



УДК 616.72-002:611.013.85.086.132

ЛЕЧЕНИЕ АДЬЮВАНТНОГО АРТРИТА У КРЫС ЛИПИДНОЙ ФРАКЦИЕЙ ПЛАЦЕНТЫ, ПОЛУЧЕННОЙ МЕТОДОМ КРИОГЕННОГО МОЛЕКУЛЯРНОГО ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ

TREATMENT OF ADJUVANT ARTHRITIS IN RATS WITH LIPID PLACENTAL FRACTION OBTAINED BY CRYOGENIC MOLECULAR FRACTIONATION

М.А. Кравченко, А.Н. Гольцев
M.A. Kravchenko, A.N. Goltsev

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины
Отдел криопатофизиологии и иммунологии
61015, Украина г. Харьков ул. Переяславская, д.23*

*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the
National Academy of Sciences of Ukraine,
Department of Cryopathophysiology and Immunology,
61015, Ukraine, Kharkov, Pereyaslavskaya St., 23*

e-mail: cryopato@rambler.ru

Ключевые слова: криогенное молекулярное фракционирование, липидная фракция плаценты, полиненасыщенные жирные кислоты, адьювантный артрит, регуляторные Т-клетки.

Key words: cryogenic molecular fractionation, lipid placental fraction, polyunsaturated fatty acids, adjuvant arthritis, regulatory T cells.

Резюме. Липидная фракция плаценты была получена методом криогенного молекулярного фракционирования из тканей плаценты свиньи. Газохроматографический анализ жирнокислотного состава выделенной фракции показал, что она содержит почти 71% ненасыщенных жирных кислот, из которых треть составляют полиненасыщенные жирные кислоты. Введение липидной фракции плаценты крысам с адьювантным артритом вызывало повышение содержания в региональных лимфоузлах CD4+CD25+ и CD4+CD25^{high} Т-клеток, относящихся к популяции регуляторных Т-клеток, что сопровождалось достоверным снижением выраженности отека суставов. Это может объясняться не только уникальным липидным составом плаценты, но и использованием для ее переработки передовых криогенных технологий, позволяющих сохранять высокое содержание в получаемом липидном экстракте полиненасыщенных жирных кислот, которые обладают выраженным иммуномодулирующим потенциалом.

Summary. Lipid placental fraction was obtained by cryogenic molecular fractionation from porcine placental tissues. Gas chromatographic analysis of fatty acid composition of the extracted fraction demonstrated that it contains almost 71% of unsaturated fatty acids, among which one third is accounted for polyunsaturated fatty acids. Administration of the lipid placental fraction to rats with adjuvant arthritis caused an increase in the content of CD4+CD25+ and CD4+CD25^{high} T cells belonging to regulatory T cell population in regional lymph nodes, accompanied by a significant decrease of joint edema. This may be explained not only by a unique lipid composition of placenta, but also by use for its processing of the advanced cryogenic technologies allowing for maintenance in the obtained lipid extract of a high level of polyunsaturated fatty acids possessing pronounced immune modulating potential.

Введение

В широком спектре патологических состояний организма человека аутоиммунные заболевания (АИЗ) занимают одно из ведущих мест и могут развиваться практически во всех его органах и тканях. На сегодняшний день основным методом их лечения является снижение иммунной реактивности организма при помощи иммуносупрессорных лекарственных средств. Однако такого рода препараты вызывают генерализованную иммуносупрессию, что повышает риск развития инфекционных и онкологических заболеваний [Flores-Borja et al., 2008]. Новые терапевтические подходы к лечению АИЗ должны быть нацелены на супрессию воспаления, не компрометируя иммунную систему пациента в целом [Flores-Borja et al., 2008]. Решить данную проблему можно путем использования иммуномодулирующих препаратов, полученных из биологического сырья, способных корректировать состояние иммунной системы пациента, а через этот вектор и состояние организма в целом. При этом предпочтение отдается тем средствам, которые близки естественным компонентам организма с известной биологической структурой и биологической активностью, т.е. являются «комплементарными» организму [Масычева и др., 2001]. Поэтому получение и использование подобных веществ в качестве моно- или полисубстанций будущих лекарственных средств является весьма привлекательным



и обоснованным подходом к созданию новых лекарственных препаратов [Масычева и др., 2001].

В настоящее время получено большое количество информации об иммуномодулирующем потенциале субстанций липидной природы, в частности полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), и перспективности их использования для лечения АИЗ [Yaqoob, 2004]. В свете данной концепции актуальным является получение такого рода субстанций из биологически активного тканевого сырья. Перспективным источником получения биологически активных липидных субстанций животного происхождения, т.е. «комплементарных» организму и, следовательно, потенциально пригодных для парентерального введения в организм, являются ткани плаценты. Помимо того, что ткани плаценты давно зарекомендовали себя в качестве наиболее доступного и богатого источника биологически активных субстанций [Грищенко, Гольцев, 2002], известно, что они способны к интенсивному синтезу полиненасыщенных жирных кислот *de novo* [Martin, Hausman, 1981; Coleman, Haynes, 1987], а их липидный состав играет важную роль в поддержании состояния иммунологической толерантности во время беременности [Crocker et al., 1999]. Поэтому, на наш взгляд, плацента является идеальным источником получения липидных субстанций с выраженными иммуномодулирующими свойствами.

На сегодняшний день разработан ряд методик переработки тканей плаценты и получения экстрактов, которые используются для коррекции различных патологических состояний организма [Грищенко, Гольцев, 2002]. Однако существует ряд проблем технологического характера, связанных с получением заданных ингредиентов и сохранением их «нативной» структуры, которая обеспечит способность данных соединений реализовывать присущую им биологическую активность *in vivo* [Осецкий и др., 2009]. С этих позиций для получения из тканей плаценты биологически активного липидного экстракта перспективным является использование метода криогенного молекулярного фракционирования (КМФ), который состоит из ряда технологических этапов, реализуемых на криогенном оборудовании, разработанном на базе Института проблем криобиологии и криомедицины (ИПКиК) НАН Украины [Грищенко и др., 2005]. В основе его разработки лежит теоретически обоснованное и экспериментально подтвержденное понимание механизмов повреждающего действия ряда факторов, которому подвергается биологический объект в процессе переработки с целью получения (экстракции) необходимых молекулярных ингредиентов. Использование метода КМФ позволяет минимизировать влияние данных факторов на исходное биологическое сырье и дифференцированно выделить из тканей плаценты липидную фракцию [Осецкий и др., 2009].

До настоящего времени исследований, посвященных оценке состава и иммуномодулирующего потенциала липидной фракции плаценты (ЛФП), полученной методом КМФ, не проводилось.

Целью данной работы было получить ЛФП из тканей свиной плаценты методом КМФ, изучить ее жирнокислотный состав, а также оценить содержание и функциональную активность $CD4^+CD25^+$ Т-клеток региональных лимфоузлов крыс с адьювантным артритом (АА) до и после введения ЛФП.

Материалы и методы

Получение и анализ ЛФП.

Источником для получения ЛФП служили ткани свиной плаценты, взятой от животных, содержащихся в стандартных условиях ОСаО «Слобожанский» (пгт Чкаловское, Чугуевский район, Харьковская область, Украина). Переработку тканей плаценты производили с использованием метода КМФ, подробно описанным Осецким и др. [2009], основными этапами которого являются: быстрое замораживание исходного биологического сырья, криогенное измельчение замороженного сырья, криосублимационное фракционирование (лиофилизация) и выделение липидных фракций из лиофилизированного биоматериала с помощью хладоновой экстракции.

Анализ жирнокислотного состава полученного экстракта проводили следующим образом: 25 мг экстракта помещали в остродонную колбу вместимостью 10 мл, прибавляли 1 мл диэтилового эфира, перемешивали до полного растворения образца, прибавляли 5 мл метанола безводного, 0,25 мл хлористого ацетила. Колбу присоединяли к обратному холодильнику, систему заполняли инертным газом и кипятили в течение 30 мин. Затем метанольный раствор выпаривали при комнатной температуре в токе инертного газа до остаточного объема 0,5 мл, прибавляли 1,0 мл циклогексана и взбалтывали в течение 1 мин, и выдерживали до полного разделения слоёв. Верхний циклогексановый слой отбирали



шприцом вместимостью 1 мл и фильтровали через 0.1 г натрия сульфата безводного в виалу автосамплера газового хроматографа. Хроматографирование проводили на газовом хроматографе модели GC-2014 с пламенно-ионизационным детектором (Shimadzu, Япония) в следующих условиях: колонка капиллярная кварцевая, размером 60 м x 0.32 мм, HP-23, толщина слоя неподвижной фазы 0.25 мкм; температуру колонки программировали: 120° С выдерживали в течение 5 мин, далее температуру повышали со скоростью 3° С/мин до температуры 225° С и выдерживали в течение 15 мин; скорость газа-носителя (гелий) 1 мл/мин; деление потока 1:70. Содержание жирных кислот рассчитывали методом «внутренней нормализации». Идентификацию жирных кислот проводили по значениям относительных времен удерживания.

Индукция и оценка АА.

Эксперимент выполнен в соответствии с Международными принципами Европейской конвенции о защите позвоночных животных (Страсбург, 1985) на 3-х месячных крысах-самцах линии Wistar массой 180-200г, содержащихся в стандартных условиях вивария ИПКиК НАН Украины. АА, являющийся экспериментальной моделью ревматоидного артрита (РА), у крыс индуцировали субплантарным введением в заднюю лапу полного адьюванта Фрейнда (ПАФ) по методу Пирсона [Pearson, Wood, 1963]. Отек сустава после введения ПАФ измерялся при помощи штангенциркуля через сагиттальный диаметр в области заплюсневого сустава. Индекс отека сустава вычислялся по формуле: $x = a/b$, где x = индекс отека сустава, a = среднее значение диаметра сустава крыс с АА для группы, b = среднее значение диаметра сустава для группы до введения адьюванта. Для интактных животных индекс отека сустава был принят за 1.

Дизайн эксперимента.

В качестве липофильной среды для приготовления инъекционной формы ЛФП, пригодной для проведения инъекций через иглу диаметром 0.6 мм, использовалось стерильное кукурузное масло. ЛФП животным вводили с 14-х по 28-е сутки развития АА через день внутримышечно в дозе 100 мг/кг в объеме 0,1 мл. Дизайн эксперимента включал в себя следующие группы животных: (1) интактные животные, (2) животные с АА без лечения (группа АА), (3) животные с АА, получавшие инъекции растительного масла без ЛФП по аналогичной схеме (группа отрицательного контроля), (4) животные с АА, получавшие ЛФП в дозе 100 мг/кг (группа лечения).

Определение содержания $CD4^+CD25^+$ и $CD4^+CD25^{high}$ клеток в подколенных лимфоузлах.

Животных выводили из эксперимента на 7-е, 14-е, 21-е, 28-е, 35-е и 42-е сутки после индукции артрита путем декапитации под эфирным наркозом. Выделенные подколенные лимфоузлы диссоциировали в гомогенизаторе Поттера с добавлением среды Хэнкса, ресуспендировали и пропускали через капроновый фильтр. Содержание $CD4^+CD25^+$ клеток определяли методом прямой иммунофлюоресценции на проточном цитофлюориметре FACSCalibur® (BD Pharmingen, США), с использованием моноклональных антител (BD Pharmingen, США) к мембранным структурам $CD4$, меченных фикоэритрином (анти- $CD4$ -PE), и $CD25$, меченных флюоресцинизоцианатом (анти- $CD25$ -FITC), согласно инструкции фирмы-производителя. При учете результатов регистрировали процент клеток, экспрессирующих данные маркеры, и процент $CD4^+$ -клеток, характеризующихся высокой степенью экспрессии маркера $CD25$ ($CD4^+CD25^{high}$ клетки).

Статистическая обработка.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета программ Excel [Лапач и др., 2001].

Результаты

Жирнокислотный состав ЛФП.

Результаты хроматографического анализа ЛФП, полученной из тканей свиной плаценты методом КМФ, показали, что основной насыщенной кислотой среди всех экстрагированных липидов была $C16:0$ (16%), в то время как доминирующей по количеству ненасыщенной кислотой являлась $C18:1n9$, на долю которой приходилось почти 40% (рис. 1). Общее содержание насыщенных кислот в полученном экстракте составляло приблизительно 27%, в то время как большинству своем ЛФП состояла из ненасыщенных жирных кислот (около 71%). Таким образом, соотношение между ненасыщенными и насыщенными жирными

кислотами составило 2.6. Интересно отметить, что среди всех ненасыщенных жирных кислот почти треть составляли полиненасыщенные жирные кислоты (МНЖК (53,2922%)/ ПНЖК (17,9022%) = 2,9), среди которых преобладающей ПНЖК являлась C18:2n9,12 (8.6455%).

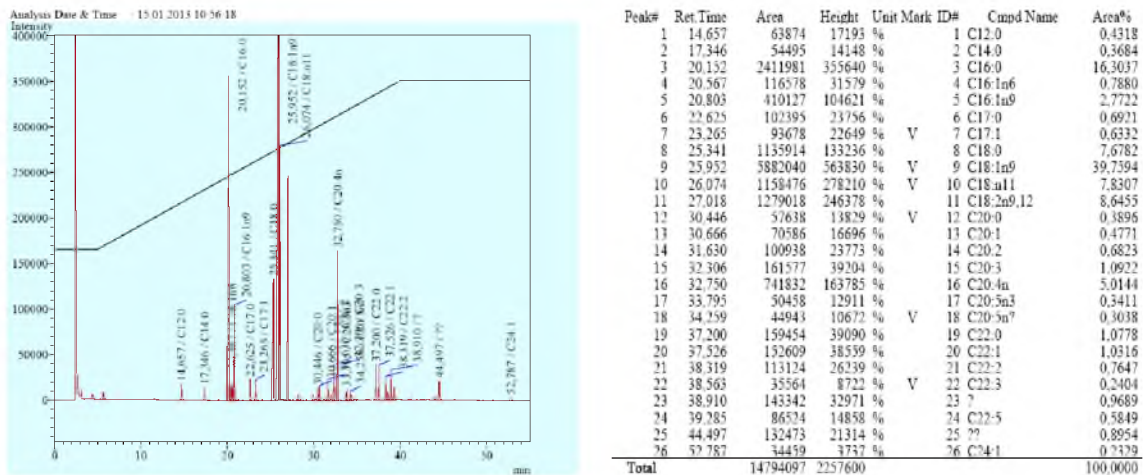


Рис.1. Хроматограмма испытуемого образца ЛФП, полученная в условиях определения жирнокислотного состава.
Fig.1. Chromatogram of the lipid placental fraction test sample obtained under conditions of fatty acid composition determination.

Динамика индекса отека сустава

Начиная с 2-х суток после индукции АА у нелеченных животных наблюдали развитие прогрессирующего отека сустава, который достигал максимума на 23 – 25-е сутки (индекс 2.41±0.12) и к 42-м суткам сохранялся на уровне 1.8±0.09 (рис.2). У животных с введением масла (группа отрицательного контроля) развитие отека имело схожую динамику, но с меньшей выраженностью: индекс отека достигал максимума на 25-е сутки АА (2.12±0.11), а на 42-е сутки составлял 1.7±0.09. У животных с введением ЛФП уже через 2-е суток после начала лечения наблюдали снижение выраженности отека, индекс которого к 25-м суткам составлял 1.55±0.08, а к 42-м суткам – 1.28±0.06 (по сравнению с 1.8±0.09 и 1.7±0.09 в группах АА и отрицательного контроля, соответственно, p<0.05).

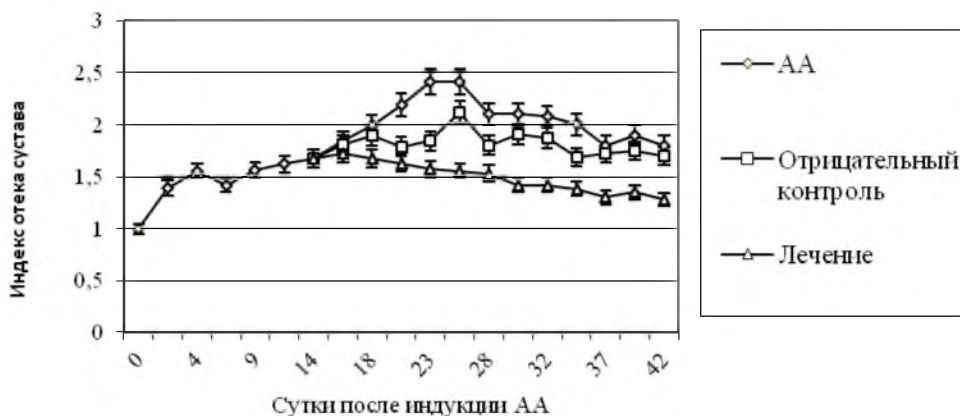


Рис. 2. Динамика развития АА у крыс с индуцированной патологией. Индекс отека сустава для интактных животных равен 1. Группа «АА» – животные с АА без лечения, группа «отрицательный контроль» – животные с АА, получающие растительное масло, группа «лечение» – животные с АА, получающие ЛФП.
Fig.2. Dynamics of adjuvant arthritis development in rats with induced pathology. Joint edema index for intact animals is equal to 1. Group “AA” – animals with adjuvant arthritis without treatment; group “negative control” – animals with adjuvant arthritis receiving oil; group “treatment” – animals with adjuvant arthritis receiving lipid placental fraction.

Содержание CD4+CD25+ и CD4+CD25^{high} клеток в региональных лимфоузлах.

На фоне развития АА изменение содержания CD4+CD25+ Т-клеток носило выраженный волнообразный характер (рис. 3А). Снижаясь к 7-м суткам (до 0.48±0.096%



по сравнению с $0.85 \pm 0.17\%$ в группе интактных животных), содержание $CD4^+CD25^+$ Т-клеток резко повышалось к 14-м суткам (до $2.25 \pm 0.45\%$) (группа АА). К 21-м суткам в группе АА их содержание снижалось до минимальных значений, что клинически манифестировало в этот срок максимальной выраженностью отека сустава (см. рис. 2). При этом данная популяция клеток не характеризовалась высоким уровнем экспрессии маркера CD25, о чем свидетельствует отсутствие на данных сроках в общем пуле клеток региональных лимфоузлов $CD4^+CD25^{high}$ Т-клеток (рис. 3Б). В дальнейшем, у нелеченных животных содержание $CD4^+CD25^+$ Т-клеток имело тенденцию к повышению, достижению и даже превышению уровня интактных животных на 42-е сутки развития АА (см. рис. 3А), однако содержание $CD4^+CD25^{high}$ Т-клеток являлось минимальным (см. рис. 3Б).

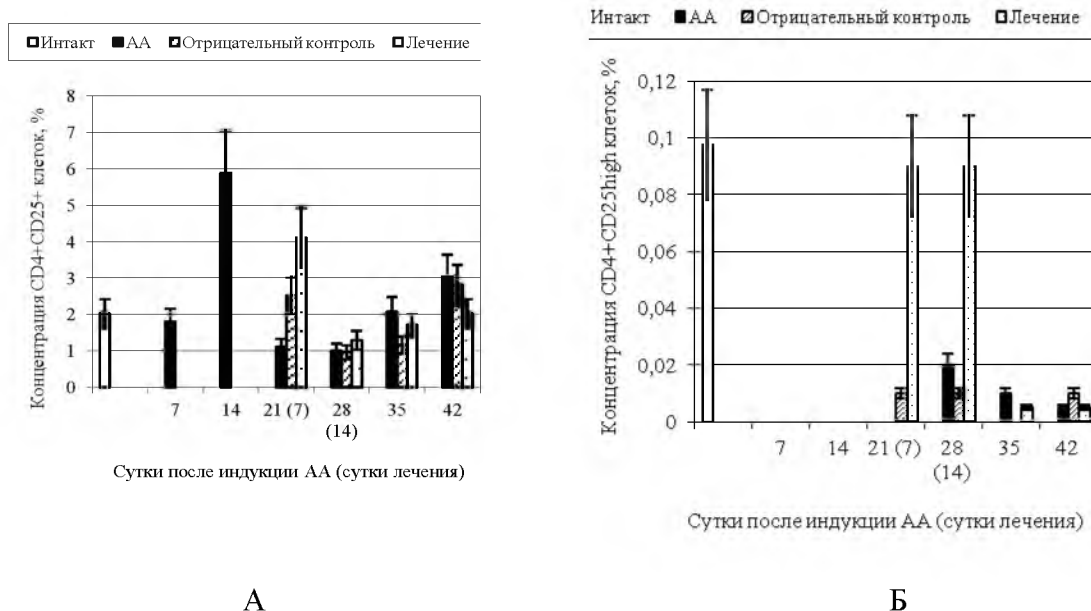


Рис. 3. Концентрация $CD4^+CD25^+$ клеток (А) и $CD4^+CD25^{high}$ клеток (Б) в общем пуле клеток региональных лимфоузлов крыс с АА. Группа «интакт» - животные без патологии, группа «АА» - животные с АА без лечения, группа «отрицательный контроль» - животные с АА, получающие растительное масло, группа «лечение» - животные с АА, получающие ЛФП
 Fig.1. Concentration of $CD4^+CD25^+$ cells (A) and $CD4^+CD25^{high}$ cells (B) in the total pool of regional lymph node cells in rats with adjuvant arthritis. Group "intact" - animals without pathology; group "AA" - animals with adjuvant arthritis without treatment; group "negative control" - animals with adjuvant arthritis receiving oil; group "treatment" - animals with adjuvant arthritis receiving lipid placental fraction

Введение ЛФП, начиная с 14-х суток развития патологии, уже через 7 суток лечения, т.е. к 21-м суткам развития АА, приводило к выраженной экспансии как популяции $CD4^+CD25^+$, так и $CD4^+CD25^{high}$ Т-клеток ($0.97 \pm 0.19\%$ и $0.09 \pm 0.018\%$ в группе лечения по сравнению с $0.09 \pm 0.018\%$ и 0% в группе АА, соответственно, $p < 0.05$) (см. рис. 3А, 3Б). На 28-е сутки отмечалось некоторое снижение содержания $CD4^+CD25^+$ Т-клеток, однако содержание $CD4^+CD25^{high}$ Т-клеток оставалось на прежнем высоком уровне, что клинически сопровождалось снижением выраженности отека (см. рис.2). После этого, на 35-е и 42-е сутки развития патологии, содержание Т-клеток с высокой степенью экспрессии CD25 резко снижалось, а уровень $CD4^+CD25^+$ Т-клеток приближался к нормальному ($0.73 \pm 0.15\%$ в группе лечения по сравнению с $0.85 \pm 0.17\%$ в группе интактных животных), что сопровождалось прогрессирующим уменьшением отека сустава (см. рис. 2).

Группа отрицательного контроля характеризовалась волнообразным изменением содержания $CD4^+CD25^+$ Т-клеток, при этом уровень содержания $CD4^+CD25^{high}$ Т-клеток оставался стабильно низким (см. рис. 3А, 3Б).

Результаты и их обсуждение

При всех условностях аналогий, как характера поведения иммунной системы, так и клинических проявлений, АА представляет собой одну из апробированных и



хорошо изученных экспериментальных моделей РА. Именно эта модель широко используется для изучения патогенеза воспалительного процесса в виде артрита, а также для оценки действия противовоспалительных и противоревматических препаратов. И хотя точный антиген (иммуногенный субстрат), ответственный за индукцию и поддержание развития данной экспериментальной модели до сих пор не известен, ранее было показано, что в патогенезе АА участвуют механизмы, обусловленные эффектами Т-клеток [Andersson et al., 2008].

Наши результаты совпадают с данными других исследований и свидетельствуют о том, что введение ПАФ приводило к развитию у экспериментальных животных прогрессирующего отека сустава (см. рис. 2). В динамике этого процесса можно выделить три стадии клинической манифестации: с 1-го по 14-й день, характеризующуюся нарастанием отека, с 14-го по 25-й день, когда отек достигал своего максимума, и с 25-го по 42-й день, когда значение индекса отека сустава снижалось, оставаясь, тем не менее, выше, чем в группе интактных животных (см. рис. 2).

Как известно, в основе патогенеза РА лежит снижение толерантности к собственным антигенам организма [Andersson et al., 2008]. Иммунологическая толерантность организма поддерживается преимущественно двумя путями: механизмами центральной толерантности, благодаря которым в тимусе происходит элиминация «запрещенных» клонов лимфоцитов, распознающих собственные антигены организма [Andersson et al., 2008], и механизмами периферической толерантности, за которую отвечает особый пул Т-клеток с фенотипом CD4⁺CD25⁺, обладающих супрессорной активностью и именуемых как «регуляторные Т-клетки» [Sakaguchi et al., 2008]. На фоне развития артрита изменение содержания CD4⁺CD25⁺ Т-клеток в региональных лимфоузлах крыс носило волнообразный характер (см. рис. 3А). Интересно, что наблюдаемое на 14-е сутки значительное повышение содержания CD4⁺CD25⁺ Т-клеток в группе животных с артритом не обеспечивало купирования клинических признаков заболевания, которые, напротив, продолжали агgravировать (см. рис. 2). Данный факт может объясняться функциональной несостоятельностью данной вновь сформированной популяции у нелеченных животных, которая хотя по фенотипическим характеристикам и относится к CD4⁺CD25⁺ клеткам, но не реализует своего иммуносупрессорного эффекта. В пользу этого свидетельствует отсутствие в этом сроке CD4⁺CD25⁺ Т-клеток, характеризующихся высокой степенью экспрессии молекулы CD25 (CD4⁺CD25^{high} Т-клетки), что является одним из фенотипических маркеров их функциональной состоятельности [Sakaguchi et al., 2008]. Отмеченное нами существенное повышение содержания CD4⁺CD25⁺ Т-клеток на 14-е сутки может быть ни чем иным как ответом наивных CD4⁺CD25⁻ Т-клеток на происходящие в этом периоде развития артрита изменения цитокинового профиля организма, а именно, повышение уровня ИЛ-2, который, собственно, и инициирует экспрессию CD25 молекулы [Луценко, Гольцев, 2010].

Введение животным ЛФП уже через 7 суток приводило не только к выраженной экспансии популяции CD4⁺CD25⁺ Т-клеток, но и к повышению степени экспрессии ими молекулы CD25 (см. рис. 3). Клинически это сопровождалось началом стабильного снижения выраженности отека сустава (см. рис. 2). Несмотря на то, что введение животным с АА масла без ЛФП оказывало определенные эффекты в отношении содержания CD4⁺CD25⁺ Т-клеток в региональных лимфоузлах, снижение выраженности отека сустава в данной группе было кратковременным и не имело значимой клинической эффективности. К тому же, низкое содержание CD4⁺CD25^{high} Т-клеток свидетельствует в пользу того, что достигаемый эффект является недостаточным для полноценной реализации CD4⁺CD25⁺ Т-клетками их супрессорной активности.

Полученные результаты показывают, что ЛФП обладает выраженной иммуномодулирующей активностью в отношении популяции CD4⁺CD25⁺ Т-клеток и, в особенности, в отношении пула CD4⁺CD25^{high} Т-клеток, относящихся к популяции регуляторных Т-клеток, что клинически проявляется в виде купирования отека сустава у крыс с АА. Это согласуется с литературными данными об успешном применении ПНЖК при различных АИЗ, в частности при РА. Например, на основании обзора результатов 17 клинических исследований, 2 мета-анализов и отчета Агентства по исследованиям и обеспечению качества в сфере здравоохранения (Agency for Healthcare Research and Quality), был сделан вывод, что добавление в рацион рыбьего жира, являющегося источником ПНЖК, может снижать потребность



пациентов в нестероидных противовоспалительных препаратах и уменьшать выраженность болевого синдрома и утренней ригидности суставов при РА [Calderb 2001].

Считается, что ПНЖК могут реализовывать свои иммуномодулирующие эффекты через четыре основных механизма, которые не являются взаимоисключающими, а именно: влияние на строение мембран иммунокомпетентных клеток, продукцию эйкозаноидов, экспрессию генов и взаимодействие с ядерными рецепторами [Shaikh, Edidin, 2008]. Доказано, что в процессах периферического образования регуляторных Т-клеток определенная роль отводится пероксисом пролифератор-активирующим рецепторам (ППАР), которые представляют собой лиганд-зависимые транскрипционные факторы и являются членами семейства ядерных гормональных рецепторов [Wohlfert et al., 2007]. К эндогенным агонистам данных рецепторов относятся субстанции липидной природы, в частности, ПНЖК, что лежит в основе одного из механизмов реализации их иммуномодулирующей активности [Yaqoob, 2004].

На сегодняшний день в литературе не имеется данных о жирнокислотном составе ЛФП, полученном методом, подобным методу КМФ. Имеются данные [Park et al., 2010] о жирнокислотном составе экстракта плаценты человека, полученного при помощи монофазной системы нейтральных органических растворителей. В данном липидном экстракте большую часть составляли насыщенные жирные кислоты (78.51%), а на долю ненасыщенных кислот приходилось всего 8.95%, среди которых основной была С18:1 (9) (3.27%). Таким образом, соотношение между ненасыщенными и насыщенными жирными кислотами в липидном экстракте плаценты, полученном указанным способом [Park et al., 2010], составляло 0,11 в сравнении с 2.64 в ЛФП, полученной нами методом КМФ. Данные существенные различия в качественном составе липидных экстрактов плаценты могут объясняться различиями в жирнокислотном составе исходного биологического сырья. Несмотря на то, что и у человека, и у свиньи ткани плаценты способны к интенсивному синтезу ПНЖК *de novo* [Martin, Hausman, 1981; Coleman, Haynes, 1987], их качественный состав может иметь существенные различия, которые связаны как с межвидовой спецификой, так и с особенностями рациона, который служит главной детерминантой содержания ПНЖК в организме [Cleland et al., 2006]. С этой точки зрения более перспективным источником получения ЛФП является плацента свиньи, что позволяет решить ряд медико-этических и экономических проблем, связанных с заготовкой биологического сырья, а также получать конечный продукт с относительно постоянным качественным составом, учитывая тот факт, что сельскохозяйственные животные, содержащиеся в условиях животноводческих комплексов, находятся на стандартном рационе. Кроме того, используемый нами метод КМФ позволяет решить ряд проблем технологического характера, связанных с процессом переработки биологического сырья, как то полностью избежать повреждающего действия повышенных температур и химически-активных экстрагентов, что позволяет сохранить биологическую активность получаемого экстракта [Осецкий и др., 2009].

Выводы

Развитие АА сопровождается выраженными изменениями в региональных лимфоузлах крыс, которые проявляются в виде изменения содержания в них Т-клеток с фенотипом CD4⁺CD25⁺, относящихся к регуляторным Т-клеткам. Введение на фоне развития ААЛФП, полученной методом КМФ, снижает выраженность клинических признаков заболевания. В основе одного из механизмов, обуславливающих терапевтический эффект ЛФП, лежит корректирующая активность ЛФП в отношении как содержания в региональных лимфоузлах общего пула CD4⁺CD25⁺ Т-клеток, так и CD4⁺Т-клеток, характеризующихся высокой степенью экспрессии молекулы CD25 (CD4⁺CD25^{high} Т-клетки), что является одним из фенотипических маркеров их функциональной состоятельности. Это может, среди прочего, объясняться способностью ПНЖК, вводимых в организм в составе ЛФП, выступать в роли эндогенных лигандов рецепторов ППАР и стимулировать периферическую дифференцировку CD4⁺CD25⁻ Т-клеток с образованием индуцированных регуляторных CD4⁺CD25⁺ Т-клеток. Полученные результаты говорят о перспективности дальнейшего изучения иммуномодулирующих свойств ЛФП, получаемой методом КМФ, с целью оценки возможности ее клинического применения для лечения заболеваний аутоиммунного генеза.



Литература

- Грищенко В.И. 2005. Патент Украины №5120. МПК⁷ А61К 35/50. Способ переработки ткани плаценты человека/ В.И. Грищенко, А.И. Осецкий, Г.А. Бабийчук, Ю.Г. Федченко, М.И. Шетинский, М.А. Осецкая. Опубл. 15.02.2005. Бюл. №2.
- Грищенко В.И. 2002. Трансплантация продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса. От понимания механизма действия к повышению эффективности применения/ В.И. Грищенко, А.Н. Гольцев// Пробл. криобиол. 1 (1): 54-84.
- Лапач С.Н. 2001. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel/ С.Н. Лапач, А.В. Чубенко, Л.Н. Бабич.-К.: МОРИОН.- 408с..
- Луценко Е.Д. 2010. Мониторинг состояния пула Т-регуляторных клеток при адьювантном артрите после применения криоконсервированных клеток плаценты/ Е.Д.Луценко, А.Н.Гольцев// Лекарства-человеку. Материалы XXVII науч.-практ. конференции.-Харьков: Издательство НФаУ: 325-332.
- Масычева В.И. 2001. Разработка препаратов на основе генно-инженерных цитокинов/ В.И. Масычева, Н.М. Пустопилова, Е.Д. Даниленко// Мед.иммунол. 3 (3): 369-378.
- Осецкий А.И. 2009. Криогенные технологии в производстве фармацевтических, косметических, агротехнических препаратов и биологически активных пищевых добавок/ А.И. Осецкий, В.И. Грищенко, А.Н. Гольцев, М.А. Кравченко, Е.В. Стрючкова// Пробл. криобиол. 19 (4): 488-499.
- Andersson A.2008. Recent developments in the immunobiology of rheumatoid arthritis/ A. Andersson, C. Li, F.M. Brennan// Arth.Res.&Ther.204: 198-207.
- Calder P.C. 2001. Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. Lipids. 36: 1007-1024;
- Cleland L.G. 2006. Fish oil: what the prescriber needs to know/L.G. Cleland, M.J. James, S.M. Proudman// Arthritis Res. Ther. 8 (1): 202.
- Coleman R. 1987. Synthesis and release of fatty acids by human trophoblast cells in culture / R. Coleman, E. Haynes // J. Lipid Res. 28: 1335-1341.
- Crocker I. 1999. Significance of fatty acids in pregnancy-induced immunosuppression / I. Crocker, N.Lawson, I.Daniels, P.Baker, J.Fletcher // Clin. Diagn. Lab. Immunology. 6 (4): 587-593.
- Flores-Borja F. 2008. Restoring the balance: hamessing regulatory T cells for therapy in rheumatoid arthritis/ F.Flores-Borja, C.Mauri, M.R.Ehrenstein// Eur.J.Immunol. 38: 934-937.
- Martin R. 1981. Placental development and fatty acid metabolism in pigs fed ad libitum or restricted during gestation / R. Martin, G. Hausman // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 166: 472-478.
- Park S.Y. 2010. Anti-oxidative and anti-inflammatory activities of placental extracts in benzo[a] pyrene-exposed rats/ S.Y. Park, S. Phark, M. Lee, J.Y. Lim, D. Sul// Placenta. 31: 873-879.
- Pearson C.M. 1963. Studies of arthritis and other lesions induced in rats by the injection of mycobacterial adjuvant/ C.M.Pearson, F.D.Wood // Am.J.Pharmacology. 42: 73-95.
- Sakaguchi S. 2008. Regulatory T cells and immune tolerance/ S. Sakaguchi, T. Yamaguchi, T. Nomura, M. Ono // Cell. 133 (5): 775-787.
- Shaikh S.R. 2008. Polyunsaturated fatty acids and membrane organization: elucidating mechanisms to balance immunotherapy and susceptibility to infection/ S.R. Shaikh, M. Edidin// Chem. Phys. Lipids. 153 (1): 24-33.
- Wohlfert E.A. 2007. Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) and immunoregulation: enhancement of regulatory T cells through PPAR γ -dependent and -independent mechanisms/ E.A. Wohlfert, F.C. Nichols, E. Nevius, R.B. Clark// J.Immunol. 178: 4129-4135.
- Yaqoob P. 2004. Fatty acids and the immune system: from basic science to clinical applications/ P. Yaqoob// Proceed.Nutr.Society. 63: 89-104.

Literature

- Grischenko V.I. 2002. Transplantatsiya produktov embriofetoplatsentarnogo kompleksa. Ot ponimaniya mekhanizma deystviya k povisheniyu effektivnosti primeneniya [Transplantation of embryofetoplacental complex products. From understanding of mechanism of action to increase of application efficacy]/ V.I. Grischenko, A.N. Goltsev// Probl. Kriobiol. [Problems of cryobiology]. 1 (1):54-84 (in Russian).
- Grischenko V.I. 2005. Ukrainian patent No. 5120. МПК⁷ А61К 35/50 [International patent classification (IPC) A61K 35/50]. Sposob pererabotky tkany platsenty cheloveka [Method for processing of human placental tissue] / V.I. Grischenko, A.I. Osetsky, G.A. Babiychuk, Yu.G. Fedchenko, M.I. Schetinsky, M.A. Osetskaya. Published on February 15, 2005. Bulletin No. 2 (in Russian).
- Lapach S.N. 2001. Statisticheskie metody v mediko-biologicheskyykh issledovaniyakh s ispolzovaniem Excel [Statistical methods in medical-biological studies with use of Excel]/ S.N. Lapach, A.V. Chubenko, L.N. Babych.-K.: MORION. 408 p. (in Russian).
- Lutsenko E.D. 2010. Monitoring sostoyaniya pula T-regulyatornykh kletok pri adyuvantnom artrite posle primeneniya kriokonservirovannykh kletok platsenty [Monitoring of T-regulatory cell pool in adjuvant arthritis after administration of cryopreserved placental cells]/ E.D. Lutsenko, A.N. Goltsev// Lekarstva-cheloveku. Materialy XXVII hauch.-prakt. konferentsii.-Kharkov: Izdatelstvo NFaU [Medicines - to humans. Materials of the XXVII scientific-practical conference.-Kharkov: Published by National Pharmaceutical University]: 325-332 (in Russian).



Masycheva V.I. 2001. Razrabotka preparatov na osnove genno-inzhenernykh tsitokinov [Development of preparations on the base of gene-engineer cytokines]/ V.I. Masycheva, N.M. Pustoshylova, E.D. Danylenko// Med. Immun. [Medical Immunology]. 3 (3): 369-378 (in Russian).

Osetsky A.I. 2009. Kriogennye tekhnologiyi v proizvodstve farmatsevticheskikh, kosmeticheskikh, agrotekhnicheskikh preparatov i biologicheskyy aktivnykh pischevyykh dobavok [Cryogenic technologies in production of pharmaceutical, cosmetic, agricultural-technical preparations and biologically active food additives]/ A.I. Osetsky, V.I. Grischenko, A.N. Goltsev, M.A. Kravchenko, E.V. Stryuchkova// Probl. Kriobiol. [Problems of cryobiology]. 19 (4): 488-499 (in Russian).

Andersson A. 2008. Recent developments in the immunobiology of rheumatoid arthritis/ A. Andersson, C. Li, F.M. Brennan// Arth.Res.&Ther. 204: 198-207.

Calder P.C. 2001. Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. *Lipids*. 36: 1007-1024;

Cleland L.G. 2006. Fish oil: what the prescriber needs to know/L.G. Cleland, M.J. James, S.M. Proudman// Arthritis Res. Ther. 8 (1): 202.

Coleman R. 1987. Synthesis and release of fatty acids by human trophoblast cells in culture / R. Coleman, E. Haynes // J. Lipid Res. 28: 1335-1341.

Crocker I. 1999. Significance of fatty acids in pregnancy-induced immunosuppression / I. Crocker, N.Lawson, I.Daniels, P.Baker, J.Fletcher // Clin. Diagn. Lab. Immunology. 6 (4): 587-593.

Flores-Borja F. 2008. Restoring the balance: harnessing regulatory T cells for therapy in rheumatoid arthritis/ F.Flores-Borja, C.Mauri, M.R.Ehrenstein// Eur.J.Immunol. 38: 934-937.

Martin R. 1981. Placental development and fatty acid metabolism in pigs fed ad libitum or restricted during gestation / R. Martin, G. Hausman // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 166: 472-478.

Park S.Y. 2010. Anti-oxidative and anti-inflammatory activities of placental extracts in benzo[a] pyrene-exposed rats/ S.Y. Park, S. Phark, M. Lee, J.Y. Lim, D. Sul// Placenta. 31: 873-879.

Pearson C.M. 1963. Studies of arthritis and other lesions induced in rats by the injection of mycobacterial adjuvant/ C.M.Pearson, F.D.Wood // Am.J.Pharmacology. 42: 73-95.

Sakaguchi S. 2008. Regulatory T cells and immune tolerance/ S. Sakaguchi, T. Yamaguchi, T. Nomura, M. Ono // Cell. 133 (5): 775-787.

Shaikh S.R. 2008. Polyunsaturated fatty acids and membrane organization: elucidating mechanisms to balance immunotherapy and susceptibility to infection/ S.R. Shaikh, M. Edidin// Chem. Phys. Lipids. 153 (1): 24-33.

Wohlfert E.A. 2007. Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) and immunoregulation: enhancement of regulatory T cells through PPAR γ -dependent and -independent mechanisms/ E.A. Wohlfert, F.C. Nichols, E. Nevius, R.B. Clark// J.Immunol. 178: 4129-4135.

Yaqoob P. 2004. Fatty acids and the immune system: from basic science to clinical applications/ P. Yaqoob// Proceed.Nutr.Society. 63: 89-104.