

УДК 612.649.011.87:616.15:615.9

О.В. Кудокоцева*, И.И. Ломакин, Г.А. Бабийчук

Купирование фторурациловой миелодепрессии у мышей путем введения криоконсервированных препаратов кордовой крови

UDC 612.649.011.87:616.15:615.9

O.V. Kudokotseva*, I.I. Lomakin, G.A. Babijchuk Cryopreserved Cord Blood Products Mitigate Fluorouracil Myelodepression in Mice

Реферат: Миелодепрессия является одним из основных патологических синдромов, возникающих в результате действия цитотоксикантов на организм человека и животных. На модели цитостатической миелодепрессии, вызванной применением 5-фторурацила (5-ФУ) в максимально переносимой дозе (228 мг/кг), изучали влияние криоконсервированного клеточного препарата кордовой крови (КК) на динамику восстановления костномозгового кроветворения у мышей линии СВА. Показано, что введение 5-ФУ приводило к выраженной миелодепрессии и торможению процессов репарации кроветворной ткани и ее отдельных ростков. Наиболее чувствительными к действию 5-ФУ оказались клетки миелоидного и эритроидного ростков кроветворения, менее чувствительны – клетки лимфоидного ростка. Внутривенное введение препарата КК способствовало восстановлению костномозгового кроветворения к 12-м суткам и полному купированию токсической лейкопении на 9-е сутки эксперимента.

Ключевые слова: цитотоксиканты, фторурацил, миелодепрессия, кроветворение, кордовая кровь, криоконсервированные ядросодержащие клетки.

Реферат: Мієлодепресія є одним із основних патологічних синдромів, який виникає в результаті дії цитотоксикантів на організм людини і тварин. На моделі цитостатичної мієлодепресії, викликаній застосуванням 5-фторурацилу (5-ФУ) в максимально переносимій дозі (228 мг/кг), вивчали вплив криоконсервованого клітинного препарату кордової крові (КК) на динаміку відновлення кістковомозкового кровотворення у мишей лінії СВА. Показано, що введення 5-ФУ призводило до вираженої мієлодепресії й гальмування процесів репарації кровотвірної тканини та її окремих ростків. Найбільш чутливими до дії 5-ФУ виявилися клітини мієлоїдного та еритроїдного ростків кровотворення, менш чутливими – клітини лімфоїдного ростка. Внутрішньовенне введення препарату КК сприяло відновленню кістковомозкового кровотворення до 12-ї доби і повному купіруванню токсичної лейкопенії на 9-у добу експерименту.

Ключові слова: цитотоксиканти, фторурацил, мієлодепресія, кровотворення, кордова кров, криоконсервовані ядромісні клітини.

Abstract: Myelodepression is one of the major pathological syndromes resulting from cytotoxicant action on humans and animals. Effect of cryopreserved cord blood cell preparation (CB) on recovery dynamics of bone marrow hematopoiesis in CBA mice was studied with the model of cytostatic myelodepression caused by the use of 5-fluorouracil (5-FU) in maximum tolerated dose (228 mg/kg). It was shown that 5-FU introduction caused an expressed myelodepression and slowed reparation of hemopoietic tissue and its individual lineages. The most sensitive to 5-FU effect were cells of myeloid and erythroid lineages, and less sensitive appeared to be the lymphoid cells. Intravenous administration of CB preparation contributed to bone-marrow hematopoietic regeneration to the 12th day and complete reduction of toxic leukopenia to the 9th day of the experiment.

Key words: cytotoxicants, fluorouracil, myelodepression, hemopoiesis, cord blood, cryopreserved nucleated cells.

Кроветворная система является основным индикатором гомеостаза организма и обеспечивает компенсаторно-приспособительные реакции при воздействии какого-либо раздражителя [5, 9, 15]. Одними из главных повреждающих кроветворную систему агентов являются цитотоксиканты, представляющие большую группу высокотоксичных веществ. Эта группа включает, помимо лекарственных препаратов (циклофосфан, 5-фторурацил, азатиоприн, трометамин/кеторолак), бое-

Hematopoietic system is the main indicator of homeostasis and provides compensatory-adaptive responses when exposed to any stimuli [9, 19, 29]. Cytotoxicants belong to the main damaging agents of hematopoietic system and represent a large group of highly toxic substances. Besides the drugs (cyclophosphamide, 5-fluorouracil, azathioprine, tromethamine/ketorolac), these include combat chemical agents (mustard gas, lewisite *etc.*) and some industrial agents (benzene, ethylene oxide, and trinitrotoluene *etc.*). Injury

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

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

*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-30-84,
электронная почта: kudokosha@gmail.com

*To whom correspondence should be addressed:
23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 3737435, fax: +380 57 373 3084,
e-mail: kudokosha@gmail.com

Поступила 30.06.2015
Принята в печать 07.10.2015

Received June, 30, 2015
Accepted October, 07, 2015

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2015. – Т. 25, №4. – С. 359–370.
© 2015 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

Probl. Cryobiol. Cryomed. 2015. 25(4): 359–370.
© 2015 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

вые отравляющие вещества (иприт, люизит и др.) и некоторые промышленные агенты (бензол, этиленоксид, тринитротолуол и др.). Поражение этими веществами возможно в ходе боевых действий, при химических авариях и катастрофах, диверсионных и террористических актах [26]. Известно, что цитотоксиканты оказывают повреждающее действие на здоровые, активно обновляющиеся ткани организма, в частности на кроветворную систему, тем самым формируют цитопенический синдром и подавляют иммунную систему, приводя к развитию вторичных иммунодефицитных состояний [9, 21]. Однако химиотерапия с применением лекарственных цитотоксикантов (цитостатиков) до сих пор занимает ведущее место в схемах лечения злокачественных новообразований. Одним из основных патологических синдромов, возникающих в условиях цитостатической терапии, является миелодепрессия, которая в значительной степени ограничивает продолжительность применения большинства известных цитостатиков [8, 9, 21]. К данной группе препаратов относится и используемый в нашей работе противоопухолевый фторпиримидиновый антиметаболический цитостатик 5-фторурацил (5-ФУ), который вызывает более глубокую и продолжительную ингибицию костномозгового кроветворения у мышей, чем циклофосфан – алкилирующий цитостатический препарат, близкий по химическому составу к азотным аналогам иприта [5, 15].

Разработка новых средств и методов лечения поражений цитотоксическими ядами, в том числе и цитостатическими лекарственными препаратами, является одной из актуальных проблем современной токсикологии и онкологии. С целью коррекции гипо- и апластических состояний кроветворения в процессе химиотерапии применяют производные нуклеиновых кислот, витамины, гормоны, моноклеотиды, пуриновые основания, иммуномодуляторы, соли лития, препараты природного происхождения [24, 28]. Однако указанные лекарственные средства (зимозан, витамины группы В, элеутерококк и др.) не обладают специфической гемопоэз-стимулирующей активностью и малоэффективны при гипопластических состояниях костного мозга. В настоящее время в клинической онкологической практике для стимуляции эритропоэза применяют рекомбинантные эритропоэтины («Эпрекс», «Рекормон»), для стимуляции лейкопоэза – факторы роста («Лейкомакс», «Нейпоген») [20, 28, 29]. Однако узкая направленность корректоров цитотоксичности, наличие побочных эффектов или высокая стоимость ограничивают их применение [8].

В литературе приведены данные о применении биологически активных веществ из тканей животного (очищенный экстракт из селезенки телят,

with these substances is possible during hostilities, in chemical accidents and disasters, sabotage and terrorist acts [3]. The cytotoxicants have been known to extremely affect healthy, actively renewing tissues of a body, particularly hematopoietic system, and to form thereby cypopenic syndrome and to suppress the immune system, leading to the development of secondary immunodeficiency [28, 29]. However, chemotherapy with medical cytotoxicants (cytostatic agents) has still occupied a leading place in treatment of malignant tumors. Myelodepression, greatly limiting the duration of the most known cytostatics application is one of the main pathological syndromes resulting from cytostatic therapy [28, 29, 33]. Antitumor fluoropyrimidine antimetabolite cytostatic 5-fluorouracil (5-FU) used in our research refers to this group of drugs. It causes more profound and long-lasting inhibition of bone marrow hematopoiesis in mice than cyclophosphan, alkylating cytostatic drug, similar in chemical composition to the nitrogen analogs of mustard gas [9, 19].

The development of new products and methods to treat cytotoxic poison lesions, including the cytotoxic drugs, is one of the actual problems of current toxicology and oncology. To correct hypo- and aplastic states of hematopoiesis during chemotherapy one uses nucleic acid derivatives, vitamins, hormones, mononucleotides, purine bases, immunomodulators, lithium salts, preparations of natural origin [6, 31]. However, the mentioned drugs (in particular, zymosan, vitamin B complex, eleuterococcus *etc.*) do not have a specific hematopoiesis-stimulating activity and are ineffective in treating hypoplastic states of bone marrow. Nowadays clinical oncologists in their practice use recombinant erythropoietins (Eprex, Recormon) to stimulate erythropoiesis and the growth factors (Leukomax, Neupogen) to stimulate the leucopoiesis [6, 7, 25]. However, a narrow targeting of cytotoxicity correctors, the presence of side effects or high expenditures limit their use [33].

There are the reports about the application of biologically active substances from animal tissues (purified extract from calf spleen, Myelopidum from bone marrow, Vilosenum and Thymogen derived from animal thymus, pig splenopeptides) and of plant origin which possess hematopoiesis-stimulating activity [4, 14]. However, these products are also not universal and their application has not an expected therapeutic effect. In this regard, the creation and study of new hemocorrecting agents is of great importance for medicine and biology.

To develop new highly effective correctors of myelodepression being the result of lesions of a body with cytotoxic poisons the mechanisms of cytotoxicant action on hematopoiesis should be profoundly understood. Over several years, these studies have been carried-out at the laboratory of Pathological Physiology



миелопид из костного мозга, виллозен и тимоген из тимуса животных, спленопептиды свиной) и растительного происхождения, обладающих гемопоэстимулирующим действием [3, 10]. Однако эти лекарственные средства также не являются универсальными, а их применение не имело ожидаемого терапевтического эффекта. В этой связи создание и изучение новых гемокорректоров имеет большое значение для медицины и биологии.

С целью разработки новых высокоэффективных средств коррекции миелодепрессивных состояний в результате поражений организма цитотоксическими ядами необходимо глубокое понимание механизмов действия цитотоксикантов на процессы кроветворения. Такие исследования на протяжении ряда лет проводятся в лаборатории патологической физиологии и экспериментальной терапии НИИ фармакологии Томского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук [5]. На примере введения цитостатических препаратов, отличающихся механизмом действия, сотрудниками лаборатории на различных моделях миелосупрессий показано, что развитие гипоплазии кроветворной ткани и динамика восстановления гемопоэза наряду с прямым супрессирующим эффектом токсических агентов на кроветворные клетки во многом определяются характером дисрегуляции кроветворения. Репаративные процессы в кроветворной ткани в значительной мере обеспечиваются стволовыми кроветворными клетками и клеточными элементами, составляющими гемопоэзиндуцирующее микроокружение.

Доступным источником стволовых гемопоэтических клеток (ГСК) является кордовая (пуповинная) кровь (КК), содержащая стволовые и коммитированные кроветворные клетки [1, 2, 4, 6, 7, 25, 27]. В КК, кроме ГСК, обладающих высокой пластичностью и плюрипотентностью, выявлено наличие мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток, эндотелиальных прогениторных клеток, которые могут рассматриваться в качестве элементов гемопоэзиндуцирующего микроокружения [16, 17]. Таким образом, в КК показано содержание различных клеточных популяций, каждая из которых по отдельности или вместе может вносить вклад в терапевтический эффект, оказываемый препаратами КК. В этой связи аллогенные и аутологичные введения ГСК КК являются общепринятым методом лечения многих онкологических и незлокачественных заболеваний системы крови [4, 16, 19], коррекции иммуно- и гемодепрессивных состояний различного генеза [7, 11, 23, 25, 31].

В состав препарата КК, используемого в наших исследованиях, входит суспензия криоконсервированных ядросодержащих (CD45⁺) клеток (кЯСК),

and Experimental Therapy of Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine of Tomsk Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences (Tomsk, Russia) [9]. The scholars introduced cytotoxic drugs with different mechanism of action and revealed in various models of myelodepression that the developed hypoplasia of hematopoietic tissue and hematopoietic recovery is largely determined by the hematopoiesis disregulation nature, besides a direct suppressive effect of toxic agents on hemopoietic cells. Reparation of hematopoietic tissues is largely provided by hemopoietic stem cells and the ones of hemopoiesis-inducing microenvironment.

Umbilical cord blood (CB), containing stem and committed hemopoietic cells is available source of hematopoietic stem cells (HSCs) [1, 2, 5, 11, 12, 30, 32]. Besides HSCs possessing a high plasticity and pluripotency, the CB contains multipotent mesenchymal stem cells, endothelial progenitor cells, which could be considered as the elements of hemopoiesis-inducing microenvironment [20, 22]. In other words, CB contains different cell populations, every one of which either alone and/or together may contribute to the therapeutic effect of CB products. Therefore, allogeneic and autologous introductions of CB HSCs are considered as a common treatment for many cancer and nonmalignant diseases of the blood system [20, 24, 32], correction of immuno- and hemodepressive states of various origin [10, 12, 15, 27, 30].

CB preparation used in our studies includes the suspension of cryopreserved nucleated (CD45⁺) cells (cNCs) suspended in autologous plasma [1, 2, 16]. Nucleated cells (NCs) of CB are presented with cell populations of different composition and differentiation degree, including the HSCs (CD34⁺) and cell populations comprising hemopoiesis-inducing microenvironments. The above mentioned facts enable to consider the cryopreserved cell suspension of CB as a complex medical product of polyvalent spectrum. It should be noted that the plasma of CB (as a unique biologically active substance), which contains NCs of CB cryopreserved preparation, is of specific interest to the scholars. It contains more than 60 specific placental proteins, being the cytokines, interleukins, enzymes, adaptogens, growth factors, immunoregulatory agents. In addition, CB plasma contains a variety of peptides, hormones, vitamins, microelements [11, 12].

All of the above mentioned properties of suspension of CB NCs suspended in autologous plasma allow to assume a high clinical efficiency of cryopreserved cell preparations based on cord blood in terms of hematopoiesis recovery under extreme cytotoxicant effects and reduction of their damaging effect on healthy proliferating cells in bone marrow.



взвешенная в аутологичной плазме [1, 2, 12]. Ядроконсервированные клетки (ЯСК) КК представлены различными по составу и степени дифференцировки клеточными популяциями, среди которых определены ГСК (CD34⁺) и популяции клеток, входящих в состав гемопоэз-индуцирующего микроокружения. Вышеуказанные факты дают право считать, что криоконсервированная клеточная суспензия КК может применяться как комплексный препарат поливалентного спектра действия. Следует отметить, что плазма КК (как уникальная биологически активная субстанция), в которой взвешены ЯСК криоконсервированного препарата КК, представляет особый интерес для исследователей. Она содержит более 60 специфических плацентарных белков, которые играют роль цитокинов, интерлейкинов, ферментов, адаптогенов, факторов роста, иммунорегуляторных агентов. Кроме этого, в плазме КК содержится целый ряд пептидов, гормонов, витаминов, микроэлементов [6, 7].

Все вышеперечисленные свойства суспензии ЯСК КК, взвешенной в аутологичной плазме, позволяют сделать предположение о высокой клинической эффективности криоконсервированных клеточных препаратов на основе кордовой крови для нормализации кроветворения при экстремальных условиях воздействия цитотоксикантов и снижения их повреждающего действия на здоровые пролиферирующие клетки костного мозга.

Целью данной работы является изучение влияния криоконсервированного клеточного препарата кордовой крови на процессы костномозгового кроветворения при фторурациловой миелодепрессии.

Материалы и методы

Эксперименты были выполнены в осенне-зимний период на мышах линии СВА массой 18–20 г. Животные содержались в стандартных условиях вивария ИПКиК НАН Украины (Харьков) при естественном световом режиме на стандартной диете, свободном доступе к воде и пище. Исследования проводили в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными V Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2013) и согласованными с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1985).

Экспериментальное моделирование миелодепрессии у мышей проводили с помощью однократного внутрибрюшинного введения препарата 5-ФУ («ЕВЕВЕ», Австрия) в максимально переносимой дозе 228 мг/кг [5]. Фторурацил относится к группе антиметаболитов, является аналогом пиримидино-

The research aim was to study the effect of cryopreserved cord blood cell preparation on bone marrow hematopoiesis at fluorouracil myelodepression.

Materials and methods

The experiments were performed within autumn-winter period in CBA mice of 18–20 g. The animals were kept in the vivarium of IPC&C of the National Academy of Sciences of Ukraine under standard conditions of natural light and standard diet with water and food *ad libitum*. The experiments in animals were performed in compliance with the ‘General Principles of Experiments in Animals’ approved by the 5th National Congress in Bioethics (Kiev, 2013) and agreed with the statements of the ‘European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes’ (Strasbourg, 1985).

Experimental myelodepression in mice was simulated using a single intraperitoneal injection of 5-FU (ЕВЕВЕ, Austria) in maximum tolerated dose of 228 mg/kg [9]. Fluorouracil is referred to the group of antimetabolites, is an analogue of pyrimidine components of nucleic acids and has a strong toxic effect. The drug is prescribed to treat the patients with malignant tumors, it is widely applied in protocols of multiagent chemotherapy for various forms of cancers. Parameters of toxicity of fluorouracil are almost identical at different ways of administration. Hematopoiesis inhibition and digestion disorders are the limiting toxicity [28].

The animals were divided into the following groups (6 mice each): control (C), experimental (E), and intact (background). Control group of animals was treated only with 5-FU. Mice of the experimental group were treated with a single injection of 5-FU and after 3–4 hrs were intravenously injected with 0.2 ml cNCs of human CB (HCB) (Interdepartmental Scientific Center of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Academy of Medical Sciences and Ministry of Health Care of Ukraine, Kharkov) in a dose of 5×10^8 viable cNCs/kg [1, 2, 11, 27, 32]. NCs were sedimented from the whole CB in a solution of dextran with $60,000 \pm 10,000$ molecular weight, cryopreserved by the program developed at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine and stored in a low temperature bank of the Institute at -196°C [1, 2]. CB cNCs were thawed in a water bath (37°C) for 40 seconds. Intact mice were injected only with physiological solution in an equivalent volume (0.2 ml). All the studied indices in the group of intact animals were not significantly changed through whole experimental term, therefore the data were averaged over the observation time for the material



вых компонентов нуклеиновых кислот и обладает сильным токсичным эффектом. Препарат 5-ФУ назначают для лечения больных злокачественными опухолями, его широко включают в схемы полихимиотерапии различных форм опухолей. Показатели токсичности при разных путях введения фторурацила практически одинаковы. Лимитирующей токсичностью являются угнетение гемопоэза и нарушения со стороны пищеварения [21].

Животных разделили на следующие группы по 6 в каждой: контрольную, опытную и интактную (фон). Группе контрольных животных вводили только 5-ФУ. Мышам опытной группы через 3–4 ч после однократной инъекции 5-ФУ внутривенно вводили 0,2 мл кЯСК кордовой крови человека (ККЧ) (ГП «МНЦ КиК НАН, АМН и МОЗ Украины», Харьков) в дозе 5×10^8 жизнеспособных кЯСК/кг [1, 2, 4, 6, 23]. Клетки выделяли из цельной КК методом седиментации в растворе декстрана с м. м. 60000 ± 10000 , криоконсервировали по разработанной в ИПКиК НАН Украины программе и хранили в низкотемпературном банке института при температуре -196°C [1, 2]. Размораживали кЯСК ККЧ на водяной бане (37°C) в течение 40 с. Интактным мышам (фон) вводили только физиологический раствор в эквивалентном объеме (0,2 мл). Все исследуемые показатели в группе интактных животных значительно не изменялись в зависимости от времени проведения эксперимента и были усреднены по всему сроку наблюдения для простоты восприятия материала. Животных выводили из эксперимента на 2, 5, 9, 12 и 16-е сутки путем декапитации.

Исследования ЯСК (CD45^+) кордовой крови, в том числе и гемопоэтических (CD34^+), до и после криоконсервирования были проведены методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитометре «FACS Calibur» («Becton Dickinson», США) с использованием реагентов «Becton Dickinson» по международному протоколу ISHAGE (International Society for Hematotherapy and Graft Engineering) [2]. Для оценки жизнеспособности ЯСК до и после криоконсервирования применяли флуоресцентный ДНК-краситель 7AAD («Becton Dickinson») [1, 2, 23]. Все используемые в работе криоконсервированные препараты КК содержали $(7,5-8,0) \times 10^8$ ЯСК (CD45^+), из которых $(0,18-0,26)\%$ составляла фракция CD34^+ -клеток с жизнеспособностью $(78,4-87,1)\%$.

Костный мозг вымывали из бедренных костей средой 199 общепринятым способом. Общее количество миелокариоцитов в костном мозге (КМ) и лейкоцитов в периферической крови (ПК) животных определяли в камере Горяева общепринятым методом, используя объектив $\times 40$ и окуляр $\times 7$.

perception simplicity. The animals were sacrificed by decapitation to the 2nd, 5th, 9th, 12th and 16th days.

Studies of NCs (CD45^+) of cord blood, including hematopoietic cells (CD34^+), prior to and after cryopreservation were performed by flow cytometry with flow cytometer FACS Calibur (Becton Dickinson, USA) using Becton Dickinson reagents according to the protocols of ISHAGE (International Society for Hematotherapy and Graft Engineering) [1]. In order to assess the viability of NCs prior to and after cryopreservation the fluorescent DNA dye 7AAD (Becton Dickinson) was used [1, 2, 27]. All the used CB cryopreserved preparations contained $(7.5-8.0) \times 10^8$ of NCs (CD45^+), among those CD34^+ cells fraction made 0.18–0.26% and had 78.4–87.1% viability.

Bone marrow was washed-out of femurs with medium 199 by a standard method. Total number of myelokaryocytes in bone marrow (BM) and leukocytes in peripheral blood (PB) of animals was counted in a Goryaev's chamber, using $\times 40$ objective and $\times 7$ ocular. Myelograms and hemograms were analysed in smears stained with azure II-eosin. The smears were microscoped with immersion lens. Calculating the cells included only neutrophilic granulocytes, lymphoid and erythroid cells. Monocytes, megalokaryocytes and other cells made not more than 5%, and therefore had not been presented in the results.

The data were statistically processed by ANOVA using Excel software (Microsoft, USA). The data were presented as $M \pm m$. Differences between the groups were considered as statistically significant at $p < 0.05$.

Results and discussion

Blood system plays a decisive role in formation of non-specific and specific responses of a body, determines its resistance and reactivity, including extreme conditions such as poisonous influence of cytotoxicants on human and animal [9]. Myelodepression and hypoplasia of hematopoietic tissue are the main pathologic syndromes occurring under conditions of cytotoxicant effect.

A single administration of 5-FU in maximum tolerated dose resulted in significant dyshematopoiesis and inhibition of hematopoietic lineages in experimental mice, as evidenced by the analysis of the BM smears, which clearly revealed aplasia of hematopoietic tissue preserving only single islets of hematopoiesis. Myeloid and erythroid lineage cells were the most sensitive to 5-FU and lymphoid lineage cells were less sensitive (Table 1). Introduction of fluoropyrimidine antimetabolite led to a statistically significant reduction in the number of neutrophilic granulocytes (NGs) and erythrocytes (EKs) to the 1–12th days of the experiment, and to the 2–5th days there was revealed the lowest content of all the studied forms of myelokaryocytes, until the complete disappearance of EKs



Анализ миелограмм и гемограмм изучали на мазках, окрашенных азур-II-эозином. Приготовленные указанным способом мазки микрофотографировали с иммерсионным объективом. При подсчете клеток учитывались только нейтрофильные гранулоциты, лимфоидные и эритроидные клетки. Моноциты, мегакариоциты и другие клетки составляли не более 5% и поэтому не были представлены в таблице.

Для статистической обработки данных использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) на компьютерной программе «Excel» («Microsoft», США). Данные представляли как $M \pm m$. Расхождения между группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Системе крови принадлежит решающая роль в формировании неспецифических и специфических реакций организма, в определении его резистентности и реактивности, в том числе и в условиях экстремальных воздействий, к которым можно отнести и губительное для организма человека и животных влияние цитотоксикантов [5]. Основными патологическими синдромами, возникающими в условиях действия цитотоксикантов, являются миелодепрессия и гипоплазия кроветворной ткани.

Однократное введение 5-ФУ в максимально переносимой дозе приводило к значительным нарушениям кроветворения и угнетению всех ростков кроветворения у экспериментальных мышей, о чем свидетельствовал анализ мазков КМ, на которых отчетливо выявлялась аплазия гемопоэтической ткани с сохранением лишь единичных островков кроветворения. Наиболее чувствительны к действию 5-ФУ оказались клетки миелоидного и эритроидного ростков, менее чувствительны – лимфоидного ростка (табл.1). Введение фторпиримидинового антиметаболита приводило к статистически значимому уменьшению количества нейтрофильных гранулоцитов (НГ) и эритрокариоцитов (ЭК) на 1–12-е сутки эксперимента, причем на 2–5-е сутки отмечалось наименьшее содержание всех изучаемых форм миелокариоцитов, вплоть до полного исчезновения на препаратах костного мозга ЭК и НГ. Вслед за периодом депрессии наблюдалось постепенное увеличение количества НГ и ЭК в КМ животных. На 9-е сутки в КМ нами отмечены первые признаки восстановительных процессов гемопоэза: незначительное повышение общего количества миелокариоцитов, появление НГ и ЭК, хотя их количество было в среднем в 10 раз меньше по сравнению с интактными животными (фон). Регенерационные процессы в КМ контрольных животных более интенсивно протекали с 12-х суток

and NGs in bone marrow smears. Depression period was followed by a gradual increase in the number of NGs and EKs in animal bone marrow. To the 9th day we noted in BM the first signs of hematopoiesis recovery: there was a slight increase in total number of myelokaryocytes, NGs and EKs appeared, although their number was 10 times in average less if compared with the intact animals (background). Regenerative processes in BM of control animals occurred more intensively from the 12th day of the experiment, and were almost completed by the 16th day for NGs, while the number of erythroid cells by this time was restored only by 62.5% of the intact animals values. There should be noted a statistically significant (up to 97% of the total myelokaryocytes number) increase in the relative number of lymphoid elements which occurred on the background of quite complete absence of erythroid cells and neutrophils in the BM smears to the 5th observation day. The gradual reparation of cells of granulocytic and erythroid series began with the 9th day and finished with a full recovery for neutrophils, whereas erythroid hematopoiesis lineage did not achieve the baseline values to the 16th observation day. Number of lymphoid elements were not significantly differed from the baseline values to the 12th day after fluorouracil administration.

The results of the experiments revealed a pronounced stimulatory effect of cryopreserved cord blood NCs on recovery of bone marrow hematopoiesis, inhibited by 5-FU administration (Table 1). In particular, NGs (immature and mature forms) were observed to the 5th day in hemograms of BM, and to the 9th day their number exceeded the control values almost 7 and 9 times, respectively. From the 5th to the 16th days the total number of myelokaryocytes in BM significantly (compared to the control) increased. The recovery dynamics of 5-FU inhibited erythroid lineage of hematopoiesis observed under effect of HCB cNCs was the most significant. For example, to the 12th day of the experiment the number of EKs in murine BM after the toxic effect of 5-FU was $(0.99 \pm 0.12) \times 10^6$ /thigh and after administration of cryopreserved cell preparation of CB this index increased up to $(4.30 \pm 0.72) \times 10^6$ /thigh, that was significantly higher even in comparison with the values of intact animals.

As the Table 1 show, the myeloid and erythroid lineages of bone marrow hematopoiesis were the most sensitive to fluoropyrimidines antimetabolite effect that should affect the cellular composition of peripheral blood. As we have previously shown [11], the PB of experimental animals represented a sharp decrease in the number of reticulocytes and erythrocytes up to the 9th day of observation.

This study established that 5-fluorouracil cytostatic led to a pronounced leukopenia of peripheral blood of



эксперимента и практически завершались к 16-м суткам для НГ, тогда как восстановление количества эритроидных клеток к этому времени составляло всего 62,5% от значений интактных животных. Следует отметить статистически значимое (до 97% от общего количества миелокарицитов) увеличение относительного числа лимфоидных элементов на фоне практически полного отсутствия эритроидных клеток и нейтрофильных гранулоцитов в мазках КМ на 5-е сутки наблюдения. Постепенная репарация клеток гранулоцитарного и эритроидного рядов начиналась с 9-х суток и завершалась полным восстановлением для нейтрофильных гранулоцитов, тогда как эритроидный росток кроветворения не достигал фоновых значений и к 16-м суткам наблюдения. Количество лимфоидных элементов значимо не отличалось от фоновых значений уже на 12-е сутки после введения фторурацила.

Результаты проведенных экспериментов позволили выявить выраженное стимулирующее действие криоконсервированных ЯСК кордовой крови на процессы восстановления костномозгового кроветворения, угнетенного введением 5-ФУ (табл. 1). Так, уже на 5-е сутки на гемограммах КМ обнаруживались НГ (незрелые и зрелые формы), а на 9-е сутки их количество превышало контрольные значения практически в 7 и 9 раз соответственно. С 5-х по 16-е сутки значимо (в сравнении с контролем) возрастало и общее количество миелокарицитов в КМ. Наиболее показательна динамика восстановления угнетенного 5-ФУ эритроидного ростка кроветворения под влиянием кЯСК ККЧ. Так, на 12-е сутки эксперимента количество ЭК в КМ мышей после токсичного действия 5-ФУ составляло $(0,99 \pm 0,12) \times 10^6/\text{бедро}$, а после введения криоконсервированного клеточного препарата КК данный показатель увеличивался до $(4,30 \pm 0,72) \times 10^6/\text{бедро}$,

Таблица 1. Показатели костномозгового кроветворения у мышей линии СВА, которым вводили кЯСК ККЧ после 5-ФУ ($\times 10^6/\text{бедро}$)
Table 1. Indices of bone marrow hematopoiesis in CBA mice administrated with HCB cNCs after 5-FU ($\times 10^6/\text{thigh}$)

Сроки исследований, сутки Observation term, days		Общее количество миелокарицитов Total number of myelokaryocytes	Незрелые НГ Non-mature NG	Зрелые НГ Mature NG	Лимфоидные клетки Lymphoid cells	Эритроидные клетки Erythroid cells
Фон Background		12,75 ± 0,59	2,64 ± 0,51	3,70 ± 0,52	3,02 ± 0,65	2,72 ± 0,54
2	Контроль Control	2,13 ± 0,45*	0*	0*	2,02 ± 0,09	0*
	Опыт Experim.	2,50 ± 0,45*			2,47 ± 0,01	
5	Контроль Control	2,03 ± 0,52*	0*	0*	1,97 ± 0,02*	0*
	Опыт Experim.	3,67 ± 0,56**			0,54 ± 0,08**	
9	Контроль Control	3,40 ± 0,86*	0,19 ± 0,06*	0,16 ± 0,11*	2,35 ± 0,05*	0,38 ± 0,11*
	Опыт Experim.	6,42 ± 1,01**	1,26 ± 0,14**	1,50 ± 0,24**	2,78 ± 0,32	0,71 ± 0,15**
12	Контроль Control	8,50 ± 1,02*	1,50 ± 0,27*	2,18 ± 0,19*	3,49 ± 0,27	0,99 ± 0,12*
	Опыт Experim.	14,50 ± 0,97**	3,19 ± 0,47**	3,48 ± 0,94**	3,00 ± 0,40	4,30 ± 0,72**
16	Контроль Control	10,66 ± 0,72*	2,67 ± 0,25	3,09 ± 0,53	2,81 ± 0,31	1,70 ± 0,29*
	Опыт Experim.	13,00 ± 0,89**	2,51 ± 0,27	3,99 ± 0,64	2,90 ± 0,64	3,12 ± 0,40**

Примечание: *, " – различия статистически значимы по сравнению с интактными (фон) и контрольными мышами соответственно, $p < 0,05$.

Note: *, " – differences are statistically significant if compared to intact (background) and control mice, respectively, $p < 0.05$.

the control animals up to the 16th day of observation (Table 2).

The PB hemogram analysis showed that up to the 9th day of observation neutrophilic leukocytes were almost absent in the blood of animals of control group and the relative number of lymphocytes significantly increased. Introduction of HCB cNCs (Table 2) accelerated the recovery of leukocytes number in PB, which was manifested in statistically significant differences of the studied indices in the control and experimental groups to the 9th day. In PB of control animals even to the 16th day of observation the leukocyte number was not fully recovered, while after the introduction of CB cell preparation this index was normalized to the 9th day. A similar effect of HCB cNCs application has been previously shown [15], *i.e.* introduction of cell preparations resulted in an accelerated recovery of an absolute number of PB erythrocytes up to the baseline values by the 9th day, whereas after 5-FU administration, this index recovered only to the 16th day of observation.

что значимо выше даже по сравнению со значениями интактных животных.

Как видно из данных табл. 1, миелоидный и эритроидный ростки костно-мозгового кроветворения были наиболее чувствительны к действию фторпиримидинового антитаболита, что не могло не повлиять на клеточный состав периферической крови. Как было показано нами ранее [11], в ПК экспериментальных животных наблюдалось резкое уменьшение количества ретикулоцитов и эритроцитов вплоть до 9-х суток наблюдения.

В данной работе установлено, что цитостатик 5-ФУ приводит к выраженной лейкопении периферической крови контрольных животных вплоть до 16-х суток наблюдения (табл. 2).

Анализ гемограмм ПК показал, что вплоть до 9-х суток наблюдения в крови животных контрольной группы практически исчезли нейтрофильные лейкоциты и статистически значимо увеличилось относительное количество лимфоцитов. Введение кЯСК ККЧ (табл. 2) ускорило процесс восстановления количества лейкоцитов в ПК, что на 9-е сутки проявлялось статистически значимыми различиями исследуемых показателей в группах контроля и опыта. В ПК животных контрольной группы даже к 16-м суткам наблюдения количество лейкоцитов полностью не восстановилось, тогда как после введения клеточного препарата КК этот показатель нормализовался на 9-е сутки. Подобный эффект от применения кЯСК ККЧ был показан нами ранее [11]: после введения клеточного препарата было отмечено ускорение восстановления абсолютного количества эритроцитов ПК до фоновых значений уже на 9-е сутки, тогда как после введения 5-ФУ данный показатель восстанавливался только к 16-м суткам наблюдения.

Экспериментальное и клиническое применение новых гемопоэзстимулирующих и иммуномодулирующих препаратов, в том числе и кЯСК ККЧ, имеет большое значение для медицины и биологии. Эти вещества позволяют разрабатывать пути направленной регуляции иммунных процессов, что необходимо для лечения и профилактики различных заболеваний, в том числе гемодепрессивных и иммунодефицитных состояний, влияют на физиологические адаптационные возможности организма и поддержание его гомеостаза.

Таблица 2. Динамика восстановления количества лейкоцитов в ПК мышей линии СВА после введения 5-ФУ и кЯСК ККЧ

Table 2. Recovery dynamics of leukocytes number in PB of CBA mice after administration of 5-FU and HCB cNCs

Группа животных Group of animals	Количество лейкоцитов ($\times 10^7$ /мл) в исследуемый период, сутки Number of leukocytes ($\times 10^7$ /ml) during observation period, days				
	2	5	9	12	16
Контроль Control	4,80 \pm 0,11*	4,61 \pm 0,23*	4,37 \pm 0,28*	5,17 \pm 0,45*	6,45 \pm 0,31*
Опыт Experimental	4,76 \pm 0,31*	5,24 \pm 0,49*	7,17 \pm 0,40	8,00 \pm 0,10	8,27 \pm 0,41

Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению с интактными животными, $p < 0,05$.

Note: * – differences are statistically significant if compared with the intact animals ($p < 0.05$)

Experimental and clinical application of novel hematopoiesis-stimulating and immunomodulatory products, including HCB cNCs is of great importance for medicine and biology. These substances allow to develop the ways of a targeted regulation of immune processes, that is necessary for treatment and prevention of various diseases, including hemodepressive and immunodeficiency states, affect the physiological and adaptive capacity of a body and maintain its homeostasis.

Over the past 50 years, approaches in treatment of secondary immunodeficiency states, including abnormal hematopoiesis, have been undergone significant changes: from transfusions of leukoconcentrate and erythrocytes of adult donors to the clinical applications of cryopreserved cell preparations of HCB [23, 24, 27, 30, 32].

A large number of experimental studies testifies to the importance of studying the properties of HCB cNCs. Scholars achieved good results in application of HCB preparations in the treatment of various hematologic, endocrine, cardiovascular pathologies, central nervous system diseases, and the ones of unknown origin [8, 10, 13, 21, 27, 32] as well, that confirmed the polyvalence of these biologically active preparations due to their composition and broad spectrum of activity. The way of treatment with HCB cNCs is also of interest. Previous studies have shown that intravenous infusion was the generally accepted method of HCB administration, used in our research as well [15, 27, 32]. N. Ende [8] demonstrated that after an intravenous administration the CB cells migrated into different organs, mainly to spleen. In addition, the cells were observed 10–12 weeks later the transplantation in degradation loci of cerebrum motoneurons and expressed neuronal markers. T. Murohara [21] showed experimentally that intramuscular injections of CD34⁺ CB cells resulted not only in an increase of arterioles number in ischemic focus, but stimulated the regeneration of skeletal muscles too.



За последние 50 лет подходы к терапии вторичных иммунодефицитных состояний, к которым относят и патологию кроветворения, претерпели значительные изменения: от трансфузии лейкоконцентрата и эритроцитарной массы взрослых доноров и до применения в клинической практике криоконсервированных клеточных препаратов ККЧ [4, 18, 19, 23, 25].

Об актуальности изучения свойств кЯСК ККЧ свидетельствует большое количество экспериментальных работ. Ученым удалось получить хорошие результаты применения препаратов ККЧ в лечении различных гематологических, эндокринных, сердечно-сосудистых патологий, заболеваний ЦНС, а также заболеваний неясного генеза [4, 23, 30–33], что подтверждает поливалентность этих биологически активных препаратов за счет многокомпонентности их состава и широкого спектра действия. Вызывает интерес и способ введения кЯСК ККЧ. Как показали ранее проведенные исследования, общепринятым способом введения ККЧ, который был использован и в нашей работе, является ее внутривенная инфузия [4, 11, 23]. В работе N. Ende [30] показано, что после внутривенного введения клетки КК мигрируют в разные органы, преимущественно – в селезенку. Также клетки были обнаружены через 10–12 недель после трансплантации в локусах дегенерации мотонейронов головного мозга и экспрессировали нейрональные маркеры. В эксперименте Т. Murohara [33] показано, что внутримышечные инъекции CD34⁺ клеток КК приводят не только к увеличению числа артериол в очаге ишемии, но и стимулируют регенерацию скелетной мышцы.

Известно много работ, подтверждающих полифункциональность лечебного действия клеточных препаратов КК [4, 25], что очень важно для купирования последствий химиотерапии. Широкий спектр терапевтического действия криоконсервированного клеточного препарата ККЧ описан во многих исследованиях [11–14, 22, 25]. Нами показано, что кЯСК КК способны воздействовать не только на определенные звенья систем гемо- и иммунопоэза, но и охватывать все функциональные системы организма, включая и нейроэндокринную, о роли которой в контроле гемопоэза при цитостатической миелодепрессии можно судить по имеющимся в литературе данным [11–14, 22, 25].

На основании приведенных литературных данных можно сделать вывод о высокой пластичности и дифференцировочном потенциале различных популяций стволовых и прогениторных клеток ККЧ в контексте перспективности их дальнейшего клинического применения. Таким образом, научно обоснована поливалентность препаратов ККЧ [4, 13, 22, 23, 25], однако механизмы действия клеток,

There are many studies, confirming the polyfunctionality of therapeutic effect of CB cell products [30, 32], that is very important for the relief of chemotherapy effects. A wide range of therapeutic action of cryo-preserved cell preparation of HCB was described in many studies [15–18, 26, 30]. We have shown that HCB cNCs were able to affect not only specific elements of hemo- and immunopoiesis systems, but to cover all functional systems of a body, including neuroendocrine one, the role of which in the control of hematopoiesis in cytostatic myelodepression can be judged from the available publications [15–18, 26, 30].

Based on the publication data we can conclude about a high plasticity and differentiation potential of different populations of stem and progenitor cells of HCB in view of the prospects for their further clinical application. Thus, polyvalence of HCB preparations was clearly substantiated [17, 26, 27, 30, 32], however, the mechanisms of cell effect, as well as the effective ways of administration require further study. Moreover, it is important to determine the correlation between effectiveness of cryopreserved cell preparations, the age of experimental animals and pathology depth. Pharmacokinetic parameters of HCB cNCs are obviously determined by the combined action of each of its components (different populations of CB nucleated cells, biologically active substances of plasma) and demand a complete detailed analysis (if such is possible due to mutual potentiating effects in multipotent complex preparation).

We expect that our further scientific studies will enable to approach the understanding of the mechanisms of general adaptation syndrome development in response to cytotoxic agents and to develop a novel methodological approaches to prevent and treat the secondary immunodeficient states associated with myelodepression and aplastic state of hematopoiesis.

Our studies of dynamics of bone marrow hematopoiesis recovery and an absolute number of peripheral blood leukocytes have confirmed the expediency for applying cryopreserved nucleated cell suspension of human cord blood to stimulate the regeneration in bone marrow suppressed with fluoropyrimidine cytostatic (5-FU).

Conclusions

1. Hematopoiesis changes in CBA mice after exposure to cytotoxicants of fluoropyrimidine series (5-FU) were especially evident to the 2nd–12th days of observation.

2. Introduction of 5-FU to mice in the maximum tolerated dose resulted in pronounced myelodepression and inhibited repairment of hematopoietic tissue and some of its lineages.

3. Cells of myeloid and erythroid hematopoietic lineages were the most sensitive to 5-FU, cells of lymphoid lineage were less sensitive.

как и оптимальные способы их введения требуют дальнейшего исследования. Кроме того, важно определить корреляционные зависимости эффективности действия криоконсервированных клеточных препаратов от возраста экспериментальных животных и выраженности патологических процессов. Очевидно, фармакокинетические параметры кЯСК КК определяются совокупным действием каждого из ее компонентов (различные популяции ядерных клеток КК, биологически активные вещества плазмы) и требуют глубокого детального анализа (если таковой возможен по причине взаимопотенцирующих эффектов в мультипотентном комплексном препарате).

Возможно, наши дальнейшие научные исследования позволят приблизиться к пониманию механизмов развития общего адаптационного синдрома в ответ на введение цитостатиков и разработать новые методические подходы в профилактике и лечении вторичных иммунодефицитных состояний, связанных с миелодепрессией и апластическим состоянием гемопоэза.

Проведенные нами исследования динамики восстановления костномозгового кроветворения и абсолютного количества лейкоцитов периферической крови подтвердили целесообразность применения криоконсервированной ядросодержащей клеточной суспензии кордовой крови человека для стимуляции восстановительных процессов в костном мозге, подавленных цитостатиком фторпиримидинового ряда 5-ФУ.

Выводы

1. После воздействия лекарственных цитотоксикантов фторпиримидинового ряда (5-ФУ) у мышей линии СВА изменения со стороны кроветворения особенно наглядно проявлялись на 2–12-е сутки наблюдения.

2. Введение 5-ФУ мышам в максимально переносимой дозе приводило к выраженной миелодепрессии и торможению процессов репарации кроветворной ткани и ее отдельных ростков.

3. Наиболее чувствительны к действию 5-ФУ оказались клетки миелоидного и эритроидного ростков кроветворения, менее чувствительны – клетки лимфоидного ростка.

4. Применение клеточного препарата кордовой крови, представляющего собой криоконсервированные ядросодержащие клетки кордовой крови в аутоплазме, явилось эффективным способом, позволившим добиться в более короткие сроки (к 12-м суткам) восстановления костномозгового кроветворения и полного купирования токсической лейкопении на 9-е сутки эксперимента.

4. The use of cord blood cell preparation, being a cryopreserved nucleated cells of cord blood in autoplasm, was an effective way of treatment, allowed to achieve recovery of bone marrow hematopoiesis in a short period of time (to the 12th day), and a complete reduction of toxic leukopenia to the 9th day of the experiment.

References

1. Babijchuk L.A., Kudokotseva O.V., Zubov P.M., Zubova O.L. New approaches to cryopreservation of cord blood nucleated cells and assessing their viability. *Ukr Khimioterapevt J* 2008; (1–2): 85–87.
2. Babijchuk L.A., Zubov P.M., Ryazantsev V.V., et al. Cord blood as alternative source of stem cells for regenerative medicine: new approaches to the problem of cryopreservation. *Bukovinskiy Medychnyy Visnyk* 2009; 13(4): 23–26.
3. Bonitenko Yu.Yu., Nikiforova A.M., editors. *Emergencies of chemical nature: chemical incidents, mass poisoning, medical aspects*. St. Petersburg: Gipocrat; 2004.
4. Borsuk O.S., Masnaya N.V., Churin A.A., Sherstoboev E.Y. Preclinical investigation of plant drugs under conditions of cytostatic influence. *Biomedicine* 2010; 1(2): 53–64.
5. Broxmeyer H.E., Douglas G.W., Hangos G. et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 3828–3832.
6. Cassileth B.R., Deng G. Complementary and alternative therapies for cancer. *The Oncologist* 2004; 9(1): 80–89.
7. Czygier M., Dakowicz L., Szmitkowski M. The effect of granulocyte colony stimulating factor on neutrophil functions in children with neutropenia after chemotherapy in the course of neoplasma. *Adv Med Sci* 2007; 52: 143–146.
8. Ende N., Weinstein F., Chen R., Ende M. Human umbilical cord blood effect on sod mice (amyotrophic lateral sclerosis). *Life Sei* 2000; 67(1): 53–59.
9. Goldberg E.D., Dygai A.M., Zhdanov V.V. Hemopoiesis-inducing microenvironment role in hematopoiesis regulation during cytostatic myelosuppression. Toms: STT; 1999.
10. Goldstein G., Toren A., Nagler A. Transplantation and other uses of human umbilical cord blood and stem cells. *Curr Pharm Des* 2007; 13(13): 1363–1373.
11. Goltsev A.N., Kalinichenko T.A. Human umbilical cord blood as a source of hemopoietic cells for clinical application. Part I. Nature of hemopoietic potential. *Problems of Cryobiology* 1998; (1): 3–24.
12. Goltsev A.N., Kalinichenko T.A. Human umbilical cord blood as a source of hemopoietic cells for clinical application. Part II. Immunological characteristics. *Problems of Cryobiology* 1998; (1): 3–21.
13. Harris D.T. Non-haematological uses of cord blood stem cells. *Br J Haematol* 2009; 147(2): 177–184.
14. Korsun V.F., Treskunov K.A., Korsun E.V. et al. Medicinal plants in oncology. Moscow: Prakticheskaya Meditsyna; 2007.
15. Kudokotseva O.V., Kovalenko I.F., Lomakin I.I., Babijchuk G.A. Correction of anemia resulting from 5-fluorouracil toxic effect using cryopreserved preparations of cord blood. *Probl Cryobiol Cryomed* 2014; 24(4): 312–321.
16. Kudokotseva O.V., Lomakin I.I. Biological activity of cryopreserved cord blood cell preparations, depending on their derivation methods. In: *Proceedings of the international interdisciplinary scientific conference 'Biologically active substances and materials: fundamental and applied issues of derivation and application'* 2013; 2: p. 357–358.



Литература

1. Бабийчук Л.А., Зубов П.М., Рязанцев В.В. и др. Кордовая кровь – альтернативный источник стволовых клеток для регенеративной медицины: новые подходы к проблеме криоконсервирования // Буковинський медичний вісник. – 2009. – Т. 13, №4. – С. 23–26.
2. Бабийчук Л.А., Кудокоцева О.В., Зубов П.М., Зубова О.Л. Новые подходы к криоконсервированию ядросодержащих клеток кордовой крови и оценка их жизнеспособности // Укр. химиотерапевт. журнал. – 2008. – №1–2. – С. 85–87.
3. Борсук О.С., Масная Н.В., Чуринов А.А., Шерстобаев Е.Ю. Доклинические исследования препаратов природного происхождения в условиях цитостатического воздействия // Биомедицина. – 2010. – Т. 1, №2. – С. 53–64.
4. Владимирская Е.Б., Майорова О.А., Румянцев С.А., Румянцев А.Г. Биологические основы и перспективы терапии стволовыми клетками. – М.: Медпрактика, 2005. – 392 с.
5. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Жданов В.В. Роль гемопоэз-индуцирующего микроокружения в регуляции кроветворения при цитостатических миелосупрессиях. – Томск: СТТ, 1999. – 114 с.
6. Гольцев А.Н., Калининченко Т.А. Пуповинная кордовая кровь человека как источник гемопоэтических клеток для клинического применения. Часть 1. Характеристика гемопоэтического потенциала // Проблемы криобиологии. – 1998. – №1. – С. 3–24.
7. Гольцев А.Н., Калининченко Т.А. Пуповинная кордовая кровь человека как источник гемопоэтических клеток для клинического применения. Часть 2. Иммунологическая характеристика // Проблемы криобиологии. – 1998. – №2. – С. 3–21.
8. Зборовский А.Б., Тюрников И.Н. Осложнения фармако-терапии: Руководство для врачей. – М.: Медицина, 2003. – 544 с.
9. Иммунодефицитные состояния / Под ред. В.С. Смирнова, И.С. Фрейдлина. – СПб.: Фолиант, 2000. – 562 с.
10. Корсун В.Ф., Трескунов К.А., Корсун Е.В. и др. Лекарственные растения в онкологии. – М.: Практическая медицина, 2007. – 452 с.
11. Кудокоцева О.В., Коваленко И.Ф., Ломакин И.И., Бабийчук Г.А. Коррекция анемии, развивающейся в результате токсического действия 5-фторурацила, криоконсервированными препаратами кордовой крови // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2014. – Т. 24, №4. – С. 312–321.
12. Кудокоцева О.В., Ломакин И.И. Биологическая активность криоконсервированных клеточных препаратов кордовой крови в зависимости от способов их получения // Биологически активные вещества и материалы: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения. Материалы международной междисциплинарной науч. конференции (27 мая – 1 июня 2013 г.). – 2013. – Т. 2. – С. 357–358.
13. Кудокоцева О.В., Ломакин И.И., Пурешева В.Ю. Коррекция нарушений системы кроветворения, вызванных экспериментальным гипотиреозом, криоконсервированными препаратами кордовой крови // Укр. химиотерапевт. журнал. – 2012. – Т. 27, №3. – С. 64–68.
14. Ломакин И.И., Кудокоцева О.В. Коррекция патологии эндокринной системы крыс аэрокриотерапией и клеточными препаратами // Приоритетні напрями розвитку медичних наук в умовах сучасних реформаційних процесів: 36. матеріалів міжнародної наук.-практ. конференції (7–8 грудня 2012 р.). – Дніпропетровськ: Salutem, 2012. – С. 16–20.
15. Матяш М.Т. Особенности и механизмы действия гемостимулирующего действия препаратов разных фармакологических групп в условиях противоопухолевой полихимиотерапии: Автореф. дис. ...канд. фарм. наук. – Томск, 2008. – 22 с.
17. Kudokotseva O.V., Lomakin I.I., Puryshcheva V.Yu. Correction of hematopoietic system disorders caused by experimental hypothyroidism with cryopreserved cord blood preparations. Ukr Khimioterapevt J 2012; 27(3): 64–68.
18. Lomakin I.I., Kudokotseva O.V. Correction of endocrine pathology of rats with aerocryotherapy cell preparations. In: Proceedings of international scientific and practical conference 'Priority directions of medical sciences development in modern reformation processes'; Dnepropetrovsk: Salutem; 2012. p. 16–20.
19. Matyash M.T. Features and action mechanisms of hemostimulating effect of preparations of different pharmacological groups in terms of anti-tumor chemotherapy [dissertation]. Tomsk; 2008.
20. Melikhova V.S., Isaev A. Cell populations isolated from umbilical and placental complex and prospects of their scientific and practical use. Cellular Transplantation and Tissue Engineering 2007; 2(4): 31–38.
21. Murohara T., Ikeda H., Duan J. et al. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. J Clin Invest 2000; 105(11): 1527–1536.
22. Musina R.A., Bekchanova E., Belayvskiy A. et al. Mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. Cell Technologies in Biology and Medicine 2007; (1): 16–20.
23. Ogorodnikova E.V., Melkova K.N., Mkhaidze D.M. Hemotransfusion support during high-dose chemotherapy with autologous hematopoietic stem cell transplantation. Russian Journal of Oncology 2003; (1): 56–65.
24. Perekhrestenko P.M., Anoshyna M.Y., Tretyak N.M. et al. Transfusion influence of hemopoietic of cord blood cells on lipid peroxidation in patients with cytostatic hemodepression. Ukr Journal of Hematology and Transfusiology 2006; 6(2): 25–30.
25. Podoltseva E.I. Colony-stimulating factors in oncology. Practical Oncology 2001; 5(1): 21–24.
26. Puryshcheva V.Yu., Volina V.V., Kudokotseva O.V., Babijchuk L.A. Effect of cord blood cell preparations on morphology of rat skin. Svit Meditsiny I Biologii 2009; 1(3): 131–136.
27. Rummyantsev A.G., Maschan A.A. Hematopoietic stem cell transplantation in children. Moscow: MIA; 2003.
28. Skil T., editor. Anticancer chemotherapy. Moscow: GEOTAR Med; 2011.
29. Smirnov V.S., Freydlin I.S. editors. Immunodeficiency states. St. Petersburg: Foliant; 2000.
30. Tsutsaeva A.A., Grischenko V.I., Tsyganenko A.Ya. et al. Clinical usage of Hemocord. Eksperyment Klin Medytsyna 2005; (3): 104–107.
31. Udut E.V. Correction of anemia with the myeloinhibiting effects [dissertation]. Tomsk; 2008.
32. Vladimirskaya E.B., Mayorova O.A., Rummyantseva S.A., Rummyantsev A.G. Biological grounds and prospects of stem cell therapy. Moscow: Medpraktika; 2005.
33. Zborovskiy A.B., Tyurenkov I.N. Complications of pharmacotherapy: Manual for physicians. Moscow: Meditsyna; 2003.



16. Мелихова В.С., Исаев А. Клеточные популяции, выделяемые из пуповинно-плацентарного комплекса и перспективы их научно-практического использования // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2007. – Т. 2, №4. – С. 31–38.
17. Мусина Р.А., Бекчанова Е., Белявский А. и др. Мезенхимальные стволовые клетки пуповинной крови // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2007. – №1. – С. 16–20.
18. Огородникова Е.В., Мелкова К.Н., Мхеидзе Д.М. Гемотрансфузионная поддержка при высокодозной химиотерапии с трансплантацией аутологичных гемопоэтических клеток // Рос. онколог. журнал. – 2003. – №1. – С. 56–65.
19. Перехрестенко П.М., Аношина М.Ю., Третьяк Н.М. та ін. Вплив трансфузії гемопоетичних клітин кордової крові на процеси перекисного окислення ліпідів у хворих при цитостатичній гемодепресії // Укр. журнал гематології та трансфузіології. – 2006. – Т. 6, №2. – С. 25–30.
20. Подольцева Э.И. Колонистимулирующие факторы в онкологии // Практик. онкология. – 2001. – Т. 5, №1. – С. 21–24.
21. Противоопухолевая химиотерапия. Руководство / Под ред. Т. Скила. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 627 с.
22. Пурышева В.Ю., Волина В.В., Кудокоцева О.В., Бабийчук Л.А. Влияние клеточных препаратов кордовой крови на морфологию кожи крыс // Світ медицини та біології. – 2009. – Т. 1, №3. – С. 131–136.
23. Румянцев А.Г., Масчан А.А. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток у детей. – М.: МИА, 2003. – 910 с.
24. Удут Е.В. Коррекция анемического синдрома при миелоингибирующих воздействиях: Автореф. дис. ... докт. мед. наук. – Томск, 2008. – 37 с.
25. Цуцаева А.А., Грищенко В.И., Цыганенко А.Я. и др. Опыт клинического применения препарата «Гемокорд» // Эксперимен. і клін. медицина. – 2005. – №3. – С. 104–107.
26. Чрезвычайные ситуации химической природы: химические аварии, массовые отравления, медицинские аспекты / Под ред. Ю.Ю. Бонитенко и А.М. Никифорова. – СПб: Гиппократ, 2004. – 464 с.
27. Broxmeyer H.E., Douglas G.W., Hangos G. et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1989. – Vol. 86. – P. 3828–3832.
28. Cassileth B.R., Deng G. Complementary and alternative therapies for cancer // The Oncologist. – 2004. – Vol. 9, №1. – P. 80–89.
29. Czygier M., Dakowicz L., Szmitkowski M. The effect of granulocyte colony stimulating factor on neutrophil functions in children with neutropenia after chemotherapy in the course of neoplasma // Adv. Med. Sci. – 2007. – Vol. 52. – P. 143–146.
30. Ende N., Weinstein F., Chen R., Ende M. Human umbilical cord blood effect on sod mice (amyotrophic lateral sclerosis) // Life Sei. – 2000. – Vol. 67, №1. – P. 53–59.
31. Goldstein G., Toren A., Nagler A. Transplantation and other uses of human umbilical cord blood and stem cells // Curr. Pharm. Des. – 2007. – Vol. 13, №13. – P. 1363–1373.
32. Harris D.T. Non-haematological uses of cord blood stem cells // Br. J. Haematol. – 2009. – Vol. 147, №2. – P. 177–184.
33. Murohara T., Ikeda H., Duan J. et al. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization // J. Clin. Invest. – 2000. – Vol. 105, №11. – P. 1527–1536.

