

Предпосылки оптимизации метода криоконсервирования клеток костного мозга животных с аутоиммунной патологией

Ю.А. КОЗЛОВА, А.Н. ГОЛЬЦЕВ, Т.Г. ДУБРАВА, Т.М. ГУРИНА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Premises for Optimizing the Method of Bone Marrow Cryopreservation in Animals with Autoimmune Pathologies

Kozlova Yu. A., Goltsev A.N., Dubrava T.G., Gurina T.M.

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

Определены функциональные характеристики клеток костного мозга (КМ) здоровых животных и доноров с аутоиммунными заболеваниями (АИЗ) до и после криоконсервирования. Исследования показали, что независимо от вида аутоиммунной патологии максимальное количество кроветворных предшественников грануломоноцитопоеза (КОЕ-ГМ) сохраняется при криоконсервировании в КМ под защитой 7%-го диметилсульфоксида (ДМСО). Для клеток КМ интактных животных такой же степени сохранность КОЕ-ГМ была получена при использовании ДМСО в 10%-й концентрации.

Ключевые слова: костный мозг, аутоиммунные заболевания, КОЕ-ГМ.

Визначено, функціональні характеристики клітин кісткового мозку (КМ) здорових тварин і донорів з аутоімунними захворюваннями до і після криоконсервування. Дослідження показали, що незалежно від виду аутоімунної патології максимальна кількість кроветворних попередників грануломоноцитопоезу (КУО-ГМ) зберігається при криоконсервуванні в КМ під захистом 7%-го диметилсульфоксиду (ДМСО). Для клітин КМ інтактних тварин така ж цілість КУО-ГМ була одержана при використанні ДМСО в 10%-й концентрації.

Ключові слова: кістковий мозок, аутоімунні захворювання, КУО-ГМ.

There were determined the functional characteristics of bone marrow cells (BM) in healthy animals and donors with autoimmune diseases (AID) prior to and following cryopreservation. The studies demonstrated that independently on the type of autoimmune pathology, the maximum amount of hemopoietic precursors of granulomonocytopoiesis (CFU-GM) in BM was reached during its cryopreservation under the protection of 7% DMSO. For BM cells of intact animals the same integrity of CFU-GM was obtained when using DMSO in 10% concentration.

Key-words: bone marrow, autoimmune diseases, CFU-GM.

К современным методам лечения АИЗ относится трансплантация аутологичного КМ [12, 14]. Известно, что ее эффективность зависит от ряда факторов, в том числе гемопоэтического потенциала, который при пересадке аутологичных миелокариоцитов определяется степенью предшествующего влияния на организм лучевой и химиотерапии. Немаловажным в определении функционального статуса миелотрансплантата является также способ его заготовки и хранения. Разработаны режимы криоконсервирования миелокариоцитов здоровых доноров [6]. При АИЗ имеет место нарушение кроветворения, которое обусловлено как внутренним дефектом стволовых кроветворных клеток, так и функциональным нарушением стромального микроокружения, т.е. изменением интегральных характеристик структурно-функциональных параметров КМ [12,14]. Цель данной работы – сравнительное изучение характера влияния определенных режимов криоконсервирования на структурные и функциональные характеристики клеток КМ

Transplantation of autologous BM is related to modern methods for AID treatment [12, 14]. Its efficacy is known to depend on the series of the factors, and hemopoietic potential as well, which is determined by the degree of the preceding effect on an organism of X-ray and chemotherapy when transplanting the autologous myelocaryocytes. The way of a myelotransplant preparing and storage is of great importance too while determining its functional status. There were elaborated cryopreservation regimens for healthy donors' myelocaryocytes [6]. During AID the hemopoiesis impairment is known to occur, that may be caused both by an inner defect of hemopoietic stem cells and a functional failure of a stromal microenvironment, that is by the change of integral characteristics of structural and functional BM parameters [12, 14]. Comparative study of the effect character of certain cryopreservation regimens on structural and functional characteristics of BM cells in control (healthy) animals and those with AID: either adjuvant arthritis (AA) or experimental allergic encephalomyelitis (EAE) was the aim of the work.

Адрес для корреспонденции: Козлова Ю.А., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Перяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 772-01-04, факс: +38 (057) 772-00-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

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

контрольных (здоровых) животных и животных с АИЗ: адьювантным артритом (АА) и экспериментальным аллергическим энцефаломиелитом (ЭАЭ).

Материалы и методы

Исследования были выполнены на белых беспородных 5-6-месячных крысах-самцах массой 160-180 г. Все манипуляции с животными проведены согласно Международным принципам Европейской конвенции о защите позвоночных животных (Страсбург, 1985г.). Объектом исследования был КМ, взятый у животных в период клинической манифестации ЭАЭ (21-е сутки), иницированного по методу Давыдовой [3], и АА (14-е сутки), иницированного субплантарным введением полного адьюванта Фрейнда. Контролем служил КМ здоровых животных. Миелокарициты вымывали из бедренных костей средой 199 с добавлением 10%-й эмбриональной телячьей сыворотки и 2%-го цитрата натрия, криоконсервировали в той же среде под защитой 5-, 7-, 10%-го ДМСО (в конечной концентрации) по программе медленного замораживания до -40°C со скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ с последующим погружением в жидкий азот в пластиковых криоконтейнерах фирмы Nunc. Количество клеток КМ всех групп животных доведено до одинаковой концентрации. Изучение влияния больших концентраций ДМСО на клетки КМ не входило в задачу данного исследования, поскольку согласно [7] они оказывают токсическое действие на их морфофункциональные свойства. Оттаивание суспензии проводили на водяной бане при температуре 41°C . Для интегральной оценки структурно-функционального потенциала деконсервированных миелокарицитов были выбраны методы адгезивной и фагоцитарной активности (ФА) клеток КМ [3]. Количество сохранных клеток в суспензии определяли с помощью суправитального красителя трипанового синего.

Для количественной оценки содержания КОЕ-ГМ использовали метод культивирования клеток КМ в полужидком агаре в концентрации 1×10^5 клеток/мл [11]. Культуру термостатировали при температуре 37°C в атмосфере с 5% CO_2 и 95% воздуха. Результаты учитывали на 14-е сутки культивирования, поскольку в [6] этот срок был обоснован как наиболее оптимальный для оценки функции КОЕ-ГМ, у которых наблюдается временная ингибция пролиферативной активности под действием криоконсервирования. Препараты учитывали под инвертированным микроскопом (увеличение $\times 40$). Эффективность колониеобразования (ЭКО) клеток КМ оценивали по общему количеству сформированных кластеров и колоний на 10^5 эксплантационных клеток. Полученные эксперимен-

Materials and methods

Investigations were performed in white mongrel 5-6 months' male rats with 160-180g mass. All the manipulations with animals were accomplished according to the International Principles of the European Convention on Vertebrates' Protection (Strasbourg, 1985). BM procured from animals at the period of EAE clinical manifestation (the 21st day) initiated by Davydova's method [3], and AA (the 14th day), initiated by subplantary injection of complete Freund's adjuvant served as the object under study. BM of healthy animals served as the control. Myelokaryocytes were washed-out from thighbones with 199 medium using 10% embryonic calf serum and 2% sodium citrate, cryopreserved in the same medium under the protection of 5, 7, 10% DMSO (under final concentration) according to the program of slow freezing down to -40°C with the rate of $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ with further immersion into liquid nitrogen in Nunc plastic cryocontainers. The amount of BM cells in all groups of animals was an equal concentration. We did not study the effect of higher DMSO concentrations on BM cells, as according to the data [7] they are known to affect toxically their morphofunctional properties. The suspension thawing was done in water bath at the temperature of 41°C . For the integral estimation of structural and functional potential of frozen-thawed myelokaryocytes there were chosen the methods of adhesive and phagocytic activity (PhA) of BM cells [3]. The amount of survived cells in suspension was determined using trypan blue supravital dye.

For a quantitative evaluation of the content of CFU-GM we used the method for BM cell culturing in semi-liquid agar in the concentration of 1×10^5 cells/ml [11]. The culture was thermostated under the temperature of 37°C in the atmosphere of 5% CO_2 and 95% air. The results were calculated to the 14th day of culturing, as earlier [6] this term was proved to be the optimum for CFU-GM estimation, in which there was observed a temporary inhibition of proliferative activity under cryopreservation effect. Preparations were calculated using an inverted microscope ($\times 40$ magnification). Colony forming efficacy (CFE) of BM cells was evaluated on the total amount of clusters and colonies formed per 10^5 explanted cells. Experimental data obtained were statistically processed using "Microsoft Excel 2000" electron tables.

Results and discussion

The data presented in Table 1 testify to the fact that BM cells of AID animals are characterized by an increased initial permeability for supravital dye comparing to BM cells of healthy animals. Following cryopreservation the maximum BM cell integrity of healthy animals, which did not significantly differ on the initial level, was noted when using 10% DMSO. Amount of BM cells in this group independently on

тальные данные статистически обрабатывались в электронных таблицах "Microsoft Excel 2000".

Результаты и обсуждение

Представленные в табл.1 данные свидетельствуют о том, что клетки КМ животных с АИЗ имели повышенную исходную проницаемость для суправитального красителя по сравнению с клетками КМ здоровых животных. После криоконсервирования максимальная сохранность клеток КМ здоровых животных, которая достоверно не отличалась от исходного уровня, отмечалась при использовании 10%-го ДМСО. Количество клеток КМ в этой группе, независимо от концентрации ДМСО, после криоконсервирования достоверно не отличалось от исходного уровня. В то же время максимальная сохранность клеток КМ доноров с АА и ЭАЭ была при использовании 7%-го ДМСО и составляла $75,30 \pm 2,34$ и $76,25 \pm 3,87\%$ соответственно. Та же тенденция наблюдалась при учете количества клеток КМ животных с данными патологиями.

Таким образом, уже на первом этапе оценки состояния КМ по данным суправитального окрашивания и количественного содержания ядерных клеток в исследуемых образцах, независимо от вида аутоиммунной патологии, установлено, что для криоконсервирования такого КМ оптимальной является 7%-я концентрация ДМСО.

Клетки макрофагально-фагоцитарной системы (МФС) активно участвуют в каскадно развивающемся воспалительном процессе [10]. Поэтому следующим этапом наших исследований было изучение ФА клеток КМ при АИЗ.

Необходимо отметить, что клетки КМ при исследуемых патологиях обладали различной ФА (табл.2). Так, при АА наблюдалось увеличение фагоцитарного индекса (ФИ) миелокариоцитов и снижение их фагоцитарного числа (ФЧ) по сравнению с контролем. Создается впечатление, что недостаточная способность клеток КМ фагоцитировать

DMSO concentration after cryopreservation did not differ on the initial level. At the same time the maximum integrity of BM cells in AA and EAE donors was while using 7% DMSO and made 75.3 ± 2.34 and $76.25 \pm 3.87\%$, correspondingly. The same tendency was observed when counting the number of BM cells in animals with these pathologies.

Thus even at the 1st stage of BM state evaluation according to the data of supravital staining and quantitative content of nucleated cells in the samples under study independently upon the type of autoimmune pathology the 7% DMSO concentration was found to be optimum for such a type of BM cryopreservation.

Macrophage-phagocyte system cells (MPhS) participate actively in a cascade-like inflammatory process [10]. The next step therefore was studying the PhA in BM cells at AID.

It should be noted that BM cells at the pathologies studied possessed different PhA. At AA we observed the increase of a phagocyte index (PhI) in myelokaryocytes and the decrease of phagocyte number comparing to the control. It looks like the lack of BM cell capability of phagocytizing the staphylococci was compensated by the rise of the amount of phagocytizing cells. Due to this fact the absolute index of myelokaryocytes' phagocyte activity (AIMPhA) did

Таблица 1. Сохранность и количество ядерных клеток КМ животных с АИЗ до и после криоконсервирования

Table 1. Integrity and number of BM nucleated cells in AID animals prior to and following cryopreservation

Клетки КМ животных BM cells of animals	Показатель Index	До криоконсервирования Prior to cryopreservation	После криоконсервирования клеток КМ с ДМСО Following the cryopreservation BM cells with DMSO		
			5% - м	7% - м	10% - м
Здоровых (контроль) Of healthy animals (control)	Сохранность,% Integrity,%	$95,34 \pm 3,07$	$73,42 \pm 2,67^{1,5}$	$82,05 \pm 4,10^{1,4}$	$90,45 \pm 3,28^4$
	Количество клеток $\times 10^6$ /мл, Amount of cells $\times 10^6$ /ml	$6,35 \pm 0,30$	$6,00 \pm 1,18$	$5,64 \pm 1,19$	$5,86 \pm 0,68$
С АА With AA	Сохранность,% Integrity,%	$81,21 \pm 2,36^2$	$68,63 \pm 2,64^{1,2,5}$	$75,30 \pm 2,34^{1,4}$	$71,23 \pm 3,57^{1,2}$
	Количество клеток $\times 10^6$ /мл, Amount of cells $\times 10^6$ /ml	$6,34 \pm 0,23$	$3,53 \pm 0,76^1$	$5,25 \pm 0,65$	$3,25 \pm 0,23^{1,5}$
С ЭАЭ With EAE	Сохранность,% Integrity,%	$80,13 \pm 3,25^2$	$64,76 \pm 2,53^{1,2,3}$	$76,25 \pm 3,87^4$	$72,34 \pm 2,50^{1,2}$
	Количество клеток $\times 10^6$ /мл, Amount of cells $\times 10^6$ /ml	$6,37 \pm 0,32$	$5,53 \pm 0,13^{1,3}$	$5,75 \pm 0,32$	$5,43 \pm 0,11^1$

Примечания: Различия статистически достоверны ($p < 0,05$) по сравнению: 1 – с данными до криоконсервирования; 2 – с контролем; 3 – с АА; 4 – с 5%-м ДМСО в данной группе; 5 – с 7%-м ДМСО в данной группе.

Notes: statistically significant differences ($p < 0.05$) comparing to: 1 – the data prior to cryopreservation; 2 – the control; 3 – with AA; 4 – with 5% DMSO in this group; 5 – with 7% DMSO in this group.

стафилококки компенсировалась увеличением количества фагоцитирующих клеток – ФИ. За счет этого абсолютный показатель фагоцитарной активности миелокариоцитов (АПФМ) достоверно не отличался от контроля. При ЭАЭ наблюдалась иная картина: все исследуемые показатели были ниже контрольного уровня. Вследствие этого АПФМ уменьшался более чем в 12 раз по сравнению с контролем.

Можно предположить, что подобного рода изменения обусловлены спецификой цитокинового профиля при АИЗ. Клетки КМ вырабатывают группу миелопептидов, обладающих иммунорегуляторными свойствами, в том числе и стимулирующих ФА макрофагов [1]. Активация фагоцитов различными агентами связана, как правило, с повышением содержания клеточного кальция, которое, например в нейтрофильных гранулоцитах, увеличивается под действием ИЛ-8 и вместе с ГМ-КСФ, ИЛ-1 и ФНО- α составляет цитокиновый фон, активизирующий фагоциты [8]. Известно, что при АА наблюдается повышенная продукция описанных выше цитокинов [16], способствующая стимуляции исследуемых

not differ significantly comparing to the control. At EAE the different picture was observed: all indices under study were lower than the control level. As a result АИМPhA decreased by more than 12 times comparing to the control.

Such changes are supposed to be caused by a cytokine profile specificity at АИЗ. BM cells produce the group of myelopeptides possessing immunoregulatory properties, which stimulate the macrophage phagocytosing activity [1]. Phagocyte activation by various agents is related as a rule to the rise of cell calcium content, which is known to increase for example in neutrophil granulocytes under IL-8 effect and along with GM-CSF, IL-1 and TNF- α make the cytokine background, activating phagocytes [8]. An increased production of mentioned above cytokines is known to be observed at АА, which promote the stimulation of the indices under study, while at EAE the inhibiting effect on the adhesion molecule and PhA expression may be manifested by the production of another kind of cytokine, that is transforming growth factor β [4].

Cryopreservation being a powerful physical and chemical factor, which affects in a way different cells

Таблица 2. Фагоцитарная активность и адгезивный потенциал клеток КМ животных с АИЗ до и после криоконсервирования

Table 2. Phagocyte activity and BM cell adhesive potential in АИЗ animals prior to and following the cryopreservation

Клетки КМ животных BM cells of animals	Показатель Index	До криоконсервирования Prior to cryopreservation	После криоконсервирования клеток КМ с ДМСО Following the cryopreservation BM cells with DMSO		
			5% – м	7% – м	10% – м
Здоровых (контроль) Of healthy animals (control)	ФИ PhI	52,52 \pm 3,91	30,23 \pm 0,87 ^{1,5}	33,87 \pm 1,52 ^{1,4}	40,56 \pm 2,28 ^{1,4,5}
	ФЧ PhA	8,75 \pm 1,52	5,75 \pm 0,73 ^{1,5}	7,67 \pm 0,494	9,86 \pm 1,36 ^{4,5}
	АПФМ, 10 ⁷ АИМPhA, 10 ⁷	294,11 \pm 14,78	111,25 \pm 5,56 ^{1,5}	166,26 \pm 9,97 ^{1,4}	255,95 \pm 12,79 ^{1,4,5}
	АК% АС,%	27,15 \pm 1,88	55,26 \pm 2,63 ^{1,5}	37,58 \pm 3,11 ^{1,4}	35,79 \pm 1,67 ^{1,4}
С АА With АА	ФИ PhI	73,13 \pm 2,33 ²	32,44 \pm 2,36 ¹	30,17 \pm 3,34 ¹	34,26 \pm 3,57 ¹
	ФЧ PhA	6,37 \pm 0,23 ²	12,15 \pm 2,51 ^{1,2}	8,75 \pm 2,32	8,43 \pm 2,67
	АПФМ, 10 ⁷ АИМPhA, 10 ⁷	307,45 \pm 16,32	267,63 \pm 20,69 ²	310,05 \pm 10,55 ²	192,06 \pm 13,43 ^{1,2,4,5}
	АК% АС,%	63,33 \pm 4,652	71,09 \pm 5,32 ^{2,5}	55,39 \pm 3,01 ^{2,4}	48,24 \pm 2,78 ^{1,4,5}
С ЭАЭ With EAE	ФИ PhI	12,75 \pm 1,37 ^{2,3}	55,32 \pm 2,53 ^{1,2,3}	60,56 \pm 1,87 ^{1,2,3}	61,54 \pm 1,50 ^{1,2,3,4}
	ФЧ PhA	4,21 \pm 0,30 ^{2,3}	11,33 \pm 0,94 ^{1,3,5}	6,20 \pm 1,161,3,4	7,53 \pm 2,34 ¹
	АПФМ, 10 ⁷ АИМPhA, 10 ⁷	23,08 \pm 1,18 ^{2,3}	269,51 \pm 14,78 ^{1,2,5}	155,07 \pm 9,87 ^{1,3,4}	199,26 \pm 7,63 ^{1,2,4}
	АК% АС,%	14,44 \pm 1,34 ^{2,3}	66,12 \pm 2,36 ^{1,2,5}	27,02 \pm 2,03 ^{1,3,4}	35,69 \pm 1,24 ^{1,3,4,5}

Примечания: Различия статистически достоверны (p<0,05) по сравнению: 1– с данными до криоконсервирования; 2– с контролем; 3 – с АА; 4 – с 5%-м ДМСО в данной группе; 5 – с 7%-м ДМСО в данной группе.

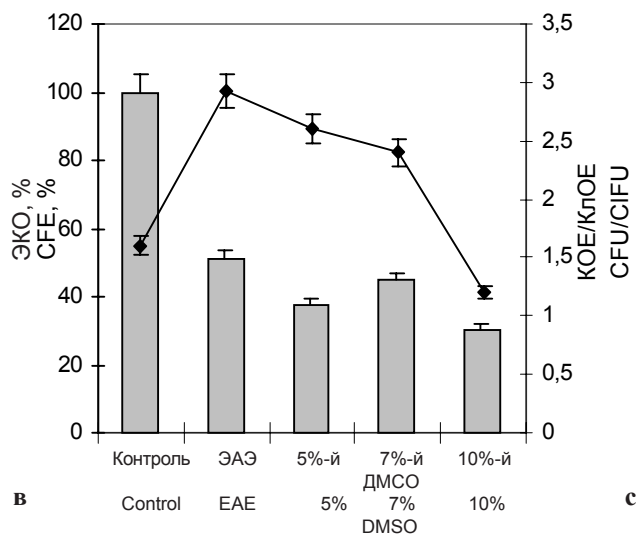
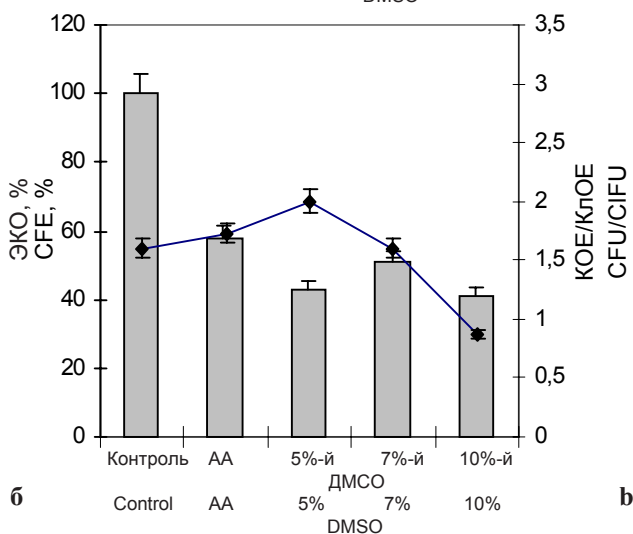
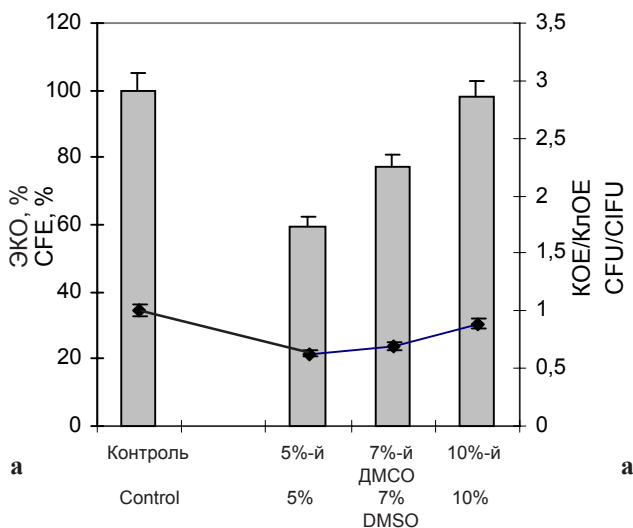
Notes: statistically significant differences (p<0.05) comparing to: 1 – the data prior to cryopreservation; 2 – the control; 3 – with АА; 4 – with 5% DMSO in this group; 5 – with 7% DMSO in this group.

характеристик, в то время как при ЭАЭ ингибирующее действие на экспрессию молекул адгезии и ФА может оказывать повышенная продукция другого цитокина – трансформирующего ростового фактора β [4].

Криоконсервирование, являясь мощным физико-химическим фактором, в той или иной степени воздействующим на разные клетки гетерогенной популяции КМ, существенно изменяет его стабильное функциональное состояние. После криоконсервирования ФИ клеток КМ здоровых животных при использовании 5%-го ДМСО снижался в 1,7, 7%-го – в 1,6, 10%-го – в 1,3 раза по сравнению с исходным показателем. Для миелокарицитов животных с АА минимальное снижение ФИ наблюдалось при использовании 7%-го ДМСО, в то время как при ЭАЭ отмечалось достоверное увеличение ФИ более чем в 4 раза во всех исследуемых группах независимо от

of BM heterogenous population, was found to change dramatically its stable functional state. Following cryopreservation the PhI of BM cells in healthy animals decreased by 1.7 times when using 5% DMSO, with 7% DMSO by 1.6 times, and 10% by 1.3 times comparing to the initial index. For myelokaryocytes of AA animals the minimum PhI was observed when using 7% DMSO, while at EAE there was noted a statistically true PhI increase by more than in 4 times in all the studied groups independently on the cryoprotectant's concentration comparing to the initial index. At both of the pathologies the phagocyte number increased following the cryopreservation, while in the control no statistically significant changes were observed, and only during freezing with 5% DMSO this index was found to decrease significantly. AIMPhA of the control group after cryopreservation with 10% DMSO approached to the initial index (prior to cryo), for BM cells with AA the proper one was found to be the 7% DMSO concentration. The slightest deviation of AIMPhA at EAE from the initial index was also noted while using 7% DMSO.

As the Table 2 shows at AA the increase of phagocytosing cells (PhI) percentage in BM correlated to a more than twice rise of adhesive cells (AC) content in it. At the same time EAE development induced a sharp decrease of PhI accompanied by nearly twice fall of AC in BM. It worth to be noted that at EAE all the studied characteristics of PhA cells in BM were significantly lower than the control values that points to "stronger" changes of an inner organism state during the pathology. Interestingly that following the cryopreservation independently on the cryoprotectant concentration there were noted mono-directed changes



Эффективность колониеобразования ЭКО и КОЕ/КлОЕ КМ контрольных животных (а), с АА (б), с ЭАЭ (с) до и после криоконсервирования с различными концентрациями ДМСО: ■ – ЭКО; ◆ – КОЕ/КлОЕ.

Colony forming efficiency (CFE) and CFU/CIFU in BM of control animals (a), with AA (b), with EAE (c) prior to and following the cryopreservation with various DMSO concentrations: ■ – CFE; ◆ – CFU/CIFU.

концентрации криопротектора по сравнению с исходным показателем. При обеих патологиях после криоконсервирования ФЧ повышалось, в контроле достоверных изменений не наблюдалось, и только при замораживании с 5%-м ДМСО этот показатель достоверно снижался. АПФАМ контрольной группы после криоконсервирования с 10%-м ДМСО приближался к исходному (до крио) показателю, для клеток КМ с АА наиболее приемлемой являлась 7%-я концентрация ДМСО. В наименьшей степени АПФАМ при ЭАЭ отклонялся от исходного показателя также при использовании 7%-го ДМСО.

Как видно из представленных в табл.2 данных, при АА повышение процента фагоцитирующих клеток – (ФИ) в КМ коррелировало с более чем двукратным увеличением в нем содержания адгезивных клеток (АК). В то же время развитие ЭАЭ индуцировало резкое снижение ФИ, которое сопровождалось почти двукратным снижением содержания АК в КМ. Важно отметить, что при ЭАЭ все изученные характеристики состояния ФА клеток КМ были существенно ниже контрольных величин, что подчеркивает более “жесткие” изменения внутреннего состояния организма при данной патологии. Интересно, что после криоконсервирования, независимо от концентрации криопротектора, отмечались однонаправленные изменения характеристик ФА патологического КМ: при ЭАЭ на фоне увеличения процента АК увеличивался и ФИ, при АА на фоне уменьшения процента АК уменьшался и ФИ. В контроле количество АК увеличивалось, а ФИ снижался. Таким образом, одни и те же режимы криоконсервирования могут индуцировать повышенную экспансию молекул адгезии на относящихся к МФС клетках КМ при одних патологических состояниях и ингибировать при других.

Как видно из рисунка, показатель ЭКО был достоверно ниже контроля и составлял: при АА – 57, при ЭАЭ – 51%, что может быть связано с уменьшением концентрации колониестимулирующих факторов при данных АИЗ [2]. Таким образом, различия между группами с АИЗ были менее выраженными. Интерес представляет дифференцированный анализ составляющих ЭКО, т.е. КОЕ и КлОЕ как отношение КОЕ/КлОЕ, указывающее на распределение разной степени дифференцировки кроветворных предшественников в КМ животных. Если сравнивать две патологии, то следует отметить, что при АА больше, чем при ЭАЭ, снижается количество КлОЕ по сравнению с контролем, о чем свидетельствует большая величина КОЕ/КлОЕ (1,73 и 2,93 соответственно), т.е. при ЭАЭ в большей степени сохраняются гемопоэтические предшественники с более высоким пролиферативным потенциалом. Индекс

in PhA characteristics of pathological BM: at EAE on the background of AC the percent rise the PhI increased as well. At AA on the background of the AC percent fall the PhI was found to decrease too. In the control the AC amount increased but PhI reduced. Thus the same cryopreservation regimens may induce an increased expansion of adhesion molecules on BM cells related to MPS during some pathological states and inhibit at other ones.

As the Figure demonstrates the CFE index was significantly lower than the control and made 57% at AA, 51% at EAE, which is supposed to be related to the decrease in colony stimulating factors concentration during these types of AID [2]. Thus the differences between the AID groups were less manifested. Differentiated analysis of CFE compounds, that is CFU and CIFU is of interest too as the CFU/CIFU ratio pointing to a degree distribution of the differentiation of hematopoietic precursors in animal BM. If one compares the two pathologies, it should be noted that the amount of CIFU decreased if compared to control during AA in a greater extent than at EAE, which is pointed by a higher CFU/CIFU value (1.73 and 2.93, respectively), that is during EAE hematopoietic precursors with higher proliferative potential are preserved better. CFU/CIFU index during the both of pathologies was significantly higher than the control. Therefore at different AID types, both AA and EAE the state of not only hematopoietic “place d’armes” in the whole, but of hematopoietic precursors’ compartments of a various commitment level being the part of it, was noted to be modified in a different way. Such changes may be supposed to be caused by specificity of a cytokine profile change at one or another AID type, when a certain deviation from the physiological cytokine content with the immune modulating and hematopoietic activity determines the change character of hematopoietic profile in the whole organism. Estimation of the state of hematopoietic precursors demonstrated the integrity of CFU-GM in healthy BM (Figure) to the rise along with the DMSO concentration increase, reaching the control level while cryopreserving myelokaryocytes under the protection of 10% DMSO. The maximum integrity of CFU-GM in donor BM with AA and EAE was noted when using 7% DMSO, while the functional potential of CFU-GM approached in a maximum way to the initial level (prior to cryopreservation). It is of interest as well that the CFU/CIFU ratio independently on the type of AID was higher at BM cryopreservation at 5% DMSO, that testifies to the integrity of less differentiated precursors (CFU) at this cryopreservation regimen.

Conclusions

Autoimmune diseases, and namely adjuvant arthritis and experimental allergic encephalomyelitis, are accompanied with the changes in phagocytic and

КОЕ/КлОЕ при обеих патологиях был достоверно выше контроля. Следовательно, при различных АИЗ, а именно АА и ЭАЭ, в различной степени модифицируется состояние не только гемопоэтического плацдарма в целом, но и входящих в него компартментов кроветворных предшественников разного уровня коммитированности. Можно предположить, что подобного рода изменения обусловлены спецификой изменения цитокинового профиля при том или ином АИЗ, когда конкретное отклонение от физиологического содержания цитокинов с иммуномодулирующей и гемопоэтической активностью определяет характер изменения состояния гемопоэтического профиля организма в целом.

Оценка состояния кроветворных предшественников после криоконсервирования показала, что сохранность КОЕ-ГМ здорового КМ (рисунок) увеличивается по мере повышения концентрации димексида, достигая контрольного уровня при криоконсервировании миелокариоцитов под защитой 10%-го ДМСО. Максимум сохранности КОЕ-ГМ костного мозга доноров с АА и ЭАЭ был отмечен при использовании 7%-го ДМСО, при этом функциональный потенциал КОЕ-ГМ максимально приближался к исходному (до крио) уровню. Интересно отметить, что отношение КОЕ/КлОЕ, независимо от АИЗ, было больше при криоконсервировании КМ под защитой 5%-го ДМСО, что указывает на сохранность менее дифференцированных предшественников (КОЕ) при данном режиме криоконсервирования.

Выводы

При АИЗ, а именно АА и ЭАЭ, происходят изменения фагоцитарного и адгезивного потенциалов клеток КМ, причем при ЭАЭ эти изменения более выражены.

Показано, что один и тот же режим криоконсервирования индуцирует повышенную экспансию молекул адгезии и ФА клеток КМ при ЭАЭ и ингибирует при АА по сравнению с их исходным состоянием.

Развитие АИЗ вызывает изменение гемопоэтического потенциала кроветворных предшественников, что подтверждается фактом снижения КОЕ-ГМ, причем при ЭАЭ в большей степени.

После криоконсервирования КМ животных с ЭАЭ с 7%-м ДМСО КОЕ-ГМ сохранялись в меньшей степени, чем при АА, однако КОЕ-ГМ костного мозга с этой патологией обладали большим пролиферативным потенциалом.

По совокупности изученных показателей для КМ животных с АИЗ предпочтительным, но не оптимальным является режим с использованием 7%-го ДМСО, для КМ контрольных животных – 10%-го.

adhesive state of BM cells potential, moreover at EAE these changes are most manifested.

It has been shown that the same cryopreservation regimen induces an increased expansion of adhesion molecules and phagocyte activity of BM cells at EAE as well as inhibits at AA in comparison with their initial state.

AIDs development causes the change in hemopoietic potential of hemopoietic precursors, that is confirmed by the reduction in CFU-GM, and for EAE in a greater extent.

After BM cryopreservation of the animals with EAE under 7% DMSO protection the CFU-GM preserved in less extent than at AA, however CFU-GM of BM with this pathology had higher proliferative potential.

According to all studied indices for BM of animals with AIDs the regimen when using 7% DMSO is preferable, but not optimal, meanwhile for BM of the control animals is the one with 10% DMSO.

References

1. *Belevskaya tR.G., Mikhaylova A.A., Fonina L.A. et al.* Myelopeptide-3 as bone marrow mediator, which stimulates phagocyte activity in macrophages//Reports of the Academy of Sciences.– 1998.– Vol.358, N6.– P. 847-849.
2. *Hembitsky E.V., Mazurov V.I., Lila A.M. et al.* Change of functional activity of granulomonocytopoiesis in rheumatoid arthritis patients // Klin. Meditsina.– 1991.– Vol.69, N3.– P.51-54.
3. *Goltsev A.N., Kozlova Yu.A., Babenko N.N. et al.* Peculiarities of the change of immunological and biochemical indices of rat organism with experimental allergic encephalomyelitis // Problems of Cryobiology.– 2004.– N1.– P. 41-49.
4. *Davydova G.S.* Application of adjuvant with different content of BCG to induce EAE in rats // Acute encephalomyelitis in experiment and clinics.– Minsk: Nauka i tekhnika, 1969.– P. 32-37.
5. *Demina T.L., Gusev E.I., Boyko A.N. et al.* Cytokines in immunopathogenesis of disseminated sclerosis // Zhurnal. Neuropatologii i psikhatrii im. Korsakova.– 1997.– Vol.97, N5.– P. 68-73.
6. *Dubrava T.G.* Efficiency of hemopoietic cells cryopreservation depending on their initial properties: Author's thesis abstract for candidate's degree obtaining (biology).– Kharkov, 1986.– 14 p.
7. *Cell suspension cryopreservation* / Ed. by Tsutsaeva A.A.– Kiev: Naukova Dumka, 1983.– P. 175-186.
8. *Lymphocytes: A practical approach.* Transl. From English / Ed. by G.G. Klaus.– M.: Mir.– 1990.– 396 p.
9. *Nesterova I.V., Kolesnikova N.V.* Cytokine regulation and functional system of neutrophile granulocytes // Hematologia and transfusiologia.– 1999.– Vol.44, N2.– P. 43-47.
10. *Khaitov R.M.* Current approaches for the estimation of main stages of a phagocyte process // Kharkov Medical Journal.– 1995.– N2.– P. 8-12.
11. *Shereshkov S.I.* Hematopoietic cell culturing on semi-solid nutritive media // Lab. delo.– 1974.– N3.– P. 146-150.
12. *Bekum D.W.* Experimental basis for the treatment of autoimmune diseases with autologous hematopoietic stem cell transplantation // Bone Marrow Transplant.– 2003.– Vol.32, №1.– P. 37-39.
13. *Ikehara S., Inaba M., Yasumizu R., et. al.* Autoimmune diseases as stem cell disorders // Tohoku J. Exp. Med.– 1994.– Vol.173, №1.– P. 141-155.

Полученные данные подчеркивают необходимость учета исходного морфофункционального состояния патологически измененного КМ для поиска оптимального режима его криоконсервирования.

Литература

1. *Белевская Р.Г., Михайлова А.А., Фоница Л.А. и др.* Миелопептид-3 – костномозговой медиатор, стимулирующий фагоцитарную активность макрофагов // Докл. академии наук.– 1998.– Т. 358, №6.– С. 847-849.
2. *Гембицкий Е.В., Мазуров В.И., Лица А.М. и др.* Изменение функциональной активности грануломоноцитопоза у больных ревматоидным артритом // Клини. медицина.– 1991.– Т. 69.– №3.– С. 51-54.
3. *Гольцев А.Н., Козлова Ю.А., Бабенко Н.Н. и др.* Особенности изменения иммунологических и биохимических показателей организма крыс с экспериментальным аллергическим энцефаломиелитом // Пробл. криобиологии.– 2004.– №1.– С. 41-49.
4. *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.
5. *Демина Т.Л., Гусев Е.И., Бойко А.Н. и др.* Цитокины в иммунопатогенезе рассеянного склероза // Журнал невропатологии и психиатрии им. Корсакова.– 1997.– Т. 97, №5.– С. 68-73.
6. *Дубрава Т.Г.* Эффективность криоконсервирования кроветворных клеток в зависимости от их исходных свойств: Автореф. дис... канд. биол. наук.– Харьков, 1986.– 14 с.
7. *Криоконсервирование клеточных суспензий* // Под ред. А.А. Цуцаевой.– Киев: Наук. думка, 1983.– С. 175-186.
8. *Лимфоциты: Методы. Пер. с англ.* / Под ред. Дж. Клауса.– М.: Мир.– 1990.– 396 с.
9. *Нестерова И.В., Колесникова Н.В.* Цитокиновая регуляция и функционирующая система нейтрофильных гранулоцитов // Гематология и трансфузиология.– 1999.– Т.44, №2.– С. 43-47.
10. *Хайтов Р.М.* Современные подходы к оценке основных этапов фагоцитарного процесса // Харьков. мед. журн.– 1995.– №2.– С. 8-12.
11. *Шерешков С.И.* Культивирование гемопоэтических клеток на полутвердых питательных средах // Лаб. дело.– 1974.– № 3.– С. 146-150.
12. *Bekkum D.W.* Experimental basis for the treatment of autoimmune diseases with autologous hematopoietic stem cell transplantation // Bone Marrow Transplant.– 2003.– Vol.32, №1.– P. 37-39.
13. *Ikehara S., Inaba M., Yasumizu R., et al.* Autoimmune diseases as stem cell disorders // Tohoku J. Exp. Med.– 1994.– Vol.173, №1.– P. 141-155.
14. *Marmont A.M.* Stem cell transplantation for severe autoimmune disorders, with special reference to rheumatic diseases. // J Rheumatol Suppl.– 1997.– Vol.48, №4.– P. 13-18.
15. *Suzuki Y., Kim K.J., Kotake S., et al.* Stromal cell activity in bone marrow from the tibia and iliac crest of patients with rheumatoid arthritis // J. Bone Miner. Metab.– 2001.– Vol.19, №1.– P. 56-60.
16. *Voulgari P.V., Kolios G., Papadopoulos G.K., et al.* Role of cytokines in the pathogenesis of anemia of chronic disease in rheumatoid arthritis // Clin Immunol.– 1999.– Vol.92, №2.– P. 153-160.

Accepted in 20.04.2004

Поступила 20.04.2004