

## Межклеточные взаимодействия в иммунокомпетентной сфере при ревматоидном артрите после применения гемопоэтических клеток эмбриональной печени

А.Н. ГОЛЬЦЕВ, И.В. РАССОХА, Е.Д. ЛУЦЕНКО, Т.Г. ДУБРАВА, Л.В. ОСТАНКОВА  
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Intercellular Interactions in Immunocompetent Sphere at Rheumatoid Arthritis Following the Application of Hematopoietic Embryonic Liver Cells

GOLTSEV A.N., RASSOKHA I.V., LUTSENKO E.D., DUBRAVA T.G., OSTANKOVA L.V.  
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

На экспериментальной модели ревматоидного артрита (РА) у мышей изучали терапевтическое действие нативных и криоконсервированных гемопоэтических клеток эмбриональной печени (ГКЭП). Используя определенный спектр показателей, продемонстрирована способность ГКЭП выступать в роли корректора ключевых механизмов развития адъювантного артрита (АА), определяемых характером и степенью кооперативных взаимодействий субстратов иммунной системы (ИС). Показаны различия корректирующего эффекта криоконсервированных ГКЭП в сравнении с нативными, что может быть обусловлено изменением их структурно-функциональной организации после действия факторов криоконсервирования.

**Ключевые слова:** ревматоидный артрит, гемопоэтические клетки эмбриональной печени, лимфогемопоэтический комплекс.

На експериментальній моделі ревматоїдного артриту у мишей вивчали терапевтичну дію нативних і криоконсервованих гемопоетичних клітин ембріональної печінки (ГКЕП). Використовуючи певний спектр показників, продемонстрована здатність ГКЕП виступати в ролі коректора ключових механізмів розвитку ад'ювантного артриту (АА), які визначаються характером і мірою кооперативних взаємодій субстратів імунної системи. Представлена різниця корегуючого ефекту криоконсервованих ГКЕП порівняно з нативними, що може бути обумовлено зміною їх структурно-функціональної організації після дії факторів криоконсервування.

**Ключові слова:** ревматоїдний артрит, гемопоетичні клітини ембріональної печінки, лімфогемопоетичний комплекс.

Using the rheumatoid arthritis' experimental model in mice there was studied the therapeutic effect of native and cryopreserved hematopoietic embryonic liver cells (HELs). Having used the certain spectrum of indices, there was demonstrated the HELs capability to correct the key mechanisms of adjuvant arthritis development, determined by the character and degree of cooperative interactions of immune system (IS) substrates. There have been shown the differences in the correcting effect of cryopreserved HELs comparing to the native ones that may be stipulated by the change in their structural and functional organization following the effect of cryopreservation factors.

**Key-words:** rheumatoid arthritis, hematopoietic embryonic liver cells, lymphohematopoietic complex.

Ревматоидный артрит – хроническое аутоиммунное заболевание (АИЗ) с прогрессирующей эрозивной деструкцией периферических суставов [16]. Предрасположенность к развитию РА определяется генетическими, возрастными и факторами микроокружения. Открытие функционально отличающихся Т-клеточных субпопуляций  $T_x-1$  и  $T_x-2$  позволило уяснить различную роль продуцируемых ими про- и противовоспалительных цитокинов в инициации и поддержании длительно текущих АИЗ, включая и РА. Важным моментом искажения цитокинового профиля при РА может быть активация специализированных фибробластов в виде синовиоцитов типа В, продуцирующих воспалительные медиаторы [14]. В результате нарушается скоординированная связь между

Rheumatoid arthritis is known to be a chronic autoimmune disease (AIDs) characterized by progressive erosive destruction of peripheric joints [16]. Predisposition to the RA development is determined by genetic, age and microenvironment factors. Establishing the functionally different T-cellular subpopulations:  $T_h-1$  and  $T_h-2$ , allowed to elucidate the different role of produced by them pro- and antiinflammatory cytokines in the initiation and maintenance of long-term AIDs including the RA. Activation of specialized B-type synoviocyte-like fibroblasts producing inflammatory mediators [14] may be an important moment of a cytokine profile alteration at RA, as a result there may be impaired a coordinated link between definite immunocompetent cell clones and harmonically developing immunoinflammatory rea-

**Адрес для корреспонденции:** Гольцев А.Н., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 7720104, факс: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

**Address for correspondence:** Goltsev A.N., Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +38 (057) 7720104, fax: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

отдельными клонами иммунокомпетентных клеток и в целом гармонично развивающихся иммуновоспалительных реакций. основополагающим принципом лечения патологии, в основе которой лежат эти процессы, должна быть коррекция скомпрометированного цитокинового профиля и кооперативных взаимодействий клонов иммунокомпетентных клеток, т.е. для коррекции широкого спектра развивающихся дисрегуляторных состояний ИС при АИЗ требуются препараты не клональной направленности, а надклональной, системной регуляции нейроиммуноэндокринного комплекса. Косвенно такого рода предположения подтверждаются эффективностью клинического применения "системных" модуляторов, например, миелотрансфузии. Принцип взаиморегуляции и взаимокоррекции систем обеспечения "бодигомеостаза", т.е. нейроиммуноэндокринного блока [13], предраполагает к тому, что коррекция статуса каждой системы, входящей в этот комплекс, будет способствовать интегральному восстановлению статуса нейроиммуноэндокринной сферы. К препаратам, обладающим свойствами системной регуляции, можно отнести КЭП, одной из основных функциональных единиц которых являются стволовые гемопоэтические клетки с мощным гистогенетическим регуляторным потенциалом и в целом широким спектром биологических активностей [5]. Данный тезис может быть подтвержден в экспериментах с индукцией какой-либо формы АИЗ.

Экспериментальной моделью РА является АА, представляющий собой адекватную модель развития коллагенозов у человека. Наиболее манифестными проявлениями течения АА у мышей и крыс являются отек, деформация и нарушение подвижности суставов, спленомегалия, снижение Т-супрессорного звена иммунитета, изменение цитокинового профиля.

Цель работы – изучение возможности использования ГКЭП для коррекции состояния лимфогемопоэтического комплекса и кооперативных взаимодействий в ИС при АА.

### Материалы и методы

У мышей линии С57В1/6 индуцировали АА субплантарным введением полного адьюванта Фрейнда в дозе 0,05 мл [10]. ГКЭП получали на 18-19-е сутки гестации сингенных мышей. Доза вводимых КЭП составляла  $5 \times 10^6$  клеток на мышшь. Выраженная иммуномодулирующая активность такой дозы КЭП была подтверждена результатами исследований на других моделях АИЗ [6,12]. В экспериментах были использованы нативные и криоконсервированные клетки под защитой 10%-го диметилсульфоксида КЭП [9], которые вводили

в целом. The basic principle to treat the pathology with these processes in its base, should be the correction of the impaired cytokine profile and cooperative interactions of immune competent cells' clones. That is to correct a wide spectrum of developing dysregulatory IS states at AIDs we need the preparations of non-clonal characteristics, but overclonal ones, of systemic regulation of neuroimmune-endocrine complex. Indirectly such suppositions are confirmed by a clinical application efficacy of "systemic modulators", for example myelotransfusion.

The principle of interregulation and intercorrection of "body-gomeostasis" providing system, i.e. neuroimmunoendocrinic block [13], predisposes to the fact that the status correction of each system comprised by this complex, will promote an integral recovery of the status of neuroimmune endocrinic sphere. Embryonic liver cells (ELCs), among main functional units of those are HELCs possessing a strong histogenetic regulatory potential and in the whole with a wide spectrum of biological activities [5], may be related to the preparations, possessing the properties of systemic regulation. Such a notion can be confirmed in experiments with the induction of any AIDs form.

Adjuvant arthritis (AA), which is an adequate model of collagenose development in human being, is known to be the experimental model of RA. The most manifested signs of AA course in mice and rats are oedema, deformation and mobility impairment in joints, splenomegalia, decrease of T-suppressory immunity link, a cytokine profile change.

The aim of the present investigation was studying the possibility to use HELCs to correct the state of lymphohematopoietic complex and cooperative interactions in IS during AA.

### Materials and methods

AA was induced by subplantary injection of Freund's complete adjuvant in 0.5ml dose in C57B1/6 mice [10]. HELCs were obtained by 18-19<sup>th</sup> gestation day of syngeneic mice. The dose of injected ELCs made  $5 \times 10^6$  cells per mouse. Manifested immune modulating activity of such a dose was confirmed by the investigation results in other AIDs models [6, 12]. In experiments there were used native and cryopreserved ELCs under 10% DMSO protection [9], injected intravenously at the day of the arthritis initiation. Using the same dose the control group animals were injected with native adult liver cells (ALCs). The selection of characteristic signs and evaluation of their manifestation degree during AA allow to get more complete information about not only the pathology, but about its treatment results as well. Quantitative cytokines extent in blood serum was determined using monoclonal antibodies in "Multiscan" spectrophotometer at a wave length of 492 nm [11]. Monitoring of clinical signs of

внутривенно в день инициации артрита. В такой же дозе животным контрольной группы были введены нативные клетки взрослой печени (КВП). Выбор характерных признаков и оценка степени их манифестации при АА позволяют получать более полную информацию не только о самой патологии, но и результатах ее лечения. Количественное содержание цитокинов в сыворотке крови определяли с помощью моноклональных антител на спектрофотометре "Multiscan" при длине волны 492 нм [11]. Мониторинг клинических признаков проявления АА осуществляли с интервалом 2-4 дня после его индукции. Индекс артрита (ИА) определяли как отношение окружности опытного сустава к контрольному. Интегральную оценку показателей, характеризующих состояние лимфогемопоэтического комплекса (ЛГПК) экспериментальных животных давали через 12 сут после инициации АА и введения КЭП. Индекс лимфоузлов (ИЛУ), индекс селезенки определяли по формуле: масса органа / масса животного × 100. Индекс клеточности селезенки рассчитывали как отношение количества клеток в селезенке опытных животных к количеству клеток в органе интактных животных.

Один из основных продуктов ПОЛ малоновый диальдегид (МДА) определяли по известному методу [4].

Полученные результаты были статистически обработаны по методу [2], для сравнения выборок использовали параметрические методы статистики (t-критерий Стьюдента).

### Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлена динамика ИА как одного из основных клинических показателей развития патологии: к 9-м суткам ИА достигал максимума, несколько снижался к 12-м, но все же оставался на достаточно высоком уровне по сравнению со 2-ми сутками ( $1,30 \pm 0,3$  и  $1,19 \pm 0,3$  соответственно;  $P < 0,05$ ). Введение эмбрионального материала минимизировало развитие отека суставов на этапе генерализованной манифестации АА. Однако нативные и криоконсервированные КЭП вплоть до 9-х суток проявляли "противофазный" эффект в плане модификации степени отека, что может свидетельствовать о разном характере влияния нативного и криоконсервированного материала на субстраты ИС, иницирующие и поддерживающие развитие АА. Другими словами, оба вида КЭП, введенные в одной и той же дозе проявляют различную функциональную активность в отношении ЛГПК животных с АА на разных этапах развития патологического процесса.

Представленные на рис.2 данные показывают, что все органы ЛГПК отвечают в той или иной

the АА manifestation was performed with a 2-4 days' interval following its induction. Arthritis index (AI) was evaluated as the ratio of circumference of the joint under study to the control one. Integral estimation of the indices characterizing the state of lymphohemopoietic complex (LHPC) in experimental animals, was performed in 12 days following the АА initiation and ELCs injection. Lymph nodes (LN) index and spleen index (SI) were determined according to the formula: an organ mass / an animal's mass × 100. Index of spleen cellularity was calculated as the ratio of cell number in experimental animals' spleen to cell number in an organ of intact animals. Malonaldehyde (MDA), which is known to be one of the main LPO products, was determined according to the method [4].

The obtained results were statistically processed according to the method [2], to compare the samplings we have used parametrical statistics methods (Student's t-criterion).

### Results and discussion

Fig. 1 demonstrates the IA dynamics among one of the main clinical indices of the pathology development: by the 9<sup>th</sup> day it achieved the maximum, decreased a little to the 12<sup>th</sup> day, but still remained at quite a high level comparing to the 2<sup>nd</sup> day ( $1.30 \pm 0.3$  and  $1.19 \pm 0.3$ , correspondingly,  $P < 0.5$ ). Embryonic material injection minimized the development of joints oedema at the stage of generalized АА manifestation. Native and cryopreserved ELCs however manifested "an antiphase" effect up to the 9<sup>th</sup> day as for oedema manifestation degree, that may testify to a different character of the effect of native and cryopreserved

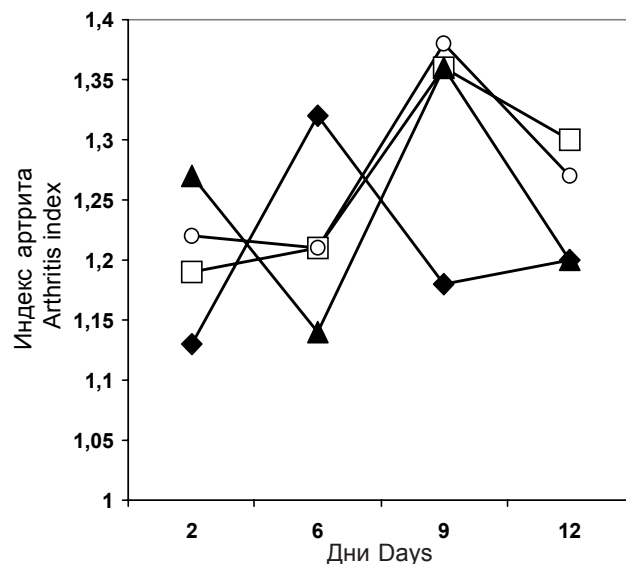
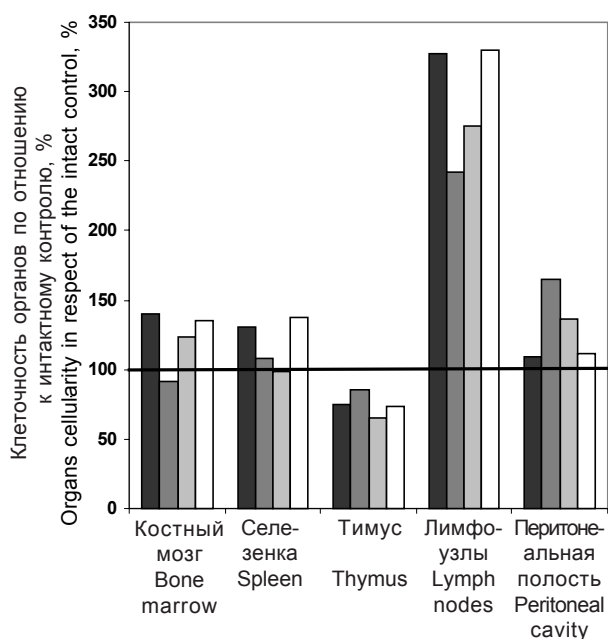


Рис.1. Динамика отека лап мышей при АА и после введения КЭП. □ – АА; ◆ – АА+ нативные КЭП; ▲ – АА + криоконсервированные КЭП; ○ – АА + КВП.

Fig. 1. Dynamics of mice paws' oedema during АА and following ELCs injection. □ – АА; ◆ – АА + native ELCs, ▲ – АА + cryopreserved ELCs; ○ – АА + ALCs.



**Рис. 2.** Клеточность органов мышей с АА и после введения КЭП на 12-е сутки. ■ – АА; ▒ – АА + нативные КЭП; ▓ – АА + криоконсервированные КЭП; □ – АА + КВП.

**Fig. 2.** Cellularity in mice organs and following ELCs injection to the 12<sup>th</sup> day. ■ – AA; ▒ – AA+native ELCs; ▓ – AA+CELCs; □ – AA+ALCs.

степени на развитие патологии. Достоверно увеличивалась клеточность в костном мозге ( $140,0 \pm 12,7\%$  в сравнении со  $100\%$  в контроле), селезенке ( $132,4 \pm 12,4\%$ ) и особенно в регионарных лимфоузлах ( $327,2 \pm 20,9\%$ ). У животных данной группы ИЛУ составлял  $2,0 \pm 0,04\%$  (в контроле  $1,0 \pm 0,01\%$ ;  $P < 0,05$ ). Необходимо отметить, что клеточность контрлатеральных лимфоузлов также была высокой ( $164,1 \pm 13,2\%$ ;  $P < 0,05$ ), что свидетельствует о генерализованном процессе развития иммуновоспалительной реакции при артрите в наблюдаемые сроки. В тимусе отмечалась гипоплазия, что может рассматриваться как результат развития стрессиндуцированной ситуации после индукции артрита. В перитонеальной полости (ПП) в указанный срок количество клеток существенно не изменялось.

Введение как нативных, так и криоконсервированных КЭП в большинстве случаев способствовало нормализации клеточности лимфомиелоидных органов, хотя при этом прослеживалась определенная, свойственная каждому препарату, специфика модуляции этих характеристик органов. Так, наиболее выраженные улучшения показателя при применении нативных КЭП наблюдались в лимфатических узлах, селезенке, костном мозге и тимусе. В ПП клеточность увеличивалась почти в 1,5 раза в сравнении с исходным уровнем АА. Криоконсервированные КЭП наибольшую корректирующую

material on IS substrates initiating and supporting the AA development. By other words, both of the ELCs types injected in the same dose manifested various functional activity in respect of LHPC of the animals of AA at different stages of the pathological process development.

The data presented in Fig. 2 show that all the LHPC organs respond in a certain extent to the pathology development.

Cellularity significantly increased in bone marrow ( $140.0 \pm 12.7\%$  if compared with  $100\%$  in the control), in spleen ( $132.4 \pm 12.4\%$ ) and, especially, in regional lymph nodes ( $327.2 \pm 20.9\%$ ). In the animals of this group LNI made  $2.0 \pm 0.04$  ( $1.0 \pm 0.01\%$  in the control,  $P < 0.05$ ).

It should be noted that the cellularity in contralateral lymphonodes was also high ( $164.1 \pm 13.2\%$ ;  $P < 0.05$ ), that testified to a generalized development process of immune inflammatory reaction at arthritis during the observation terms. In thymus there was noted hypoplasia, that may be considered as the result of stress-induced situation development following the arthritis induction. In peritoneal cavity (PC) the amount of cells within the period mentioned has not been considerably changed.

Injection of both native and cryopreserved ELCs in the majority of cases promoted the normalization of lymphomyeloid organs' cellularity, although in this case there was noted a certain specifics of the modulation of these parameters of the organs, characteristic for each the preparation. The most manifested improvements of the index when using native ELCs there was observed in lymph nodes, spleen, bone marrow and thymus. In PC the cellularity increased by nearly 1.5 times if compared with the AA initial level. Cryopreserved ELCs manifested the highest correcting activity in spleen, but in a lesser extent comparing to native ones, in bone marrow, lymph nodes and thymus. They also distorted in a lesser extent the cellularity in PC.

It was interesting to note that intravenously transplanted ELCs induced a cellularity rise in PC. The absence of such an effect when injecting ELCs and differences in the degree of the cellularity stimulation between native and cryopreserved ELCs testify, obviously, to a specific PC cells' response to the regulatory mediators, produced under different concentrations by 2 types of ELCs.

Splenomegalia is known to be one of the characteristic symptoms of the AA development in mice [10]. Fig. 3 shows the manifested SI increase, i.e. its mass in AA animals comparing to the control ( $2.75 \pm 0.04$ , control is  $1.0 \pm 0.04$ ,  $P < 0.05$ ).

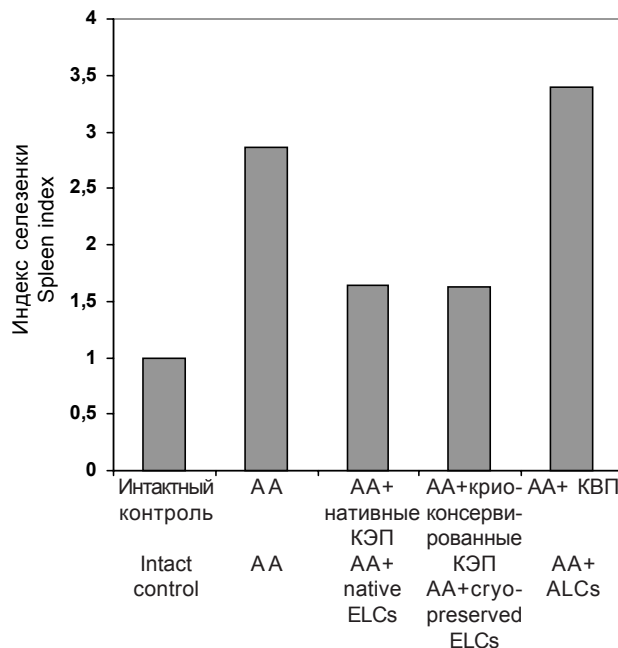
Following the injection of both native and cryopreserved ELC splenomegalia decreased by about 50%. Consequently, the correcting effect of ELCs made nearly 100% in respect of the cellularity in spleen

активность проявляли в селезенке, но меньше, чем нативные в костном мозге, лимфатических узлах и тимусе. В меньшей степени они “искажали” и клеточность ПП.

Интересно, что трансплантируемые внутривенно КЭП индуцировали увеличение клеточности в ПП. Отсутствие такого эффекта при введении КВП и различия степени стимуляции клеточности между нативными и криоконсервированными КЭП свидетельствует, по-видимому, о специфическом ответе клеток ПП на продуцируемые в различных концентрациях двумя видами КЭП регуляторные медиаторы.

Спленомегалия является одним из характерных симптомов развития АА у мышей [10]. На рис.3 представлено выраженное увеличение ИС, т.е. ее массы у животных с АА в сравнении с контролем ( $2,75 \pm 0,04$ , контроль  $1,0 \pm 0,04$ ,  $P < 0,05$ ). При сопоставлении этого индекса ( $2,75 \pm 0,04$ ) с индексом клеточности органа при АА ( $1,3 \pm 0,03$ ) очевидно превалирование разрастания в селезенке при АА ее стромальных элементов. Это еще раз подтверждает, что АА, как аналог РА, есть системная патология соединительно-тканых структур организма. После введения как нативных, так и криоконсервированных КЭП спленомегалия снижалась примерно на 50%. Следовательно, корректирующий эффект КЭП был практически 100% в отношении клеточности селезенки (рис.2), но менее выраженным в плане ингибции гиперактивного роста соединительно-тканых элементов органа.

Абсолютное большинство АИЗ развивается на фоне измененного физиологического баланса иммунорегуляторных субпопуляций Т-клеток, в частности, сниженной активности супрессорного звена иммунитета [4]. Это подтверждают данные, приведенные на рис. 4. При АА в регионарных лимфоузлах отмечено не только снижение концентрации Т-супрессоров (CD8<sup>+</sup> клеток), но и некоторое повышение содержания Т-хелперов (CD4<sup>+</sup> клеток). В результате иммунорегуляторный индекс (ИРИ) увеличивается с 2,45 (контроль) до 3,78 (АА). После введения КЭП установлена их иммунокорректирующая активность в отношении формирования лимфоцитов регуляторных субпопуляций Т-хелперов и Т-супрессоров в регионарных лимфоузлах. При этом важно, что оба вида клеток стимулировали экспансию Т-супрессоров. Учитывая потенциальную возможность КЭП продуцировать широкий спектр иммуотропных субстанций, такого рода перераспределение субпопуляций этих клеток не удивительно. Так, на протяжении почти всего срока гестации печень вырабатывает один из индукторов активации Т-супрессорных клеток – альфа-фетопротеин (α-ФП). Его актив-



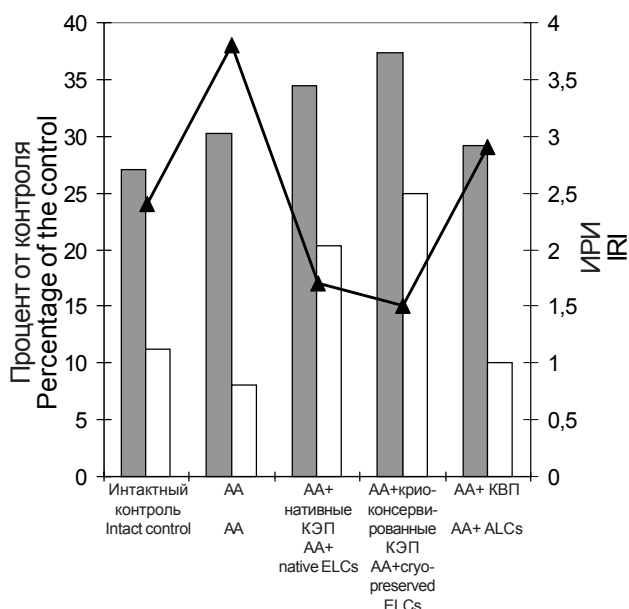
**Рис.3.** Индекс селезенки мышей с АА и после введения КЭП на 12-е сутки.

**Fig. 3.** Index in mice spleen with AA and following ELCs injection to the 12<sup>th</sup> day.

(Fig. 2), but was less manifested as for a hyperactive growth of connective tissue organ elements.

The absolute majority of AIDs are known to develop at the background of changed physiological balance of immune regulatory T-cells subpopulations, in particular, the decreased activity of a suppressor immunity link [4], this fact is confirmed by the data presented in Fig. 4. During AA in regional lymph nodes there is noted not only the decrease of T-suppressors' concentration (CD8<sup>+</sup> cells), but also a slight increase of T-helpers content (CD4<sup>+</sup> cells). As a result, immune regulatory index (IRI) rises from 2.45 (control) up to 3.78 (AA). After ELCs' injection there was found their immune correcting activity as for the lymphocytes formation of regulatory subpopulations of T-helpers and T-suppressors in regional lymph nodes. In this case it is of an importance that the both cell types stimulated the T-suppressors expansion. Taking into consideration the possible capability of ELCs of producing a wide spectrum of immunotropic substances, such a kind of redistribution in subpopulations of these cells is not surprising, during nearly the entire gestation term the liver produces one of the activation inducers of T-suppressor cells: alpha-fetoprotein (α-FP). Activity of which in respect of T-suppressors is strictly dose-dependent [11], by this point is confirmed, obviously, the fact of more significant stimulation of T-suppressors by cryopreserved ELC in this experimental model, than by native ones, that also underlines a little bit different character of the IRI change.

The works [6, 9] testify to the pathologically significant change of cytokine profile of the produced



**Рис. 4.** Фенотип клеток лимфоузлов при АА и после введения КЭП. ■ – T<sub>x</sub>, □ – T<sub>s</sub>, ▲ – ИРИ.

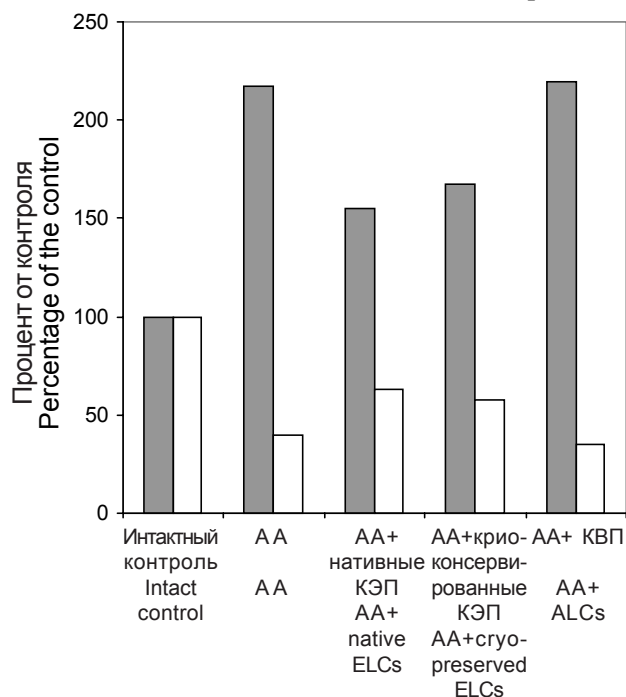
**Fig. 4.** Phenotype of lymph nodes cells during AA and following ELCs injection to the 12<sup>th</sup> day. ■ – T<sub>x</sub>, □ – T<sub>s</sub>, ▲ – IRI.

ность в отношении T-супрессоров строго дозозависима [11], чем, по-видимому, и объясняется факт большей стимуляции в данной экспериментальной модели T-супрессоров криоконсервированными КЭП, чем нативными, что подчеркивает и несколько отличающийся характер изменения ИРИ.

В [6, 9] указывается на патогенетически значимое изменение профиля цитокинов, продуцируемых T<sub>x</sub>-1 и T<sub>x</sub>-2 клетками, в частности, на повышение уровня содержания цитокинов провоспалительного каскада при РА [9]. Особая роль при этом отводится ФНО-α. На рис.5 показано содержание оппозитных про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови животных с АА до и после введения КЭП. У животных с данной патологией наблюдаются более чем двукратное увеличение (217,2% от контроля, что составляет 6,7 нг/мл) содержания ключевого в инициации артрита медиатора ФНО-α и существенное снижение концентрации ИЛ-4 (40% от контроля, что составляет 0,18 пг/мл). Введение нативных и криоконсервированных КЭП приводит к снижению почти в 1,5 раза содержания ФНО-α и повышению приблизительно в такой же степени концентрации ИЛ-4, что может свидетельствовать о способности эмбрионального материала модифицировать функциональный статус T<sub>x</sub>-1 и T<sub>x</sub>-2 клеток одновременно. Причем, в данном случае двунаправленное действие в отношении субпопуляций клеток, продуцирующих эти цитокины, реализовалось в равной степени нативными и криоконсервированными КЭП. Однако, как показано выше, модифицирующая активность этих КЭП проявля-

by cells T<sub>h</sub>-1 and T<sub>h</sub>-2, in particular to the increase of a cytokine content level of pro-inflammatory cascade during RA. A special role in this case is dedicated to TNF-α. Fig. 5 shows the content of opposite pro- and anti-inflammatory cytokines in blood serum of animals with AA prior to and following the ELCs injection. In animals with such a pathology there was observed more than two fold increase of TNF-α, which is the key mediator in arthritis initiation (217.2% of the control, that makes 6.7ng/ml), and a considerable decrease of IL-4 concentration (40% of the control making 0.18% ng/ml). Injection of native and cryopreserved ELCs results in about 1.5 times fall of TNF-α and in the rise of nearly the same IL-4 concentration, that may testify to the capability of embryonic material to modify the functional status of T<sub>h</sub>-1 and T<sub>h</sub>-2 simultaneously. In this case a two directed effect as for subpopulations of cells, producing these cytokines, was equally performed both by native CELs and cryopreserved ones. However as it is mentioned above, the modifying activity of these CELs was manifested differently regarding to other systems involved in the AA development. Nevertheless, CELs use has obviously resulted in the correction of misbalanced intercellular interactions in immunocompetent sphere, those are the base for the developing pathology during AA.

TNF-α is known to intensify the expression of adhesion molecules in endothelial cells, to increase the amount of dissolved E-selectin forms and intercellular adhesion molecules [15], to stimulate the expression



**Рис.5.** Количество ФНО-α и ИЛ-4 в сыворотке крови животных с АА и после введения КЭП на 12-е сутки. ■ – ФНО-α, □ – ИЛ-4.

**Fig. 5.** Amount of TNF-α and IL-4 in blood serum of the animals with AA and following ELCs injection to the 12<sup>th</sup> day. ■ – TNF-α, □ – IL-4.

лась по-разному в отношении других систем, причастных к развитию АА. И все же, очевидно, использование КЭП приводит к коррекции разбалансированных межклеточных взаимодействий в иммунокомпетентной сфере, которые являются основой развивающейся патологии при АА.

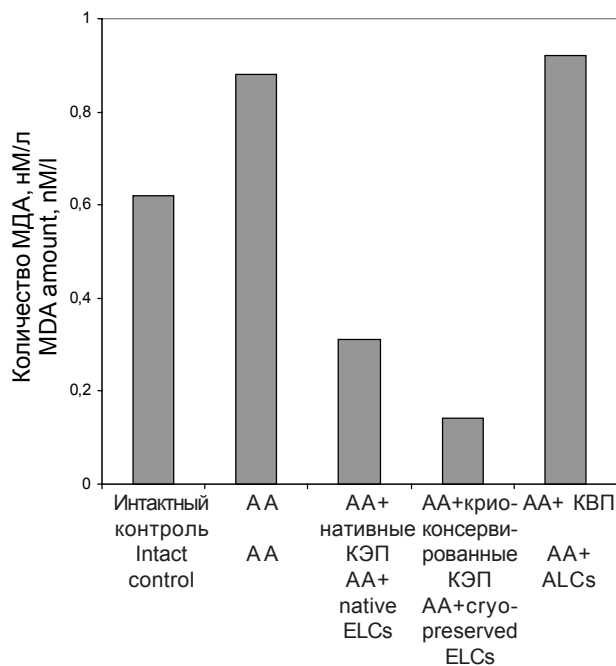
Известно, что ФНО- $\alpha$  усиливает экспрессию молекул адгезии на эндотелиальных клетках, повышает количество растворимых форм Е-селектина и межклеточных адгезионных молекул [15], стимулирует экспрессию антигенов гистосовместимости II класса на антигенпрезентирующих клетках [15]. В целом это приводит к нарушению скоординированных связей между отдельными клоонами иммунокомпетентных клеток. Следовательно, снижение продукции ФНО- $\alpha$  после введения КЭП может быть основой коррекции кооперативных взаимодействий иммунокомпетентных клеток при АА, что снижает иммуновоспалительный процесс *in situ*.

Хронически протекающие иммуновоспалительные реакции в виде АИЗ, включая и АА, характеризуются на определенных стадиях развития интенсификацией ряда метаболических процессов, в частности ПОЛ [4]. Как видно из рис.6, количество МДА в печени мышей при АА было повышено примерно на 30% в сравнении с контролем. Вводимые препараты КЭП значительно снижали количество малонового диальдегида, причем до более низкого уровня, чем в контроле. Судя по данному показателю, криоконсервированные КЭП, проявляли в два раза более выраженную ингибицию ПОЛ, чем нативные. Представленные на рис.6 результаты в совокупности с вышеприведенными могут свидетельствовать о снижении интенсивности воспалительного процесса у экспериментальных животных после такой терапии. И все же надо подчеркнуть, что нативные и криоконсервированные КЭП, вызывая однонаправленное изменение этих показателей, реализуют их в различной степени. Не исключено, что после криоконсервирования КЭП изменяют способность продуцировать биоактивные субстанции и, возможно, в меньшем количестве. Но даже в этом случае реализуемая криоконсервированными КЭП более выраженная активность еще раз подчеркивает наличие дозозависимого корректирующего эффекта вводимого материала при данной патологии. Подобные эффекты были нами отмечены при использовании криоконсервированных продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса и при лечении других АИЗ, в частности экспериментального аллергического энцефаломиелиита [3]. Введение препаратов КЭП, за редким исключением, способствовало улучшению, но не полному восстановлению исследованных пока-

of histocompatibility II class antigens on antigen-presenting cells [15]. In the whole this results in the impairment of coordinated bonds between separate clones of immunocompetent cells. Consequently, the reduction of TNF- $\alpha$  production following the CELs injection may be the background to correct cooperative interactions of immunocompetent cells during AA, that reduces an immune inflammatory process *in situ*.

Chronic course of immune inflammatory reactions as AIDs including also AA, is characterized at certain stages by intensification of the series of metabolic processes, in particular LPO [4] (Fig. 6).

As the Fig. 6 demonstrates the MDA content in mice liver during AA was increased by nearly 30% comparing the control. ELCs, being injected, significantly reduced its amount down to the lower level if compared with the control. As we can judge from this index, cryopreserved ELCs manifested the twice higher LPO inhibition than the native ones. The results in Fig. 6 together with the presented above ones may testify to the intensity reduction of inflammatory process in experimental animals following such a therapy. Nevertheless, it should be pointed that both native and cryopreserved CELs, which cause an mono-orientated change of these indices, realize it differently. It is possible, that CELs alter the capability of producing the biologically active substances after cryopreservation, and obviously, in a less extent. However even in this case the more manifested activity realized by cryopreserved ELCs underlines once more the existence of dose-dependent correcting effect of the material injected at this pathology. Similar effects were



**Рис.6.** Количество МДА в печени мышей при АА и после введения КЭП на 12-е сутки.

**Fig. 6.** MDA amount in mice liver during AA and following ELCs injection to the 12<sup>th</sup> day.

зателей, что позволяет совершенствовать такой метод лечения путем варьирования дозовременных параметров введения КЭП.

Обсуждая представленные данные, логично задать вопрос, насколько специфичным является эффект изменения тех или иных показателей под действием вводимых КЭП. Исследования в адекватных условиях эффекта введения контрольного препарата КВП на течение АА и констатация факта отсутствия выраженной модулирующей активности в отношении клинических проявлений патологии и состояния ЛГПК свидетельствуют о том, что наблюдаемый как интегральный лечебный эффект КЭП при АА обусловлен активностью специфических субстратов используемого эмбрионального материала.

### Выводы

Используя определенный спектр показателей, характеризующих клинический статус, иммуноцитологические параметры лимфогемопоетической системы, интенсивность метаболических процессов в модели АА у мышей, протестирован биомодулирующий эффект нативных и криоконсервированных ГКЭП. Продемонстрирована их способность выступать в роли корректора ключевых механизмов развития АА, определяемых характером и степенью кооперативных взаимодействий субстратов ИС. Показаны различия коррегирующего эффекта криоконсервированных клеток в сравнении с нативными, что может быть обусловлено изменением структурно-функциональной организации клеток после действия факторов криоконсервирования.

### Литература

1. *Абелев Г.И.* Альфа-фетопроtein: биология, биохимия, молекулярная генетика // Иммунология.– 1994.– №3.– С.4-10.
2. *Ашмарин И.П., Воробьев А.А.* Статистические методы микробиологических исследований.– Л.: Медицина, 1972.– 180 с.
3. *Бабенко Н.Н., Козлова Ю.А., Гольцев А.Н.* Возможность коррекции экспериментального аллергического энцефаломиелита продуктами эмбриофетоплацентарного комплекса // Сб. тезисов III Межд. мед. конф. студ. и молодых ученых "Медицина – здравоохранение XXI столетия".– Днепропетровск, 2002.–С.292.
4. *Владимиров Ю.А., Арчаков А.И.* Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.– М.,1972.– С. 82-96.
5. *Гольцев А.Н., Дубрава Т.Г., Луценко Е.Д. и др.* Поиск альтернативных криоконсервированию путей модификации иммунореактивности алломиелотрансплантата. Часть II. Возможность сотрансплантации клеток эмбриональной печени // Пробл.криобиологии.– 2000.– №1.–С. 10-22.
6. *Гольцев А.Н., Останкова Л.В., Луценко Е.Д. и др.* Ответ лимфогемопоетической системы организма на введение продуктов фетоплацентарного комплекса // Пробл. криобиологии.– 2000.– №2.– С. 15-31.

noted by us when using cryopreserved products of embryofetoplacental complex and when treating other AIDs, in particular, experimental allergic encephalomyelitis [3].

Introduction of ELCs preparations excluding single cases promoted the improvement, but not the complete recovery of the indices under study, that gives us the chance of improving such a treatment way by varying the dose-dependent parameters of ELCs introduction.

When discussing the data presented it would be reasonable to ask the following question, in which extent the effect of the change in those or other indices under the effect of ELCs injected, is specific? Studying under adequate conditions the introduction effect of control preparation on the AA course and stating the fact of the absence of manifested modulating activity as for clinical manifestation of the pathology and LHPC state, testifies that the integral ELCs treatment effect observed at AA is stipulated by the activity of specific substrates of the embryonic preparations used.

### Conclusions

Using the certain spectrum of the indices characterizing a clinical status, immune cytologic parameters of lymphohaemopoietic system, intensity of metabolic processes in the AA model in mice there has been tested a biomodulating effect of native and cryopreserved HELCs. There was demonstrated their capability of being the correctors of key mechanisms in the AA development, determined by the character and extent of cooperative interactions of the IS substrates. We have shown the differences of the correcting effect of cryopreserved cells in comparison with the native ones, that may be stipulated by the change in structural and functional cell organization following the effect of cryopreservation factors.

### References

1. *Abelev G.I.* Alpha-fetoprotein: biology, biochemistry, molecular genetics // Immunologiya.– 1994.– N3.– P. 4-10.
2. *Ashmarin I.P., Vorobyev A.A.* Statistical methods of microbiological studies.– Leningrad: Meditsina, 1972.– 180 p.
3. *Babenko N.N., Kozlova Yu.A., Goltsev A.N.* The possibility to correct experimental allergic encephalomyelitis with the products of embryofetoplacental complex // Collection of Abstracts II International Medical Conference of students and young scientists "Medicine – health care of XXI century".– Dnepropetrovsk, 2002.– P. 292.
4. *Vladimirov Yu.A., Archakov A.I.* Lipid peroxidation in biological membranes.– Moscow, 1972.– P. 82-96.
5. *Goltsev A.N., Dubrava T.G., Lutsenko E.D. et al.* Search for the alternative to cryopreservation methods of modifying immune reactivity of allomyelotransplant. Part II. Possible cotransplantation of embryonic liver cells // Problems of Cryobiology.– 2000.– N1.– P. 10-22.
6. *Goltsev A.N., Ostanкова L. V., Lutsenko E.D. et al.* Response of lymphohaemopoietic system of the organism on the injection of the products of fetoplacental complex // Problems of Cryobiology.– 2000.– N2.– P. 15-31.



7. Грищенко В.И., Лобынцева Г.С., Вотякова И.В. и др. Гемопоэтические клетки эмбриональной печени (эмбриогенез, трансплантация и криоконсервирование.– Киев: Наук. думка, 1988.– 192 с.
8. Грищенко В.И., Гольцев А.Н. Модифікація стану лімфогемопоетичного комплексу організму в умовах застоювання продуктів фетоплацентарного комплексу // Трансплантологія.– 2001.– №3.– С.5-20.
9. 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.
10. Маджидов У.В., Норимов А.Ш. Клеточные основы иммунореактивности при экспериментальной аутоиммунной патологии. Изучение физиологической активности Т- и В-лимфоцитов при адьювантном артрите // Иммунология.– 1987.– №1.– С.73-78.
11. Оганезов В.К., Майоров А.В. Продукция фактора некроза опухоли- $\alpha$  при тяжелом atopическом синдроме // Иммунология.– 1991.– №6.– С.75-78.
12. Рассоха И.В., Гольцев А.Н., Останкова Л.В. и др. Оценка структурно-функциональных характеристик клеток моноцитарно-макрофагальной системы при применении продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса в условиях развития аутоиммунных заболеваний // Пробл. криобиологии.– 2002.– №1.– С. 131-132.
13. Fox D.A. Cytokine blockade as a new strategy to treat rheumatoid arthritis inhibition of tumor necrosis factor// Arch. Intern. Med.– 2000.– Vol.160.– P. 437-444.
14. Graciel J.A., Forsey R.J. et al. A proinflammatory for IL-18 in rheumatoid arthritis // J. Clin. Invest.– 1999.– Vol.104, N10.– P. 1393-1401.
15. Flugge L.A., Miller-Deist L.A. Petillo P.A. Towards a molecular understanding of arthritis // Chemistry & Biology.– 1999.– Vol.6.– P. 157-166.
16. Frey D., Hasler P., Tyndall A. Treatment of chronic polyarthritis // Schweiz. Med. Wochenschr.– 1997.– Vol.127, N46.– P. 887-900.
7. Grischenko V.I., Lobyntseva G.S., Votyakova I.V. et al. Embryonic liver hematopoietic cells (embryogenesis, transplantation and cryopreservation.– Kiev:Naukova dumka, 1988.– 192p.
8. Grischenko V.I., Goltsev A.N. Modification of the state of an organism's lymphohaemopoietic complex when using the products of embryofetoplacental complex //Transplantology.– 2001.– N3.– P. 5-20.
9. Grischenko V.I., Goltsev A.N. Transplantation of the products of embryofetoplacental complex. From understanding of the effect mechanism to increasing the efficiency of application // Problems of Cryobiology.– 2002.– N1.– P.54-84.
10. Madzhidov U.V., Norimov A.Sh. Cellular backgrounds of immune reactivity at experimental autoimmune pathology. Studying the physiological activity of T- and B-lymphocytes at adjuvant arthritis // Immunologiya.– 1987.– N1.– P. 73-78.
11. Oganeyov V.K., Majorov A.V. Tumor necrosis factor- $\alpha$  production at severe atopic syndrome // Immunologiya.– 1991.– N6.– P.75-78.
12. Rassokha I.V., Goltsev A.N., Ostankova L.V. et al. Evaluation of structural and functional characteristics of monocytemacrophage system cells when applying the products of embryofetoplacental complex under conditions of autoimmune disease development // Problems of Cryobiology.– 2002.– N1.– P. 131-132.
13. Fox D.A. Cytokine blockade as a new strategy to treat rheumatoid arthritis inhibition of tumor necrosis factor// Arch. Intern. Med.– 2000.– Vol.160.– P. 437-444.
14. Graciel J.A., Forsey R.J. et al. A proinflammatory for IL-18 in rheumatoid arthritis // J. Clin. Invest.– 1999.– Vol.104, N10.– P. 1393-1401.
15. Flugge L.A., Miller-Deist L.A. Petillo P.A. Towards a molecular understanding of arthritis // Chemistry & Biology.– 1999.– Vol.6.– P. 157-166.
16. Frey D., Hasler P., Tyndall A. Treatment of chronic polyarthritis // Schweiz. Med. Wochenschr.– 1997.– Vol.127, N46.– P. 887-900.

*Accepted in 11.03.2003*

*Поступила 11.03.2003*