

Обоснование возможности использования эмбриональных нервных клеток при лечении органоспецифических аутоиммунных заболеваний

А.Н. ГОЛЬЦЕВ, Н.Н. БАБЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Stipulation of the Possibility to Use Embryonic Neuronal Cells when Treating Organospecific Autoimmune Diseases

GOLTSEV A.N., BABENKO N.N.

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

На модели аллергического энцефаломиелимита как экспериментального аналога рассеянного склероза (РС) изучали возможность лечения данной патологии внутрибрюшинным введением нативных и криоконсервированных эмбриональных нервных клеток (нЭНК и кЭНК соответственно). Установлено, что эффективность проведенной терапии определяется как морфофункциональным статусом трансплантатов, так и сроком их введения, то есть на 7-е или 14-е сутки развития патологического процесса. Отмечено, что кЭНК в отличие от нЭНК при введении имели особенности коррекции клинико-неврологического статуса животных, иммунорегуляторного индекса, киллерной активности спленоцитов и содержания мелкодисперсных циркулирующих иммунных комплексов (мЦИК) в сыворотке крови.

Ключевые слова: трансплантация эмбриональных нервных клеток, криоконсервирование, аллергический энцефаломиелит.

На моделі алергічного енцефаломієліту як експериментального аналога розсіяного склерозу вивчали можливість лікування даної патології внутрішньочеревинним введенням нативних і криоконсервованих ембріональних нервових клітин (нЕНК і кЕНК відповідно). Доведено, що ефективність проведеної терапії визначається як морфофункціональним статусом трансплантатів, так і терміном їх введення, тобто на 7-му або 14-ту добу розвитку патологічного процесу. Зазначено, що кЕНК на відміну від нЕНК при введенні мали особливості корекції клініко-неврологічного статусу тварин, імунорегуляторного індексу, кілерної активності спленоцитів і вмісту дрібнодисперсних циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові.

Ключові слова: трансплантатія ембріональних нервових клітин, криоконсервування, алергічний енцефаломієліт.

There was studied the possibility of this pathology treatment with intraperitoneal introduction of native and cryopreserved embryonic neuronal cells (ENCs) in the model of allergic encephalomyelitis as experimental analogue of multiple sclerosis (MS). The efficiency of performed therapy is established to be determined both by morphofunctional status of transplants and their introduction terms, i.e. to the 7th and 14th day of the pathological process development. It has been noted that cryopreserved ENCs (cENCs) in contrast to native ENCs (nENCs) during the introduction had correction peculiarities of clinical and neurological status of animals, immune regulatory index, killer activity of splenocytes and content of finely dispersed circulating immune complexes (fCIC) in blood serum.

Key words: transplantation of embryonic neuronal cells, cryopreservation, allergic encephalomyelitis.

Нарушения межклеточных взаимодействий в иммунной системе (ИС) и функционирования цитокиновой регуляторной сети при РС вызывают необходимость применять препараты, комплексно влияющие на механизмы иммунного ответа больных и обладающие возможностью нормализовать разбалансированную взаимосвязь между центральной нервной, иммунной и эндокринной системами. В настоящее время проходят клинические испытания препараты, воздействующие на различные звенья патогенеза РС [9, 16]. Механизм действия одних заключается в изменении соотношения противо- и провоспалительных цитокинов [16]. Другие нарушают образование тримолекулярного комплекса в системе антигенраспознающая клетка – Т-лимфоцит или способствуют выработке толерантности

Impairments of intercellular interaction in immune system (IS) and functioning of cytokine regulatory network at MS cause the necessity to apply the preparations, both affecting in complex the mechanisms of immune response of patients and possessing the possibility to normalize misbalanced relationship between central nervous, immune and endocrine systems. Nowadays there are in progress the clinical trials of preparations affecting different links of MS pathogenesis [9, 16]. Effect mechanism for some of them consists in the change of the ratio of anti- and proinflammatory cytokines [16]. Other impairs the formation of trimolecular complex in the antigen-recognizing cell-T-lymphocyte system or contributes to the production of tolerance to myelin (Copaxone, Teva, Israel) oral bovine myelin, T-cell vaccines). But anyway this therapy is directed to minimization of the

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

к миелину (Копаксон, Teva, Israel, оральный бычий миелин, вакцины Т-клеток). И все же такого рода терапия направлена на минимизацию последствий развития патологии без устранения истинной причины хронической сенсибилизации в отношении антигенных структур головного мозга. Уникальной способностью восстанавливать утраченные функции патологически измененных органно-тканевых структур мозга путем мобилизации его собственных резервных возможностей, восполнения утраченного морфологического субстрата обладают продукты эмбриофетоплацентарного комплекса (ПЭФПК), в частности донорские эмбриональные нервные клетки (ЭНК) [6,17]. Возможность этими клетками продуцировать такие биологически активные вещества, как эндорфины, ростовые факторы и т.д., обеспечивает их собственное выживание и стимуляцию регенерации поврежденных тканей реципиента *in situ*, а также модуляцию генерального состояния иммунокомпетентной сферы [11,14]. Таким образом, ПЭФПК потенциально способны в конкретных условиях состояния организма реципиента отвечать на “запрос ситуации”, а эффективность реализации этого биологического потенциала зависит от их исходного структурно-функционального статуса. Этот тезис важен в том плане, что использование подобного рода терапии в клинической практике связано с проблемой криоконсервирования проспективных трансплантатов. Следовательно, оценка в сравнительном аспекте терапевтической эффективности нативного и криоконсервированного материала является весьма актуальной.

Цель данной работы – изучение особенностей влияния трансплантируемых нЭНК и кЭНК на клинические и иммунологические показатели крыс с индуцированным экспериментальным аллергическим энцефаломиелитом (ЭАЭ) – аналогом РС человека [10].

Материалы и методы

Исследования выполнены на 140 белых беспородных крысах-самцах массой 160-180 г. ЭАЭ индуцировали введением в подушечки лап гомогената аллогенной ткани спинного мозга, эмульгированной в полном адьюванте Фрейнда по методу Давыдовой [7]. Тяжесть клинических проявлений оценивали по пятибалльной шкале [8]. ЭНК 11-и суток гестации криоконсервировали по методу, описанному в [4], и вводили как и нативные на 7-е и 14-е сутки развития ЭАЭ внутрибрюшинно в дозе 5×10^6 клеток на 100 г массы животного. Контролем служили животные, которым вводили физиологический раствор, а также бесклеточную фракцию ЭНК-супернатант ЭНК (сЭНК). Для получения сЭНК суспензию выделенных ЭНК

consequences of pathology development without elimination of a true cause of chronic sensibilization in respect of brain antigen structures. The unique capability to recover the lost functions of the pathologically changed brain organ-tissue structures by mobilization of its own reserve possibilities, the filling-up of lost morphological substrates is possessed by the products of embryo fetoplacental complex (PEFPC), in particular donor embryonic neuronal cells (ENCs) [6, 17]. The possibility to produce with the help of these cells the biologically active substances, such as endorphins, growth factors etc, provides their own survival and stimulation of regeneration in damaged tissues of a recipient *in situ*, as well as modulation of immune competent sphere general state [11, 14]. Thus under certain states of a recipient's organism the PEFPC are potentially capable of responding the “situation request” and the efficiency of this biological potential realization depends on their initial structural and functional status. This statement is very important in the aspect, that the usage of such a therapy in clinical practice is related to the cryopreservation problem of prospective transplants. Consequently, the estimation in a comparative aspect of therapeutic efficiency of native and cryopreserved material is very actual.

The aim of this work was to study the peculiarities of the effect of nENCs and cENCs being transplanted on clinical and immunological indices for rats with an induced experimental allergic encephalomyelitis (EAE), the analogue of human MS [10].

Materials and Methods

The investigations were carried out in 140 white breedless male rats of 160-180g. EAE was induced by the injection into paws of the allogeneic spinal tissue homogenate, suspended in a complete Freund's adjuvant according to the method of Davydova [7]. The severity of clinical manifestations was estimated according to five-grade scale [8].

ENCs of 11-days gestation term were cryopreserved by the method described previously [4] and were introduced both as native to the 7th and 14th days of EAE development intraperitoneally in the dose of 5×10^6 cells per 100 g of animals' mass. The animals, injected with physiological solution as well as cell-free fraction of ENCs, ENCs supernatant (sENCs) served as the control. To obtain sENCs the suspension of isolated ENCs was divided into aliquots in respect of 9×10^6 cells/ml per animal of 180 g mass and then was subjected to multiple freeze-thawing. Afterwards the suspension was centrifuged at 1000g for 15 min and the supernatant was used for further investigations.

The concentration of fCIC in blood serum was assessed by precipitation method with 3.5% solution of polyethylene glycol (PEG) [15]. The number of

разливали по аликвотам из расчета 9×10^6 клеток/мл на животное массой 180 г и затем подвергали многократному замораживанию-оттаиванию. Далее суспензию центрифугировали при 1000g в течение 15 мин, надосадок использовали в дальнейших исследованиях.

Концентрацию мЦИК в сыворотке крови оценивали методом преципитации с 3,5%-м раствором полиэтиленгликоля (ПЭГ) [15]. Количество Т-хелперов и Т-супрессоров определяли с помощью ФИТЦ-меченых антикрысиных моноклональных антител (CALTAG, USA) к CD4 и CD8 структурам. Эффекторную активность мононуклеаров селезенки крыс оценивали по их цитотоксичности (индекс цитотоксичности – ИЦ), используя тест 18-часовой инкубации с эритроцитами кур [18]. Для установления фагоцитарной активности клеток перитонеальной полости (ПП) их инкубировали с суточной инактивированной культурой *Staphylococcus aureus* (1 млрд на 1 мл) в течение 1 ч при 37°C; определяли фагоцитарный индекс (ФИ) как процент фагоцитировавших клеток и фагоцитарное число (ФЧ) как число поглощенных клеткой кокков [1]. Адгезивный потенциал клеток ПП оценивали с помощью теста их прилипания к поверхности чашек Петри [12]. Характер патоморфологических изменений в спинном мозге после индукции ЭАЭ анализировали на гистологических срезах, окрашенных по методу Вейгерта [19]. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием критерия Стьюдента.

Результаты исследований

Первые клинические признаки ЭАЭ, выражающиеся потерей массы животных и нарастанием отека лап в местах введения энцефалитогенной смеси, наблюдались у крыс между 8-м и 10-м днем. Пик клинических проявлений в виде нарушений двигательной функции животных вследствие парезов задних, реже передних, конечностей был отмечен на 18-21-е сутки. Изменение клинко-неврологического состояния животных с ЭАЭ подтверждено и данными гистологических исследований. Прежде всего, на уровне пояснично-крестцовых сегментов спинного мозга появлялись очаги воспаления, инфильтрованные мононуклеарными клетками, и отмечалось разрушение миелиновой оболочки аксонов.

При оценке состояния клеточного звена иммунитета экспериментальных животных установлено, что на протяжении всего срока наблюдения (7-35-е сутки) имело место выраженное изменение содержания регуляторных Т-лимфоцитов в сравнении с контролем. В частности, снижалось относительное содержание как Т-хелперов (CD4⁺),

Т-хелперов и Т-супрессоров, что было обнаружено с помощью FITC-меченых моноклональных антител (CALTAG, USA) к CD4 и CD8 структурам. Эффекторная часть перитонеальных мононуклеаров была оценена по индексу цитотоксичности (ИЦ) с помощью теста инкубации с эритроцитами кур [18]. Для определения фагоцитарной активности клеток перитонеальной полости (П) они были инкубированы с 24-часовой инактивированной культурой *Staphylococcus aureus* (1 млрд на 1 мл) в течение 1 ч при 37°C; были определены фагоцитарный индекс (PhI) как процент фагоцитирующих клеток и фагоцитарное число (PhN) как число кокков, захваченных клеткой [1]. Адгезивный потенциал П клеток был оценен с помощью теста их прилипания к поверхности чашек Петри [12]. Характер патоморфологических изменений в спинном мозге после ЭАЭ индукции был проанализирован на гистологических срезах, окрашенных по методу Вейгерта [19]. Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием критерия Стьюдента.

Results

The first clinical signs of EAE, manifesting in the loss of animals' mass and enhance in the paws' oedema in the sites of encephalitogenic mixture injection were found in rats between the 8th and 10th days. The peak of clinical manifestations, expressing as a disorder in movement functions as a result of the low extremities' paresis, not so often there was noted the paresis of upper extremities to the 18th-21st day. The change in clinical and neurological state of animals with EAE was confirmed as well by the data of histological investigations. First of all, at the level of spinal lumbosacral segments there were appeared the inflammation foci, infiltrated with mononuclear cells and the destruction of myelin coat of axons was detected.

When estimating the state of immunity cellular link of experimental animals it has been established that within the whole observation term (the 7-35th day) there was a remarkable change in the content of regulatory T-lymphocytes in comparison with the control. In particular, the relative content of both T-helpers (CD4⁺) and T-suppressors (CD8⁺) reduced, however the change in latter was more significant, and the maximum of their reduction was to the 21st day, that is on the peak of manifestation of pathology clinical signs. Within this term the immune regulatory index (IRI) maximally (almost 4 times) exceeded the control index (Table 1). In a different way the killer activity of spleen mononuclears changed: the manifested reduction to the 7th day of EAE development (Fig. 1), its sharp strengthening to the 14th day with following decrease in IC, which however even to the 35th day of EAE was statistically higher than the control. Thus the fact of activation of immune competent cells (ICCs) of the effector link even at the stage of an acute period

так и Т-супрессоров (CD8⁺), однако изменение последних было более существенным, а максимум их снижения приходился на 21-е сутки, то есть на пик манифестации клинических признаков патологии. В этот срок иммунорегуляторный индекс (ИРИ) максимально (почти в 4 раза) превышал контрольный показатель (табл. 1). Иначе изменялась киллерная активность мононуклеаров селезенки: выраженное снижение на 7-е сутки

development of pathology was accompanied with a disorder of the state of organ-tissue structures, that at the background of the reduction of the activity of suppressor cells (judging on their concentration) is quite logical and natural state of IS under conditions of the development of autoimmune diseases (AIDs). It is important that within the period of remission (the 28th day) and following clinical recovery of animals (the 35th day) there was kept the tendency to a decrease in

Таблица 1. Относительное содержание Т-хелперов и Т-супрессоров в селезенке крыс с ЭАЭ до и после введения ЭНК

Table 1. Relative content of T-helpers and T-suppressors in spleen of rats with EAE before and after ENC introduction

Показатели Indices	Введение ЭНК, сут ENC introduction, day	Группы Groups	Развитие ЭАЭ, сут EAE development, days					
			7-е 7th	14-е 14th	21-е 21st	28-е 28th	35-е 35th	
Т-хелперы CD4 ⁺ , % Контроль 31,25±1,34 T-helpers CD4 ⁺ , % Control 31.25±1.34	—	ЭАЭ ЕАЭ	21,8±1,2 ¹	15,0±0,9 ¹	16,2±1,4 ¹	14,7±1,8 ¹	13,9±2,1 ¹	
	На 7-е сутки To 7th day	+ нЭНК + нENC	—	14,1±1,6 ¹	15,3±1,9 ¹	14,5±0,9 ¹	13,4±2,1 ¹	
		+ кЭНК + сENC	—	20,3±3,5 ^{1,2}	25,1±2,4 ^{1,2}	30,5±3,1 ^{1,2}	15,1±1,4 ¹	
		+ сЭНК + sENC	—	15,1±0,7 ¹	12,2±0,8 ¹	12,1±1,2 ¹	10,7±0,6 ¹	
	На 14-е сутки To 14th day	+ нЭНК + нENC	—	—	14,2±0,5 ¹	24,1±3,7 ¹	8,31±0,9 ¹	
		+ кЭНК + сENC	—	—	29,2±4,1 ²	32,2±3,6 ²	22,2±1,6 ^{1,2}	
		+ сЭНК + sENC	—	—	19,2±1,4 ¹	25,2±2,3 ¹	35,6±4,2	
	Т-супрессоры CD8 ⁺ , % Контроль 25,24±2,53 T-suppressors CD8 ⁺ , % Control 25.24±2.53	—	ЭАЭ ЕАЭ	13,9±1,2 ¹	8,3±0,81	3,6±0,6 ¹	12,7±1,2 ¹	11,3±1,1 ¹
		На 7-е сутки To 7th day	+ нЭНК + нENC	—	10,2±0,7 ¹	5,2±0,4 ¹	10,3±2,1 ¹	10,6±0,8 ¹
+ кЭНК + сENC			—	15,4±0,8 ^{1,2}	20,2±1,6 ^{1,2}	15,9±0,7 ^{1,2}	12,2±1,5 ¹	
+ сЭНК + sENC			—	12,2±0,71	10,1±0,3 ¹	7,6±0,5 ¹	7,8±0,1 ¹	
На 14-е сутки To 14th day		+ нЭНК + нENC	—	—	15,2±1,9 ¹	21,3±2,2	8,6±1,4 ¹	
		+ кЭНК + сENC	—	—	32,1±3,1 ^{1,2}	22,5±2,7	17,3±1,8 ^{1,2}	
		+ сЭНК + sENC	—	—	7,7±0,2 ¹	19,2±1,6 ¹	9,4±0,6 ¹	
ИРИ, CD4 ⁺ /CD8 ⁺ Контроль 1,24±0,2 IRI, CD4 ⁺ /CD8 ⁺ Control 1.24±0.2		—	ЭАЭ ЕАЭ	1,53±0,3 ¹	1,80±0,1 ¹	4,45±0,7 ¹	1,18±0,3	1,17±0,2
		На 7-е сутки To 7th day	+ нЭНК + нENC	—	1,39±0,2	2,96±0,3 ¹	1,4±0,2	1,28±0,1
	+ кЭНК + сENC		—	1,32±0,1	1,25±0,2 ²	1,29±0,2	1,24±0,2	
	+ сЭНК + sENC		—	1,24±0,1	1,2±0,1	1,61±0,31	1,37±0,3 ¹	
	На 14-е сутки To 14th day	+ нЭНК + нENC	—	—	0,93±0,1 ¹	1,13±0,1	0,97±0,1 ¹	
		+ кЭНК + сENC	—	—	0,91±0,1 ¹	1,43±0,2	1,28±0,2	
		+ сЭНК + sENC	—	—	2,49±0,8 ¹	1,31±0,1	3,78±0,5 ¹	

Примечания: ¹ – различия статистически достоверны (p<0,05) по сравнению с контрольными показателями;
² – различия статистически достоверны (p<0,05) по сравнению с показателями группы с введением нЭНК

Notes: ¹ – differences are significant (p<0.05) comparing to control values;
² – differences are significant (p<0.05) comparing to values of group with nENC introduction.

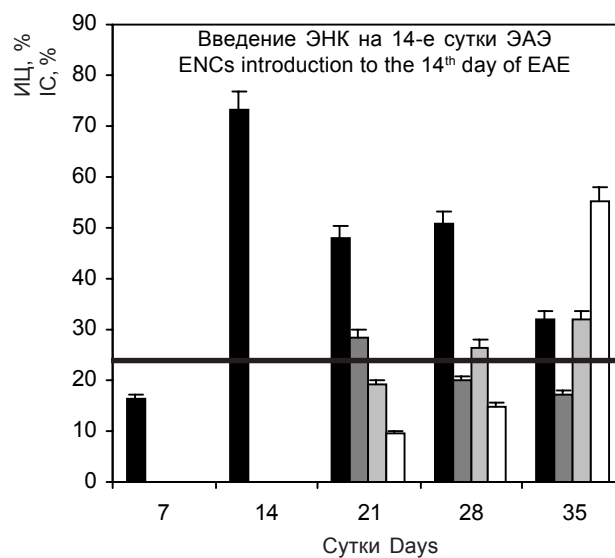
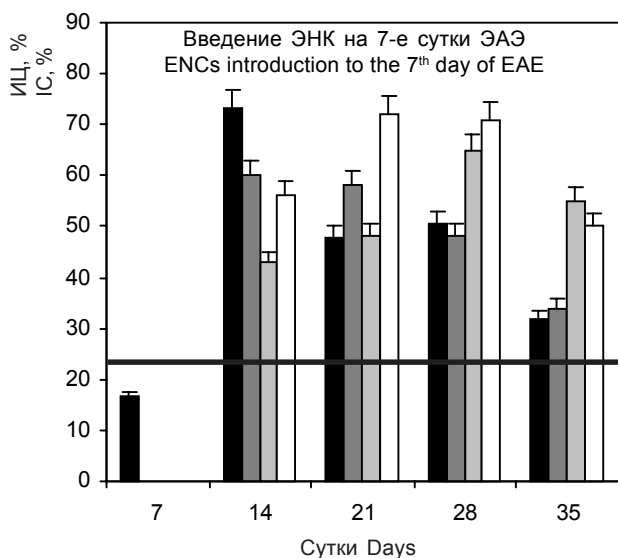


Рис.1. Динамика изменения естественной киллерной активности спленоцитов крыс после введения ЭНК.
 ■ – ЭАЭ; ■ – ЭАЭ+nЭНК; □ – ЭАЭ+kЭНК; □ – ЭАЭ+cЭНК.

Fig. 1. Dynamics of the change in natural killer activity of rat's splenocytes after ENCs introduction.
 ■ – EAE; ■ – EAE+nENC; □ – EAE+kENC; □ – EAE+sENC.

развития ЭАЭ (рис.1), резкое ее усиление к 14-м суткам с последующим снижением ИЦ, который, однако, даже на 35-е сутки ЭАЭ оставался достоверно выше контроля. Таким образом, факт активации иммунокомпетентных клеток (ИКК) эффекторного звена уже на этапе острого периода развития патологии сопровождался нарушением состояния органно-тканевых структур, что на фоне снижения активности супрессорных клеток (судя по их концентрации) является вполне логичным и закономерным состоянием ИС в условиях развития аутоиммунных заболеваний (АИЗ). Важно, что в период ремиссии (28-е сутки) и последующего клинического выздоровления животных (35-е сутки) поддерживалась тенденция к снижению повышенной активности естественных киллеров (ЕК), что наряду с изменениями других показателей свидетельствует о минимизации выраженности аутоиммунного процесса. Так, снижение активности ЕК селезенки может быть результатом изменения содержания провоспалительного цитокина $INF-\gamma$ – классического активатора ЕК [23]. Отмечалось, что АИЗ являются патологией всего организма [5], подчеркивая “заинтересованность” различных компарментов ИС и в развитии ЭАЭ. Действительно, к 7-м суткам заболевания количество клеток ПП существенно снижалось (на 56%) по сравнению с контролем (табл.2). Такого рода изменения показателя могут характеризовать генерализованный ответ ИКК на развивающийся патологический процесс и на начальных этапах его развития интенсивную их миграцию из ПП в участки непосредственного взаимодействия со специфическими структурами в ЦНС, чему может

an increased activity of natural killers (NKs), that together with the changes of other indices testifies to a minimization of manifested autoimmune process. So, the reduction in the activity of spleen NKs can result from the change in the content of pro-inflammatory cytokine $INF-\gamma$, classic activator of NKs [23]. There was noted that AIDs was the pathology of the whole organism [5], emphasizing the “interest” of all the compartments of IS in the EAE development as well. Actually, to the 7th day of the disease the number of PC cells considerably reduced (by 56%) in comparison with the control (Table 2). Such changes of the indices can characterize the generalized response of ICCs on developing pathological process and at the initial stages of its development their intensive migration out of PC to the sites of direct interaction with specific structures in CNS, that can be contributed by the impairment in permeability of blood brain barrier (BBB) under this pathology [26]. The rise in the content of cells in PC to the 14th-21st days up to the control level can be the consequence both of their proliferation activation *in situ* and the migration of cells of monocyte-macrophage series out of bone marrow. It is evident that these cells express the differing from mature cells repertoire of adhesion molecules, because the obtained data testify to a low content to the 14th day of relative number of PC adhesive cells (PCACs) (Table 2). To the 21st day of EAE development the number of PCACs increased more than 5 times in comparison with the 14th day, but anyway their content remained at lower level than in the control (53.1 ± 1.7 and 56 ± 0.7 , correspondingly, $p < 0.05$). It is known that the adhesion molecules of various classes is responsible for adhesive potential, and the adhesion degree of them is under the control of cytokine profile of an organism in a whole

Таблица 2. Показатели структурно-функциональной организации клеток ПП крыс до и после введения ЭНК
Table 2. Indices of structural and functional organization of rats' PC cells before and after ENC's introduction

Показатели Indices	Введение ЭНК, сут ENC introduction, day	Группы Groups	Развитие ЭАЭ, сут EAE development, days					
			7-е 7th	14-е 14th	21-е 21st	28-е 28th	35-е 35th	
Количество клеток ПП, 10 ⁶ Контроль 14,4±1,1 PC cell number, 10 ⁶ Control 14.4±1.1	—	ЭАЭ ЕАЭ	6,5±0,4 ¹	13,8±0,8	16,8±0,6 ¹	5,7±0,2 ¹	6,9±0,7 ¹	
	На 7-е сутки To 7th day	+ нЭНК + nENC	—	13,2±1,2	23,0±1,9 ¹	25,6±2,1 ¹	18,6±1,4 ¹	
		+ кЭНК + cENC	—	13,2±0,7	17,2±2,5 ^{1,2}	10,0±1,7 ^{1,2}	11,5±0,4 ^{1,2}	
		+ сЭНК + sENC	—	10,5±1,1 ¹	6,8±0,7 ¹	6,6±0,5 ¹	6,5±0,3 ¹	
	На 14-е сутки To 14th day	+ нЭНК + nENC	—	—	13,6±0,4	12,2±2,5	11,5±0,6 ¹	
		+ кЭНК + cENC	—	—	11,5±0,6 ¹	10,6±0,8 ¹	10,2±1,6 ¹	
		+ сЭНК + sENC	—	—	18,7±0,5 ¹	12,1±1,4	10,9±1,7 ¹	
	Количество АКПП, % Контроль 56,7±0,7 Number of PC ACs, % Control 56.7±0.7	—	ЭАЭ ЕАЭ	23,1±1,9 ¹	15,6±0,2 ¹	53,1±1,7 ¹	79,1±2,1 ¹	47,1±2,1 ¹
		На 7-е сутки To 7th day	+ нЭНК + nENC	—	26,7±1,9 ¹	46,8±7,9 ¹	50,7±4,5 ¹	44,5±2,4 ¹
+ кЭНК + cENC			—	85,0±9,7 ^{1,2}	83,6±9,5 ^{1,2}	67,8±7,1 ^{1,2}	40,9±5,8 ¹	
+ сЭНК + sENC			—	16,4±1,5 ¹	87,6±5,8 ¹	12,0±0,9 ¹	15,7±1,4 ¹	
На 14-е сутки To 14th day		+ нЭНК + nENC	—	—	53,6±2,8	59,2±7,4	24,5±3,7 ¹	
		+ кЭНК + cENC	—	—	41,6±2,1 ^{1,2}	50,6±8,2	35,6±4,3 ^{1,2}	
		+ сЭНК + sENC	—	—	77,1±2,9 ¹	69,9±3,9 ¹	57,8±4,8	
ФИ клеток ПП, % Контроль 38,8±0,8 PhI of PC cells, % Control 38.8±0.8		—	ЭАЭ ЕАЭ	11,0±0,5 ¹	9,0±0,5 ¹	25,1±1,1 ¹	48,6±2,3 ¹	47,2±1,1 ¹
		На 7-е сутки To 7th day	+ нЭНК + nENC	—	38,2±4,3	10,0±3,4 ¹	20,5±2,1 ¹	25,6±1,8 ¹
	+ кЭНК + cENC		—	56,1±7,5 ^{1,2}	15,4±5,9 ¹	62,8±9,5 ^{1,2}	20,5±1,5 ^{1,2}	
	+ сЭНК + sENC		—	29,4±8,2	20,7±1,8 ¹	30,5±3,4	30,0±2,4 ¹	
	На 14-е сутки To 14th day	+ нЭНК + nENC	—	—	48,0±0,2 ¹	40,8±1,4 ¹	52,4±4,8 ¹	
		+ кЭНК + cENC	—	—	52,1±0,3 ¹	30,8±2,2 ²	18,7±0,4 ^{1,2}	
		+ сЭНК + sENC	—	—	22,7±0,4 ¹	12,1±0,7 ¹	10,4±0,3 ¹	
	ФЧ клеток ПП, абс. ед., Контроль 5,3±0,3 PhN of PC cells, abs. units Control 5.3±0.3	—	ЭАЭ ЕАЭ	7,9±0,6 ¹	6,9±0,2	4,6±0,4	3,1±0,5 ¹	12,2±1,1 ¹
		На 7-е сутки To 7th day	+ нЭНК + nENC	—	3,5±0,3 ¹	3,3±0,2 ¹	7,2±0,4 ¹	10,5±0,7 ¹
+ кЭНК + cENC			—	5,0±0,6	10,5±0,7 ¹	7,1±0,3 ¹	10,3±0,5 ¹	
+ сЭНК + sENC			—	3,2±0,1 ^{1,2}	5,7±0,3 ²	10,6±0,7 ^{1,2}	8,6±0,2 ^{1,2}	
На 14-е сутки To 14th day		+ нЭНК + nENC	—	—	20,0±1,9 ¹	7,6±0,3 ¹	20,7±2,1 ¹	
		+ кЭНК + cENC	—	—	12,3±1,1 ^{1,2}	8,4±0,6 ¹	5,0±0,7 ²	
		+ сЭНК + sENC	—	—	5,1±0,1	5,1±0,3	8,3±0,2 ¹	

Примечания: ¹ – различия статистически достоверны (p<0,05) по сравнению с контрольными показателями;
² – различия статистически достоверны (p<0,05) по сравнению с показателями группы с введением нЭНК
Notes: ¹ – differences are significant (p<0.05) comparing to control values;
² – differences are significant (p<0.05) comparing to values of group with nENC introduction.

способствовать нарушению проницаемости гематоэнцефалического барьера при данной патологии [26]. Подъем содержания клеток в ПП к 14-21-м суткам до уровня контроля может быть следствием как активации их пролиферации *in situ*, так и миграции клеток моноцитарно-макрофагального ряда из костного мозга. Очевидно, эти клетки экспрессируют отличающийся от зрелых клеток репертуар молекул адгезии, так как полученные данные свидетельствуют о низком содержании на 14-е сутки относительного количества адгезивных клеток ПП (АКПП) (табл.2). К 21-м суткам развития ЭАЭ количество АКПП увеличивалось более, чем в 5 раз по сравнению с 14-ми сутками, но все же их содержание продолжало оставаться на более низком уровне, чем в контроле ($53,1 \pm 1,7$ и $56,7 \pm 0,7$ соответственно, $p < 0,05$). Известно, что за адгезивный потенциал ИКК отвечают различного класса молекулы адгезии, степень экспрессии которых находится под контролем цитокинового профиля организма в целом и *in situ* в частности [20,25]. Из этого следует, что отмеченное нами изменение адгезивного потенциала ПП подтверждает факт модуляции цитокинового фона при ЭАЭ. В этих условиях в ПП происходит изменение не только количественного содержания, но и качественных характеристик макрофагальных элементов в виде перераспределения их субпопуляционного состава и существенного изменения фагоцитарной способности, в частности ФИ и ФЧ. Так, ФИ на 7-14-е сутки снижался на 72-76% по сравнению с контролем, что совпадало с характером изменения адгезивной способности клеток ПП в эти же сроки развития патологии. В то же время ФЧ возрастало к 7-м суткам на 50%, а к 14-м – на 32,4%, что, очевидно, отражает компенсаторную реакцию фагоцитирующих клеток на снижение количественного их содержания. На 21-е сутки развития ЭАЭ отмечалось усиление как адгезивных свойств, так и ФИ клеток ПП.

Одним из характерных признаков развития хронического иммуновоспалительного процесса, включая и АИЗ, является накопление в организме ЦИК [21]. Считается, что чрезмерное их содержание вносит значительный вклад в повреждение тканей при РС [22], причем наиболее патогенными являются мЦИК. К 7-м суткам их количество увеличивалось в 10,2 раза по сравнению с контролем (рис.2), а к 14-м суткам хотя и существенно снижалось по сравнению с 7-ми сутками, однако продолжало оставаться выше уровня контроля. Уменьшение количества мЦИК в сыворотке крови может объясняться оседанием их на эндотелии сосудов “шоковых органов”, обуславливая реализацию их патогенного действия, тем более что выраженность клинических

and *in situ*, in particular [20,25]. This means that the found by us change in adhesive potential of PC confirms the fact of modulation of cytokine background at EAE. Under these conditions in PC there is not only the change in quantitative content, but also in qualitative characteristics of macrophagal elements as a redistribution of their subpopulational composition and considerable change in phagocyte ability, in particular, PhI and PhN. PhI to the 7-14th days reduced by 72-76% in comparison with the control, that coincided with the character of change in adhesive ability of PC cells at the same terms of pathology development. At the same time PhN increased to the 7th day by 50% and to the 14th day by 32%, that, apparently reflects the compensatory response of phagocytosing cells to the decrease in their quantitative content. To the 21st day of EAE development there was found the strengthening of both adhesive properties and PhI of PC cells.

One of the peculiar parameter of the development of chronic immune inflammatory process, AIDs including, is the accumulation of CIC in an organism [21]. There is a notion that their surplus content contributes greatly into tissue damage at MS [22], and the most pathogenic are fCIC. To the 7th day their number increased in 10.2 times in comparison with the control (Fig. 2) and to the 14th day even when the decrease was significant in comparison with the 7th day, but the number remained at higher level than the control one. The decrease in the amount of fCIC in blood serum can be explained by their sedimentation on the endothelium of “shock organs” vessels, stipulating the realization of their pathogenic action, moreover that the manifestation of EAE clinical signs enhanced to the 14th day. After some rise in the fCIC amount in serum to the 21st day there was found a further reduction on their number to the 28th day in 5 times and to the 35th day in 12 times in comparison with the 21st day. Such a decrease of fCIC content along with the improvement of clinical and neurological status of animals, distinctly correlates with a rise in total phagocyte activity of PC cells and can testify to the elimination of fCIC due to spontaneous activity of monocyte-phagocyte system (MPhS) in a whole in animals with an induced EAE.

Using the change in clinical and neurological status of animals as an integral index of the efficiency of ENC therapy it is necessary to note the successful application of cENCs both to the 7th and 14th days of pathological process development. At the same time when introducing nENCs to the 7th day of EAE (pre-clinical development phase) in 30% there were found the lethal outcomes of disease in 3-4 days after introduction (Fig. 3). The disease course of survived animals of this group was characterized with the manifestation of symptoms in 3.2-2.5 points up to the 20th day, phenomena of extremities' paralysis, acute

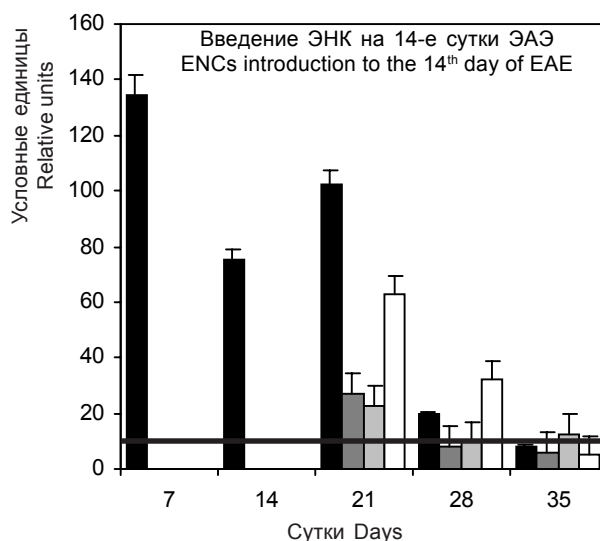
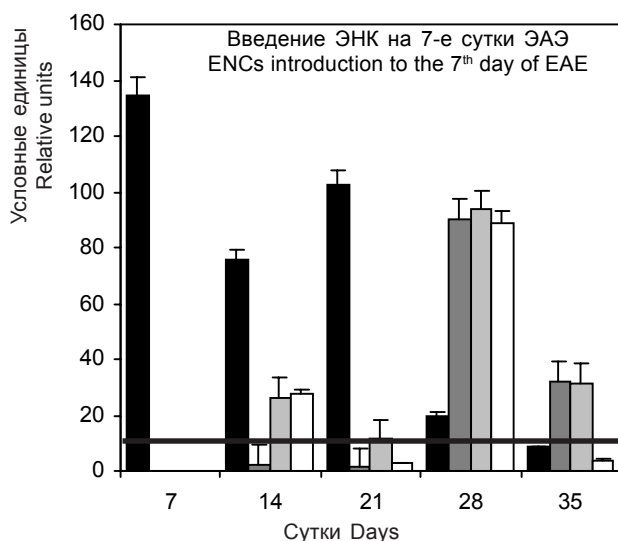


Рис.2. Динамика изменения содержания мЦИК в сыворотке крови крыс после введения ЭНК.
 ■ – ЭАЭ; ■ – ЭАЭ+нЭНК; □ – ЭАЭ+кЭНК; □ – ЭАЭ+сЭНК.

Fig. 2. Dynamics of the change in natural killer activity of rat's splenocytes after ENC's introduction.
 ■ – EAE; ■ – EAE+nENC; □ – EAE+kENC; □ – EAE+sENC.

признаков ЭАЭ нарастала к 14-м суткам. После некоторого повышения количества мЦИК в сыворотке на 21-е сутки отмечено дальнейшее снижение их количества к 28-м суткам в 5 раз, а к 35-м – в 12 раз по сравнению с 21-ми сутками. Такое снижение содержания мЦИК, наряду с улучшением клинико-неврологического статуса животных, четко коррелирует с повышением общей фагоцитарной активности клеток ПП и может свидетельствовать об элиминации ЦИК благодаря спонтанной нормализации деятельности моноцитарно-фагоцитарной системы (МФС) в целом у животных с индуцированным ЭАЭ.

Используя в качестве интегрального показателя эффективности терапии ЭНК изменение клинико-неврологического статуса животных, необходимо отметить успешность применения кЭНК как на 7-е, так и 14-е сутки развития патологического процесса. В то же время при введении нЭНК на 7-е сутки ЭАЭ (доклиническая фаза развития) в 30% отмечены смертельные исходы заболевания через 3-4 сут после введения (рис.3). Течение заболевания выживших животных данной группы характеризовалось проявлением симптоматики в 3,2-2,5 балла вплоть до 20-х суток, явлениями параличей конечностей, резким истощением животных и расстройством функций тазовых органов. Введение сЭНК на 7-е сутки ЭАЭ, хотя и не приводило к гибели крыс, но вызывало аггравацию неврологических симптомов до 3,5-4 баллов и резкое истощение вплоть до 17-х суток.

Динамика изменения тяжести клинической картины ЭАЭ при применении ЭНК на 14-е сутки патологического процесса носила качественно иной характер (рис.3). Уже через 3-е суток после

exhaustion of animals and disorder in pelvic organ functions. The introduction of sENCs to the 7th day of EAE, though did not result in rats' death, but caused the aggravation of neurological symptoms up to 3.5-4 points and a sharp exhaustion up to the 17th day.

The dynamics of the change in severity of EAE clinical picture when applying the ENC's to the 14th day of pathological process was of another quality (Fig. 3). Even in 3 days after introduction of both cENCs and nENCs there was found a rise in animals' mass together with simultaneous improvement of their general state, and to the 10-12th there was observed a complete recovery of clinical and neurological status. sENCs introduction to the 14th day of EAE development similar to the one to the 7th day, resulted in a significant and long-term aggravation of clinical picture of animals' disease in comparison with the group of non-treated animals. Thus the presented data testify to the fact that the success of carried-out treatment is determined not only by the type of treating material, but also the peculiarities of preliminary changes in a recipient's organism on the background of which the therapy is performed. Although the 7th day of EAE development is characterized with the absence of visible clinical and neurological impairments in animals, however this stage of diseases has already had the changes of both immunological (Table 1) and biochemical indices, for instance, the manifested activation of lipid peroxidation [3]. Actually the matter is an acute phase of immune inflammatory process manifestation at the stage of pre-clinical pathology development. To the 14th day there are appeared the EAE clinical signs, it looks like "visualization" of pre-existing changes in an organism.

введения как кЭНК, так и нЭНК отмечено увеличение массы животных с одновременным улучшением их общего состояния, а к 10-12-м суткам наблюдалось полное восстановление клинико-неврологического статуса. Введение сЭНК на 14-е сутки развития ЭАЭ, подобно введению на 7-е сутки, приводило к значительному и длительному ухудшению клинической картины заболевания животных по сравнению с группой животных, которым не вводили их. Таким образом, представленные данные свидетельствуют о том, что успех проводимого лечения определяется не только видом лечебного материала, но и особенностями предварительных изменений в организме реципиента, на фоне которых проводится терапия. Хотя 7-е сутки развития ЭАЭ характеризуются отсутствием видимых клинико-неврологических нарушений у животных, однако данной стадии заболевания уже присущи изменения как иммунологических (табл.1), так и биохимических показателей, например, выраженная активация перекисного окисления липидов [3]. Фактически речь идет об острой фазе манифестации иммуновоспалительного процесса на этапе доклинического развития патологии. К 14-м суткам проявляются клинические признаки ЭАЭ, происходит как бы “визуализация” предсуществующих изменений в организме.

Факт зависимости клинико-неврологического статуса животных, которым вводили ЭНК, от типа трансплантата и срока его введения подтверждается и изменением показателей состояния их иммунокомпетентной сферы. При изучении фенотипических характеристик Т-лимфоцитов селезенки отмечено, что при применении ЭНК на 7-е сутки развития ЭАЭ стабильная нормализация ИРИ как интегрального показателя субпопуляционного состава клеток селезенки наблюдалась только в группе с введением криоконсервированного материала (табл. 1). Важно, что концентрация CD4⁺ и CD8⁺-клеток (T_x, T_c соответственно) после введения кЭНК максимально приближалась к контрольным показателям. При введении кЭНК на 14-е сутки концентрация T_x и T_c нормализовалась уже на 21-е сутки ЭАЭ, то есть значительно быстрее, чем при введении нЭНК, хотя ИРИ в обоих случаях был примерно одинаковым (0,91 и 0,93 соответственно). Кроме того, до конца наблюдения у животных, которым вводили кЭНК, содержание обеих субпопуляций Т-клеток было на стабильном и близком к контролю уровне.

Ведущая роль в обеспечении механизмов резистентности организма отводится клеткам с киллерной активностью (ЕК-клеток). Они же могут участвовать и в реализации аутоиммунных реакций [23]. Активность этих клеток спустя неделю после

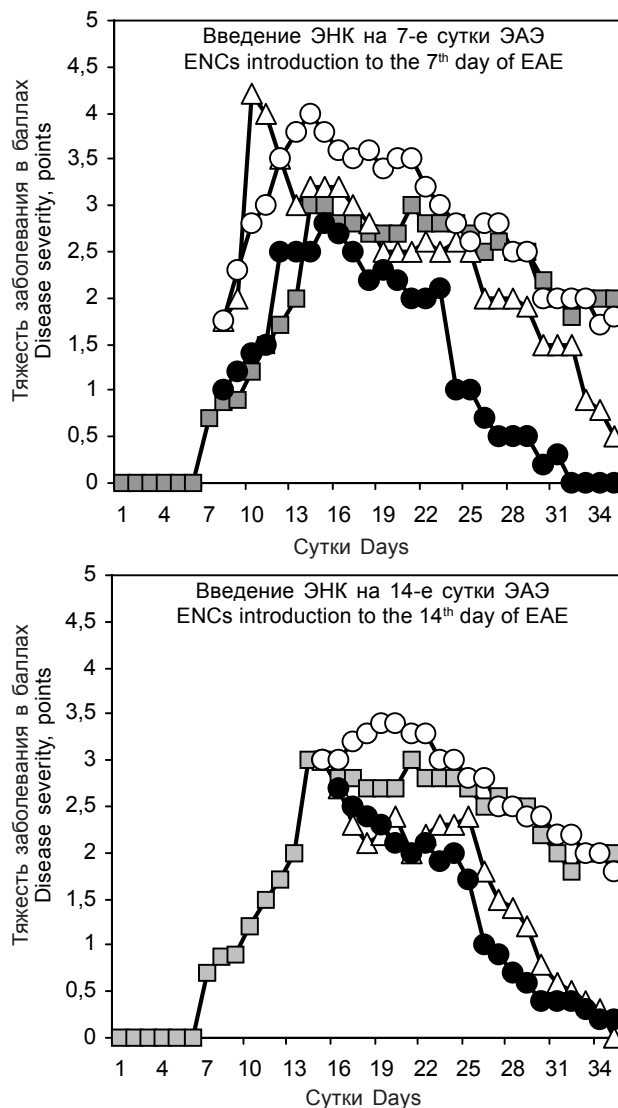


Рис. 3. Динамика изменения степени тяжести ЭАЭ до и после введения эмбрионального материала.

■ – ЭАЭ; ● – кЭНК; △ – нЭНК; ○ – сЭНК.
Fig. 3. Dynamics of the change in EAE severity before and after introduction of embryonic material.
 ■ – EAE; ● – cENC; △ – nENC; ○ – sENC.

The fact of dependency of clinical and neurological status of animals treated with ENC on the transplant type and the term of its introduction is confirmed with the change in the indices of state of their immune competent sphere as well. When studying the phenotypic characteristics of spleen T-lymphocytes there was noted, that when applying ENC to the 7th day of EAE development the stable normalization of IRI as an integral index of subpopulational composition of spleen cells was observed only in the group with introduced cryopreserved material (Table 1). It is important that the concentration of CD4⁺ and CD8⁺-cells (T_{help}, T_{suppr}, correspondingly) after introduction of cENCs maximally approached to the control indices. When introducing cENCs to the 14th day the concentration of T_{help} and T_{suppr} normalized even to the 21st day of EAE, i.e. much more rapid than at

проведения терапии на 7-е сутки (см. рис. 1) несколько снижалась в сравнении с активностью клеток у животных с патологией, вне зависимости от вида трансплантата, а в остальные сроки отмечено даже ее повышение. Важно также, что характер изменения активности ЕК, особенно при введении ЭНК на 7-е сутки, не коррелировал со степенью изменения клинично-неврологического статуса крыс, хотя этот показатель в наибольшей степени изменялся в сторону нормальных величин (14-е, 21-е сутки) при введении кЭНК. Не исключено, что высокий уровень активности ЕК на 21-, 28- и 35-е сутки может отражать адаптационно-компенсаторные механизмы ИС в условиях некоррегированного развития хронического иммуновоспалительного процесса.

Вместе с тем выраженное снижение активности ЕК прослеживалось при введении нативного или криоконсервированного материала на 14-е сутки патологии (см. рис.1). Похоже, что активность этих клеток соподчинена функции Т-супрессоров, концентрация которых значительно выше при введении ЭНК на 14-е сутки, чем на 7-е. Подтверждает это тот факт, что при введении сЭНК на 14-е сутки активность ЕК была максимальной к 35-м суткам, когда ИРИ был значительно выше контрольного уровня, подчеркивая преобладание содержания Т-хелперов.

Изменение количества мЦИК после введения всех видов ЭНК на 7-е сутки (см. рис.2) имело волнообразный характер с различной степенью отклонения от уровня здорового организма. При введении их на 14-е сутки влияние кЭНК и нЭНК на содержание мЦИК было сходным, приближая этот показатель к норме уже на 21-е сутки и обеспечивая его на уровне контроля до конца срока наблюдения. Возможно, в этом случае эффект был обусловлен усилением активности клеток МФС, о чем свидетельствуют данные, представленные в табл.2.

Через неделю после введения животным как нативного, так и криоконсервированного материала общее число клеток ПП нормализовалось в отличие от животных, которым его не вводили (табл. 2). Однако относительно стабильно коррелировал этот показатель до конца срока наблюдения только криоконсервированный материал. Интересно, что количество АКПП в рассматриваемой группе оставалось достоверно выше контрольных значений вплоть до 28-х суток. В то же время введение обоих видов ЭНК на 14-е сутки обеспечивало долгосрочную коррекцию показателя количества клеток ПП, причем и количество АКПП восстанавливалось до контрольного уровня значительно быстрее. Изменение показателя ФИ при введении ЭНК на 7-е сутки носило явно

nENCs introduction, though IRI in both cases was approximately the same (0.91 and 0.93, correspondingly). In addition, to the end of observation term in animals which were treated with cENCs, the content of both subpopulations of T-cells was at the stable and close to the control level.

The leading role in providing the mechanisms of an organism resistance is given to the cells with killer activity (NK cells). They as well can participate in realization of autoimmune reactions [23]. The activity of these cells in a week after therapy performing (see Fig. 1) slightly reduced in comparison with the one of animals with pathology, not depending on the type of transplant, and in other terms even its rise was found.

It is important as well that the change character, especially when introducing ENCс to the 7th day, did not correlated with the degree of the change in clinical-neurological status of rats, though this index greatly changed towards the normal values (14th, 21st days) when introducing cENCs. It is not excluded that a high level of NK activity to the 21st, 28th and 35th days can reflect adaptation and compensatory mechanisms of IS under conditions of non-corrected development of chronic immune inflammatory process.

Along with this the manifested reduction of NK activity was traced when introducing native or cryopreserved material to the 14th day of pathology (see Fig. 1). It looks like that the activity of these cells is co-subjected to the function of T-suppressors, the concentration of which is significantly higher at the introduction of ENCс to the 14th day, than to the 7th day. It is confirmed by the fact that when introducing the sENCs to the 14th day the activity of NK was maximum to the 35th day, when IRI was considerably higher than the control level, emphasizing the predominance of T-helpers' content.

The change in the fCIC amount after introduction of all the types of ENCс to the 7th day (see Fig. 2) had a wave-like character with a various degree of deviation from the level of healthy organism. When introducing them to the 14th day the effect of cENCs and nENCs on the content of fCIC was the similar, approaching this index to the norm even to the 21st day and providing it at the control level up to the end of observation term.

The effect was likely stipulated by the strengthening of the activity of MPhS cells, that was confirmed with the data presented in Table 2.

In a week after introduction to the animals of both native and cryopreserved material, the total number of PC cells normalized in contrast to non-treated animals (Table 2). However just cryopreserved material corrected this index in almost stable way up to the end of observation term. It is interesting that the number of PCACs in the group under consideration remained statistically higher than control values up to the 28th day. At the same time the introduction of both

выраженный волнообразный характер, тогда как такая же особенность для изменения ФЧ была отмечена при введении кЭНК. Принципиально иной характер имела динамика изменения этих показателей в группах при трансплантации клеток на 14-е сутки. Если ФИ при введении нЭНК оставался на уровне выше контроля до конца срока наблюдения, то после трансплантации кЭНК показатель постепенно снижался до уровня в два раза меньше контрольного к 35-м суткам. Подобная картина наблюдалась и при оценке ФЧ, то есть интегральная фагоцитарная активность клеток ПП у реципиентов кЭНК была на протяжении 3-х недель после начала лечения ниже, чем у реципиентов нЭНК. Вместе с тем известно, что ИЛ-1 продуцируемый активированными клетками МФС, активирует субпопуляцию Т-хелперов [24]. В таком случае минимизация функционального состояния клеток МФС после трансплантации кЭНК в условиях развития ЭАЭ должна сопровождаться преобладанием противоположной Т-хелперам субпопуляции Т-супрессоров, что и находит подтверждение при оценке ИРИ (см. табл.1). Следовательно, функционально измененные ЭНК после криоконсервирования могут продуцировать иные, чем нативные клетки, профиль и количество регуляторных цитокинов и по-иному отвечать на “запрос ситуации” о необходимости коррекции состояния организма, в частности его ИС. Этот факт подчеркивает, что в реализации терапевтического эффекта ЭНК должное место занимают механизмы коррекции состояния МФС, а различная степень ее проявления находится в соответствии с данными [13], которые свидетельствуют, что экспрессия молекул адгезии и функциональный потенциал клеток МФС действительно существенно изменяются в условиях преформации цитокинового профиля организма.

Выводы

Полученные результаты демонстрируют экспериментально обоснованную возможность применения нЭНК и кЭНК для лечения нейродегенеративных заболеваний аутоиммунной природы в виде ЭАЭ. Динамическое развитие иммуновоспалительной реакции, в том числе и АИЗ, является каскадным процессом, на каждом этапе которого меняются многие параметры состояния иммунокомпетентной сферы, включая создаваемый ее субстратами цитокиновый профиль [3]. Очевидно, что на 7-е и 14-е сутки развития ЭАЭ этот профиль различен. Не вызывает также сомнения, что вводимые нами функционально активные ЭНК сами продуцируют широкий спектр цитокинов, а трансплантаты представляют собой мощные иммуномодуляторы [5, 11]. Известно, что

types of ENC_s to the 14th day provided a long-term correction of the index of PC cells' amount, and in this case the number of PCAC_s recovered up to the control level much more rapidly. The change in PhI parameter when introducing ENC_s to the 7th day had an evident wave-like character, meanwhile the same peculiarity for the PhI change was noted when introducing cENC_s. Absolutely another character was inherent to the dynamics of the change in these indices in the groups after cell transplantation to the 14th day. If PhI under nENC_s introduction was kept at the level higher than the control up to the end of observation term, then after transplantation of cENC_s the parameter gradually decreased down to the level twice less than the control to the 35th day. Similar picture was observed during the estimation of PhN, i.e. during 3 weeks after the treatment start an integral phagocyte activity of PC cells in recipients of cENC_s was lower, than in recipients of nENC_s. In addition it is known that IL-1 produced by MPhS activated cells activates the subpopulation of T-helpers [24]. In such a case the minimization of functional state of MPhS after transplantation with cENC_s under conditions of the EAE development should be accompanied with opposite to T-helpers of T-suppressors subpopulation, that is confirmed by IRI evaluation (see Table 1). Therefore the functionally altered ENC_s after cryopreservation can produce different from the native cells number of regulatory cytokines and in a different way respond to the “situation request” about necessary corrections of an organism state, in particular its IS. This fact emphasizes that in realization of therapeutic effect of ENC_s the proper place is taken by the mechanisms of the correction of MPhS state and various degree of its manifestation is in accordance with the data [13], testifying to the real change in the expression of adhesion molecules and functional potential of MPhS cells under conditions of preformation of an organism cytokine profile.

Conclusions

The obtained results demonstrate the experimentally stipulated opportunity to apply nENC_s and cENC_s the to treat neurodegenerative diseases of autoimmune origin as EAE. Dynamic development of immune inflammatory reaction, including AIDs, is the cascade process, at each stage of which lots of parameters of immune competent sphere change, including cytokine profile, created by its substrates [3]. It is evident, that to the 7th and 14th days of EAE development this profile is different. There is no doubt as well, that introduced by us functionally active ENC_s themselves produce a wide spectrum of cytokines and the transplants are represented as powerful immune modulators [5, 11]. It is known that the same cytokine is potentially capable of manifesting opposite activity from stimulation to

один и тот же цитокин потенциально способен проявлять оппозитную активность от стимуляции до ингибиции в зависимости от степени и характера антигенной нагрузки на ИС, а также фазы развития иммунного ответа [5]. Другими словами, проявление разной степени активности трансплантата ЭНК может определяться фазой развития иммуновоспалительной реакции, которая на 14-е сутки будет иметь более благоприятный профиль для проведения подобного рода терапии. Наличие позитивного эффекта криоконсервированных ЭНК как на 7-е, так и 14-е сутки развития ЭАЭ может свидетельствовать, во-первых, о селективном воздействии факторов криоконсервирования на ЭНК и соответственно спектр продуцируемых ими регуляторных медиаторов, и, во-вторых, о модификации антигенного спектра и иммуногенных свойств ЭНК после цикла замораживания-отогрева, что открывает новые возможности криобиологии в управлении исходными свойствами используемых тканевых биологически активных субстанций. Кроме того, время введения трансплантата оказывает решающую роль в успехе проводимой терапии ЭНК.

Литература

1. Александров М.Т., Кудрявицкий А.И., Румянцева Е.Г. и др. Метод вычисления абсолютных показателей фагоцитоза // Лаб. дело.– 1988.– №9.– С.30-33.
2. Гольцев А.Н. Возможные причины развития аутоиммунной патологии и поиск путей ее лечения // Пробл. мед. науки та освіти.– 1999.– №1.– С.22-37.
3. Гольцев А.Н., Овсянников С.Е., Козлова Ю.А. и др. Изучение характера взаимодействия между степенью развития аутоиммунных заболеваний и интенсивностью перекисного окисления липидов // Укр. біохім. журн.– 2002.– Т.74, №4а (додаток 1).– С.123.
4. Гольцев А.Н., Гурина Т.М., Бабенко Н.Н. и др. Влияние различных режимов криоконсервирования на некоторые характеристики эмбриональных нервных клеток // Пробл. криобиологии.– 2003.– №1, С.46-50.
5. 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.
6. Грищенко В.И., Гольцев А.Н., Бабенко Н.Н. Экспериментальный аллергический энцефаломиелит как возможная модель изучения механизма действия продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса при лечении аутоиммунных заболеваний // Пробл. криобиологии.– 2002.– №2.– С. 34-43.
7. Давыдова Г.С. Применение адьюванта с различным количеством БЦЖ для воспроизведения ЭАЭ у крыс: Острый энцефаломиелит в эксперименте и клинике.– Минск: Наука и техника.–1969.– С.32-37.
8. Жаботинский Ю.М., Иоффе В.И. Экспериментальные аллергические демиелинизирующие заболевания нервной системы.– Л.: Медицина, 1975.– 264 с.
9. Завалишин И.А., Жученко Т.Д., Переседова А.В. Патогенез и лечение рассеянного склероза (состояние проблемы на 2000 год) // Вестник РАМН.–2001.– №7.– С. 18-22.

inhibition depending on the degree and character of antigen loading to IS, as well as the development phase of immune response [5]. By other words, the manifestation of various degree of the activity of ENC's transplant can be determined by the phase of the development of immune inflammatory reaction, which to the 14th day will have more favourable profile for carrying-out the similar therapy. The presence of positive effect of cryopreserved ENC's both to the 7th and 14th day of EAE development can testify, first of all, to a selective effect of cryopreservation factors on ENC's and, correspondingly, the spectrum of produced by them regulatory mediators, and, secondly, about the modification of antigen spectrum and immunogenic properties of ENC's after the cycle of freeze-thawing, that opens new prospects in cryobiology in controlling the initial properties of used tissue biologically active substances. In addition, the time of transplant introduction plays a decisive role in the success of ENC's therapy being performed.

References

1. Aleksandrov M.T., Kudryavitsky A.I., Rumyantseva E.G. et al. Method for calculation of absolute indices of phagocytosis // Lab. Delo.– 1988.– N9.– P. 30-33.
2. Goltsev A.N. Possible causes of the development of autoimmune pathology and the search for its treatment ways // Probl. med. nauki ta osvity.– 2000.– N1 – P. 22-37.
3. Goltsev A.N., Ovsyannikov S.E., Kozlova Yu.A. et al. Study of the relationship character between the extent of the development of autoimmune diseases and the intensity of lipid peroxidation // Ukr. Biochim. Zhurn.– 2002.– Vol.74, N4a (ann. 1).– P. 123.
4. Goltsev A.N., Gurina T.M., Babenko N.N. et al. Effect of different cryopreservation regimens on some characteristics of embryonic neuronal cells // Problems of Cryobiology.– 2003.– N1.– P. 46-50.
5. Grischenko V.I., Goltsev A.N. Transplantation of the products of embryofetoplacental complex. From understanding of mechanism of the effect to increasing the efficiency of application // Problems of Cryobiology.– 2002.– N1.– P.54-84.
6. Goltsev A.N., Grischenko V.I., Babenko N.N. Experimental allergic encephalomyelitis as a probable model for studying the effect mechanism of the products of embryofetoplacental complex when treating autoimmune diseases // Problems of Cryobiology.– 2002, N2.– P. 34-43.
7. Davydova G.S. Application of adjuvant with various amount of BCG for EAE reproduction in rats // Acute encephalomyelitis in the experiment and clinic.– Minsk: Nauka i tekhnika.– 1969.– P. 32-37.
8. Zhabotinsky Yu.M., Ioffe V.I. Experimental allergic demyelinating diseases of nervous system.– Leningrad: Meditsina, 1975.– 264 p.
9. Zavalishin I.A., Zhuchenko T.D., Peresedova A.V. Pathogenesis and treatment of multiple sclerosis (state of the problem to 2000) // Vestnik Ros. Acad. med. nauk.– 2001, N7.– P. 18-22.
10. Zargarova T.A., Favorova O.O. Experimental autoimmune encephalomyelitis as the model of multiple sclerosis (state of the problem for 2000) // Vestnik Ros. Akad. med. nauk.– 2001.– N7.– P. 18-22.
11. Immune system of brain / Ed. by N.I. Lysyany.– Kiev, 1999.

10. Заргарова Т.А., Фаворова О.О. Экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит – модель рассеянного склероза // Иммунология.– 1999.– №2.– С.5-8.
11. Иммуная система головного мозга / Под ред. Н.И. Лисяного.– Киев, 1999.
12. Иммунология: Практикум / Е.У. Пастер, В.В. Овод, В.К. Позур, Н.Е. Вихоть.– Киев: Вища шк., 1989.– 304 с.
13. Кетлинский С.А., Калинина Н.М. Цитокины мононуклеарных фагоцитов в регуляции воспаления и иммунитета // Иммунология.– 1995.– №3.– С. 30-44.
14. Ключник Т.П. Нейротрофические факторы как возможное эффекторное звено при терапии с использованием фетальных клеток и тканей: Трансплантация фетальных тканей человека.– М., 1996, С. 103-108.
15. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под ред. В.В. Миньшикова.– М.: Медицина, 1987.– 365 с.
16. Левин О.С. Иммунотерапия рассеянного склероза // Рос. мед. журн.– 2001.– №6.– С. 48-52.
17. Лисяний М.І., Любич Л.Д., Маркова О.В., Бельська Л.М. Дослідження гуморальних аутоімунних реакцій до нейроспецифічних білків у разі експериментального алергічного енцефаломієліту на етапах патогенезу та імунокорекції аlogenною нервовою тканиною // Фізіол. журн.– 2002.– Т.48, №1.– С. 15-24.
18. Мельников О.Ф., Заяц Т.А. Сравнение радиоизотопного и спектрофотометрического методов определения цитотоксичности клеток // Лаб. диагностика.– 1999.– №1.– С. 43-45.
19. Меркулов Г.А. Курс патологоанатомической техники.– Л.: Медгиз, 1980.– 340 с.
20. Нестерова И.В., Колесникова Н.В. Цитокиновая регуляция и функционирующая система нейтрофильных гранулоцитов // Гематология и трансфузиология.– 1999.– Т.44, №2.– С. 43-47.
21. Роит А. Основы иммунологии./ Под ред. Р.Г. Василова, А.Ф. Киркина.– М., 1991.– 327 с.
22. Филлипович А.Н. Диагностика начального периода рассеянного склероза // Журнал неврологии и психиатрии.– 2003, №2.– С.49-50.
23. Чекнев С.Б. Естественная цитотоксичность в комплексе межклеточных взаимодействий // Вестник РАМН.– 1999.– №4.– С. 30-34.
24. Bellone G., Tinchieri G. Dual stimulatory and inhibitory effect of NC-cells stimulatory factor / IL-12 on human hematopoiesis // J. Immunol.– 1994.– Vol.153(1).– P. 930-937.
25. Cannella B., Raine C.S., Cannella B. et al. The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions // Ann. Neurol.– 1995.– Vol.37.– P. 424-435.
26. Graeber M.B. Microglia, macrophages and the blood brain barrier // Clin. Neuropathol.– 1993.– Vol.12.– P. 296-297.
27. Immunology: Practicum / E.U. Paster, V.V. Ovod, V.K. Pozur, N.E. Vyhot.– Kiev: Vyscha shkola, 1989.– 304 p.
28. Ketlinsky S.A., Kalinina N.M. Cytokines of mononuclear phagocytes in the regulation of inflammation and immunity // Immunologiya.– 1995.– N3.– P. 30-44.
29. Klyushnik T.P. Neurotrophic factors as possible effector link at the therapy with the usage of fetal cells and tissues // Transplantation of human fetal tissues.– Moscow, 1996.– P. 103-108.
30. Laboratory methods of investigations in clinic. Reference book / Ed. by V.V. Menshikov.– Moscow: Meditsina, 1987.– 365 p.
31. Levin O.S. Immune therapy of multiple sclerosis // Ros. Med. zhurn.– 2001.– N6.– P. 48-52.
32. Lysyany M.I., Lybych L.D., Markova O.B., Belska L.M. Investigation of humoral autoimmune reactions to neuro-specific proteins at allergic encephalomyelitis at the stages of pathogenesis and immune correction with allogeneic nerve tissue // Fiziol. zhurn.– 2002.– Vol.48, N1.– P. 15-24.
33. Melnikov O.F., Zayats T.A. Comparison of radio isotopic and spectrophotometrical methods for determining cell cytotoxicity // Lab. Diagnostika.– 1999.– P. 43-45.
34. Merkulov G.A. Course of pathoanatomical technique.– Leningrad: Medgiz, 1980.– 340p.
35. Nesterova I.V., Kolesnikova N.V. Cytokine regulation and functioning system of neutrophile granulocytes // Gematologiya i transfuziologiya.– 1999.– Vol.4, N2.– P. 43-47.
36. Reut A. Grounds of immunology / Ed. by R.G. Vasilov, A.F. Kirkin. Moscow: Mir, 1991.– 327 p.
37. Fillipovich A.N. Diagnosis of initial period of multiple sclerosis // Zhurn. neurologii i psihiiatrii.– 2003.– N2.– P. 49-50.
38. Cheknev S.B. Natural cytotoxicity in the complex of intracellular interactions// Vestnik RAMN.– 1999.– N4.– P. 30-34.
39. Bellone G., Tinchieri G. Dual stimulatory and inhibitory effect of NC-cells stimulatory factor / IL-12 on human hematopoiesis // J. Immunol.– 1994.– Vol.153(1).– P. 930-937.
40. Cannella B., Raine C.S., Cannella B. et al. The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions // Ann. Neurol.– 1995.– Vol.37.– P. 424-435.
41. Graeber M.B. Microglia, macrophages and the blood brain barrier // Clin. Neuropathol.– 1993.– Vol.12.– P. 296-297.

Accepted in 23.07.2003

Поступила 23.07.2003