

УДК 576.367:612.35.014.2-053.1:616.72-002.77

А.Н. Гольцев\*, Е.Е. Ямпольская, М.В. Останков, Н.А. Бондарович

## Исследование апоптотических процессов в клетках моноцитарно-фагоцитарной системы при развитии адъювантного артрита до и после введения криоконсервированных клеток фетальной печени

UDC 576.367:612.35.014.2-053.1:616.72-002.77

A.N. Goltsev\*, E.E. Yampolskaya, M.V. Ostankov, N.A. Bondarovich

## Study of Apoptotic Processes in Cells of Monocyte-Phagocyte System During Development of Adjuvant Arthritis Prior to and After Administration of Fetal Liver Cells

**Реферат:** Ревматоидный артрит (РА) является одним из самых распространенных хронических воспалительных заболеваний суставов с многофакторной этиологией. Существенным моментом при РА является нарушения реализации в иммунокомпетентных клетках, в том числе и клетках моноцитарно-фагоцитарной системы (МФС), процессов пролиферации и апоптоза. Одной из составляющих стратегии ограничения чрезмерного воспалительного ответа при РА может быть активация апоптоза в клетках МФС. На модели адъювантного артрита (АА) животных проведена сравнительная оценка развития апоптотических процессов в клетках МФС до и после введения нативных и криоконсервированных клеток фетальной печени (кКФП). С помощью вестерн-блот анализа показаны особенности экспрессии протеинов CD95-каскада в клетках МФС в условиях развития АА. Установлен более выраженный проапоптотический эффект после введения кКФП, степень проявления которого зависела от срока их введения.

**Ключевые слова:** апоптоз, моноцитарно-фагоцитарная система, адъювантный артрит, клетки фетальной печени, криоконсервирование.

**Реферат:** Ревматоїдний артрит (РА) є одним із найпоширеніших хронічних запальних захворювань суглобів із багатофакторною етіологією. Суттєвим моментом при РА є порушення реалізації в імунокомпетентних клітинах, у тому числі й клітинах моноцитарно-фагоцитарної системи (МФС), процесів проліферації та апоптозу. Однією зі складових стратегій обмеження надмірної запальної відповіді при РА може бути активація апоптозу у клітинах МФС. На моделі ад'ювантного артриту (АА) тварин проведено порівняльну оцінку розвитку апоптотичних процесів у клітинах МФС до та після введення нативних і криоконсервованих клітин фетальної печінки (кКФП). За допомогою вестерн-блот аналізу показано особливості експресії протеїнів CD95-каскаду в клітинах МФС в умовах прогресу АА. Встановлено більш виражений проапоптотичний ефект після введення кКФП, ступінь прояву якого залежала від строку їх введення.

**Ключові слова:** апоптоз, моноцитарно-фагоцитарна система, ад'ювантний артрит, клітини фетальної печінки, криоконсервування.

**Abstract:** Rheumatoid arthritis (RA) is one of the most widespread chronic inflammatory diseases of the joints with multifactor etiology. A crucial point in RA is the disorder of proliferation and apoptosis in immunocompetent cells as well as in the cells of monocyte-phagocyte system (MPS). Using the model of adjuvant arthritis (AA) in animals we comparatively assessed the development of apoptotic processes in MPS cells before and after administration of native and cryopreserved fetal liver cells (cFLCs). By means of Western blot analysis we showed the peculiarities of CD-95 cascade proteins expression in MPS cells during development of AA. After administration of cFLCs we found more pronounced proapoptotic effect, which degree depended on the period of their administration.

**Key words:** apoptosis, monocyte-phagocyte system, adjuvant arthritis, fetal liver cells, cryopreservation.

Ревматоидный артрит (РА) – хроническое, системное, иммунозависимое, воспалительное заболевание с многофакторной этиологией. Для РА характерно многолетнее прогрессирующее воспаление, которое выражается в разрушении структур суставов и поражении околосуставных тканей [6].

Rheumatoid arthritis (RA) is chronic, systemic, immune-dependent, inflammatory disease of multifactor etiology. RA is characterized by long-term progressive inflammation manifesting in destruction of joint structure and damage of periarticular tissues [16]. Activation of monocyte-phagocyte system (MPS) cells

Отдел криопатофизиологии и иммунологии, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

\*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:  
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015;  
тел.: (+38 057) 373-57-89, факс: (+38 057) 373-30-84,  
электронная почта: cryopato@rambler.ru

Поступила 22.04.2014  
Принята в печать 28.05.2014

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2014. – Т. 24, №3. – С. 249–261.  
© 2014 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

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

\*To whom correspondence should be addressed:  
23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015;  
tel.: +380 57 373 5789, fax: +380 57 373 3084,  
e-mail: cryopato@rambler.ru

Received April, 22, 2014  
Accepted May, 28, 2014

Probl. Cryobiol. Cryomed. 2014. 24(3): 249–261.  
© 2014 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

Активация клеток моноцитарно-фагоцитарной системы (МФС) является одним из наиболее универсальных звеньев патогенеза РА [17, 18]. Существует несколько фактов, дающих основание рассматривать клетки МФС как возможную мишень для терапевтических воздействий. Существенным моментом при РА является нарушение реализации в иммунокомпетентных клетках, включая клетки МФС, процессов пролиферации и апоптоза, что способствует пролонгации иммуновоспалительного процесса [5, 21, 22]. В связи с этим одной из составляющих стратегии ограничения чрезмерного воспалительного ответа при РА может быть активация апоптоза в клетках МФС [23].

К альтернативным подходам лечения РА можно отнести клеточно-тканевую терапию [7], одним из компонентов которой являются клетки фетальной печени (КФП). Предыдущие исследования продемонстрировали способность продуктов фетоплацентарного комплекса активировать апоптоз, хотя механизм их действия остается до конца не изученным [2, 5]. Подобной активностью обладают  $\alpha$ -фетопротейн КФП и плацентарный протеин PP-11. Кроме того, КФП продуцируют ряд медиаторов, таких как ИЛ-4 и ИЛ-10, которые обладают как противовоспалительной, так и проапоптотической активностью [9, 13, 14, 20].

Необходимость применения КФП в клинической практике определила разработку эффективных методов их криоконсервирования и длительного хранения. При этом воздействие низких температур может выступать в роли модификатора состояния биообъекта на молекулярном и клеточном уровнях, в ряде случаев улучшая его терапевтическую эффективность [3, 4, 10, 15, 16]. Вместе с тем нет данных о влиянии криоконсервирования на выраженность апоптоза ИКК после введения КФП реципиентам. В связи с этим представляет интерес выяснение характера влияния криоконсервирования на проапоптотический потенциал КФП в отношении клеток МФС в условиях развития адьювантного артрита (АА) животных – экспериментального аналога РА человека.

Цель работы – сравнительная оценка развития апоптотических процессов в клетках моноцитарно-фагоцитарной системы в условиях формирования адьювантного артрита до и после введения криоконсервированных и нативных клеток фетальной печени.

### Материалы и методы

Эксперименты выполнены на 120 мышах линий C57Bl/6J и CBA/H 3-месячного возраста массой 18–20 г, которые были получены из питомника

is one of the most versatile links of RA pathogenesis [14, 15]. There are several facts affording grounds to consider MPS cells as a possible target for therapeutic interventions. An essential point in RA is the disorder of proliferation and apoptosis in immunocompetent cells as well as in MPS ones, thereby prolonging immunoinflammatory process [13, 19, 20]. In this regard, the activation of apoptosis in the MPS cells may be a component of strategy restricting an excessive inflammatory response at RA [21].

Alternate approaches for treatment of RA include cell and tissue therapy [23], one of the components of which are fetal liver cells (FLCs). The previous investigations have demonstrated the ability of fetoplacental complex products to activate apoptosis, although the mechanism of their action remains poorly studied [10, 13]. Similar activity is a feature of FLC  $\alpha$ -fetoprotein and placental protein PP-11. Furthermore, FLCs produce several mediators, such as IL-4 and IL-10 which have both anti-inflammatory and proapoptotic activity [4, 5, 9, 18].

The need to apply FLCs in clinical practice stipulated the development of effective methods for their cryopreservation and long-term storage. Moreover the effect of low temperatures can be the modifier of biological object state at molecular and cellular levels, in some cases improving its therapeutic efficacy [8, 9, 11, 12, 25]. However, there are no data on the influence of cryopreservation on the expression of ICC apoptosis after FLC administration into the recipients. In this respect it is of interest to clarify the character of cryopreservation impact on the FLC proapoptotic potential in relation to MPS cells during development of adjuvant arthritis (AA) in animals, experimental counterpart of human RA.

The research aim was to comparatively assess the development of apoptotic processes in cells of monocyte-phagocyte system at adjuvant arthritis before and after administration of native and cryopreserved fetal liver cells.

### Materials and methods

Experiments were carried out in 120 three months-old C57Bl/6J and CBA/H mice of 18–20 g weight, which were obtained from the nursery 'Stolbovaya' of the Russian Academy of Medical Sciences with the following storage under standard conditions in vivarium at the IPC&C of the NASU. Each test group consisted of 7 animals at least. Pathology was induced in CBA/H mice by subplantar administration of complete Freund's adjuvant at the dose of 0.05 ml/mouse [1]. MPS cells were derived from the mice peritoneal cavity (PC) [26]. Their adhesive properties were measured in plastic dishes (Spectar, Serbia) after incubation at 37°C for one hour. The percentage of adherent cells (ACs)



РАМН «Столбовая» с последующим содержанием в стандартных условиях вивария ИПКиК НАНУ. В каждой исследуемой группе использовалось не менее 7 животных. Патологию индуцировали у мышей СВА/Н субплантарным введением полного адьюванта Фрейнда в дозе 0,05 мл/мышь [11]. Клетки МФС получали из перитонеальной полости (ПП) мышей [26]. Их адгезивные свойства определяли в пластиковых чашках («Spectar», Сербия) после инкубации при температуре 37°C в течение часа. Процент адгезивных клеток (АК) подсчитывали как разницу между количеством внесенных клеток и клеток в супернатанте [26]. Количество клеток МФС в адгезивной фракции клеток ПП определяли на проточном цитофлуориметре «FACS Calibur» («Becton Dickinson», США), применяя моноклональные антимышьи антитела к маркеру CD68 («Biolegend», США) согласно инструкции производителя. В качестве контроля использовали пробы с добавлением неиммунных меченных FITC моноклональных антител (МАТ) («Biolegend»). Перед инкубацией с МАТ для внутриклеточных антигенов клетки предварительно фиксировали и пермеабилizировали с помощью набора реактивов Cytofix/Cytoperm («BD Biosciences», США). Процент мертвых клеток определяли методом окрашивания пропидий йодидом («Sigma», США) на проточном цитофлуориметре «FACS Calibur» («Becton Dickinson») [24], количество ядросодержащих клеток – в камере Горяева. Полученные данные анализировали с помощью программы «Win MDI 2.9».

Фетальную печень, выделенную из эмбрионов на 14-й посткоитальный день, дезинтегрировали в гомогенизаторе Поттера в среде 199 (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов, Россия) с добавлением 10%-й эмбриональной телячьей сыворотки («БиолоТ», Россия) и 2%-го цитрата натрия (далее в тексте – рабочая среда) с последующей очисткой через иглы уменьшающегося диаметра (0,8–0,5 мм) и капроновый фильтр. Раствор для криоконсервирования КФП представлял собой рабочую среду с 10%-м раствором диметилсульфоксида (ДМСО) («Arterium», Украина). К полученной на рабочей среде суспензии клеток по каплям добавляли криоконсервирующий раствор в соотношении 1:1 при температуре 18°C в течение 2 мин (конечная концентрация ДМСО составила 5%). Экспозицию клеток в растворе проводили в течение 10 мин при той же температуре. Клетки фетальной печени с концентрацией  $1 \times 10^6$ /мл и объемом 1,8 мл замораживали на программном замораживателе («Cryoson», Германия) в пластиковых ампулах («Nunc», Германия) по следующей программе: охлаждение от комнатной темпера-

was calculated as the difference between the amount of administered cells and supernatant [26]. The number of MPS cells in the adhesive fraction of PP cells was determined by flow cytometer FACS Calibur (Becton Dickinson, USA) using the anti-mouse monoclonal antibodies to the marker CD68 (Biolegend, USA) according to the manufacturer's instructions. As the control we used the samples supplemented with marked non-immune FITC monoclonal antibodies (MABs) (Biolegend). Before incubation with MABs for intracellular antigens the cells were preliminary fixed and permeabilized with the set of reagents Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences, USA). The percentage of dead cells was determined by propidium iodide staining (Sigma, USA) with the flow cytometer FACS Calibur (Becton Dickinson) [22], the number of nucleated cells – in Goryaev's chamber. The data obtained were analyzed using Win MDI 2.9.

Fetal liver isolated from embryos to the 14<sup>th</sup> post-coital day was disintegrated in Potter homogenizer in medium 199 (Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis, Russia) supplemented with 10% fetal bovine serum (BioloT, Russia) and 2% sodium citrate (hereinafter handling medium), followed by purification through the needles of decreasing diameter (0.8–0.5 mm) and nylon filter. Solution for cryopreservation of FLCs is a handling medium with 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) (Arterium, Ukraine). The cell suspension obtained in handling medium was dropwise supplemented with cryopreserving solution in 1:1 ratio at 18°C for 2 min (final DMSO concentration was 5%). Cells were exposed in the solution during 10 min at the same temperature. Fetal liver cells of  $1 \times 10^6$ /ml concentration in 1.8 ml volume were frozen with a programmable freezer (Cryoson, Germany) in the plastic vials (Nunc, Germany) by the following program: cooling from room temperature down to –40°C with the rate of 1 deg/min, 10-min pause, then cooling with 10 deg/min down to –80°C with the following plunging of the vials into liquid nitrogen [25]. The samples were thawed on water bath at 38...40°C until disappearance of solid phase. The cells were once washed from DMSO by dropwise addition of handling medium of equal volume, and then they were centrifuged (200g, 10 min). FLC suspension not subjected to freeze-thawing will be hereafter denoted as native FLCs (nFLCs). Native FLCs and cryopreserved FLCs (cFLCs), the survival of which in the test with propidium iodide was not less than 80%, were once administered intravenously in a dose of  $5 \times 10^6$ /mouse and 0.3 ml volume to the 7<sup>th</sup> day (omitting the acute phase) or to the 14<sup>th</sup> day (early chronic phase) of AA development. As a positive control of AA therapy we used glucocorticoid-dexamethasone (DX) in a dose of 0.002 ml, which is the main preparation for the basic RA therapy [16].



туры до  $-40^{\circ}\text{C}$  со скоростью 1 град/мин, 10-минутная выдержка, затем охлаждение со скоростью 10 град/мин до  $-80^{\circ}\text{C}$  и последующим погружением ампул в жидкий азот [10]. Оттаивание образцов проводили на водяной бане при температуре 38...40 $^{\circ}\text{C}$  до исчезновения твердой фазы. Клетки однократно отмывали от ДМСО путем покапельного добавления равного объема рабочей среды, затем центрифугировали (200g, 10 мин). Суспензию КФП, не подвергавшуюся процедуре замораживания-отогрева, далее будем называть нативными КФП (нКФП). Нативные КФП и криоконсервированные КФП (кКФП), сохранность которых в тесте с пропидий йодидом составляла не менее 80%, вводили однократно внутривенно в дозе  $5 \times 10^6$ /мышь и объеме 0,3 мл на 7-е сутки (минуя острую фазу) или 14-е сутки (начало хронической фазы) развития АА. В качестве позитивного контроля терапии АА использовали глюкокортикоид \ дексаметазон (ДК) в дозе 0,002 мл, который является основным препаратом базовой терапии РА [6].

Оценку состояния клеток МФС проводили на 7, 14, 21, 28-е сутки после индукции АА и через 7 и 14 суток после введения КФП или ДК. Интактным контролем были животные того же возраста, которые находились в тех же условиях, что и опытные группы (таблица).

Анализировали активацию каспаз, FLIP и экспрессию CD95-рецептора с использованием моно- и поликлональных антител: anti-CD95 (FL-335) – поликлональные кроличьи антитела; anti-Caspase-8 (p18 (D-8)) – моноклональные мышинные антитела с изотипом IgG 2a; anti-cFLIP (5D8) – моноклональные мышинные антитела с изотипом IgG3; anti-Caspase-3 (46) – моноклональные мышинные антитела с изотипом IgG1; вторичные HRP-конъюгированные антикроличьи антитела (s2040); вторичные HRP-конъюгированные антимышинные IgG (s2005) («Santa Cruz», США).

Исследование апоптоза в клетках МФС на разных стадиях развития АА до и после введения КФП проводили с помощью вестерн-блот анализа в лизатах клеток МФС. Анализ проводили в 12%-м полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (180 V, 25 mA) в течение часа. Размер белков контролировали с помощью стандартов («Fermentas», США). Перенос на нитроцеллюлозную мембрану («Pharmacia», США) осуществляли полусухим способом. Блокирование неспецифического связывания на мембране проводили в 5%-м сухом молоке. Анализ интенсивности хемилюминесценции выполняли с помощью субстрата пероксидазы («Perkin Elmer», США). Изображение анализировалось с использованием

The state of MPS cells were assessed to the days 7, 14, 21, 28 after induction of AA and in 7 and 14 days after administration of FLCs or DX. The animals of the same age and under the same conditions as the experimental groups were the intact control (Table).

We analyzed the activation of caspases, FLIP and CD95-receptor expression using mono- and polyclonal antibodies: anti-CD95 (FL-335) – rabbit polyclonal antibodies; anti-Caspase-8 (p18 (D-8)) – mouse monoclonal antibodies with isotype IgG2a; anti-cFLIP (5D8) – mouse monoclonal antibodies with isotype IgG3; anti-Caspase-3 (46) – mouse monoclonal antibodies with isotype IgG1; secondary HRP-conjugated anti-rabbit antibodies (s2040); secondary HRP-conjugated anti-mouse IgG (s2005) (Santa Cruz, USA).

Apoptosis in MPS cells at various stages of AA development prior to and after administration of FLCs was studied using Western blot analysis of MPS cell lysates. The analysis was performed in 12% polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate (180 V, 25 mA) during one hour. The size of proteins was monitored by the standards (Fermentas, USA). Transfer to nitrocellulose membrane (Pharmacia, USA) was performed by semi-dry method. Nonspecific binding on the membrane was blocked in 5% dry milk. Chemiluminescence intensity was analyzed using peroxidase substrate (Perkin Elmer, USA). The image was analyzed with ImageJ 1.36 (USA), estimating the relative amount of protein in units of optical density.

The catalytic activity of caspases 3 and 8 in MPS cells was determined by measuring the proteolytic cleavage of fluorogenic substrates: ZIETD-AFC and AC-DEVD-AMC (Calbiochem, La Jolla, USA). Fluorescence was measured with spectrophotometer (Perkin Elmer, USA) by output of AFC product (caspase 8, extinction at 400 nm, emission at 505 nm) or AMC one (caspase 3, extinction at 380 nm, emission at 460 nm). The results are presented in fluorescence units per mg of total protein.

The obtained data were statistically processed by Student's t-test using Statistika 7.0 (USA). The differences between the groups were considered significant at  $p < 0.05$ . The experiments were performed in accordance with the General Principles of Experiments in Animals approved by the 3<sup>rd</sup> National Congress on Bioethics (Kiev, 2007) consistent with the regulations of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

## Results and discussion

As the findings show the PC of intact mice contains about 33% of cells with adhesive potential. According to the cytofluorometry data 78% of them expressed CD68-structure known as a marker of monocytes and



«ImageJ 1.36» (США), с оценкой относительного количества белка в единицах оптической плотности.

Каталитическую активность каспаз 3 и 8 в клетках МФС устанавливали путем измерения протеолитического расщепления флуорогенных субстратов: ZIETD-AFC и AC-DEVD-AMC («Calbiochem», США). Флуоресценцию определяли с помощью спектрофотометра («Perkin Elmer», США) по выходу продукта AFC (каспаза 8, экстинция 400 нм, эмиссия 505 нм) или AMC (каспаза 3, экстинция 380 нм, эмиссия 460 нм). Результаты представлены в единицах флуоресценции на 1 мг общего белка.

Полученные данные статистически обрабатывали по методу Стьюдента-Фишера с использованием программы «Statistika 7.0» (США). Различия между группами считали значимыми при  $p < 0,05$ . Эксперименты проведены в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными III Национальным конгрессом по биоэтике (г. Киев, 2007) и согласованными с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (г. Страсбург, 1986).

### Результаты и обсуждение

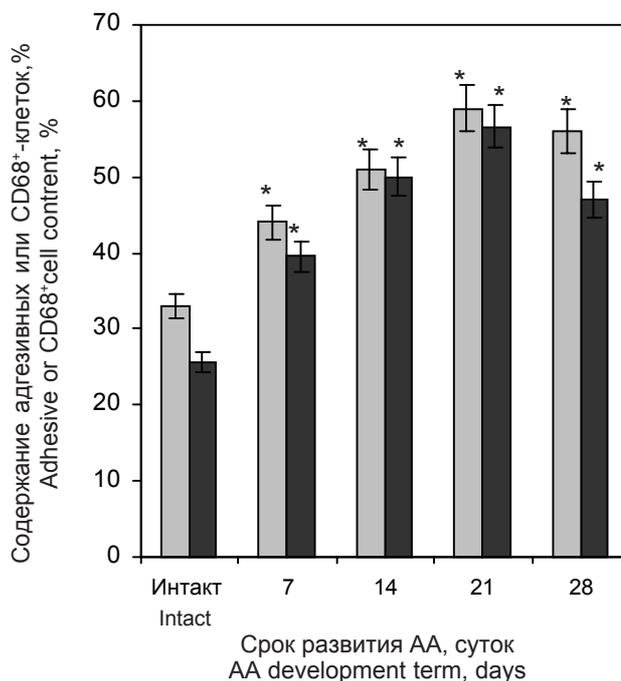
Как следует из полученных нами результатов, в ПП интактных мышей содержится около 33% клеток с адгезивным потенциалом. По данным цитофлуориметрии, 78% из них экспрессировало CD68-структуру, известную как маркер моноцитов и макрофагов [19]. Анализ результатов экспериментов показал, что развитие АА сопровождалось увеличением в ПП как общего содержания клеток, так и клеток с маркерами МФС, что свидетельствует об активации клеток данной системы (рис. 1).

Показатели спонтанной гибели клеток МФС свидетельствуют о том, что у интактных животных процент погибших клеток не превышал ( $1,97 \pm 0,03\%$ ), а в группах животных с АА – ( $5,2 \pm 0,5\%$ ) ( $p < 0,05$ ). После введения ДК во всех исследуемых группах (группы 6–9) количество погибших клеток значительно увеличивалось по сравнению с животными без введения препарата. Введение обоих видов КФП также приводило к увеличению содержания погибших клеток, причем данный показатель зависел как от срока введения, так и вида материала. Максимальная гибель наблюдалась после введения кКФП на 7-е сутки развития АА, которая была значимо выше, чем после применения нКФП. При введении КФП на 14-е сутки развития патологии уже через неделю после их введения этот показатель снижался (таблица).

macrophages [17]. Analysis of experimental results showed that the development of AA was accompanied by an increase in PC of total content of cells as well as the cells with MPS markers, indicating the activation of cells in this system (Fig. 1).

Indices of spontaneous death of MPS cells suggest that in the intact animals the percentage of dead cells did not exceed ( $1.97 \pm 0.03\%$ ), while in the groups of animals with AA it was ( $5.2 \pm 0.5\%$ ) ( $p < 0.05$ ). After DX administration, in all experimental groups (groups 6–9) the number of dead cells significantly increased compared to that of animals not administered with any preparation. The administration of both types of FLCs also resulted in an increased level of cell death, moreover this index depended on the period of administration and the type of material. Maximal death was observed after administration of cFLCs to the 7<sup>th</sup> day of AA, which was significantly higher than after applying nFLCs. In one week after administration of FLCs to the 14<sup>th</sup> day of pathology development this index reduced (Table).

The noted fact of cell death may be the result of apoptotic processes activation and it can be implemented through modulating of intracellular signals with intracellular proteins-caspases. Common index of apop-



**Рис. 1.** Содержание CD68<sup>+</sup> и адгезивных клеток в общей суспензии клеток перитонеальной полости на разных стадиях развития адьювантного артрита; ■ – АК; ■ – CD68<sup>+</sup>; \* – значимые различия по сравнению с интактными животными;  $p < 0,05$ .

**Fig. 1.** Content of CD68<sup>+</sup> and adherent cells in total suspension of peritoneal cavity at different stages of adjuvant arthritis. Notes: ■ – ACs, ■ – CD68<sup>+</sup>; \* – significant changes if compared with intact animals;  $p < 0.05$ .

Процентное содержание погибших клеток МФС у животных на разных стадиях развития адьювантного артрита и после введения КФП  
Content of dead MPS cells in animals at different stages of adjuvant arthritis and after FLCs administration

Группы животных Groups of animals		Подгруппы животных Subgroups of animals	Содержание погибших клеток МФС, % Content of dead MPS cells, %
Интактные (контроль) Intact (control)		1	1,97 ± 0,03
Без введения препаратов Without administration of preparations	AA 7 суток 7th day of AA	2	4,4 ± 0,2
	AA 14 суток 14th day of AA	3	3,1 ± 0,1
	AA 21 суток 21st day of AA	4	4,52 ± 0,46
	AA 28 суток 28th day of AA	5	5,2 ± 0,5
Введение дексаметазона Administration of dexamethasone	AA 7 суток + ГК (через неделю после введения) 7th day of AA + DX (in one week after administration)	6	18,6 ± 0,8*
	AA 7 суток + ГК (через 2 недели после введения) 7th day of AA + DX (in two weeks after administration)	7	17,9 ± 0,6*
	AA 14 суток + ГК (через неделю после введения) 14th day of AA + DX (in one week after administration)	8	16,8 ± 0,19*
	AA 14 суток + ГК (через 2 недели после введения) 14th day of AA + DX (in two weeks after administration)	9	16,4 ± 0,11*
Введение кКФП Administration of cFLCs	AA 7 суток + кКФП (через неделю после введения) 7th day of AA + cFLCs (in one week after administration)	10	9,5 ± 0,05**
	AA 7 суток + кКФП (через 2 недели после введения) 7th day of AA + cFLCs (in two weeks after administration)	11	6,1 ± 0,1**
	AA 14 суток + кКФП (через неделю после введения) 14th day of AA + cFLCs (in one week after administration)	12	7,9 ± 0,05**
	AA 14 суток + кКФП (через 2 недели после введения) 14th day of AA + cFLCs (in two weeks after administration)	13	8,1 ± 0,1**
Введение нКФП Administration of nFLCs	AA 7 суток + нКФП (через неделю после введения) 7th day of AA + nFLCs (in one week after administration)	14	8,6 ± 0,3**
	AA 7 суток + нКФП (через 2 недели после введения) 7th day of AA + nFLCs (in two weeks after administration)	15	7,4 ± 0,08**
	AA 14 суток + нКФП (через неделю после введения) 14th day of AA + nFLCs (in one week after administration)	16	7,5 ± 0,5**
	AA 14 суток + нКФП (через 2 недели после введения) 14th day of AA + nFLCs (in two weeks after administration)	17	5,75 ± 0,25**

**Примечание:** различия значимы ( $p < 0,05$ ) по сравнению с: \* – животными без введения препаратов; # – между группами животных, которым вводили кКФП и нКФП.

**Notes:** significant changes ( $p < 0.05$ ) if compared with \* – animals not administered with any preparations; # – between groups of animals administered with cFLCs and nFLCs.

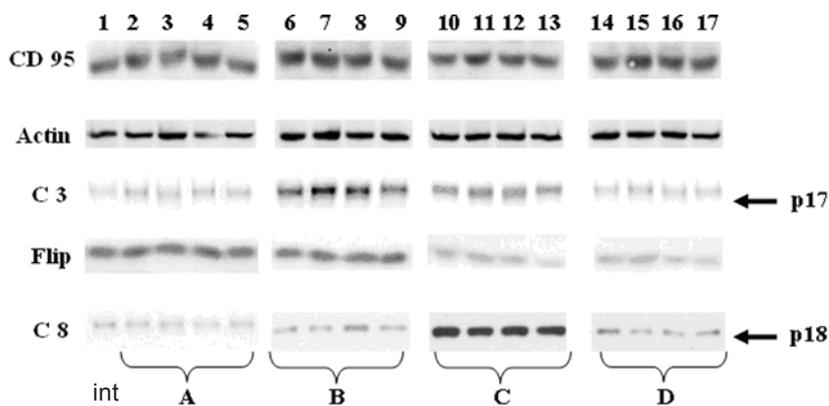
Отмеченный факт гибели клеток может быть результатом активации апоптотических процессов и реализоваться через модулирование внутриклеточных сигналов при участии внутриклеточных белков-каспаз. Классическим показателем индукции апоптоза является активация каспазы 3 [8], сопровождающаяся появлением продукта ее

induction is the caspase 3 activation [6] accompanied by the appearance of product of its catalytic activity, protein p17. In terms of the obtained results the protein p17 was in lysates of MPS cells in all the studied groups except the intact animals (group 1) which were observed to have a background level of enzyme (Fig. 2, A).



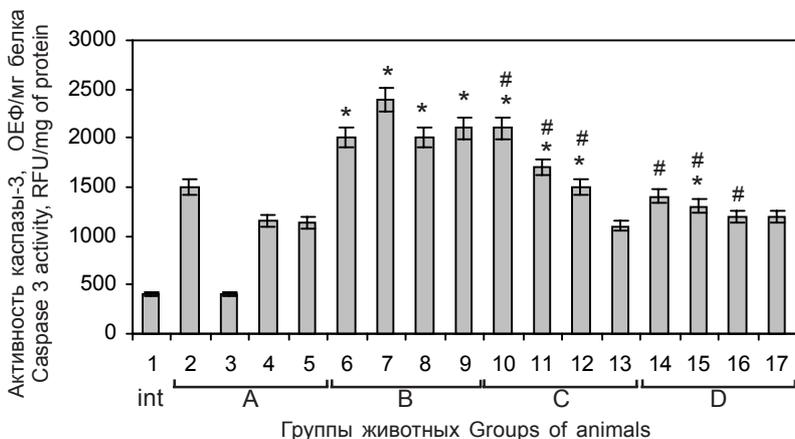
каталитической активности – белка p17. Как следует из полученных результатов, белок p17 присутствовал в лизатах клеток МФС всех исследуемых групп животных, кроме интактных (группа 1), у которых наблюдался фоновый уровень фермента (рис. 2, А).

Для количественной оценки каталитической активности каспазы 3 в разных экспериментальных группах был использован DEVD-AMC флуорогенный метод. Наиболее выраженная активность фермента (рис. 3) наблюдалась в группах животных, которым вводили ДК, с максимальным показателем в группе 7 (через 2 недели после введения ДК – на 7-е сутки развития АА). Высокий уровень активности каспазы 3 также был отмечен в группах животных, которым вводили кКФП. При этом максимальный результат, сравнимый по эффективности с ДК, наблюдался через неделю после введения кКФП на 7-е сутки развития АА (группа 10, С).



**Рис. 2.** Экспрессия протеинов каскада CD95 в клетках моноцитарно-фагоцитарной системы у животных на разных стадиях развития адъювантного артрита и после введения КФП: int – интактные; А – без введения препаратов; В – введение дексаметазона; С – введение кКФП; D – введение нКФП. Вестерн-блот анализ против CD95, каспазы 3(C3), FLIP, каспазы 8 (C8) был проведен на лизатах клеток МФС (p17 – продукт протеолиза каспазы 3; p18 – продукт протеолиза каспазы 8). Вестерн-блот анализ против актина был проведен в качестве контроля количества общего белка в образце. Нумерация групп животных соответствует приведенной в таблице.

**Fig. 2.** Expression of CD95 cascade proteins in MPS cells in animals at different stages of adjuvant arthritis and after administration of FLCs: int – intact; A – without administration of preparations; B – administration of dexamethasone; C – administration of cFLCs; D – administration of nFLCs. Western blot analysis of CD95, caspase 3(C3), FLIP, caspase 8 (C8) was performed in MPS cell lysates (p17 – product of caspase 3 proteolysis; p18 – product of caspase 8 proteolysis). Western blot analysis of actin was performed to control the amount of total protein in the sample. Enumeration of animal groups corresponds to the one presented in the Table.



**Рис. 3.** Активность каспазы 3 в лизатах клеток моноцитарно-фагоцитарной системы у животных на разных стадиях развития адъювантного артрита и после введения КФП: int – интактные; А – без введения препаратов; В – введение дексаметазона; С – введение кКФП; D – введение нКФП. Нумерация изучаемых групп животных соответствует группам в таблице. \* – значимые различия с группой животных без введения препаратов; # – между группами животных, которым вводили кКФП и нКФП;  $p < 0,05$ .

**Fig. 3.** Caspase 3 activity in MPS cell lysates of animals at different stages of adjuvant arthritis and after administration of FLCs: int – intact; A – without administration of preparations; B – administration of dexamethasone; C – administration of cFLCs; D – administration of nFLCs. Enumeration of animal groups corresponds to the one presented in the Table. \* – significant changes if compared with groups of animals not administered with any preparations; # – between groups of animals administered with cFLCs and nFLCs;  $p < 0.05$ .

We used fluorogenic method DEVD-AMC to evaluate caspase 3 activity in different experimental groups. The most pronounced enzyme activity (Fig. 3) was observed in the groups of animals which were administered DX with maximum index in group 7 (in 2 weeks after DX administration – to the 7<sup>th</sup> day of AA development). High level of caspase 3 activity was also noted in groups of animals which were administered cFLCs. Furthermore, the maximum result compared to DX by the efficacy was revealed in one week after cFLCs administration to the 7<sup>th</sup> day of AA development (group 10, C).

A positive effect after cFLCs administration to the 7<sup>th</sup> day of pathology development was kept during two weeks. Administration of cFLCs to the 14<sup>th</sup> day of AA (group 12, C) led to less activation of caspase 3 although this index exceeded that in group of animals not treated with preparations (groups 4 and 5, A). It is worth noting that nFLCs

Положительный эффект после введения кКФП на 7-е сутки развития патологии сохранялся на протяжении двух недель. Введение кКФП на 14-е сутки АА (группа 12, С) приводило к меньшей активации каспазы 3, хотя этот показатель превышал таковой в группе животных без введения препаратов (группы 4 и 5, А). Важно отметить, что нКФП имели примерно одинаковый эффект не зависимо от срока введения, и он существенно уступал эффекту в случае введения криоконсервированных клеток. Более высокие, по сравнению с животными с АА без введения препаратов, показатели активности каспазы 3 в группах животных, получавших КФП, могут быть обусловлены активацией «рецепторов летальности», играющих ведущую роль в стимуляции программированной клеточной гибели, например CD 95-рецептора – представителя семейства фактора некроза опухоли (ФНО) [5].

Известно, что в отличие от нейтрофилов макрофаги устойчивы к CD95/CD95L-опосредованному апоптозу [23]. Данный феномен связывают с повышенной (обычно при патологических состояниях) внутриклеточной экспрессией ингибитора апоптоза c-FLIP (*caspase 8 homologue FLICE-inhibitory protein*). Он действует как «молекула-переключатель», смещая активность Fas-сигнала в сторону пролиферации [12].

На рис. 2 видно, что клетки МФС во всех исследуемых группах имели высокий и примерно одинаковый уровень экспрессии CD95-структуры, что свидетельствует об их готовности к апоптозу. Также установлена высокая экспрессия FLIP у животных с АА, что в свою очередь соответствовало самому низкому проценту погибших клеток. У леченых ДК животных также был отмечен высокий уровень экспрессии FLIP. Важно, что уровень экспрессии этого протеина после введения животным КФП был значительно ниже. Данный факт позволяет говорить о том, что вводимые КФП, возможно, обладают более широким спектром как про- так и антиапоптотической активности относительно клеток МФС реципиентов с АА. Нами было показано, что такого рода активность характерна именно для КФП, поскольку после применения ДК подобного эффекта не наблюдалось (см. рис. 2, В). Способность КФП продуцировать те или иные регуляторные медиаторы при лечении РА является многоплановой и определяется выраженностью иммуновоспалительного процесса в организме [1]. Как отмечалось выше, имея *a priori* разный исходный статус перед введением реципиенту, нативные и криоконсервированные КФП могут по-разному «отвечать» на сложившуюся на данный момент в организме ситуацию [3]. Подтверждением этому

had virtually the same effect not depending on the period of administration, and it was significantly inferior to the effect in case of cryopreserved cells administration. Higher indices of caspase 3 activity in groups of the animals treated with FLCs as compared to the animals with АА not administered any preparation can be caused by the activation of ‘lethality receptors’, playing a leading role in the stimulation of programmed cell death, such as CD-95 receptor, a representative of the family of tumor necrosis factor (TNF) [14].

It is known that in contrast to neutrophils, macrophages are resistant to CD95/CD95L-mediated apoptosis [21]. This phenomenon is associated with an increased (usually under pathological conditions) intracellular expression of apoptosis inhibitor c-FLIP (caspase 8 homologue FLICE-inhibitory protein). It functions as a ‘switching molecule’ displacing the activity of Fas-signal towards proliferation [2].

Fig. 2 shows that the MPS cells in all experimental groups had high and nearly the same level of CD95 structure expression, which indicated their readiness to apoptosis. We also found high expression of FLIP in the animals with АА, which in turn corresponded to the lowest percentage of dead cells. In DX-treated animals we also noted a high level of FLIP expression. It is important that the expression level of this protein after administration of FLCs into animals was considerably lower. This fact suggests that the administered FLCs may have wider spectrum of both pro- and antiapoptotic activity in relation to the MPS cells of the recipients with АА. We have shown that this kind of activity is typical for FLCs, since after applying DX this effect was not observed (see Fig. 2, B). The ability of FLCs to produce any regulatory mediators during treatment of RA is multidimensional and it is determined by the severity of immunoinflammatory process in a body [7]. As mentioned above, native and cryopreserved FLCs *a priori* having different initial status prior to administration into a recipient may ‘response’ in different ways to the current situation in an organism [8]. This is proved by the established fact of FLIP production reduction. As is known, FLIP in the apoptotic cascade may be either an inhibitor or inducer of apoptosis interacting directly with the CD95 ligand through its ‘death domain’ and competing with procaspase 8 for the binding [2]. Therefore, it was of interest to assess the activity of caspase 8, one of the main caspases initiating apoptosis.

The analysis of the caspase 8 activation (see Fig. 2) by proteolysis products allowed establishing the tendency of its increase after FLCs administration. We did not manage to reveal the difference in the amount of p18 as compared to the intact control and other experimental groups. In order to establish more subtle differences in the content of this protein we used

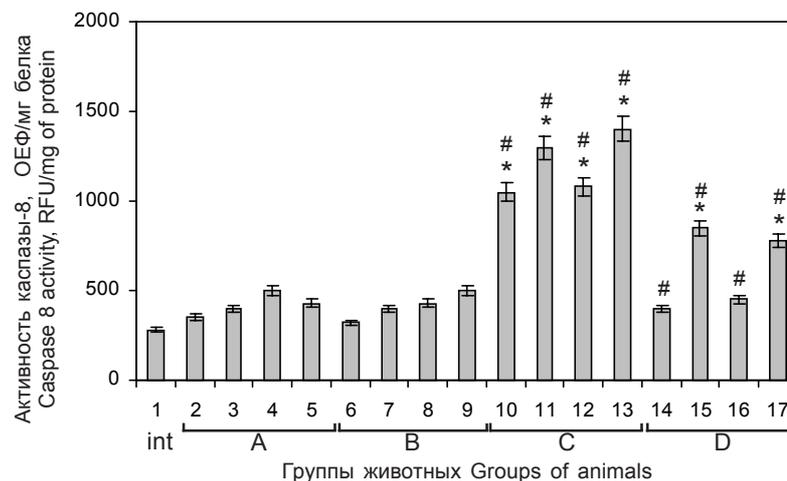


является установленный нами факт уменьшения продукции FLIP. Как известно, FLIP в апоптотическом каскаде может быть как ингибитором, так и индуктором апоптоза, взаимодействуя напрямую с CD95 лигандом через свой «домен смерти» и конкурируя с прокаспазой 8 за связывание [12]. Поэтому представляло интерес провести оценку активности каспазы 8 – одной из основных каспаз, инициирующих апоптоз.

Проведенный анализ активации каспазы 8 (см. рис. 2) по продуктам протеолиза позволил установить тенденцию ее повышения после введения кКФП. Разницу в количестве p18 по сравнению с интактным контролем и другими экспериментальными группами обнаружить не удалось. С целью установления более тонких различий содержания данного белка был использован метод определения каталитической активности каспазы 8, заключающийся в измерении количества продукта протеолитического расщепления флуорогенного субстрата. Были установлены значимые межгрупповые различия показателей. Так, наиболее выраженная активация каспазы 8 была отмечена после введения кКФП на 7 и 14-е сутки развития АА. При этом максимальная активность каспазы 8 в обоих случаях наблюдалась через 2 недели после введения клеток (рис. 4, С).

Подобные изменения наблюдали и после введения нКФП (рис. 4, D), но активность каспазы 8 была более чем в 2 раза меньше, чем у животных в группе с введением кКФП и не превышала показатели контроля через неделю после введения нКФП на 7 и 14-е сутки развития АА (группы 14 и 16).

Очевидно, что различия в проявлении как про-, так и антиапоптотической активности кКФП в отношении клеток МФС по сравнению с нКФП могут быть обусловлены следующими причинами. Во-первых перераспределением после криоконсервирования популяционного состава в суспензии КФП [4]. Ранее установлено, что некоторые режимы замораживания-отогрева способны селективно влиять на клетки гемопоэтических тканей, повышая содержание в них стволовых элементов [4, 10]. Этим объясняют, например, изменение иммунореактивности криоконсервированного материала по сравнению с нативным [15], его способности взаимодействовать с различными системами организ-



**Рис. 4.** Активность каспазы 8 в лизатах клеток моноцитарно-фагоцитарной системы у животных на разных стадиях развития адьювантного артрита и после введения КФП: int – интактные; А – без введения препаратов; В – введение дексаметазона; С – введение кКФП; D – введение нКФП. Нумерация изучаемых групп животных соответствует группам в таблице. \* – значимые различия с группой животных без введения препаратов; # – между группами животных, которым вводили кКФП и нКФП;  $p < 0,05$ .

**Fig. 4.** Caspase 8 activity in MPS cell lysates of animals at different stages of adjuvant arthritis and after administration of FLCs: int – intact; A – without administration of preparations; B – administration of dexamethasone; C – administration of cFLCs; D – administration of nFLCs. Enumeration of animal groups corresponds to the one presented in the Table. \* – significant changes if compared with groups of animals not administered with any preparations; # – between groups of animals administered with cFLCs and nFLCs;  $p < 0.05$ .

method of determining the catalytic activity of caspase 8, which consists in measuring the amount of product of proteolytic cleavage of fluorogenic substrate. There were established the significant differences in indices between the groups. Thus, the most pronounced activation of caspase 8 was noted after FLCs administration to the 7<sup>th</sup> and 14<sup>th</sup> days of AA. Moreover the maximum caspase 8 activity in both cases was observed in 2 weeks after cell administration (Fig. 4, C).

Similar changes were observed after administration of nFLCs (Fig. 4, D), but the caspase 8 activity by more than two times was lower than that of the group with administration of cFLCs and did not exceed the control values one week later administration of nFLCs to the 7<sup>th</sup> and 14<sup>th</sup> days of AA (groups 14 and 16).

Apparently, the differences in manifestation of both pro- and antiapoptotic activity of cFLCs in relation to MPS cells as compared to nFLCs may be stipulated by the following reasons. Firstly, this is the redistribution of population content in FLC suspension after cryopreservation [9]. Previously we have found that certain regimens of freeze-thawing can selectively affect the cells of hematopoietic tissues, increasing the content of stem elements in them [9, 25]. This is explained, for instance, by the change in immunoreactivity of

ма. Во-вторых, КФП продуцируют в высокой концентрации такие медиаторы, как  $\alpha$ -фетопротеин, ФНО- $\alpha$ , ИФН- $\gamma$ , ИЛ-10, которые при определенных условиях способны оказывать проапоптотическое действие на клетки МФС [9, 13, 14, 20]. Например, апоптогенное действие ФНО- $\alpha$ , играющего ключевую роль в патогенезе ряда воспалительных заболеваний аутоиммунного генеза, в том числе РА, ассоциируют с активацией каскада каспаз. При связывании ФНО- $\alpha$  со своим рецептором на поверхности клетки формируется внутриклеточный комплекс «домена смерти» и каспазы 8, в результате активации которого происходит запуск всего протеолитического каскада. Однако этот медиатор нельзя рассматривать как безусловный индуктор клеточной гибели, поскольку имеются данные о его антиапоптозном эффекте, который связан с перманентной продукцией короткоживущих ингибиторов апоптоза, в частности с активацией одного из ключевых факторов транскрипции – NF- $\kappa$ B. Известно, что антиапоптотические эффекты характерны для цитокинов воспалительного пула в физиологических концентрациях, тогда как их высокие концентрации вызывают обратную реакцию [5].

Очевидно, что в процессе криоконсервирования в КФП, как и в других биообъектах, могут проходить качественные изменения. На примере мононуклеаров периферической крови продемонстрировано значительное увеличение продукции таких цитокинов, как ФНО- $\alpha$ , ИФН- $\gamma$ , ИЛ-10 после холодового воздействия [25]. Не исключено, что криоконсервирование, как стрессиндуцирующий фактор, способно изменять и профиль продуцируемых КФП медиаторов, что может отражаться на их терапевтическом потенциале [15, 16]. В-третьих, нельзя недооценивать возможность факторов криоконсервирования влиять на уровень экспрессии определенных генов в КФП, кодирующих синтез регуляторных медиаторов, активаторов/ингибиторов апоптотических каскадов. В данном случае речь может идти как об особенностях «акцепторных» взаимодействий медиатор (лиганд) с мишенями (рецепторами) в системе донорский материал/организм реципиента, так и о дозозависимом проявлении эффекта этими медиаторами. Можно полагать, что продуцируемые КФП медиаторы находят свои альтернативные пути активации апоптотических каскадов, отличающихся от таковых у классических индукторов апоптоза – глюкокортикоидов. Так, в наших экспериментах, во всех исследуемых группах животных после применения ДК была отмечена активация каспазы 3, тогда как для каспазы 8 данный факт не был установлен. Кроме того, под действием КФП повышалась

cryopreserved material compared to the native one [18], its ability to interact with different systems of an organism. Secondly, FLCs in high concentrations produce mediators such as  $\alpha$ -fetoprotein, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10, which under certain conditions can have proapoptotic effect on MPS cells [3, 4, 5, 18]. For example, the apoptogenic effect of TNF- $\alpha$ , which plays a key role in pathogenesis of several inflammatory diseases of autoimmune origin, including RA, is associated with the activation of the caspase cascade. Upon binding of TNF- $\alpha$  to its receptor on the cell surface is formed an intracellular complex ‘death domain’ and the caspase 8, its activation results in the trigger of the entire proteolytic cascade. However, this mediator should not be considered as an unconditional inducer of cell death, since there is evidence on its antiapoptotic effect that is associated with a permanent production of short-living apoptosis inhibitors, particularly with the activation of a key transcription factor NF- $\kappa$ B. It is known that antiapoptotic effects are characteristic for cytokines of inflammatory pool at physiological concentrations, whereas their high concentrations cause reverse response [13].

Obviously, in the process of cryopreservation the qualitative changes may occur in FLCs as well as in other biological objects. In the example of peripheral blood mononuclear cells we demonstrated a significant rise of cytokine production such as TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10 after cold exposure [24]. It is possible that cryopreservation as a stress-inducing factor is also capable to change the profile of FLC-produced mediators, which can affect their therapeutic potential [11, 12]. Thirdly, one should not underestimate the possibility of cryopreservation factors to influence the level of expression of certain genes in FLCs coding the synthesis of regulatory mediators, activators/inhibitors of apoptotic cascades. In this case, we can talk about the features of ‘acceptor’ interactions between mediators (ligands) and targets (receptors) within the system donor material/recipient organism as well as the dose-dependent manifestation of the effect by these mediators. We can assume that the mediators produced by FLCs find their alternative ways of apoptotic cascades activation that differ from those of classical apoptosis inducers, glucocorticoids. Thus, in our experiments in all the groups of animals after application of DX we observed the activation of caspase 3, whereas in caspase 8 the one was not established. At the same time, under the effect of FLCs the caspase 3 and 8 activities increased. These data suggest that in FLCs there is a specific ‘protein profile’ determining a unique phenomenology of their behavior in animals with AA.

Of particular relevance are the results attesting the presence of more pronounced proapoptotic effect in cFLCs when administering into animals, escaping an



активность каспазы 3 и 8. Эти данные позволяют говорить о наличии у КФП специфического «протеинового профиля», который обуславливает уникальную феноменологию их поведения у животных с АА.

Особую значимость имеют результаты, свидетельствующие о проявлении более выраженного проапоптотического эффекта кКФП при их введении животным, минуя острую фазу развития патологии (на 7-е сутки АА). Ранее было показано, что активность биологических веществ, присутствующих в продуктах эмбриофетоплацентарного комплекса, может проявляться в различной степени, в зависимости от характера антигенной нагрузки на иммунную систему реципиента в конкретный период развития заболевания [1]. Наши данные подтверждают этот тезис, поскольку терапевтический эффект КФП зависел не только от их качественных характеристик, но и срока введения клеток. Так, при введении кКФП на 7-е сутки развития АА мы наблюдали активацию обеих каспаз, в то время как эффект после введения нКФП в данный период развития патологии существенно уступал криоконсервированным клеткам. Очевидно, что проявление разной степени активности КФП определяется фазой развития иммуновоспалительной реакции, которая на 7-е сутки имеет более благоприятный профиль для коррекции состояния МФС. Таким образом, полученные результаты являются экспериментальным обоснованием возможности использования КФП в качестве потенциальных препаратов при лечении АА – экспериментального аналога РА человека с обязательным учетом схем их применения в клинике.

### Выводы

Установлено снижение апоптотической активности в клетках МФС на фоне активации антиапоптотического каскада у животных с АА, что подтверждается высоким уровнем экспрессии ингибитора апоптоза – FLIP. Продемонстрирована способность нативных и криоконсервированных КФП проявлять проапоптотическую активность относительно клеток МФС при развитии АА у животных. Установлена зависимость терапевтического эффекта КФП от вида и срока введения клеток. Более выраженный проапоптотический эффект наблюдался после введения кКФП на 7-е сутки развития АА, что сопровождалось максимальной активацией белков CD95 каскада.

Проведенные исследования являются актуальными с точки зрения повышения эффективности методов лечения патологий аутоиммунного генеза, в основе которых лежат нарушения процессов апоптоза.

acute phase of disease (to the day 7 of AA). Previously it has been shown that the activity of biological substances present in the products of embryofetoplacental complex may be manifested in various degrees, depending on the character of an antigenic load on the recipient's immune system in a specific period of the disease [7]. Our findings prove this thesis, as long as the therapeutic effect of FLCs depended not only on their qualitative characteristics, but also on the period of cells administration. Thus, when administering the cFLCs to the 7<sup>th</sup> day of AA, we observed activation of both caspases, while the effect after the nFLCs administration in this period of pathology was significantly inferior to the cryopreserved cells. It is obvious that the expression of different activity in FLCs is determined by the phase of immunoinflammatory reaction development which to the 7<sup>th</sup> day has more favorable profile for the correction of MPS state. Thus, the results obtained are experimental basis for the possibility of using FLCs as potential preparations for the treatment of AA, experimental counterpart of human RA, with the obligatory consideration of schemes of their application in the clinic.

### Conclusions

We established the reduction of apoptotic activity in the MPS cells on the background of activation of antiapoptotic cascade in the animals with AA, as evidenced by a high level of expression of FLIP, the inhibitor of apoptosis. We have demonstrated the ability of native and cryopreserved FLCs to manifest proapoptotic activity as regard to MPS cells during the development of AA in animals. The dependence of FLCs therapeutic effect on the type and period of cell administration was established. More pronounced proapoptotic effect was observed after administration of cFLCs to the 7<sup>th</sup> day of AA, which was accompanied by the maximum activation of CD95 cascade protein.

The studies are relevant in terms of increase in treatment efficiency of pathologies of autoimmune genesis, which are based on a disordered apoptosis.

### References

1. Bendele A.M. Animal models of rheumatoid arthritis. *J Musculoskel Neuron Interact* 2001; 1(4): 377–385.
2. Catrina A.I., Ulfgrén A.K., Lindblad S. et al. Low levels of apoptosis and high FLIP expression in early rheumatoid arthritis synovium. *Ann Rheum Dis* 2002; 61: 934–936.
3. Chereshev V.A., Rodionov S.Yu., Cherkasov V.A. et al. Alpha-fetoprotein. *Ekaterinburg: Uro RAN*; 2004.
4. Dubich E., Semenkova L., Dubich I. et al. Fetoprotein causes apoptosis in tumor cells via a pathway independent of CD 95, TNFR1 and TNFR2 through activation of caspase-3-like proteases. *Eur J Biochem* 1999; 266(3): 750–761.



## Литература

1. Гольцев А.М., Бабенко Н.М., Останкова Л.В. и др. Застосування криоконсервованих продуктів ембріофетоплацентарного комплексу як коректорів аутоімунних захворювань на моделі експериментального алергійного енцефаломієліту (ЕАЕ) // Трансплантологія. – 2003. – Т. 4, №1. – С. 207–209.
2. Гольцев А.Н., Грищенко В.И., Рассоха И.В. и др. Возможность использования продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса как корректора апоптотических процессов при аутоиммунных заболеваниях // Проблемы криобиологии. – 2003. – №4. – С. 41–48.
3. Гольцев А.Н., Дубрава Т.Г., Гаевская Ю.А. и др. Криобиологические технологии как компонент оптимизированных методов лечения аутоиммунных заболеваний // Клінічна імунологія. Алергологія. Інфектологія. – 2009. – №1–2. – С. 46–51.
4. Гольцев А.Н., Дубрава Т.Г., Останкова Л.В. и др. Особенности влияния криоконсервирования на функциональный потенциал стволовых кроветворных клеток фетальной печени разных сроков гестации // Проблемы криобиологии. – 2009. – Т. 19, №2. – С. 186–199.
5. Гольцев А.Н., Ямпольская Е.Е. Апоптоз клеток моноцитарно-фагоцитарной системы и механизмы его регуляции // Проблемы криобиологии. – 2006. – Т. 16, №4. – С. 408–419.
6. Коваленко В.М. Ревматичні захворювання: сучасні тенденції фармакотерапії // Укр. ревматол. журн. – 2009. – Т. 3, №37. – С. 511.
7. Сухих Г.Т., Богданова И.М., Малайцев В.В., Фисенко А.П. Перспективы использования фетальных стволовых/прогениторных клеток человека в клеточной терапии // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1998. – Т. 126. – С. 178–181.
8. Фильченков А.А. Каспазы: регуляторы апоптоза и других клеточных функций // Биохимия. – 2003. – Т. 68, Вып.4. – С. 453–466.
9. Черешнев В.А., Родионов С.Ю., Черкасов В.А. и др. Альфа-фетопротеин. – Екатеринбург: Уро РАН, 2004. – 376 с.
10. Ямпольская Е.Е., Гольцев А.Н., Гурина Т.М. Изменение функционального потенциала клеток фетальной печени в зависимости от режима криоконсервирования // Світ медицини та біології. – 2007. – №1. – С. 89–93.
11. Bendele A.M. Animal models of rheumatoid arthritis // J. Musculoskel. Neuron. Interact. – 2001. – Vol. 1, №4. – P. 377–385.
12. Catrina A.I., Ulfgren A.K., Lindblad S. et al. Low levels of apoptosis and high FLIP expression in early rheumatoid arthritis synovium // Ann. Rheum. Dis. – 2002. – №61. – P. 934–936.
13. Dubich E., Semenkova L., Dubich I. et al. Fetoprotein causes apoptosis in tumor cells via a pathway independent of CD 95, TNFR1 and TNFR2 through activation of caspase-3-like proteases // Eur. J. Biochem. – 1999. – Vol. 266, №3. – P. 750–761.
14. Estaquier J., Ameisen J.C. A role for T-helper type 1 and type 2 cytokines in the regulation of human monocyte apoptosis // Blood. – 1997. – Vol. 90, №4. – P. 1618–1625.
15. Goltsev A.N., Grischenko V.I., Sirous M.A. et al. Cryopreservation: an optimizing factor for therapeutic potential of fetoplacental complex products // Biopreservation and Biobanking. – 2009. – Vol. 7, №1. – P. 29–38.
16. Goltsev A.N., Lutsenko E.D., Dimitrov A.Yu. et al. Peculiarities of functional state modulation of genetic apparatus of fetal liver cells with stemness characteristics after cryopreservation // CryoLetters. – 2011. – Vol. 32, №6. – P. 543–544.
17. Huang Q., Ma Y., Adebayo A., Pope R.M. Increased macrophage activation mediated through toll-like receptors in rheumatoid arthritis // Arthritis Rheum. – 2007. – Vol. 56, №7. – P. 2192–2201.
18. Kinne R.W., Stuhlmiller B., Palombo-Inne E. et al. The role of macrophages in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. In: Estaquier J., Ameisen J.C. A role for T-helper type 1 and type 2 cytokines in the regulation of human monocyte apoptosis. Blood 1997; 90(4): 1618–1625.
19. Filchenkov A.A. Caspases: regulators of apoptosis and other cell functions. Biochemistry 2003; 68(4): 453–466.
20. Goltsev A.N., Babenko N.M., Ostantkova L.V. Use of embryo-fetoplacental complex products as correctors of autoimmune diseases in experimental model of allergic encephalomyelitis. Transplantologiya 2003; 4(1): 207–209.
21. Goltsev A.N., Dubrava T.G., Gayevskaya Yu.A. et al. Cryobiological technologies as a component of optimized methods in therapy of autoimmune diseases. Klin Immunol Alergol Infektol 2009; 1–2: 46–51.
22. Goltsev A.N., Dubrava T.G., Ostantkova L.V. et al. Peculiarities of cryopreservation effect on functional potential of fetal liver hemopoietic stem cells of various gestation terms. Problems of Cryobiology 2009; 19(2): 186–199.
23. Goltsev A.N., Grischenko V.I., Rassokha I.V., Ostantkov M.V. Possibility of using the embryo fetoplacental complex products to correct apoptotic processes under autoimmune disease. Problems of Cryobiology 2003; 4: 41–48.
24. Goltsev A.N., Grischenko V.I., Sirous M.A. et al. Cryopreservation: an optimizing factor for therapeutic potential of fetoplacental complex products. Biopreservation and Biobanking 2009; 7(1): 29–38.
25. Goltsev A.N., Lutsenko E.D., Dimitrov A.Yu. et al. Peculiarities of functional state modulation of genetic apparatus of fetal liver cells with stemness characteristics after cryopreservation. CryoLetters 2011; 32(6): 543–544.
26. Goltsev A.N., Yampolskaya E.E. Cell apoptosis of monocyte-phagocytic system and mechanisms for its regulation. Problems of Cryobiology 2006; 16(4): 408–419.
27. Huang Q., Ma Y., Adebayo A., Pope R.M. Increased macrophage activation mediated through toll-like receptors in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 2007; 56(7): 2192–2201.
28. Kinne R.W., Stuhlmiller B., Palombo-Inne E. et al. The role of macrophages in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. In: rheumatoid arthritis: the new frontiers in pathogenesis and treatment. Oxford University Press; 2000: p. 69–87.
29. Kovalenko V.M. Rheumatic diseases: modern trends in pharmacotherapy. Ukr Revmatol Zhurn 2009; 3 (37): 511.
30. Linehan S.A. The mannose receptor is expressed by subsets of APC in non-lymphoid organs. BMC Immunol 2005; 6: 1471–1477.
31. Mangan D.F., Robertson B., Wahl S.M. IL-4 enhances programmed cell death (apoptosis) in stimulated human monocytes. J Immunol 1992; 148(6): 1812–1816.
32. Maniati E., Potter P., Rogers N.J., Morley B.J. Control of apoptosis in Autoimmunity. J Pathology 2008; 214: 190–198.
33. Nagata S., Hanayama R., Kawane K. Autoimmunity and the clearance of dead cells. Cell 2010; 140: 619–630.
34. Pope R.M. Apoptosis as a therapeutic tool in rheumatoid arthritis. Nature Reviews Immunology 2002; 2(7): 1–9.
35. Riccardi C., Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. Nature Protocols 2006; 1: 1458–1461.
36. Sukhikh G.T., Bogdanova I.M., Malaytsev V.V., Fisenko A.P. Prospectives of using human fetal stem/progenitor cells in cell therapy. Bulletin of Experimental Biology and Medicine 1998; 126: 178–181.
37. Venkataraman M. Effect of cryopreservation on immune responses. VIII. Enhanced secretion of interferon-gamma by frozen human peripheral blood mononuclear cells. Cryobiology 1995; 32: 528–534.
38. Yampolskaya K.Ye., Goltsev A.N., Gurina T.M. Change in functional potential of fetal liver cells dependent from cryopreservation regimen. Svit of Medicine and Biology 2007. 1: 89–93.
39. Zhang X., Goncalves R., Mosser D.M. The Isolation and Characterization of Murine Macrophages. Curr Protoc Immunol; 2008; Chapter: Unit–14.1.



- rheumatoid arthritis: the new frontiers in pathogenesis and treatment / Ed. by Wollheim F., Firestein G.S., Panayi G.S. Oxford University Press. – 2000. – P. 69–87.
19. Linehan S.A. The mannose receptor is expressed by subsets of APC in non-lymphoid organs // *BMC Immunol.* – 2005. – Vol. 6. – P. 1471–1477.
  20. Mangan D.F., Robertson B., Wahl S.M. IL-4 enhances programmed cell death (apoptosis) in stimulated human monocytes // *J. Immunol.* – 1992. – Vol. 148, №6. – P. 1812–1816.
  21. Maniati E., Potter P., Rogers N.J., Morley B.J. Control of apoptosis in Autoimmunity // *J. Pathology.* – 2008. – Vol. 214. – P. 190–198.
  22. Nagata S., Hanayama R., Kawane K. Autoimmunity and the clearance of dead cells // *Cell.* – 2010. – №140. – P. 619–630.
  23. Pope R.M. Apoptosis as a therapeutic tool in rheumatoid arthritis // *Nature Reviews Immunology.* – 2002. – Vol. 2, №7. – P. 1–9.
  24. Riccardi C., Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry // *Nature Protocols.* – 2006. – №1. – P. 1458–1461.
  25. Venkatarman M. Effect of cryopreservation on immune responses. VIII. Enhanced secretion of interferon-gamma by frozen human peripheral blood mononuclear cells // *Cryobiology.* – 1995. – Vol. 32. – P. 528–534.
  26. Zhang X., Goncalves R., Mosser D.M. The Isolation and Characterization of Murine Macrophages // *Curr. Protoc. Immunol.* – 2008., Chapter: Unit–14.1.