

УДК 578.832.1.084.1:615.361.018.5.013.8.014.41

А.Н. ГОЛЬЦЕВ\*, В.В. ВОЛИНА, Е.С. ОНАСЕНКО,  
К.А. ГОЛЬЦЕВ, О.Ю. КОЖИНА, В.Л. ПОНОМАРЕВА

## Инфицирование животных вирусом гриппа после предварительного введения препарата "Криоцелл-гемокорд".

Сообщение III. Изучение морфофункционального состояния легких мышей

UDC 578.832.1.084.1:615.361.018.5.013.8.014.41

A.N. GOLTSEV\*, V.V. VOLINA, E.S. ONASENKO,  
K.A. GOLTSEV, O.YU. KOZHINA, V.L. PONOMAREVA

## Infection Of Animals with the Influenza Virus After a Preliminary Administration of Preparation "Cryocell-Haemocord".

Report III. Study of Morphofunctional State of Mice Lungs

Изучали влияние предварительного введения препарата "Криоцелл-гемокорд" на морфофункциональное состояние легких, а также исследовали содержание вируса гриппа А/Виктория в органах мышей, инфицированных им в летальной дозе. Полученные данные свидетельствуют о противовирусном действии препарата "Криоцелл-гемокорд", выражающемся в отсутствии дистрофических и некротических нарушений в легких животных, инфицированных после его введения.

**Ключевые слова:** мыши, легкие, инфицирование вирусом гриппа, противовирусное действие препарата "Криоцелл-гемокорд", морфологические исследования.

Вивчали вплив попереднього введення препарату "Криоцелл-гемокорд" на морфофункціональний стан легень, а також досліджували вміст вірусу грипу А/Вікторія в органах мишей, інфікованих їм в летальній дозі. Отримані дані свідчать про противірусну дію препарату "Криоцелл-гемокорд", яка виявляється у відсутності дистрофічних і некротичних порушень у легенях тварин, інфікованих після його введення.

**Ключові слова:** миші, легені, інфікування вірусом грипу, противірусна дія препарату "Криоцелл-гемокорд", морфологічні дослідження.

There has been studied the effect of preliminary administration of "Cryocell-Haemocord" preparation on morphofunctional state of lungs, as well as there was investigated the content of influenza virus A/Victoria in murine organs infected with it in a lethal dose. The findings testify to an anti-viral effect of "Cryocell-Haemocord" preparation, manifesting in the absence of dystrophic and necrotic impairments in lungs of the animals infected after its introduction.

**Key words:** mice, lungs, infection with influenza virus, antiviral effect of preparation "Cryocell-Haemocord", morphological studies.

Проведенные исследования показали, что применение препарата "Криоцелл-гемокорд", который является криоконсервированной суспензией ядро-содержащих клеток кордовой крови человека, взвешенных в аутологичной плазме [4], приводит к долгосрочному профилактическому эффекту, обеспечивающему невосприимчивость исследуемых животных к вирусу гриппа в течение 6 месяцев с момента его интраназального введения [1, 5].

Было установлено стимулирующее действие препарата на иммунокомпетентные органы мышей

The carried-out studies have shown that application of "Cryocell-Haemocord" preparation, which is cryo-preserved suspension of human cord blood nucleated cells, suspended in autologous plasma [4], results in long-term preventive effect providing insusceptibility by the studied animals to influenza virus for 6 months from the moment of its intranasal administration [1, 5].

Stimulating effect of preparation on immune competent organs of mice prior to and after infection with influenza virus has been established. Further study of antiviral effect of preparation to examine its efficiency

Институт проблем криобиологии и криомедицины  
НАН Украины, г. Харьков

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

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

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

до и после инфицирования вирусом гриппа. Безусловный интерес представляет дальнейшее изучение противовирусного действия препарата для определения степени его эффективности как неспецифического средства профилактики гриппа.

Цель работы – определение содержания вируса гриппа в органах мышей, инфицированных после предварительного введения препарата "Криоцелл-гемокорд", а также проведение гистологического исследования их легких.

### Материалы и методы

Штамм вируса гриппа А/Виктория, который был предоставлен НИИ гриппа РАМН (Санкт-Петербург, Россия), прошел 6 пассажей на белых мышах и 2 пассажа на куриных эмбрионах. Титр гемагглютининов инфицированной аллантоисной жидкости был 1:512, инфекционный титр –  $10^4 LD_{50/10}$ .

Эксперименты проводили на 2-месячных беспородных белых мышах в соответствии с положениями "Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей" (Страсбург, 1985). Все оперативные вмешательства на животных, включая декапитацию, проводили под ингаляционным эфирным наркозом.

Экспериментальные животные были разделены на контрольные и опытные группы:

К1 – мыши, которым интраназально вводили вирус гриппа в дозе 0,05 мл  $LD_{100/10}$ ;

К2 – мыши, которым интраназально вводили препарат "Криоцелл-гемокорд" в дозе 0,05 мл;

К3 – интактные мыши;

О1 – мыши, инфицированные вирусом гриппа на 2-е сутки после введения препарата;

О2 – мыши, инфицированные вирусом гриппа через 7 суток после введения препарата;

О3 – мыши, инфицированные вирусом гриппа через 30 суток после введения препарата.

Каждая группа состояла из 18 животных.

На 2, 5, 7 и 10-е сутки после инфицирования определяли содержание вируса в легких и сыворотке крови животных всех экспериментальных групп.

В работе использовали стандартные вирусологические и серологические методы исследований [3]. Наличие вируса гриппа и его титр в легких и сыворотке крови животных определяли с помощью реакции гемагглютинации (РГА). Объем ингредиентов РГА составлял 0,05 мл. Во все лунки добавляли также по 0,05 мл 1%-й взвеси эритроцитов человека группы крови I (0).

Подготовка легких к проведению РГА включала измельчение ткани легких ножницами и последующую жесткую гомогенизацию в физиологическом

as non-specific mean of influenza prevention is of evident interest.

The research aim is to determine the content of influenza virus in organs of the mice infected after preliminary introduction of "CryoCell-Haemocord" preparation, as well as histological examination of their lungs.

### Materials and methods

Strain of influenza virus A/Victoria provided by R&D Institute of Grippe of Russian Academy of Medical Sciences (St. Petersburg) was subjected to 6 passages in white mice and 2 passages in chicken embryos. The titer of hemagglutinins of infected allantoise fluid was 1:512, infection titer was  $10^4 LD_{50/10}$ .

Experiments were carried-out in 2 months' breedless white mice in accordance with the statements of "European convention on the protection of vertebrate animals used for experimental and other purposes" (Strasbourg, 1985). All surgical invasions in animals including decapitation were done under inhalation ether narcosis.

Experimental animals were divided into control and research groups:

C1, mice intrasally administered with influenza virus in a dose of 0.05 ml  $LD_{100/10}$ ;

C2, mice intranasally administered with "CryoCell-Hemocord" preparation in a dose of 0.05 ml;

C3, intact mice;

E1, mice infected with influenza virus to the 2<sup>nd</sup> day after preparation introduction;

E2, mice infected with influenza virus to the 7<sup>th</sup> day after preparation introduction;

E3, mice infected with influenza virus to the 30<sup>th</sup> day after preparation introduction.

Each group consisted of 18 animals.

To the 2<sup>nd</sup>, 5<sup>th</sup>, 7<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> days after infection the virus content in lungs and blood serum of the animals of all experimental groups was examined.

In the research the standard virusological and serological methods were used [3]. The presence of influenza virus and its titers in lungs and blood serum of animals was examined by means of hemagglutination reaction (HAR). The volume of HAR ingredients made 0.05 ml. 0.05 ml of 1% suspension of human erythrocytes of blood group I(0) were added to the wells.

The preparing of lungs to HAR comprised the fragmentation of lung tissue with scissors and following hard homogenization in physiological solution. Homogenized material was centrifuged at 1,500 rpm for 20 min. Virus presence was assessed in supernatant liquid. The sequence of gradual two-fold dilutions of the studied material was made in the wells of plastic plate. Two control wells were filled with physiological solution.

растворе. Гомогенизированный материал центрифугировали при 1500 об/мин в течение 20 мин. Вирус определяли в надосадочной жидкости. В лунках планшета готовили последовательные двукратные разведения исследуемого материала. В эксперимент включали две контрольные лунки с физиологическим раствором. После внесения 1%-й взвеси трижды отмытых эритроцитов человека смесь в лунках аккуратно перемешивали и инкубировали в термостате при 37°C в течение 45 мин. За титр вируса принимали последнее разведение, в котором определялась РГА не менее, чем на два креста.

Для изготовления гистологических препаратов фрагменты легких экспериментальных животных фиксировали в 10%-м формалине, промывали проточной водой, обезжизивали в спиртах возрастающей концентрации, просветляли в ксилоле и заливали в парафин. Микротомные срезы толщиной 5–7 микрон из парафиновых блоков окрашивали гематоксилином и эозином для получения обзорных гистологических препаратов.

### Результаты и обсуждение

В сыворотке периферической крови животных группы К1 вирус определялся в 100% случаев. Максимальный титр вируса составлял 1:8 у 56% животных этой группы на 2-е сутки после инфицирования. У животных экспериментальных групп, которым перед инфицированием вводили препарат "Криоцелл-гемокорд", максимальный титр вируса был 1:2. Большой процент в этих группах составляли животные, у которых вирус гриппа в сыворотке периферической крови не определялся. Полученные результаты представлены в табл. 1.

After adding of 1% suspension of thrice washed human erythrocytes the mixtures in the wells were accurately mixed and incubated in thermostat at 37°C for 45 min. The last dilution, under which HAR was found not less than by two crosses, was assumed as virus titer.

To produce histological preparations the lung fragments of experimental animals were fixed in 10% formalin, washed with running water, dehydrated in alcohols of ascending concentrations, cleared in xylol and embedded into paraffin.

Microtome slices of 5–7 micron width from paraffin blocks were stained with hematoxylin and eosin to obtain demonstrative histological samples.

### Results and discussion

In the serum of peripheral blood of the animals of C1 group the virus was found in 100% of cases. Maximum titer of virus made 1:8 in 56% of animals of this group to the 2<sup>nd</sup> day after infection. In the animals of experimental groups introduced with "Cryocell-Haemocord" prior to the infection the maximum titer of virus was 1:2. High percent in these groups made the animals in those the influenza virus in serum of peripheral blood was not found. The obtained results are shown in Table 1.

The next research stage was determination of the content of virus in murine lungs at various stages of viral infection development.

Maximum hemagglutinating virus titer (1:64) was found in lungs of 35.8% control animals to the 7<sup>th</sup> day of development of viral infection. To the 10<sup>th</sup> observation day the death of animals of the group C1 made 100%. It was noted the different extent of damage of pulmonary tissue in the animals of various experimental

**Таблица 1.** Титр вируса гриппа в сыворотке периферической крови мышей на разных этапах развития вирусной инфекции

**Table 1.** Titer of influenza virus in serum of peripheral blood of mice at different developmental stages of viral infection

Титр вируса (по РГА) Virus titer (HAR)	Распределение животных экспериментальных групп в зависимости от титра вируса, % Distribution of animals of experimental groups, depending on virus titer, %															
	2 суток 2 days				5 суток 5 days				7 суток 7 days				10 суток 10 days			
	O1 E1	O2 E2	O3 E3	K1 C1	O1 E1	O2 E2	O3 E3	K1 C1	O1 E1	O2 E2	O3 E3	K1 C1	O1 E1	O2 E2	O3 E3	K1 C1
Негативный Negative	76,6	78,1	76,3	0	80,4	72,6	75,4	0	78,3	82,1	80	0	100	100	97	–
1:2	23,4	21,9	23,7	44	19,6	27,4	24,6	0	21,7	17,9	20	0	0	0	3	–
1:4	0	0	0	0	0	0	0	72,8	0	0	0	61,2	0	0	0	–
1:8	0	0	0	56	0	0	0	27,2	0	0	0	38,8	0	0	0	–

**Примечание:** "–" – все животные погибли.

**Notes:** "–" – all animals died.

Следующим этапом исследования было определение содержания вируса в легких мышей на разных этапах развития вирусной инфекции.

Максимальный гемагглютинирующий титр вируса (1:64) определялся в легких у 35,8% контрольных животных на 7-е сутки развития вирусной инфекции. К 10-м суткам наблюдения гибель животных группы К1 составляла 100%. Необходимо отметить различную степень поражения легочной ткани у животных разных экспериментальных групп. Легкие животных опытных групп О1 и О2 были поражены незначительно, лишь изредка выявлялись точечные кровоизлияния. Максимальный титр вируса гриппа в легких мышей этих групп на 5-е сутки после инфицирования был 1:8. Легкие животных в группе О3 были поражены в большей степени (10–20% поверхности легких). Максимальный титр вируса гриппа 1:16 определялся у 4% животных на 7-е сутки после заражения. Результаты изучения патологического материала (легкие), выделенного у исследуемых животных, приведены в табл. 2.

На основании проведенных исследований установлено, что вирус гриппа А/Виктория не определялся у большинства животных (83,3%) группы О1. Эти данные свидетельствуют о том, что наибольший эффект от применения препарата "Криоцелл-гемокорд" выявляется в более короткий срок (2-е суток) от его введения до инфицирования животных. Однако противовирусный эффект препарата

groups. Lungs of the animals of experimental groups E1 and E2 were impaired slightly, only rare local bleedings were revealed. Maximum titer of influenza virus in murine lungs of these groups to the 5<sup>th</sup> day after infection was 1:8. Lungs of animals in the group E3 were damaged in a greater extent (10–20% of lungs surface). Maximum titer of influenza virus 1:16 was found in 4% of animals to the 7<sup>th</sup> day after infection. The results of the assessment of pathological material (lungs), isolated from the animals under investigation are shown in Table 2.

Basing on the carried-out studies it has been established that influenza virus A/Victoria was not found in the majority of animals (83.3%) of the group E1. These data testify to the fact that the highest effect of the application of "Cryocell-Haemocord" preparation is manifested if infection of animals was performed in a short period (48 hrs) from the preparation introduction. However, antiviral effect of preparation was preserved within a month, becoming slightly weaker.

During infection of mice with adapted to them influenza virus strains the infection process develops in their lungs causing, as a rule, hemorrhagic pneumonia with focal or confluent tissue "hepatization" [2]. Visual investigation of pathological material, isolated during experiment, confirms this. Hemorrhagic pneumonia injury of 60–90% pulmonary tissue was found macroscopically in animal lungs in the group C1.

Histological investigations of lung preparations in the control groups C2 and C3 revealed almost no

**Таблица 2.** Титр вируса в легких животных, зараженных вирусом гриппа после введения препарата "Криоцелл-гемокорд", в разные сроки исследования  
**Table 2.** Titer of virus in lungs of the animals infected with influenza virus after introduction of "Cryocell-Hemocord" preparation at different terms of study

Титр вируса (по РГА) Virus titer (HAR)	Распределение животных экспериментальных групп в зависимости от титра вируса, % Distribution of animals of experimental groups, depending on virus titer, %															
	2 суток 2 days				5 суток 5 days				7 суток 7 days				10 суток 10 days			
	О1 E1	О2 E2	О3 E3	К1 C1	О1 E1	О2 E2	О3 E3	К1 C1	О1 E1	О2 E2	О3 E3	К1 C1	О1 E1	О2 E2	О3 E3	К1 C1
Негативный Negative	83,3	77,8	58,4	0	72,2	66,7	51,2	0	94,4	80,0	68,0	0	100	100	93,0	–
1:2	16,7	16,7	26,4	0	11,1	16,7	28,2	7,2	5,6	13,3	12,8	0	0	0	7,0	–
1:4	0	5,5	15,2	11,1	9,7	11,1	15,0	12,0	0	6,7	10,0	0	0	0	0	–
1:8	0	0	0	17,2	7,0	5,5	5,6	8,7	0	0	5,2	12,0	0	0	0	–
1:16	0	0	0	21,8	0	0	0	23,4	0	0	4,0	18,1	0	0	0	–
1:32	0	0	0	27,6	0	0	0	28,4	0	0	0	34,1	0	0	0	–
1:64	0	0	0	22,3	0	0	0	20,3	0	0	0	35,8	0	0	0	–

**Примечание:** "–" – все животные погибли.

**Notes:** "–" – all animals died.

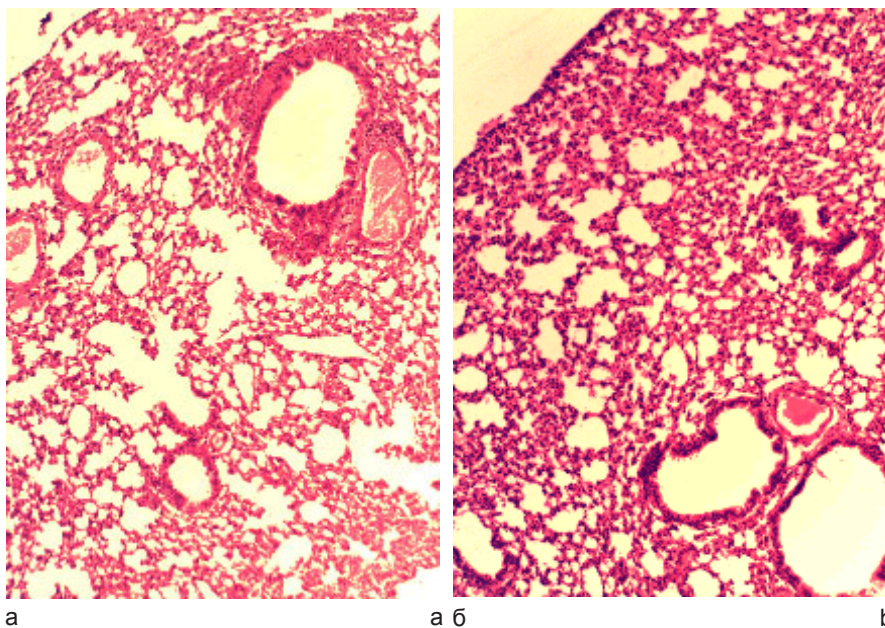


сохраняется на протяжении 1 месяца, становясь несколько слабее.

При заражении мышей адаптированными к ним штаммами вируса гриппа инфекционный процесс развивается у них в легких, вызывая, как правило, геморрагическую пневмонию с очаговым или сливным "опеченением" ткани [2]. Визуальное исследование патологического материала, выделяемого в ходе эксперимента, подтверждает это. Макроскопически в легких животных группы К1 определялось поражение геморрагической пневмонией 60–90% ткани легких.

При гистологическом исследовании препаратов легких контрольных групп животных К2 и К3 было установлено, что они практически не отличались между собой: в обоих случаях определялось нормальное строение этого органа. На препаратах обнаруживались участки легких с разрезами малых бронхов (рис. 1, а, б).

Паренхима легких имела ажурный вид вследствие того, что основную массу их составляли разрезы тонкостенных концевых альвеолярных мешочков (альвеол). Малые бронхи были выстланы кубическим эпителием. За их собственной оболочкой залегал слой гладких мышц. В подслизистом слое малых бронхов встречались отдельные небольшие пакеты желез. С уменьшением калибра бронхов железы абсолютно исчезали. Малые бронхи сопровождалась бронхиальными артериями, разрезы которых постоянно встречались около них. Легочные вены, содержащие в своих стенках большое количество гладких мышц, по своему строению были схожи с артериями, но проходили независимо от бронхов. Респираторные отделы легких (ацинусы) начинались респираторными (альвеолярными) бронхиолами, в которые переходили мельчайшие бронхи. Альвеолярные бронхиолы, являющиеся отделами ацинуса, которые были выстланы кубическим эпителием и чередовались с альвеолярными выпячиваниями, имели очень тонкую стенку. В стенках альвеолярных мешочков мышц уже не наблюдалось. Большая часть срезов легких была занята разрезами аль-



**Рис. 1.** Легкие мышей: а – через 5 суток после введения препарата "Криоцелл-гемокорд" (группа К2); б – интактные животные (группа К3). Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 100$ .

**Fig. 1.** Lungs of mice: a – in 5 days after introduction of "Cryo-cell-Hemocord" preparation (group C2); b – intact animals (group C3). Staining with hematoxylin and eosin,  $\times 100$ .

difference between them: in both cases the normal structure of the organ was observed. The sites of lungs with sections of small bronchi were found in preparations (Fig. 1a, b).

Lung parenchyma was of laced appearance as it was mainly composed of the thin-wall terminal alveolar sacs (alveoli) sections. Small bronchi were layered with cubic epithelium. The layer of smooth muscles was located beyond the bronchi coat. In submucous layer of small bronchi a single small gland bundles were found. With lessening of bronchi caliber the glands completely disappeared. Small bronchi were accompanied with bronchial arteries, the sections of which were constantly found nearby. Pulmonary veins, containing in their walls a big amount of smooth muscles, were similar with arteries by their structure, but were located independently on bronchi. Respiratory regions of lungs (acini) began with respiratory (alveolar) bronchioles and followed by smallest bronchi. Alveolar bronchioles being the parts of acinus were layered with cubic epithelium, interchanged with alveolar protrusion and had a very thin wall. No muscles were found in the walls of alveolar bags. The majority of lung sections were the cross-sections of alveolar pathways and terminal alveoli which were variously extended.

Sponge-like structure was preserved in 5 days only in small areas on the lung edge in parenchyma of the group C1 mice; however, alveoli in these areas were unevenly stretched, and the wall ruptures were obser-

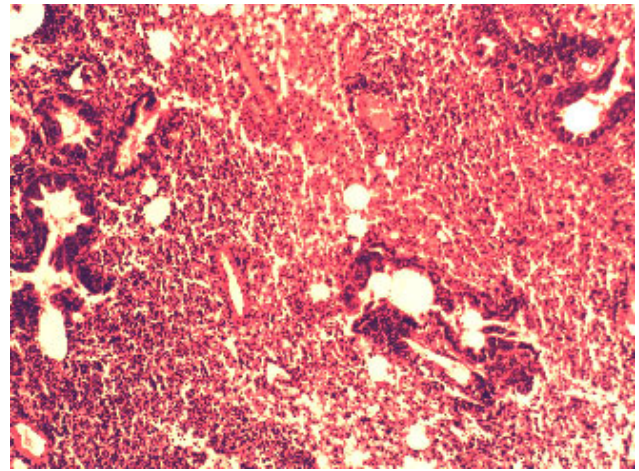


веолярных ходов и концевых альвеол, которые были растянуты в разной степени.

В паренхиме легких мышей группы К1 через 5 суток только на небольших участках по краям легких сохранялось губчатое строение, однако альвеолы в этих местах были неравномерно растянуты, часто наблюдались разрывы их стенок. Непрерывный эндотелий альвеолярных капилляров только в некоторых местах был сохранен. В большинстве случаев он слущивался и был плохо выражен. В результате отмечались заполнение альвеол кровью и множественные кровоизлияния. Обнаруживалась деструкция альвеол в центральных отделах легких, их "опеченение". Во внутрилегочных бронхах и бронхиолах разного калибра выявлялась десквамация эпителия. Стенки бронхиальных артерий и вен были истончены, наблюдались стазы кровеносных сосудов. В паренхиме легких отмечалась масса нуклеаров, среди них встречались сегментоядерные клетки и множество малых лимфоцитов, следовательно, имела место моноцито-лимфоцитарная инфильтрация (рис. 2).

К 10-м суткам после инфицирования вирусом гриппа все животные этой экспериментальной группы погибли.

В легких мышей групп О1 и О2 как на 5-е, так и на 10-е сутки обнаруживалось нормальное губчатое строение паренхимы органа (рис. 3, а; 4, а). Однако альвеолы были неравномерно то растя-



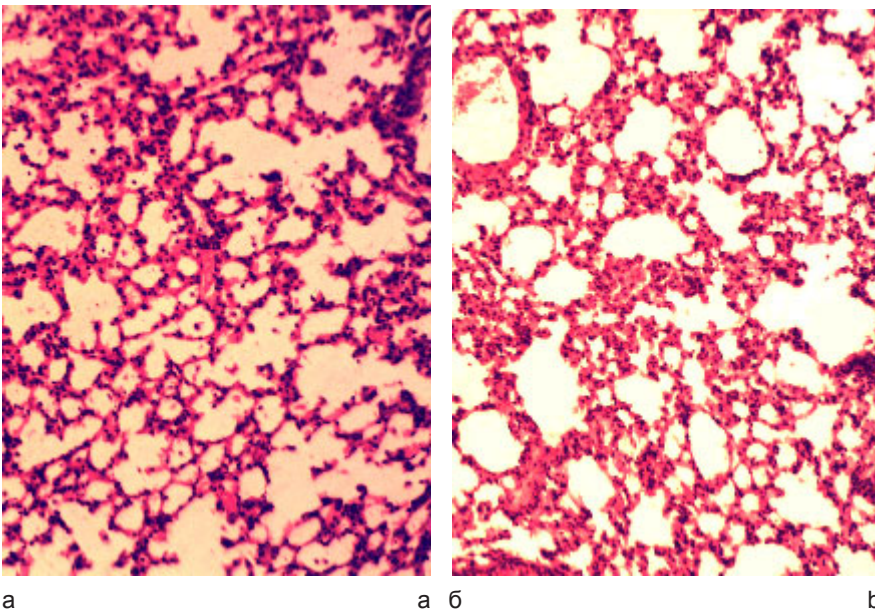
**Рис. 2.** Легкие мышей через 5 суток после заражения животных вирусом гриппа (группа К1). Окрасивание гематоксилином и эозином,  $\times 100$ .

**Fig. 2.** Lungs of mice in 5 days after infection of the animals with influenza virus (group C1). Staining with hematoxylin and eosin,  $\times 100$ .

ved. Continuous endothelium of alveolar capillaries was preserved only in some areas. In the most cases it was exfoliated and poorly manifested. The filling with blood alveoli as well as multiple hemorrhages were noted. The destruction of alveoli in central areas of lungs and their "hepatization" was observed. In intrapulmonary bronchi and bronchioles of different sizes the desquamation of epithelium was revealed. The walls of bronchial arteries and veins were thinned and the stases of blood vessels were observed. In lung parenchyma the bulk of nucleated cells was found, among them the segmented cells and a big number of small lymphocytes was noted, consequently, the monocyte-lymphocyte infiltration took place (Fig. 2).

To the 10<sup>th</sup> day after infection with influenza virus all the animals of this experimental group died.

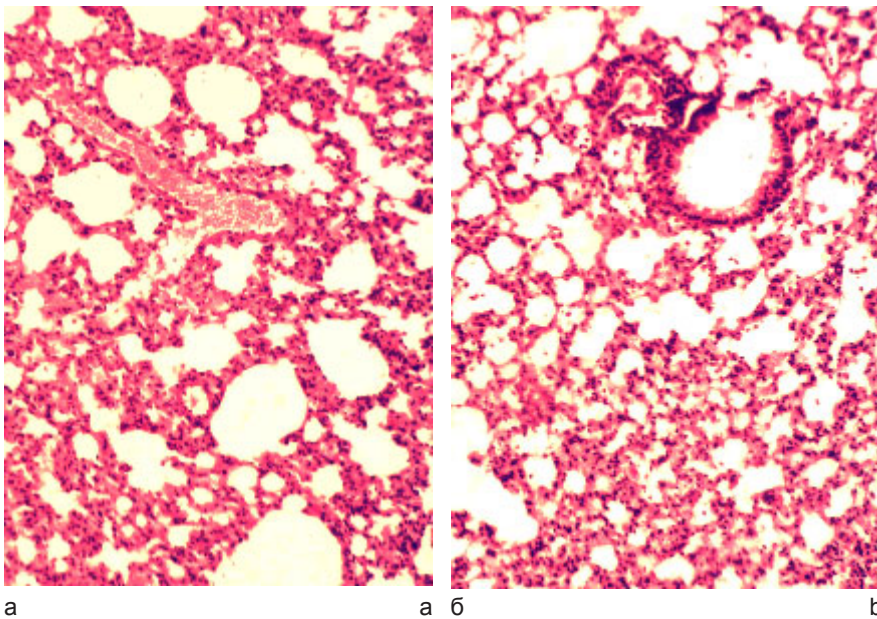
In lungs of mice of the groups E1 and E2 the normal sponge-like structure of organ parenchyma was observed to the 5<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> days (Fig. 3a; 4a). However, alveoli were unevenly sometimes stretched, sometimes narrowed, and rarely (only in some sites) the ruptures of their walls were noted. Endothelium of alveolar capillaries was mainly preserved. In alveolar pathways



**Рис. 3.** Легкие мышей: а – через 5 суток; б – через 10 суток после заражения вирусом гриппа животных (группа О1), которым за 2-е суток до этого был введен препарат "Криоцелл-гемокорд". Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 200$ .

**Fig. 3.** Lungs of mice: а – in 5 days; б – in 10 days after infection of the animals with influenza virus (group O1), which were introduced with "Cryocell-Haemocord" preparation 2 days prior. Staining with hematoxylin and eosin,  $\times 200$ .





**Рис. 4.** Легкие мышей: а – через 5 суток; б – через 10 суток после заражения вирусом гриппа животных (группа О2), которым за 7 суток до этого был введен препарат "Криоцелл-гемокорд". Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 200$ .

**Fig. 4.** Lungs of mice: a – in 5 days; b – in 10 days after infection of the animals with influenza virus (group O2), which were introduced with "Cryocell-Hemocord" preparation 7 days prior. Staining with hematoxylin and eosin,  $\times 200$ .

нуты, то сужены, редко (лишь в некоторых местах) наблюдались разрывы их стенок. Эндотелий альвеолярных капилляров преимущественно был сохранен. В альвеолярных ходах изредка отмечались небольшие скопления эритроцитов (рис. 4, а). Эпителий терминальных бронхиол в некоторых местах был слущен (рис. 3, б; 4, б). В паренхиме легких отмечалась слабая моноцито-лимфоцитарная инфильтрация. Стенки кровеносных сосудов были несколько истончены, в некоторых из них наблюдались стазы. На внутренней поверхности альвеол и в их полости встречались относительно крупные клетки с включениями фагоцитированных частиц – альвеолярные макрофаги.

При гистологическом исследовании паренхимы легких мышей группы ОЗ, которых заражали вирусом гриппа через 30 суток после интраназального введения препарата "Криоцелл-гемокорд", на 5-е и особенно на 10-е сутки отмечалось более или менее губчатое ее строение. Альвеолярные мешочки часто были сужены, наблюдались разрывы их стенок. Эндотелий альвеолярных капилляров только в некоторых местах был сохранен. В большинстве случаев он слущивался и был слабо выражен. При этом выявлялись участки паренхимы с "опеченением", где обнаруживалась моноцито-лимфоцитарная инфильтрация, а также дилатированные кровеносные сосуды с истонченной стенкой, заполненные эритроцитами. Изредка на-

a rare small aggregates of erythrocytes (Fig. 4a) were noted. Epithelium of terminal bronchioles in some sites was exfoliated (Fig. 3b; 4b). In lung parenchyma of lungs a slight monocyte-lymphocyte infiltration was found. The walls of blood vessels were somewhat thinned, in some cases the stases were found. On inner surface of alveoli and in their cavity a relatively large cells were found, the alveolar macrophages, having the inclusions of phagocytized particles.

Histological investigation revealed more or less spongy structure of parenchyma to the 5<sup>th</sup> day and especially to the 10<sup>th</sup> day in the lungs of group E3 mice infected with influenza virus in 30 days after intranasal introduction of the "Cryocell-Haemocord" preparation. Alveolar sacs

were often narrowed, their walls had ruptures.

Endothelium of alveolar capillaries was preserved only in some areas. In the most cases it was exfoliated and was slightly manifested. Herewith the parenchyma sites with "hepatization" were appeared, whereat the monocyte-lymphocyte infiltration was observed, as well as dilated blood vessels with thinned wall and filled with erythrocytes. Sometimes a slight bleedings were found. Alveolar macrophages were observed frequently on inner surface of alveoli (Fig. 5a). To the 10<sup>th</sup> observation day the lung parenchyma was slightly normalized. Alveolar sacs were somewhere narrowed, somewhere extended. Monocyte-lymphocyte infiltration (Fig. 5b) was slightly weakened. In most cases the epithelium of terminal bronchioles preserved its integrity.

### Conclusions

"Cryocell-Haemocord" preparation significantly reduces the titer of influenza virus in lungs and serum of peripheral blood providing the survival of the studied animals by 85–100%.

Preventive effect of the preparation is histologically manifested in the preservation of both sponge-like structure of pulmonary parenchyma due to maintenance of the alveolar wall integrity, and endothelium of alveolar capillaries and blood vessels, as well as in the reduction of inflammatory response in the lungs of the animals infected with influenza virus

блюдались небольшие кровоизлияния. На внутренней поверхности альвеол часто встречались альвеолярные макрофаги (рис. 5, а). К 10-м суткам наблюдения паренхима легких несколько нормализовалась. Альвеолярные мешочки местами были сужены, местами – растянуты. Несколько ослабевала моноцито-лимфоцитарная инфильтрация (рис. 5, б). В большинстве случаев эпителий терминальных бронхиол сохранял свою целостность.

### Выводы

Препарат "Криоцелл-гемокорд" значительно снижает титр вируса гриппа в легких и сыворотке периферической крови, обеспечивая выживаемость исследуемых животных на 85–100%.

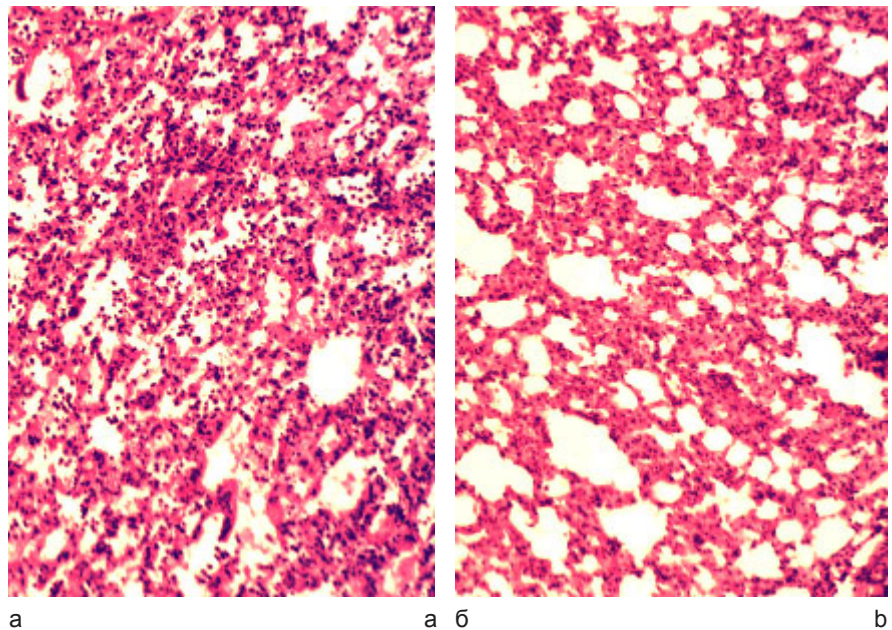
Профилактическое действие препарата гистологически выражается в сохранности губчатого строения паренхимы легких за счет сохранения целостности альвеолярных стенок, эндотелия альвеолярных капилляров и кровеносных сосудов, а также в снижении воспалительной реакции в легких животных, зараженных вирусом гриппа после предварительного интраназального введения им препарата.

Эффективность препарата "Криоцелл-гемокорд" зависит от времени, которое прошло с момента его интраназального введения до инфицирования животных. Профилактическое действие препарата тем эффективнее, чем меньше времени проходит с момента его введения до заражения животных вирусом гриппа. Однако в течение 1 месяца этот эффект сохраняется.

Необходимо последующее изучение механизмов противовирусного действия препарата "Криоцелл-гемокорд" для его использования как неспецифического средства профилактики гриппа.

### Литература

1. Бровко О., Черноусова С., Желтякова І. Новий імунобіологічний протівірусний препарат кордової крові людини – "Гемокорд" // Молодь і поступ біології: Збірник тез IV Міжнарод. наук. конф. студентів і аспірантів. – Львів, 2008. – С. 297–298.



**Рис. 5.** Легкие мышей: а – через 5 суток; б – через 10 суток после заражения вирусом гриппа животных (группа О3), которым за 30 суток до этого был введен препарат "Криоцелл-гемокорд". Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 200$ .

**Fig. 5.** Lungs of mice: а – in 5 days; б – in 10 days after infection of the animals with influenza virus (group O3), which were introduced with "Cryocell-Haemocord" preparation 30 days prior. Staining with hematoxylin and eosin,  $\times 200$ .

after preliminary intranasal administration of the preparation.

Efficiency of "Cryocell-Haemocord" preparation depends on the time passed from the moment of its intranasal introduction prior to infection of the animals. Preventive effect of the preparation is the more efficient, the less time passed from the moment of its introduction prior to the infection of the animals with influenza virus. However during a month this effect has been kept.

The following study of the mechanisms of antiviral effect of "Cryocell-Haemocord" preparation for its use as non-specific mean of influenza prophylaxis is necessary.

### References

1. Brovko O., Chernousova S., Zheltyakova I. New immune biological antiviral preparation of human cord blood, "Hemocord" // Youth and Progress in Biology: Proc. of the 4th International Scientific Conference of Students and Post-Graduate Students. – Lviv, 2008. – P. 297–298.
2. Vozianova Zh. I. Infection and parasitic diseases. – Kyiv: Zdorovya, 2000. – Vol. 1. – 904 p.
3. Reference book on microbiological and virological research methods/ Ed. by M.O. Birger. – Moscow: Meditsyna, 1982. – 461 p.
4. Patent N31847A, IPC A01N1/02. Ukraine. Cryopreservation method of hemopoietic cord blood cells/ A.O. Tsutsayeva, V.I. Grischenko, O.V. Kudokotseva et al. Filed 05.11.1998; Publ. 15.12.2000. Bul. N7.



2. *Возіянова Ж.І.* Інфекційні та паразитарні хвороби.– Київ: Здоров'я, 2000.– Т. 1.– 904 с.
3. *Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования* / Под ред. М.О. Биргера.– М.: Медицина, 1982.– 461 с.
4. *Патент №31847А, МПК А01N1/02. Україна.* Спосіб кріо-консервування кровотворних клітин кордової крові / А.О. Цуцаєва, В.І. Грищенко, О.В. Кудокоцева та ін. Заявлено 05.11.1998; Опубл. 15.12.2000. Бюл. №7.
5. *Патент №21484, МПК А61K35/16. Україна.* Спосіб профілактики респіраторної вірусної інфекції /А.О. Цуцаєва, О.С. Онасенко, В.І. Грищенко та ін. Заявлено 06.10.2006; Опубл. 15.03.2007. Бюл. № 3.
5. *Patent N21484, IPCA61K35/16. Ukraine.* Prophylaxis method of respiratory viral infection/ A.O. Tsutsayeva, O.S. Onasenko, V.I. Grischenko *et al.* Filed 06.10.2006; Publ. 15.03.2007. Bul. N3.

*Accepted in 16.02.2010*

*Поступила 16.02.2010  
Рецензент Т.Ф. Петренко*