа при РА может быть активация апоптоза в клетках МФС [15, 16]. Например, механизм действия антиревматического препарата буциллина реализуется путем активации в клетках МФС апоптоза [17]. Положительный терапевтический эффект отмечен также при использовании бисфосфонатов, инкапсулированных в липосомы, которые способны вызывать апоптоз активированных МФ [18].

К альтернативным подходам лечения РА можно отнести и клеточно-тканевую терапию, одним из компонентов которой являются клетки фетальной печени (КФП) [19, 20]. Предыдущие исследования продемонстрировали способность некоторых продуктов фетоплацентарного комплекса (ПФПК) активировать апоптоз, хотя механизм их действия остается до конца не изученным. Так, подобной активностью обладают альфа-фетопротеин КФП и плацентарный протеин РР-11 [21, 22]. Предполагают, что эти протеины могут воздействовать на экспрессию генов, индуцирующих апоптоз или ингибировать антиапоптотический протеин Bcl-2 [21, 23]. Кроме того, КФП продуцируют ряд медиаторов, таких как ИЛ-4, ИЛ-10, которые обладают как противовоспалительной, так и апоптозиндуцирующей активностью [24, 25].

Необходимость применения КФП в клинической практике определила разработку эффективных методов их криоконсервирования и длительного хранения. При этом криоконсервирование может выступать в роли модификатора состояния биообъекта

на молекулярном и клеточном уровнях, в ряде случаев улучшая его терапевтическую эффективность [26]. В этом плане представляет интерес выяснение характера влияния криоконсервирования на апоптоз-индуцибельный потенциал КФП в отношении клеток МФС в условиях развития адьювантного артрита (АА).

Цель работы — сравнительная оценка развития апоптотических процессов в клетках МФС в условиях развития АА до и после применения криоконсервированных и нативных КФП.

Материалы и методы

Эксперименты выполнены на мышах линии С57Bl/6J и СВА/Н 3-месячного возраста массой 18–20 г. В эксперименте использованы 144 животных, полученных из питомника РАМН «Столбовая» с последующим содержанием в стандартных условиях вивария ИПКиК НАНУ. В каждой исследуемой группе использовалось не менее 7 животных. Патологию индуцировали у мышей СВА/Н субплантарным введением полного адьюванта Фрейнда в дозе 0,05 мл/мышь [27]. Выбранная экспериментальная модель адекватна клинической форме РА человека со сходными гистологическими и функциональными признаками этой патологии: отек, деформация, нарушение подвижности суставов и т. д. [28, 29].

Животных декапитировали под легким эфирным наркозом. Клетки перитонеальной полости (ПП) получали как описано ранее [30]. Их адгезивные свойства определяли в пластиковых чашках (Spectar, Сербия) при температуре 37 °С в течение 45 мин, после чего трижды мягко смывали средой 199. Процент адгезивных клеток (АК) определяли как разность между количеством внесенных клеток и количеством таковых в супернатанте [31]. Количество клеток МФС в адгезивной фракции определяли на проточном цитофлуориметре FACS Calibur с использованием моноклональных антител к CD 68-антигену (BD Farmingen, США), описанному как маркер моноцитов/МФ и представляющему собой гомолог мышино-го макросиалина, члена семейства LAMP (лизосомассоциированных мембранных протеинов) [32]. Количество мертвых клеток МФС устанавливали цитофлуориметрически при помощи пропидия йодида (5 мкг/мл) (Sigma, США) [33]. Анализ полученных данных осуществляли с применением программы Win MDI 2.8.

КФП были получены у мышей линии C57Bl/6J на 14-е сут гестации [34]. Суспензию КФП получали на среде 199 с 3%-й эмбриональной телячьей сывороткой и 2%-м цитратом натрия [35]. Кримоконсервирование КФП осуществляли в пластиковых ампулах Nunc (Германия) в объеме 1,8 мл с концентрацией $1 \cdot 10^6$ /мл на программном замораживателе Cryoson (Германия) в соответствии с протоколом [36]. Скорость охлаждения на первом этапе составляла 1 °С/мин до -40 °С, 10-минутная экспозиция, затем со скоростью 10 °С /мин до -80 °С с последующим погружением образцов в жидкий азот. Нативные КФП (нКФП) и кримоконсервированные КФП (кКФП), сохранность которых составляла не менее 80%, вводили мышам-реципиентам СВА/Н однократно внутривенно в дозе $5 \cdot 10^6$ клеток/мышь в объеме 0,3 мл на 7-е или 14-е сут после индукции АА. Выраженная иммуномодулирующая активность такой дозы КФП была подтверждена результатами предыдущих исследований [37]. В качестве позитивного контроля терапии АА использовали глюкокортикоид (ГК) дексаметазон в дозе 0,002 мл/мышь, который является основным препаратом базовой терапии РА. Оценку исследуемых показателей проводили через 7 и 14 сут после введения КФП или ГК.

Анализ активации каспаз, FLIP и экспрессии CD95-рецептора проводили с использованием моно- и поликлональных антител: anti-CD95 (FL-335) — поликлональные кроличьи антитела; anti-Caspase-8 [p18 (D-8)] — моноклональные мышьиные антитела с изотипом IgG_{2a}; anti-cFLIP (5D8) — моноклональные мышьиные антитела с изотипом IgG₃; anti-Caspase-3 (46) — моноклональные мышьиные антитела с изотипом IgG₁; вторичные HRP-конъюгированные антикроличьи антитела (s2040); вторичные HRP-конъюгированные антимышиные IgG (s2005) (Santa Cruz).

Исследования молекулярных механизмов апоптоза в клетках МФС на разных стадиях развития АА до и после терапии КФП проводили с помощью вестерн-блоттинга. Лизаты клеток МФС анализировали, используя 12% -й полиакриламидный гель в присутствии додецилсульфата натрия (180 V, 25 mA, 1 ч). Для контроля размера протеинов применяли стандарт от Fermentas (Cat. No.: SM1841). Перенос на нитроцеллюлозную мембрану (Pharmacia, США) осуществляли полусухим способом. Блокирование неспецифического связывания на мембране происходило в 5%-м сухом моло-

ке. Анализ интенсивности хемилюминесценции проводили с помощью субстрата пероксидазы (Perkin Elmer, США). Изображение анализировали с использованием NIH Image program version 1.36, оценивая относительное количество протеина в единицах оптической плотности.

Каталитическую активность каспаз-3 и -8 в клетках МФС определяли, измеряя протеолитическое расщепление флюорогенных субстратов: ZIETD-AFC и AC-DEVD-AMC (Calbiochem, La Jolla, США). Флюоресценцию определяли с помощью спектрофотометра (PerkinElmer, Wellesley, США) по выходу продукта AFC (каспаза-8, экстинция $\lambda = 400$ нм, эмиссия $\lambda = 505$ нм) или AMC (каспаза-3, экстинция $\lambda = 380$ нм, эмиссия $\lambda = 460$ нм). Результаты рассчитывали как единицы флюоресценции на 1 мг тотального протеина.

Полученные результаты обрабатывали статистически по методу Стьюдента–Фишера с использованием программы Statistika 7.0.

Выполненные работы не противоречат «Общим принципам экспериментов на животных», одобренным Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2001) и согласуются с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1985).

Результаты и обсуждение

Как следует из полученных нами данных, в ПП интактных мышей содержится около 33% клеток с адгезивным потенциалом. По данным цитофлуориметрии, 78% из них экспрессировали CD68-структуру (рис. 2). Анализ результатов показал, что изменение содержания клеток МФС зависит



Рис 1. Схема эксперимента

от стадии развития воспалительного процесса. Так, на протяжении всего срока наблюдения было отмечено достоверное увеличение по сравнению с интактными животными количества как АК ПП, так и CD 68⁺. Эти показатели оставались на высоком уровне до 21-х сут развития АА, свидетельствуя об активации клеток МФС (рис. 2).

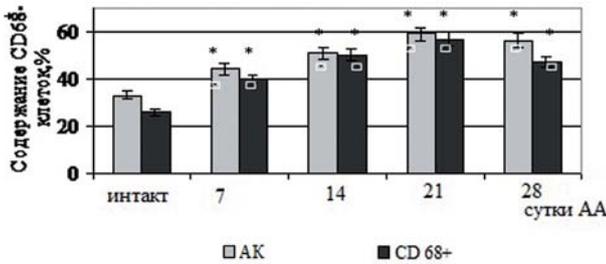


Рис. 2. Содержание CD68⁺-клеток среди адгезивных клеток (АК) перитонеальной полости на разных стадиях развития АА

* — Различия достоверны при $P < 0,05$ в сравнении с: * — интактными животными

Показатели спонтанной гибели клеток МФС (таблица) свидетельствуют о том, что у интактных животных процент погибших клеток не превышал $1,97 \pm 0,03\%$, а в группах животных с АА — $5,2 \pm 0,5\%$ ($P < 0,05$). Однако после лечения ГК во всех исследуемых группах (№ 6–9) количество погибших клеток значительно увеличивалось по сравнению с контролем.

Оба вида КФП также увеличивали процент погибших клеток, причем этот показа

тель зависел как от срока введения, так и вида материала. Например, максимальная гибель наблюдалась при введении кКФП на 7-е сут развития АА и была достоверно выше, чем после применения нКФП (соответственно $9,5 \pm 0,05\%$ и $8,6 \pm 0,3\%$; $P < 0,05$). К 14-м сут АА (через 1 нед после их введения) этот показатель снижался до $7,5 \pm 0,5\%$ и $7,9 \pm 0,05\%$ (таблица). Данный факт может свидетельствовать об изменении после криоконсервирования активности определенных медиаторпродуцирующих популяций КФП, способных модулировать рецепторы ИКК реципиента, что было продемонстрировано ранее [38]. Отмеченный факт гибели клеток может быть результатом активации апоптотических процессов и реализоваться через сложные механизмы модулирования внутриклеточных сигналов при участии внутриклеточных протеинов. Ключевыми факторами апоптогенных сигналов, вызываемых различными типами индукторов, являются энзимы — каспазы [39]. В связи с этим представляло интерес изучение того, какие из них ответственны за апоптоз в клетках МФС. Поэтому в дальнейшем нами был проведен анализ присутствия про- и антиапоптотических протеинов и активации в выделенных клетках МФС. Известно, что классическим показателем индукции апоптоза является активация каспазы-3 [39], сопровождающаяся появлением продукта ее каталитической активности — протеина p17. Как следует из полученных результатов, протеин p17 присутствовал

Процентное содержание погибших клеток МФС

Интактные	Группы животных с АА															
	А Без введения препаратов				В Введение глюкокортикоидов (дексаметазон)				С Введение кКФП				D Введение нКФП			
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Конт- роль	7 сут	14 сут	21 сут	28 сут	7 сут	7 сут	14 сут	14 сут	7 сут	7 сут	14 сут	14 сут	7 сут	7 сут	14 сут	14 сут
$1,97 \pm 0,03$	$4,4 \pm 0,2$	$3,1 \pm 0,1$	$4,52 \pm 0,46$	$5,2 \pm 0,5$	$18,6 \pm 0,8^*$	$17,9 \pm 0,6^*$	$16,8 \pm 0,19^*$	$16,4 \pm 0,11^*$	$9,5 \pm 0,05^{*#}$	$6,1 \pm 0,1^{*#}$	$7,9 \pm 0,05^{*#}$	$8,1 \pm 0,1^{*#}$	$8,6 \pm 0,3^{*#}$	$7,4 \pm 0,08^{*#}$	$7,5 \pm 0,5^{*#}$	$5,75 \pm 0,25^{*#}$

Примечания: А. Без введения препаратов: 1 — интактные; 2 — АА 7 сут; 3 — АА 14 сут; 4 — АА 21 сут; 5 — АА 28 сут; В. Введение ГК: 6 — АА 7 сут+ГК (через 1 нед после введения); 7 — АА 7 сут+ГК (через 2 нед после введения); 8 — АА 14 сут+ГК (через 1 нед после введения); 9 — АА 14 сут+ГК (через 2 нед после введения); С. Введение кКФП: 10 — АА 7 сут+кКФП (через 1 нед после введения); 11 — АА 7 сут+кКФП (через 2 нед после введения); 12 — АА 14 сут+кКФП (через 1 нед после введения); 13 — АА 14 сут+кКФП (через 2 нед после введения); D. Введение нКФП: 14 — АА 7сут+нКФП (через 1 нед после введения); 15 — АА 7сут+нКФП (через 2 нед после введения); 16 — АА 14 сут+нКФП (через 1 нед после введения); 17 — АА 14 сут+нКФП (через 2 нед после введения).

Различия достоверны при $P < 0,05$ по сравнению с: * — без введения препаратов животным; # — между группами животных, которым вводили кКФП и нКФП.

в лизатах клеток МФС всех исследуемых групп животных, кроме интактных (группа №1), у которых наблюдалось лишь фоновое присутствие активного энзима (рис. 3, А).

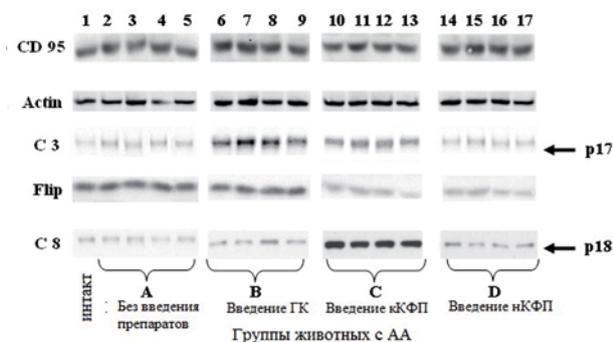


Рис. 3. Анализ экспрессии протеинов каскада CD95.

Вестерн-блот-анализ против CD95, каспазы-3 (C3), FLIP, каспазы-8 (C8) был проведен на лизатах клеток МФС (p17 — продукт протеолиза каспазы-3; p18 — продукт протеолиза каспазы-8). Вестерн-блот против актина проведен в качестве контроля количества тотального протеина в образце. Нумерация групп животных соответствует приведенной в таблице

Факт присутствия p17 не позволяет до конца оценить активность каспазы-3 в указанных клетках. Для количественной оценки каталитической активности данного энзима в разных экспериментальных группах был использован DEVD-АМС-флюорогенный метод. Как видно из рис. 4, наибольшая активность каспазы-3 наблюдалась в группах животных, которым вводили ГК, с максимальным показателем в группе №7 (через 2 нед после введения ГК на 7-е сут АА).

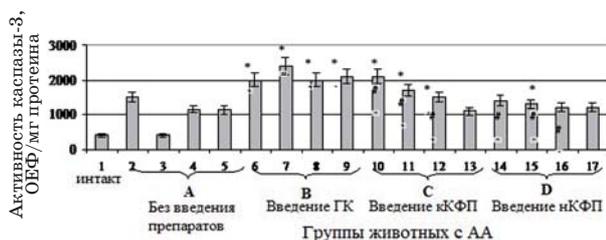


Рис. 4. Анализ активации каспазы-3.

Нумерация изучаемых групп животных соответствует группам в таблице. Различия достоверны при $P < 0,05$ в сравнении с: * — животными без введения препаратов; # — между группами животных, которым вводили кКФП и нКФП

Достаточно высокий уровень активности каспазы-3 также был отмечен в группах животных, которым вводили кКФП. При этом максимальный, сравнимый по эффективности с ГК результат, наблюдался при введении кКФП на 7-е сут развития АА, однако реализовывался уже через 1 нед после их введения (группа № 10, С). Положительный эффект вводимых кКФП в данный период развития патологии (7-е сут АА) сохранялся на протяжении 2 нед после введения. Введение кКФП на 14-е сут АА (группа №12, С) в меньшей степени активировало каспазу-3, хотя этот показатель превышал таковой в группе животных без введения препаратов (№ 4 и № 5, А). При введении АА нКФП существенных различий показателей между группами не наблюдалось, причем максимальный эффект этих клеток уступал криоконсервированным. Более высокие, по сравнению с животными без введения препаратов, показатели активности каспазы-3 в группах животных, получавших КФП, могут быть обусловлены активацией «рецепторов летальности», играющих ведущую роль в стимуляции программированной клеточной гибели, например CD 95-рецептора — представителя семейства фактора некроза опухоли (ФНО).

Известно, что в отличие от нейтрофилов, МФ устойчивы к CD 95/CD95L-опосредованному апоптозу [40, 41]. Этот феномен связывают с повышенной, особенно при патологических состояниях, внутриклеточной экспрессией ингибитора апоптоза с-FLIP (caspase 8 homologue FLICE-inhibitory protein). Он действует как «молекула-переключатель», смещая активность Fas-сигнала от клеточной гибели к пролиферации. Активность этого протеина прямо коррелирует с уровнем экспрессии антиапоптотического гена *bcl-2* и продуцируемых им протеинов Bcl-2 [42].

Из рис. 3 видно, что клетки МФС во всех исследуемых группах экспрессировали высокий и примерно одинаковый уровень CD 95-структуры, что свидетельствует об их активации к апоптозу. В этой связи была установлена высокая степень экспрессии FLIP-протеинов у животных с АА, что коррелировало с самым низким процентом погибших клеток. Однако неожиданным оказался высокий уровень экспрессии FLIP у животных с введением ГК. При этом весьма важно, что уровень экспрессии этого же протеина после лечения животных КФП становился значительно ниже (рис. 3, С, D). Данный факт говорит о том, что вводимые

КФП обладают значительно более широким спектром активности в процессе регуляции как про-, так и антиапоптотических каскадов в клетках МФС. Нами было показано, что такого рода активность присуща именно КФП, поскольку после применения ГК подобного эффекта не наблюдалось (рис. 3, В). Способность этих клеток продуцировать те или иные регуляторные медиаторы при лечении РА является многоплановой и определяется уровнем экспансии иммунновоспалительного процесса в организме. Иными словами, регуляторная активность введенных КФП есть результат адаптации. Имея, как отмечалось выше, различный исходный статус, нКФП и кКФП могут иметь различную степень адаптации. Подтверждением тому служит установленный нами принцип продуцирования FLIP.

Как известно, FLIP может быть как ингибитором, так и индуктором апоптоза, активируя каспазу-8 [43]. Проведенный нами анализ активации каспазы-8 (рис. 3) по продуктам протеолиза позволил установить тенденцию их повышения после введения кКФП. Вместе с тем при использовании этого метода разницу в количестве p18 между другими экспериментальными группами обнаружить не удалось. Нами был применен более чувствительный метод определения каталитической активности каспазы-8 в клетках МФС, заключающийся в измерении протеолитического расщепления флюорогенных субстратов: ZIETD-AFC и AC-DEVD-AMC. В данном случае были установлены достоверные межгрупповые различия показателей. Так, наиболее выраженная активация каспазы-8 отмечена при введении кКФП на 7-е и 14-е сут развития АА. При этом максимальная активность каспазы-8 в обоих случаях наблюдалась через 2 нед после введения препарата (рис. 5, С). Подобную тенденцию наблюдали и в случае введения нКФП (рис. 5, D), но активность каспазы-8 более чем в 2 раза уступала в группе с введением кКФП. Более того, активность каспазы-8 не превышала показатели контроля через 1 нед после введения нКФП на 7-е и 14-е сутки развития АА (группы 14, 16).

Очевидно, что различия как в апоптоз-, так и антиапоптоз-индуцибельной активности кКФП в отношении клеток МФС по сравнению с нКФП могут быть обусловлены рядом причин. Во-первых, изменением после криоконсервирования количественного состава КФП. Установлено, что некоторые режимы замораживания-оттаивания

могут оказывать селективное влияние на клетки гемопоэтических тканей, повышая содержание в них стволовых элементов [34]. Этим объясняют, например, изменение иммунореактивности криоконсервированного материала по сравнению с нативным [44], его способности соответствовать различным системам организма. Во-вторых, возможностью криоконсервирования изменять компонентный состав КФП, что сопровождается увеличением содержания недифференцированных бластов в общей популяции [38]. Кроме того, в процессе криоконсервирования в КФП, как и в других биообъектах, могут проходить и качественные изменения. На примере мононуклеаров периферической крови продемонстрировано значительное возрастание после криоконсервирования продуцирования ими цитокинов, таких как ФНО- α , интерферон- γ , ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-10, [45]. Не исключено, что криоконсервирование, как стрессиндуцирующий фактор, способно изменять и профиль продуцируемых КФП медиаторов, что может отражаться на их терапевтической эффективности.

Необходимо также учитывать возможность криофакторов изменять уровень экспрессии определенных генов в КФП, кодирующих регуляторные медиаторы, активации/ингибирования апоптотического каскада [46, 47]. В обоих случаях речь может идти как об особенностях «акцепторных» взаимодействий медиатора (лиганда) с мишенями (рецепторами) в системе: донорский материал/организм реципиента, так и о дозозависимом проявлении эффекта медиаторами. Очевиден и тот факт, что продуцируемые КФП регуляторные медиаторы образуют альтернативные пути активации апоптотических каскадов, отличающихся от классических индукторов апоптоза — ГК.



Рис. 5. Анализ активации каспазы-8.

Нумерация изучаемых групп животных соответствует группам в таблице.

Различия достоверны при $P < 0,05$ в сравнении с: * – животными без введения препаратов; # — между группами животных, которым вводили кКФП и нКФП

Например, во всех исследуемых нами группах животных после введения ГК была отмечена активация каспазы-3 (рис. 4), в то время как для каспазы-8 этот факт не был установлен (рис. 5, В). Вместе с тем под действием КФП повышалась активность каспазы-3 и каспазы-8. Эти данные свидетельствуют о возможности наработки КФП с определенным профилем протеинов, который обуславливает их активность у животных с АА.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о способности как нКФП,

так и кКФП проявлять апоптозинуцибельную активность относительно клеток МФС.

Установлено, что механизм действия КФП в отношении модуляции апоптотических каскадов в клетках МФС животных с АА отличается от действия ГК.

Проявление апоптозинуцибельного потенциала КФП зависит от вида препаратов и сроков их введения.

Полученные результаты являются экспериментальным обоснованием возможности использования КФП в качестве потенциальных препаратов при применении определенных схем лечения РА.

ЛИТЕРАТУРА

1. Коваленко В. М., Шуба Н. М., Проценко Г. О. Актуальні питання діагностики та лікування ревматичних хвороб за підсумками роботи III національного конгресу ревматологів України // Укр. ревматол. журн. — 2002. — № 1. — С. 3–12.
2. Гольцев А. Н. Возможные причины развития аутоиммунной патологии и поиск путей ее лечения // Пробл. мед. науки та освіти. — 2000. — № 1. — С. 22–37.
3. Бехало В. А., Сысолятина У. В., Нагурская Е. В. Регуляция врожденного иммунного ответа в очаге хронического воспаления // Иммунология. — 2009. — № 3. — С. 184–189.
4. Пинегин Б. В., Карсонова М. И. Макрофаги: свойства и функции // Там же. — 2009. — № 4. — С. 241–249.
5. Huang Q., Ma Y., Adebayo A., Pope R. M. Increased macrophage activation mediated through toll-like receptors in rheumatoid arthritis // *Arthritis Rheum.* — 2007. — V. 56, N 7. — P. 2192–2201.
6. Munoz L. E., Lauber K., Schiller M. et al. The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity // *Nat. Rev. Rheumatol.* — V. 6, N 5. — P. 280–289.
7. Nagata S., Hanayama R., Kawane K. Autoimmunity and the clearance of dead cells // *Cell.* — 2010. — N 140. — P. 619–630.
8. Erwig L. P., Henson P. M. Clearance of apoptotic cells by phagocytes // *Cell Death Differ.* — 2008. — N 15. — P. 243–250.
9. Elliot M. R., Ravichandran K. S. Clearance of apoptotic cells: implication in health and disease // *J. Cell Biol.* — 2010. — V. 189, N 7. — P. 1059–1070.
10. Stuart L. M., Takahashi K., Shi L. et al. Mannose-binding lectin-deficient mice display defective apoptotic cell clearance but no autoimmune phenotype // *J. Immunol.* — 2005. — N 174. — P. 3220–3226.
11. Maniati E., Potter P., Rogers N. J., Morley B. J. Control of apoptosis in autoimmunity // *J. Pathol.* — 2008. — V. 214 — P. 190–198.
12. Richard M. Pope. Apoptosis as a therapeutic tool in rheumatoid arthritis // *Nat. Rev. Immunol.* — 2002. — V. 2, N 7. — P. 1–9.
13. Stout R. D., Suttles J. T cell signaling of macrophage function in inflammatory disease // *J. Front. Biosci.* — 1997. — N 2. — P. 197–206.
14. Мальшев И. Ю., Круглов С. В., Бахтина Л. Ю. и др. Стресс-ответ и апоптоз в про- и противовоспалительном фенотипе макрофагов // Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 2004. — Т. 138, № 8. — С. 162–165.
15. Scatizzi J. C., Hutcheson J., Pope R. M. et al. Bim-Bcl-2 homology 3 mimetic therapy is effective at suppressing inflammatory arthritis through the activation of myeloid cell apoptosis // *Arthritis Rheum.* — 2010. — V. 62. — P. 441–451.
16. Murphy F. J., Hayes I., Cotter T. G. Targeting inflammatory diseases via apoptotic mechanisms // *Curr. Opin. Pharmacol.* — 2003. — V. 3, N 4. — P. 402–412.
17. Sawada T., Hashimoto S., Furukawa H. et al. Generation of reactive oxygen species is required for bucillamine, a novel anti-rheumatic drug, to induce apoptosis in concert with copper // *Immunopharmacology.* — 1997. — V. 35. — P. 195–202.
18. Schmidt-Weber C. B., Rittig M., Buchner E. et al. Apoptotic cell death in activated monocytes following incorporation of clodronate-liposomes // *J. Leukoc. Biol.* — 1996. — V. 60. — P. 230–244.
19. Gale R. P. Fetal liver transplants // *Bone Marrow Transplant.* — 1992. — V. 9, Suppl. 1. — P. 118–120.
20. Грищенко В. И., Гольцев А. Н. Трансплантация продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса. От понимания механизма действия — к повышению эффективности применения // Пробл. криобиол. — 2002. — № 4. — С. 3–11.
21. Гольцев А. Н., Грищенко В. И., Рассоха И. В. и др. Возможность использования продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса как корректора апоптотических процессов

- при аутоиммунных заболеваниях // Там же. — 2003. — № 4. — С. 41–49.
22. Черешнев В. А., Хаитов Р. М., Сидорович И. Г., Родионов С. Ю. Влияние α -фетопротейна человека на иммунореактивность при трансплантации тканей в эксперименте // Иммунология. — 2003. — № 6. — С. 330–332.
 23. Dubich E., Semenkova L., Dubich I. et al. Fetoprotein causes apoptosis in tumor cells via a pathway independent of CD 95, TNFR1 and TNFR2 through activation of caspase-3-like proteases // Eur. J. Biochem. — 1999. — V. 266, N 3. — P. 750–761.
 24. Estaquier J., Ameisen J. C. A role for T-helper type 1 and type 2 cytokines in the regulation of human monocyte apoptosis // Blood. — 1997. — V. 90, N 4. — P. 1618–1625.
 25. Mangan D. F., Robertson B., Wahl S. M. IL-4 enhances programmed cell death (apoptosis) in stimulated human monocytes // J. Immunol. — 1992. — V. 148, N 6. — P. 1812–1816.
 26. Гольцев А. Н., Дубрава Т. Г., Гаевская Ю. А. и др. Кробиологические технологии как компонент оптимизированных методов лечения аутоиммунных заболеваний // Клін. імунол. алергол. інфектол. — 2009. — № 1–2. — С. 46–51.
 27. Міщенко О. Я., Котвіцька А. А. Фармакологічна ефективність емульсії анальбену на моделі ад'ювантного артриту у щурів // Вісн. фармації. — 2001. — № 3. — С. 124–125.
 28. Bendele A. M. Animal models of rheumatoid arthritis // J. Musculoskelet Neuronal Interact. — 2001. — V. 1, N 4. — P. 377–385.
 29. Marques A., Müller S. Mouse Models of Autoimmune Diseases // Curr. Drug Discovery Technol. — 2000. — N 6. — P. 262–269.
 30. Лобасенко Н. П. Макрофагальные реакции при трансплантации нативной и деконсервированной кожи: Дис. ... канд. биол. наук: 14.00.36. / Кробиология, 1999. — 171 с.
 31. Пастер Е. У., Позур Н. Е., Овод В. В., Вихоть В. К. Иммунология: Практикум. — К.: Вища школа. — 1989. — 304 с.
 32. Linehan S. A. The mannose receptor is expressed by subsets of APC in non-lymphoid organs // BMC Immunol. — 2005. — V. 6. — P. 1471–1477.
 33. Riccardi C., Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry // Nat. Protocols. — 2006. — N 1. — P. 1458–1461.
 34. Ямпольская Е. Е., Гольцев А. Н., Гурина Т. М. Изменение функционального потенциала клеток фетальной печени в зависимости от режима криоконсервирования // Світ мед. біол. — 2007. — № 1. — С. 89–93.
 35. Гольцев А. Н., Дубрава Т. Г., Луценко Е. Д. и др. Поиск альтернативных криоконсервированию путей модификации иммунореактивности алломиелотрансплантата. II. Возможность сотрансплантации клеток эмбриональной печени // Пробл. криобиол. — 2000. — № 1. — С. 10–21.
 36. Jones D. R. E., Anderson E. M., Evans A. A. et al. Long-term storage of human haematopoietic progenitor cells and their subsequent reconstitution // Bone Marrow Transplant. — 1995. — N 16. — P. 298–301.
 37. Горская А. Ю., Луценко Е. Д., Останков М. В. и др. Особенности проявления модулирующей активности клеток эмбриональной печени на лимфогемопоэтический комплекс мышей с аутоиммунной гемолитической анемией // Пробл. криобиол. — 2003. — № 2. — С. 31–37.
 38. Гольцев А. Н., Дубрава Т. Г., Останкова Л. В. и др. Особенности влияния криоконсервирования на функциональный потенциал стволовых кроветворных клеток фетальной печени разных сроков гестации // Там же. — 2009. — Т. 19, № 2. — С. 186–187.
 39. Фильченков А. А. Каспазы: регуляторы апоптоза и других клеточных функций // Биохимия. — 2003. — Т. 68, Вып. 4. — С. 453–466.
 40. Chang C. S., Song G. Y., Lomas J. et al. Inhibition of Fas/Fas ligand signaling improves septic survival: differential effects on macrophage apoptotic and functional capacity // J. Leukoc. Biol. — 2003. — V. 74, N 3. — P. 344–351.
 41. Hohlbaum A. M., Gregory M. S., Ju S. T. et al. Fas ligand engagement of resident peritoneal macrophages in vivo induces apoptosis and the production of neutrophil chemotactic factors // J. Immunol. — 2001. — V. 167. — P. 6217–6224.
 42. Perlman H. Differential expression pattern of the anti-apoptotic proteins, Bcl-2 and Flip in experimental arthritis // Arthritis Rheum. — 2001. — V. 44. — P. 2899–2908.
 43. Chang D. W., Xing X., Pan Y. et al. c-FLIP₁ is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis // J. EMBO. — 2002. — V. 21. — P. 3704–3714.
 44. Goltsev A. N., Grischenko V. I., Sirous M. A. et al. Cryopreservation: an optimizing factor for therapeutic potential of fetoplacental complex products // Biopreserv. Biobank. — 2009. — V. 7, N 1. — P. 29–38.
 45. Venkatarman M. Effect of cryopreservation on immune responses. VIII. Enhanced secretion of interferon-gamma by frozen human peripheral blood mononuclear cells // Cryobiology — 1995. — V. 32. — P. 528–534.
 46. Фуллер Б., Грин К., Грищенко В. И. Охлаждение, криоконсервирование и экспрессия генов в клетках млекопитающих // Пробл. криобиол. — 2004. — № 3. — С. 58–70.
 47. Goltsev A. N., Vabenko N. N., Ostankov M. V. et al. Modification of the state of bone marrow hematopoietic cells after cryopreservation // Intern. J. Refrigeration. — 2006. — N 29. — P. 358–367.

**МЕХАНІЗМИ АПОПТОЗУ
У МОНОЦИТАРНО-ФАГОЦИТАРНІЙ
СИСТЕМІ ЗА РОЗВИТКУ
РЕВМАТОЇДНОГО АРТРИТУ
ПІСЛЯ ВВЕДЕННЯ КЛІТИН
ФЕТАЛЬНОЇ ПЕЧІНКИ**

*К. Є. Ямпольська
О. М. Шатнева
М. О. Бондарович
А. М. Гольцев*

Інститут проблем кріобіології
та кріомедицини НАН України, Харків

E-mail: yamp@ukr.net

Проведено порівняльне оцінювання апоптотичних процесів у клітинах моноцитарно-фагоцитарної системи в умовах розвитку ад'ювантного артриту до і після застосування кріоконсервованих та нативних клітин фетальної печінки. З використанням вестерн-блот-аналізу було показано, що в умовах розвитку ад'ювантного артриту клітини моноцитарно-фагоцитарної системи виявляють стійкість до апоптозу. Встановлено проапоптотичний ефект клітин фетальної печінки після введення їх реципієнтам з ад'ювантним артритом, який був більш вираженим у кріоконсервованих клітин фетальної печінки. Вияв апоптозіндуцибельного потенціалу клітин фетальної печінки безпосередньо залежав як від виду препаратів, так і термінів їх введення. Особливості експресії протеїнів CD95-каскаду в клітинах моноцитарно-фагоцитарної системи після застосування клітин фетальної печінки свідчать про значущість впливу кріоконсервування на функціональний статус біооб'єкта. Кріоконсервування в цьому разі може виступати фактором активації протеїнів проапоптотичного каскаду. Відзначено, що механізм дії клітин фетальної печінки щодо модуляції апоптотичних каскадів у клітинах моноцитарно-фагоцитарної системи тварин з патологією принципово відрізняється від дії глюкокортикоїдів, застосовуваних для лікування за ревматоїдного артриту, експериментальною моделлю якого є ад'ювантний артрит. Отримані результати можуть слугувати експериментальним обґрунтуванням можливості використання клітин фетальної печінки для лікування хворих на ревматоїдний артрит.

Ключові слова: апоптоз, моноцитарно-фагоцитарна система, ревматоїдний артрит, клітини фетальної печінки, кріоконсервування.

**APOPTOTIC MECHANISMS
IN MONOCYTIC-PHAGOCYTTIC SYSTEM
DURING RHEUMATOID
ARTHRITIS DEVELOPMENT
AFTER FETAL LIVER
CELLS INTRODUCTION**

*E. E. Yampolskaya
O. M. Shatneva
N. A. Bondarovich
A. N. Goltsev*

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

E-mail: yamp@ukr.net

Comparative evaluation of apoptotic processes in cells of monocytic-phagocytic system in the development of adjuvant arthritis before and after the introduction of cryopreserved and native fetal liver cells is done. Western blot analysis showed that under the conditions of adjuvant arthritis development the cells of monocytic-phagocytic system are resistant to apoptosis. Proapoptotic effect of fetal liver cells is set followed by their administration to the recipients with adjuvant arthritis that was more pronounced in the cryopreserved fetal liver cells. Development of an apoptosis inducible potential of fetal liver cells directly depended both on the type of drugs and term of their treatment. The nature of CD95-cascade protein expression in cells of monocytic-phagocytic system after fetal liver cells treatment emphasized cryopreservation effect on functional status of a biological object. In this case cryopreservation might appear as protein activation factor of a proapoptotic cascade. It is noted that the mechanism of action of fetal liver cells in modulation of apoptotic cascades in the cells of the monocyte-phagocytic animal pathology is significantly different from the action of glucocorticoids used in rheumatoid arthritis treatment, which is an experimental model of adjuvant arthritis. These results are experimental basis for the possibility to use fetal liver cells for rheumatoid arthritis treatment.

Key words: apoptosis, monocytic-phagocytic system, rheumatoid arthritis, fetal liver cells, cryopreservation.