

УДК 591.144.4:615.28:612.649.011.87:615.014.41

О.В. Кудокотцева*, В.В. Волина, И.И. Ломакин

Морфологические особенности ткани селезенки после введения фторурацила и криоконсервированных ядросодержащих клеток кордовой крови

UDC 591.144.4:615.28:612.649.011.87:615.014.41

O.V. Kudokotseva*, V.V. Volina, I.I. Lomakin

Morphological Features of Spleen Tissue After Introduction of Fluorouracil and Cryopreserved Cord Blood Nucleated Cells

Реферат: В работе изучено влияние введения криоконсервированных ядросодержащих клеток кордовой крови (кЯСК КК) человека на морфологическое состояние ткани селезенки мышей в условиях гемо- и иммуносупрессии, вызванной однократной внутрибрюшинной инъекцией антиметаболита нуклеинового обмена 5-фторурацила (5-ФУ) в максимально переносимой дозе. Под влиянием 5-ФУ в селезенке на протяжении всего периода наблюдения (16 суток) были выявлены прогрессирующие изменения, характерные для поражения токсическими веществами, а именно: полнокровие, экссудация и инфильтрация лейкоцитами пульпы селезенки; скопление макрофагов с фагоцитированными лимфоцитами или их фрагментами; дегенеративные и некротические изменения со стороны тканевых элементов пульпы и фолликулов. Выявлена высокая степень реактивности селезенки мыши в ответ на введение криоконсервированных клеток кордовой крови. На 2-е сутки после применения кЯСК КК наблюдались структурные преобразования селезенки, а уже через 10 суток после токсического поражения антиметаболитом 5-ФУ строение органа отвечало норме.

Ключевые слова: селезенка, иммуно- и гемосупрессия, фторурацил, криоконсервированные клетки кордовой крови.

Реферат: У роботі вивчено вплив введення криоконсервованих ядерних клітин кордової крові (кЯСК КК) людини на морфологічний стан тканини селезінки мишей в умовах гемо- та імуносупресії, викликаній одноразовою внутрішньо-очеревинною ін'єкцією антиметаболіту нуклеїнового обміну 5-фторурацилу (5-ФУ) в максимально припустимій дозі. Під впливом 5-ФУ в селезінці протягом усього періоду спостереження (16 діб) були виявлені прогресуючі зміни, характерні для ураження токсичними речовинами, а саме: повнокров'я, екссудація та інфільтрація лейкоцитами пульпи селезінки; скоплення макрофагів із фагоцитованими лімфоцитами або їх фрагментами; дегенеративні та некротичні зміни з боку тканинних елементів пульпи і фолікулів. Виявлено високий ступінь реактивності селезінки миші у відповідь на введення криоконсервованих клітин кордової крові. На 2-у добу після застосування кЯСК КК спостерігалися структурні перетворення селезінки, а вже через 10 діб після токсичного ураження антиметаболітом 5-ФУ будова органа відповідала нормі.

Ключові слова: селезінка, імуні- та гемосупресія, фторурацил, криоконсервовані клітини кордової крові.

Abstract: We studied the effect of administered cryopreserved nucleated cells of human cord blood (cCBNCs) on murine spleen tissue morphology under hemo- and immunosuppression induced by a single intraperitoneal injection of 5-fluorouracil (5-FU) antimetabolite of nucleic metabolism in the maximum tolerated dose. Progressing changes, typical for a damage caused by toxic substances, such as: congestion, exudation and leukocytes infiltration of spleen pulp; accumulation of macrophages either with phagocytized lymphocytes or their fragments; degenerative and necrotic changes in tissue elements of the pulp and follicles were revealed in spleen following 5-FU introduction within entire observation period (16 days). A high degree of murine spleen reactivity in response to the administration of cryopreserved cord blood cells was found. To day 2 after cCBNCs administration we observed structural rearrangements in spleen, and already 10 days later 5-FU antimetabolite toxic injury the organ structure was back to the norm.

Key words: spleen, immuno- and hemosuppression, fluorouracil, cryopreserved cord blood cells.

Иммунная и кроветворная системы являются индикаторами приспособляемости организма к изменяющимся условиям внешней и внутренней среды [6]. Различные по своей природе экстремальные воздействия способны угнетать отдельные звенья системы крови и иммунитета, что может привести к развитию гемо- и иммунодепрессивных состояний [8]. Селезенка – крупный вторичный периферический орган иммуногенеза [13, 16]. Кроме

The immune and hematopoietic systems reflect the ability of an organism to adapt to the changing conditions of external and internal environments [7].

Extreme exposures being different by their nature can inhibit certain links of hemopoietic and immune systems, that may result in development of hemo- and immunosuppressive states [10]. Spleen is the large secondary peripheral organ of immunogenesis [15, 18]. Furthermore, it is the largest depot of lymphoid tissue

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

*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61016;
тел.: (+38 057) 372-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52,
электронная почта: kudokosha@gmail.com

Поступила 31.05.2016
Принята в печать 29.06.2016

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2016. – Т. 26, №3. – С. 249–259.
© 2016 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

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

*To whom correspondence should be addressed:
23, Pereyaslavskaya str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 372 7435, fax: +380 57 373 5952,
e-mail: kudokosha@gmail.com

Received May, 31, 2016
Accepted June, 29, 2016

Probl Cryobiol Cryomed 2016; 26(3): 249–259.
© 2016 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

того, она является наибольшим коллектором лимфоидной ткани в организме, выполняет важные гематологические и иммунологические функции при формировании генерализованного иммунного ответа всего организма на проникновение антигена, воспалительный процесс или любое другое нарушение гомеостаза [11]. Возросший в последнее время интерес к исследованию органов иммунной системы объясняется ухудшением экологической ситуации в мире, урбанизацией, негативным воздействием экзо- и эндогенных факторов, а также усилением психологической нагрузки на организм человека. В результате увеличивается численность населения с аутоиммунными, аллергическими и онкологическими патологиями, связанными с нарушением гомеостаза, вследствие которого развивается стойкий иммунный дисбаланс, приводящий к анергии или гиперэргии иммунной системы [7]. В этой связи возросло число заболеваний, патогенез которых связан с развитием вторичных иммунодефицитных состояний [17]. В клинике для купирования иммунных нарушений широко применяются методы иммунокорригирующей или иммуномодулирующей терапии [18].

Поскольку многие используемые лекарственные средства не обеспечивают комплексную терапию и имеют побочные эффекты, то важен поиск новых эффективных и малотоксичных методов нормализации гомеостаза [12].

На основании вышеизложенного очевидно необходимость разработки альтернативных нетоксичных и обладающих высокой биодоступностью средств, способных действовать на системном уровне.

Селезенка имеет более сложное строение, чем другие периферические органы иммунной системы, а также высокую чувствительность к различным воздействиям экзо- и эндогенной природы [13, 16]. Исследование морфологических особенностей селезенки при воздействии 5-фторурацила (5-ФУ), моделирующего состояние иммуно- и гемосупрессии [12], и криоконсервированных ядродержащих клеток кордовой крови (кЯСК КК) в качестве иммунокорректора широкого спектра действия [9, 10] позволит углубить понимание механизмов ее реактивного ответа на воздействие факторов различной этиологии.

Целью данной работы было изучение влияния введения криоконсервированных ядродержащих клеток кордовой крови на морфологическое состояние селезенки в условиях иммуно- и гемосупрессии, вызванной применением фторпиримидинового антиметаболического цитостатика 5-фторурацила.

Материалы и методы

Исследования проводили в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными V Национальным конгрессом

in the body, and implements the important hematologic and immunologic functions under formation of generalised immune response of the whole body to either antigen penetration, inflammation or any other homeostasis disorder [13]. Recently an increased interest to study the immune system organs is explained by a worsened ecological situation in the world, urbanisation, negative impact of exo- and endogenous factors, as well as a strengthened psychological pressure on human body. Consequently, there is an increase of population with autoimmune, allergic and oncological pathologies, associated with impaired homeostasis, resulting in persistent immune imbalance, leading to either anergy or hyperergy of immune system [8]. In this context, the incidence of diseases, which pathogenesis was associated with the developed secondary immuno-deficiency state, augmented [4]. The methods of either immunocorrecting or immunomodulating therapy are widely used in clinic to mitigate immune disorders [9].

Since most applied medicinal products could not provide any comprehensive therapy and often their use is accompanied with side effects, of importance is to search new efficient low-toxic methods for homeostasis normalization [14].

Proceeding from the mentioned above the need in development of the alternative non-toxic and highly bioactive products, capable to act at a system level, becomes apparent.

Spleen has a more complicated structure vs. other peripheral organs of immune system, as well as possesses a high sensitivity to different effects of exo- and endogenous nature [15, 18]. The study of morphological features of spleen following 5-fluorouracil (5-FU) effect, simulating the state of immuno- and hemosuppression [14], and introduction of cryopreserved cord blood nucleated cells (cCBNCs) as a broad-spectrum immune correcting agent [11, 12] will extend the understanding of the mechanisms of its reaction to the impact of factors of different etiology.

This research was aimed to study the effect of cCBNCs administration on morphological state of spleen under immuno- and hemosuppression, caused by applying the fluoropyrimidine antimetabolite 5-fluorouracil.

Materials and methods

The studies were carried-out according to the General Principles of Experiments in Animals approved by the 5th National Congress in Bioethics (Kyiv, 2013) and agreed to the statements of European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

Experiments were performed within the autumn-winter period in CBA mice weighing 18–20 g. Animals



по биоэтике (Киев, 2013) и согласованными с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

Эксперименты были выполнены в осенне-зимний период на мышах линии СВА массой 18–20 г. Животные содержались в условиях вивария Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины при естественном освещении на стандартной диете и при свободном доступе к воде и пище.

Экспериментальное моделирование гемо- и иммуносупрессии у мышей проводили с помощью однократного внутрибрюшинного введения 5-фторурацила («ЕБЕВЕ», Австрия) в максимально переносимой дозе 228 мг/кг [4]. Данный препарат относится к группе антиметаболитов, является аналогом пиримидиновых компонентов нуклеиновых кислот, обладает сильным токсическим эффектом и оказывает мощное угнетающее действие на костный мозг [5, 12].

Животные были разделены на три группы: интактная (контроль) и две опытные (по 6 мышей в каждой). Мышам первой опытной группы вводили только 5-ФУ (группа 5-ФУ), второй опытной группе (группа 5-ФУ + КЯСК КК) через 3–4 ч после однократной инъекции 5-ФУ внутривенно вводили 0,2 мл КЯСК КК человека (ГП «Межведомственный научный центр криобиологии и криомедицины НАН, АМН и МЗ Украины», г. Харьков) в дозе 5×10^8 жизнеспособных КЯСК КК/кг [1, 2].

Ядросодержащие клетки выделяли из цельной кордовой крови (КК) методом седиментации в растворе декстрана с м. м. $60\,000 \pm 10\,000$, криоконсервировали по разработанной в Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины программе и хранили в низкотемпературном банке института при температуре -196°C [1, 2]. Клеточный препарат размораживали на водяной бане (37°C) в течение 40 с.

Исследования ядросодержащих клеток ($\text{CD}45^+$) кордовой крови человека, в том числе и гемопоэтических ($\text{CD}34^+$), до и после криоконсервирования были проведены методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитометре «FACS Calibur» («BD», США) с использованием реагентов фирмы «BD» по протоколу Международного общества гематотерапии и трансплантационной инженерии (International Society for Hematotherapy and Graft Engineering, ISHAGE) [2]. Для оценки жизнеспособности ядросодержащих клеток до и после криоконсервирования применяли флуоресцентный краситель ДНК 7AAD («BD») [1, 2]. Все используемые в работе криоконсервированные препараты КК содержали $(7,5\text{--}8,0) \times 10^8$ ЯСК ($\text{CD}45^+$), из которых $(0,18\text{--}0,26)\%$ составляла фракция $\text{CD}34^+$ -клеток с жизнеспособностью $(78,4\text{--}87,1)\%$.

were kept under conditions of animal house of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of NAS of Ukraine at natural lighting with the standard diet and free access to food and water.

Hemo- and immunosuppression were experimentally simulated in mice using a single intraperitoneal introduction of 5-fluorouracil (EBEWE, Austria) at the maximum tolerated dose of 228 mg/kg [5]. This drug belongs to the group of antimetabolites, being the analogue of pyrimidine nucleic acid components, with a strong toxic effect, and a powerful inhibitory effect on bone marrow [6, 14].

The animals were divided into three groups: the intact (control) and two experimental ones (6 mice in each). The mice of the first experimental group received only 5-FU (group 5-FU), the second experimental group (group 5-FU + cCBNCs) 3–4 hrs later a single injection of 5-FU was intravenously administered with 0.2 ml of human cCBNCs (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, Kharkiv) at a dose of 5×10^8 of viable cCBNCs per kg [1, 2].

The nucleated cells were isolated from the whole cord blood (CB) by sedimentation in dextran solution with molecular weight of $60,000 \pm 10,000$, cryopreserved according to the program, developed at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of NAS of Ukraine and stored at the Institute's Low Temperature Bank at -196°C [1, 2]. Cell samples were thawed in a water bath (37°C) during 40 sec.

The nucleated cells ($\text{CD}45^+$) of human cord blood, including hematopoietic ($\text{CD}34^+$) ones were studied both before and after cryopreservation with flow cytometry using FACS Calibur flow cytometer (BD, USA) with BD reagents according to the protocol of International Society for Hematotherapy and Graft Engineering (ISHAGE) [2]. To assess the viability of nucleated cells prior to and after cryopreservation we used the DNA fluorescent dye 7AAD (BD) [1, 2]. All the cryopreserved CB samples used in this research contained $(7.5\text{--}8.0) \times 10^8$ NCs ($\text{CD}45^+$), where the fraction of $\text{CD}34^+$ cells made $(0.18\text{--}0.26)\%$ and their viability was $(78.4\text{--}87.1)\%$.

Animals were sacrificed to days 2, 7, 10 and 16. Spleen fragments were fixed in 10% neutral formalin, washed with running water, dehydrated in alcohol solutions of increasing concentration, clarified in xylene and embedded into paraffin. The 6–8 μm sections from paraffin blocks were stained with hematoxylin and eosin to obtain the plain histological specimens [3]. Histological studies were performed using the image analyzer composed of Olympus CX-41 microscope (Japan) with Olympus SP 500UZ digital camera (China) and PC.

Животных выводили из эксперимента на 2, 7, 10 и 16-е сутки путем декапитации. Фрагменты селезенки фиксировали в 10%-м нейтральном формалине, промывали в проточной воде, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, просветляли в ксилоле и заливали парафином. Срезы из парафиновых блоков толщиной 6–8 мкм окрашивали гематоксилином и эозином для получения обзорных гистологических препаратов [3]. Гистологические исследования проводили с помощью анализатора изображений, состоящего из микроскопа «Olympus CX-41» (Япония) с цифровой камерой «Olympus SP 500UZ» (Китай) и персонального компьютера.

Результаты и обсуждение

При анализе гистологических срезов селезенки интактных мышей определялось ее нормальное строение. Внутрь от соединительнотканной капсулы отходили трабекулы селезенки, которые в глубоких ее частях анастомозировали между собой. Соотношение красной и белой пульпы было сдвинуто в сторону красной пульпы, которая состояла из ретикулярной ткани с расположенными в ней клеточными элементами крови и многочисленными кровеносными сосудами, главным образом синусоидного типа. Это свидетельствовало о нормальном кровенаполнении органа. В расположенных между синусами пульпарных тяжах обнаруживались очаги плазмоцитогенеза. Лимфоидная ткань – белая пульпа селезенки – располагалась в адвентиции ее артерий в виде шаровидных скоплений или удлиненных лимфатических влагалищ (лимфатические фолликулы). В них проходили центральные артерии, от которых отходили гемокапилляры по направлению к краевым синусам красной пульпы. В лимфатических фолликулах различались три нечетко разграниченные зоны: периартериальная (центр размножения), мантийный слой и маргинальная зона (рис. 1).

Как показали наши предыдущие исследования [9, 10], признаки деструктивного влияния цитостатического препарата 5-ФУ на кроветворение возникают уже на 2-е сутки после его введения и проявляются в истощении процессов гемопоэза. Введение 5-ФУ мышам в максимально переносимой дозе приводило к выраженной миелодепрессии, торможению процессов репарации кроветворной ткани и ее отдельных ростков, что, в свою очередь, может свидетельствовать об угнетении функции костного мозга и развитии иммунодефицитных состояний [10].

Селезенка, являясь органом, осуществляющим взаимосвязь систем кровообращения и кроветворения [11], активно реагирует на введение иммуносупрессивных препаратов, что подтверждается

Results and discussion

Analysis of the spleen histological sections in intact mice revealed its normal structure. The splenic trabeculae were inside-directed from the connective tissue capsule, which in its deep parts were anastomosed with each other. The ratio of red and white pulps was shifted towards the red one, consisted of a reticular tissue with located therein cellular elements of the blood and numerous blood vessels, mainly of sinusoidal type. This fact testified to a normal blood filling of the organ. The foci of plasmogenesis were revealed in the pulp strands, located between sinuses. Lymphoid tissue, a splenic white pulp, was located in the adventitia of its arteries in the form of either globular clusters or elongated lymphatic sheaths (lymphatic follicles). They contained the central arteries, from which the hemocapillaries went towards the boundary sinuses of red pulp. Three vaguely defined areas: periarterial (germinal center), mantle layer and marginal area were distinguished in lymphatic follicles (Fig. 1).

As our previous studies demonstrated [11, 12], the signs of destructive effect of 5-FU cytostatic drug on hematopoiesis occurred even to day 2 after its administration, and were manifested as hematopoiesis exhaustion. The 5-FU administration into mice at the maximum tolerated dose resulted in a pronounced myelodepression, slowed restoration of hematopoietic tissue and its individual germs, which, in turn, might testify to a suppressed function of bone marrow and immunodeficiency development [12].

The spleen, being the organ, implementing the relationship between blood flow and hematopoiesis [13], actively responds to administration of immunosuppressive drugs, as evidenced by the results of morpho-

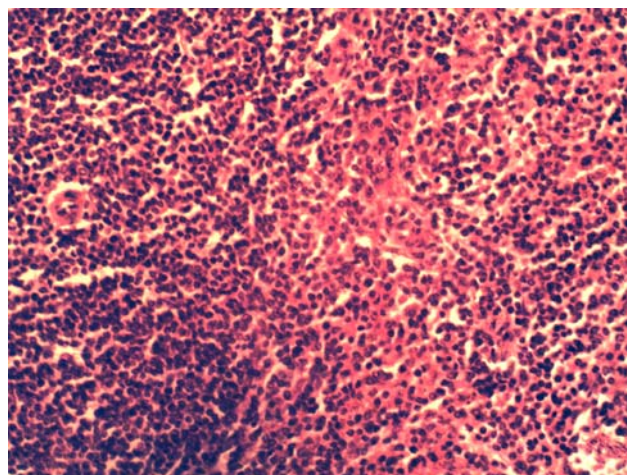


Рис. 1. Ткань селезенки интактных мышей. Фолликулы белой пульпы. Красная пульпа с гемокапиллярами. Окраска гематоксилином и эозином; $\times 400$.

Fig. 1. Spleen tissue of intact mice. White pulp follicles. Red pulp with hemocapillaries. Hematoxylin and eosin staining; $\times 400$.



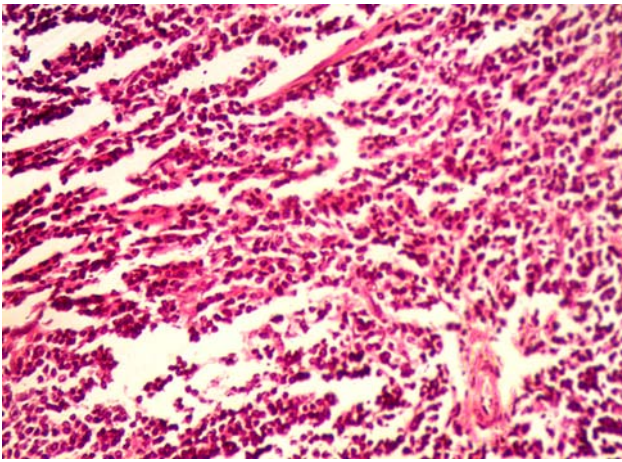


Рис. 2. Ткань селезенки мышей через 2-е суток после воздействия 5-ФУ. Дегенеративные изменения со стороны тканевых элементов пульпы и фолликулов. Окраска гематоксилином и эозином; $\times 400$.

Fig. 2. Murine spleen tissue 2 days later exposure to 5-FU. Degenerative changes in tissue elements of pulp and follicles. Hematoxylin and eosin staining; $\times 400$.

результатами морфометрического анализа [7]. Данные литературы указывают на деструктивное влияние цитостатиков на селезенку животных, которое приводит к ее истощению [5, 7, 11].

Характерные для острых поражений изменения в селезенке мы наблюдали уже на 2-е сутки после введения 5-ФУ: полнокровие, экссудация и инфильтрация лейкоцитами пульпы, пролиферация В-лимфоцитов в центрах размножения фолликулов; небольшие скопления макрофагов с фагоцитированными лимфоцитами или их фрагментами в виде хромофильных телец; дегенеративные изменения со стороны тканевых элементов пульпы и фолликулов. Ретикулярная ткань, образующая строму селезенки животных первой опытной группы и составляющая основу ее пульпы, была разволокнена, из-за чего ткань селезенки имела многочисленные разрывы и трещины. Трабекулы селезенки, отходящие от соединительнотканной капсулы внутрь, были представлены преимущественно истонченными эластическими волокнами. В адвентиции артерий, пронизывающих селезенку, определялась лимфоидная ткань. Белая пульпа преобладала над красной, что свидетельствовало о раздражении лимфоидной ткани (рис. 2).

К 7-м суткам в селезенке мышей после воздействия 5-ФУ по-прежнему обнаруживались инфильтрация лейкоцитами пульпы селезенки, частые скопления макрофагов с фагоцитированными лимфоцитами или их фрагментами, полнокровие и экссудация, а также дегенеративные изменения со стороны тканевых элементов пульпы и фолликулов (рис. 3).

На 10-е и особенно на 16-е сутки после воздействия 5-ФУ в селезенке выявлялись прогресси-

метрический анализ [8]. The reported data indicate a destructive effect of cytostatics on animal spleen, resulting in its exhaustion [6, 8, 13].

Even to day 2 after 5-FU administration we observed the changes in spleen, typical for acute damages such as: congestion, exudation and infiltration by pulp leukocytes, proliferation of B-lymphoblasts in germinal centers of follicles; small clusters of macrophages with either phagocytized lymphocytes or their fragments as chromophilic bodies; degenerative changes in tissue elements of pulp and follicles. The reticular tissue of the animal splenic stroma in the first experimental group being the basis of its pulp was teased, wherefore a splenic tissue had numerous ruptures and cracks. Splenic trabeculae, extending from the connective tissue capsule inside, were mostly presented by thinned elastic fibers. Lymphoid tissue was present in the adventitia of arteries, penetrating the spleen. The white pulp prevailed over the red one, thereby indicating the stimulation of lymphoid tissue (Fig. 2).

Murine spleen in day 7 after 5-FU exposure still had the leukocyte infiltration of splenic pulp, numerous clusters of macrophages with either phagocytized lymphocytes or their fragments, congestion and exudation, as well as degenerative changes in tissue elements of the pulp and follicles (Fig. 3).

Progressing changes being typical for the toxic injury were revealed in spleen to day 10 and especially day 16 after 5-FU exposure. For example, the splenic pulp was infiltrated by leukocytes, and the clusters of macrophages with either phagocytized lymphocytes or

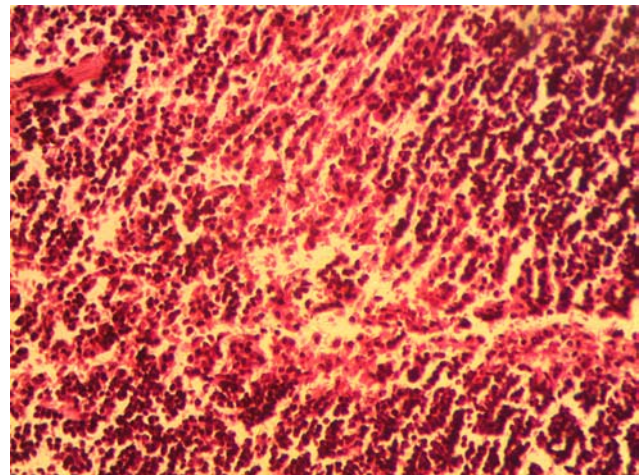


Рис. 3. Ткань селезенки мышей через 7 суток после воздействия 5-ФУ. Скопления макрофагов с фагоцитированными лимфоцитами или их фрагментами в виде хромофильных телец, полнокровие и экссудация. Окраска гематоксилином и эозином; $\times 400$.

Fig. 3. Murine spleen tissue in 7 days after exposure to 5-FU. Accumulations of macrophages with phagocytized lymphocytes or their fragments visible as chromophilic bodies, congestion and exudation. Hematoxylin and eosin staining; $\times 400$.

рующие изменения, характерные для поражения токсическими веществами. Так, пульпа селезенки была инфильтрирована лейкоцитами, в ней обнаруживались скопления макрофагов с фагоцитированными лимфоцитами или их фрагментами в виде хромофильных телец, наблюдались полнокровие, экссудация, а также дегенеративные и некротические изменения тканевых элементов пульпы и фолликулов (рис. 4 и 5).

Несмотря на полученные нами результаты [10] частичного восстановления к 16-м суткам наблюдения костномозгового кроветворения, токсическое действие фторпиримидинового антиметаболита еще затрагивает все структуры селезенки. Полученные данные можно объяснить тем, что селезенка имеет более сложное строение по сравнению с другими периферическими органами иммуногенеза и наиболее подвержена токсическому действию химиотерапевтических препаратов [11].

С.А. Кащенко и М.В. Золотаревская [7] отметили значимые изменения морфометрических показателей селезенки половозрелых крыс, которым вводили цитостатик циклофосфан, и приближение этих значений к норме только на 30-е сутки эксперимента, что указывает на постепенное восстановление иммунологического статуса в этот период наблюдения. Кроме того, авторы отметили частичное восстановление и реактивное увеличение некоторых гистоморфометрических показателей белой пульпы селезенки крыс после применения циклофосфана в еще более поздние сроки наблюдения (90-е сутки), что может свидетельствовать о завершении иммуносупрессивного действия препарата и об активации реакций гуморального и клеточного иммунитета.

В опубликованных нами ранее работах [9, 10] было показано, что после введения 5-ФУ мышам линии СВА применение кЯСК КК оказывало выраженный стимулирующий эффект на эритропоэз; значительно снизился процент гемолизированных (вследствие токсического действия цитостатиков) эритроцитов периферической крови; в более короткие сроки (к 12-м суткам) восстановилось костномозговое кроветворение и на 9-е сутки полностью купировалась токсическая лейкопения. В этой связи представляло интерес исследовать иммуномодулирующее действие криоконсервированного препарата кордовой крови на коррекцию деструктивных изменений, вызванных цитостатическим действием 5-ФУ, в селезенке мышей.

При исследовании селезенки мышей на 2-е сутки после воздействия 5-ФУ + кЯСК КК было обнаружено, что соотношение красной и белой пульпы сдвинуто в сторону красной. Образующая ее ретикулярная ткань с клеточными элементами крови и кровеносными сосудами, главным образом сину-

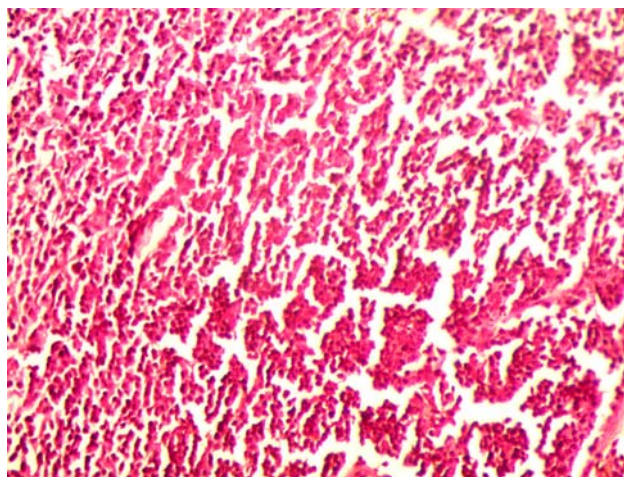


Рис. 4. Ткань селезенки мышей через 10 суток после воздействия 5-ФУ. Полнокровие, экссудация и инфильтрация лейкоцитами пульпы селезенки. Окраска гематоксилином и эозином; $\times 400$.

Fig. 4. Murine spleen tissue 10 days later exposure to 5-FU. Congestion, exudation and leukocyte infiltration of splenic pulp. Hematoxylin and eosin staining; $\times 400$.

their fragments as chromophilic bodies were found. We observed the congestion, exudation, as well as degenerative and necrotic changes in pulp tissue elements and follicles (Fig. 4 and 5).

Unlike of our previous findings [12] about a partial recovery of bone marrow hematopoiesis to day 16 of observation, all the structure of spleen to this term

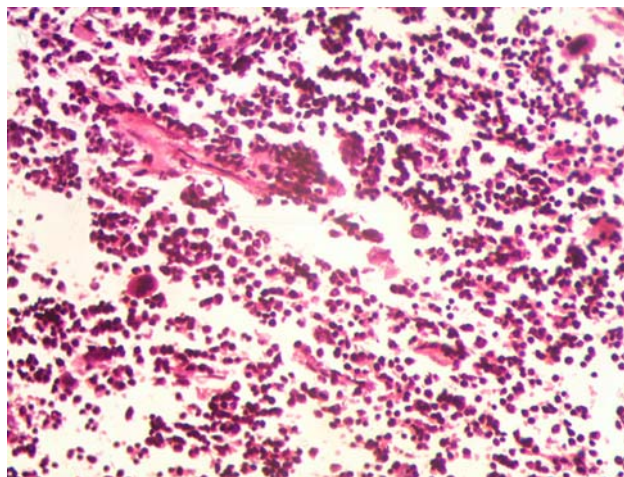


Рис. 5. Ткань селезенки мышей через 16 суток после воздействия 5-ФУ. Скопления макрофагов с фагоцитированными лимфоцитами или их фрагментами, а также дегенеративные и некротические изменения со стороны тканевых элементов пульпы и фолликулов. Окраска гематоксилином и эозином; $\times 400$.

Fig. 5. Murine spleen tissue 16 days later exposure to 5-FU. Clusters of macrophages with phagocytized lymphocytes and their fragments, as well as degenerative and necrotic changes in tissue elements of pulp and follicles. Hematoxylin and eosin staining; $\times 400$.



соидного типа, свидетельствовала о нормальном кровенаполнении органа. В расположенных между синусами пульпарных тяжах выявлялись очаги плазмоцитогенеза. Белая пульпа селезенки располагалась в адвентиции ее артерий в виде шаровидных лимфатических скоплений (фолликулов). В них проходили центральные артерии, которые располагались эксцентрично. От лимфатических фолликулов отходили гемокапилляры по направлению к краевым синусам красной пульпы (рис. 6, А, В).

Исследование селезенки мышей после воздействия 5-ФУ + кЯСК КК через 7 суток показало преобладание белой пульпы над красной. Основу пульпы составляла ретикулярная ткань, образующая ее строму. В ней визуализировались трабекулы, представленные преимущественно эластическими волокнами, которые отходили от соединительнотканной капсулы внутрь и в глубоких ее частях анастомозировали между собой. В адвентиции артерий, пронизывающих селезенку, определялась лимфоидная ткань в виде лимфатических фолликулов – округлых или овальных скоплений. Обнаруживались расширенные синусы и небольшие скопления макрофагов (рис. 7, А, В).

Через 10 суток после воздействия 5-ФУ + кЯСК КК структура селезенки мышей отвечала норме. Отходящие от соединительнотканной капсулы трабекулы анастомозировали между собой в глубоких частях селезенки. Соотношение красной и белой пульпы было несколько сдвинуто в сторону красной пульпы, состоящей из ретикулярной ткани с клеточными элементами крови и кровеносными сосудами синусоидного типа, что свидетельствовало о нормальном кровенаполнении органа (рис. 8, А, В). В расположенных между синусами пульпарных

were still toxically affected by fluoropyrimidine antimetabolite. These data may be explained by more complicated structures of the spleen as compared to other peripheral organs of immunogenesis and a higher susceptibility to a toxic effect of chemotherapy drugs [13].

S.A. Kaschenko and M.V. Zolotarevskaya [8] demonstrated the significant changes in morphometric parameters of the spleen in mature rats, treated with cytostatic cyclophosphan, and the approaching of these values to the norm only to day 30 of the experiment, thereby indicating a gradual recovery of immunological status within this observation period. In addition, the authors noted a partial recovery and reactive increase in some histomorphometric indices of the rat spleen white pulp after cyclophosphan administration within later observation terms (day 90), that might testify to the completion of immunosuppressive effect of the drug and the activation of reactions of humoral and cell immunity.

In our previously published papers [11, 12] we demonstrated a pronounced stimulating effect on erythropoiesis of cCBNCs application after 5-FU administration to the CBA mice; the percentage of hemolyzed (due to a toxic effect of cytostatics) erythrocytes of peripheral blood significantly decreased; the bone marrow hemopoiesis recovered within a shorter time period (to day 12) and a toxic leukopenia was completely terminated to day 9. In this regard, of interest was to investigate an immunomodulating effect of cryopreserved preparation of CB on correction of destructive changes, caused by a cytostatic effect of 5-FU in murine spleen.

Studying the murine spleen to day 2 after the effect of 5-FU + cCBNCs revealed a shift in the ratio of red

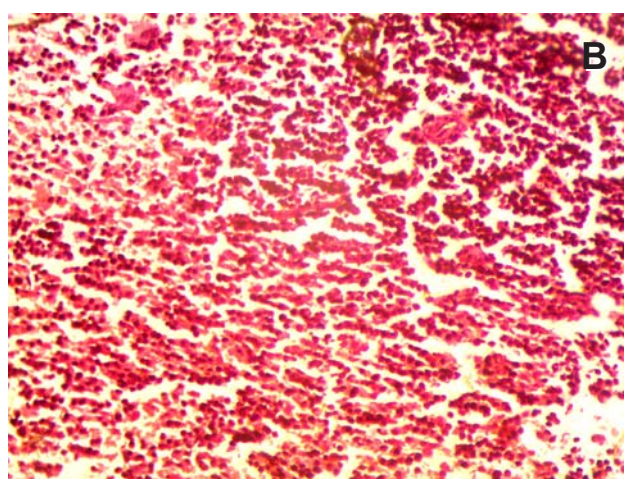
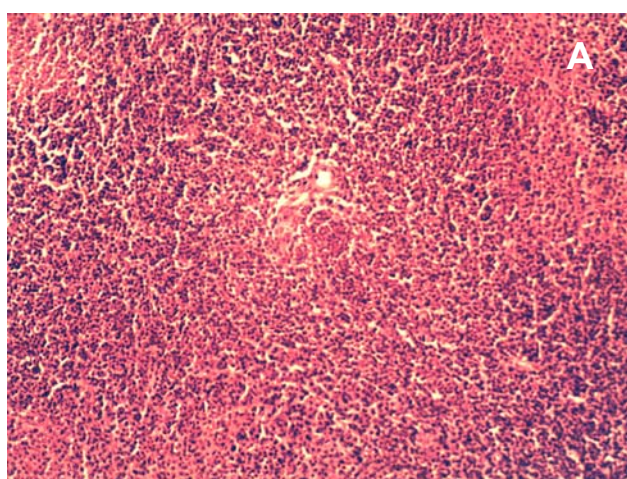


Рис. 6. Ткань селезенки мышей через 2-е суток после воздействия 5-ФУ и введения кЯСК КК. **А** – соотношение красной и белой пульпы сдвинуто в сторону красной пульпы; $\times 200$; **В** – кровеносные сосуды синусоидного типа; $\times 400$. Окраска гематоксилином и эозином.

Fig. 6. Murine spleen tissue 2 days later exposure to 5-FU and cCBNCs administration. **A** – ratio of red and white pulps is shifted towards the red pulp; $\times 200$; **B** – blood vessels of sinusoidal type; $\times 400$. Hematoxylin and eosin staining.

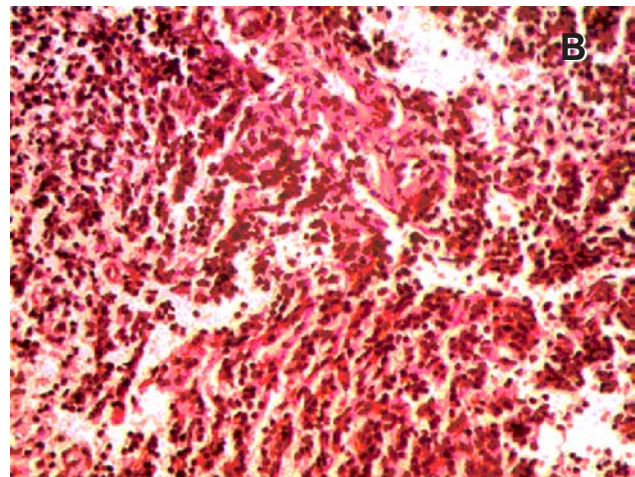
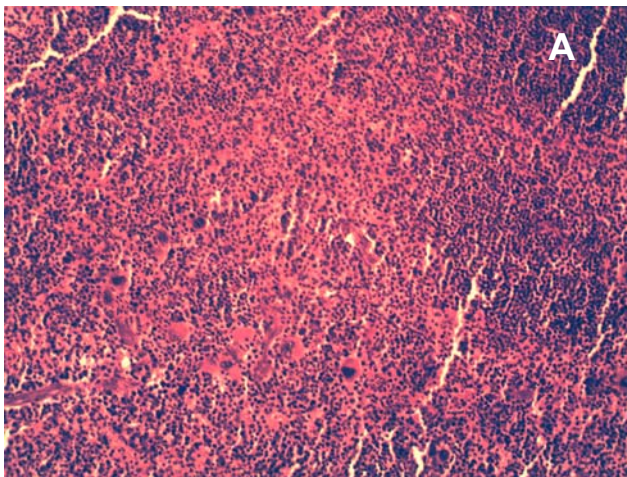


Рис. 7. Ткань селезенки мышей через 7 суток после воздействия 5-ФУ и введения кЯСК КК. **А** – белая пульпа преобладает над красной; ретикулярная ткань с кровеносными сосудами и капиллярами; скопления макрофагов; $\times 200$; **В** – расширенные синусы и небольшие скопления макрофагов; $\times 400$. Окраска гематоксилином и эозином.
Fig. 7. Murine spleen tissue 7 days later exposure to 5-FU and cCBNCs administration. **A** – white pulp dominates the red one; reticular tissue with blood vessels and capillaries; accumulation of macrophages; $\times 200$; **B** – extended sinuses and small accumulations of macrophages; $\times 400$. Hematoxylin and eosin staining.

тяжах выявлялись очаги плазмоцитогенеза. Белая пульпа селезенки визуализировалась в адвентиции ее артерий в виде шаровидных лимфатических фолликулов. Центральные артерии, проходящие в них, располагались эксцентрично. От лимфатических фолликулов отходили гемокапилляры по направлению к краевым синусам красной пульпы.

Гистологическое строение селезенки мышей группы 5-ФУ + кЯСК КК к 16-м суткам наблюдения практически не отличалось от такового у контрольных (интактных).

Как известно, угнетающее действие цитостатических препаратов проявляется в уменьшении пролиферации и дифференциации иммунокомпетентных клеток, следствием чего являются клеточное опустошение, усиление процессов апоптоза и макрофагальная активность [11]. Полученные нами данные о позитивном воздействии кЯСК КК на коррекцию деструктивных изменений в селезенке мышей, вызванных цитостатическим действием 5-ФУ, согласуются с результатами Е.И. Савина и соавт. [14]. Авторы вводили аллогенные мезенхимальные стволовые клетки (СК) человека, полученные из подкожного жира, крысам после введения 5-ФУ и регистрировали положительную динамику морфологических изменений в селезенке, указывающую на активацию в ней процессов пролиферации и дифференцировки иммунокомпетентных клеток.

Показано, что эффективность клеточной трансплантации обеспечивается миграционной активностью введенных клеток [15], которая зависит от «запроса» клеток микроокружения того или иного органа и запаса собственных СК в каждом

and white pulps towards the red one. The state of its reticular tissue with blood cell elements and vessels, especially of sinusoidal type, testified to a normal blood filling of the organ. The plasmocytogenesis foci were revealed in the pulp strands, located between sinuses. The spleen white pulp was located in the adventitia of its arteries as globular lymphatic clusters (follicles) containing central arteries located eccentrically. The hemocapillaries were extended from the lymph follicles towards the boundary sinuses of red pulp (Fig. 6, A, B).

Examining the murine spleen after exposure to 5-FU + cCBNCs in 7 days revealed the dominance of the white pulp *vs.* the red one. The pulp consisted of reticular tissue, forming its stroma. It had the trabeculae which were presented mostly by elastic fibers, extended from the connective tissue capsule inside and anastomosed with each other in its deep parts. The adventitia of arteries, penetrating the spleen, contained a lymphoid tissue in the form of lymph follicles, being roundish or oval clusters. Enlarged sinuses and small clusters of macrophages were found (Fig. 7A, B).

After 10 days following the effect of 5-FU + cCBNCs the murine spleen structure approached the norm. The trabeculae, extending from the connective tissue capsule, were anastomosed with each other in deep parts of spleen. The ratio of red and white pulps was slightly shifted toward the red one, consisting of reticular tissue with cellular blood elements and blood vessels of sinusoidal type, testifying to a normal blood filling of the organ (Fig. 8A, B). The plasmocytogenesis foci were revealed in the pulp strands, located between sinuses. The white spleen pulp was visualized in the adventitia of its arteries in the form of spherical lymph



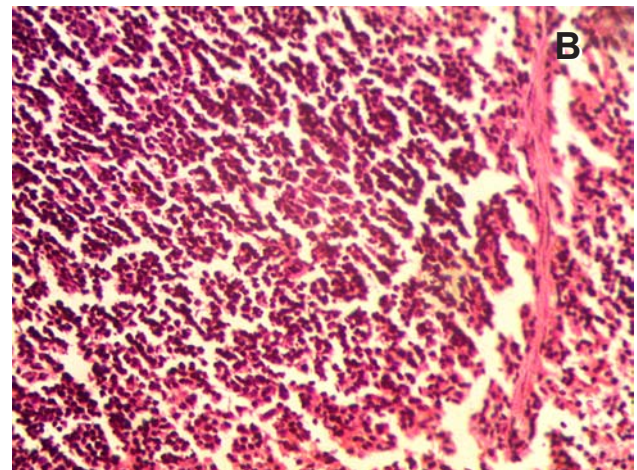
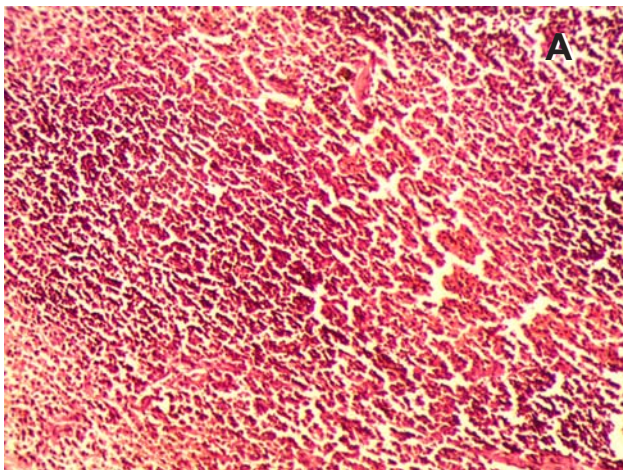


Рис. 8. Ткань селезенки мышей через 10 суток после воздействия 5-ФУ и введения кЯСК КК. **А** – соотношение красной и белой пульпы несколько сдвинуто в сторону красной пульпы, нормальное кровенаполнение органа; $\times 200$; **В** – очаги плазмоцитогенеза между синусами пульпарных тяжей; $\times 400$. Окраска гематоксилином и эозином.
Fig. 8. Murine spleen tissue 10 days later exposure to 5-FU and NCs CB administration. **A** – ratio of red and white pulps is slightly shifted towards the red one, normal blood filling of organ; $\times 200$; **B** – foci of plasmacytogenesis between sinuses of pulp cords; $\times 400$. Hematoxylin and eosin staining.

органе. Селезенка не только содержит лимфоидную ткань и фагоциты, удаляющие старые клетки крови, но и наряду с костным мозгом участвует в процессах кроветворения. Таким образом, селезенка выполняет функции как «депо» зрелых клеточных элементов крови, используемых организмом при кровопотере, так и «депо» СК. А.О. Соловьевой и соавт. [15] были представлены интересные экспериментальные результаты, доказывающие, что внутривенно введенные клетки костного мозга мигрируют во все исследуемые органы, поскольку маркер этих клеток (ДНК *sgu*-гена Y-хромосомы) определяется в костном мозге, лимфатических узлах, печени, селезенке, сердце, головном мозге и коже. В первый час после введения большинство имплантированных клеток костного мозга было обнаружено в печени и селезенке.

В литературе [15, 20] описаны механизмы миграции трансплантированных клеток, связанные с цитокинами, хемокинами и их рецепторами. Важным цитокином, регулирующим миграцию клеток, является высококомобильный групповой белок-1 (high mobility group box-1, HMGB1) – негистоновый протеин, требующийся для поддержания архитектоники хроматина. Ранее показано [20], что HMGB1 может пассивно освобождаться гибнущими клетками, являясь сигналом повреждения тканей, и индуцировать СК к трансмиграции через эндотелиальный барьер. Показано [19, 21], что уже в первые часы после внутривенного введения СК обнаруживаются практически во всех органах, однако через двое суток их количество в организме реципиента уменьшается. Поскольку процессы

follicles. The trending in it central arteries were located eccentrically. The hemocapillaries were extended from the lymph follicles towards the boundary sinuses of red pulp.

To day 16 of observation the histological structure of spleen in mice of 5-FU + cCBNCs group did not virtually differ from that in the control group (intact).

The inhibitory effect of cytotoxic drugs is known to manifest in a decreased proliferation and differentiation of immunocompetent cells, resulting in cell depletion, strengthening of apoptotic processes and macrophage activity [13]. Our findings of a positive effect of cCBNCs on correction of destructive changes in murine spleen, induced by cytostatic effect of 5-FU, correlate with those of E.I. Savin *et al.* [16]. They administered the human allogeneic mesenchymal stem cells (SCs), derived from subcutaneous fat to the rats after 5-FU administration and observed a positive dynamics of morphological changes in spleen, indicating the activation of proliferation and differentiation of immunocompetent cells therein.

The efficiency of cell transplantation was shown as provided by migration of introduced cells [17], depending on the 'request' of microenvironment cells of various organ and the pool of the own SCs in each organ. Spleen contains not only lymphoid tissue and phagocytes, removing old blood cells, it is also involved into hematopoiesis processes along with the bone marrow. Therefore, the spleen implements the functions both as a 'depot' of mature blood cell elements, used by a body in case of blood loss, and a stock of SCs as well. A.O. Solovieva *et al.* [17] revealed experimentally the migration of intravenously administered bone

миграции клеток-предшественников тесно связаны с их последующей пролиферацией и дифференцировкой, А.О. Соловьева и соавт. [15] предположили, что регистрируемое ими количество маркера HMGB1 в органах через 1 и 24 ч увеличивалось за счет миграции клеток донора, а через 1 и 3 месяца – из-за пролиферации и дифференцировки пластичных по своей природе трансплантированных СК.

Таким образом, на основании полученных нами результатов положительного корригирующего влияния кЯСК КК на динамику деструктивных процессов в селезенке мышей, развивающихся в результате токсического действия антимаболита 5-ФУ, можно предположить, что главную роль в этом процессе играют криоконсервированные стволовые клетки кордовой крови.

Выводы

Однократное внутрибрюшинное введение антимаболита нуклеинового обмена 5-ФУ в максимально переносимой дозе вызывает деструктивные изменения в ткани селезенки мышей на протяжении всего периода наблюдения (16 суток), приводящие к ее истощению. Выявленные изменения характерны для поражения токсическими веществами и проявляются в виде полнокровия, экссудации, некротических изменений со стороны тканевых элементов пульпы и фолликулов, скопления макрофагов с фагоцитированными лимфоцитами или их фрагментами.

Введение криоконсервированных ядросодержащих клеток кордовой крови приводило к структурным преобразованиям селезенки уже на 2-е сутки наблюдения и способствовало полной нормализации ее строения к 10-м суткам после токсического поражения организма мыши 5-ФУ.

Перспективой является дальнейшее исследование влияния введения криоконсервированных ядросодержащих клеток кордовой крови с целью коррекции функционального состояния органов и систем организма в условиях экспериментальной гемо- и иммуносупрессии.

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 мед. вісник. – 2009. – Т. 13, №4. – С. 23–26.
2. Бабийчук Л.А., Кудкоцева 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. Бобрышева И.В. Морфологическая реактивность селезенки крыс различных возрастных периодов при иммуно-

marrow cells to all the studied organs, which was shown by presence of the marker of these cells (DNA of *sry*-gene in Y-chromosome) in bone marrow, lymph nodes, liver, spleen, heart, brain and skin. In the first hour after administration the most of the implanted bone marrow cells were found in liver and spleen.

There are the reports [17, 20] describing the migration mechanisms of transplanted cells associated with cytokines, chemokines and their receptors. An important cytokine, regulating the cell migration was a high mobility group box-1 (HMGB1), non-histone protein, required for maintaining chromatin architectonics. Previously it was shown [20] that HMGB1 could be passively released by perishing cells, that was a signal of tissue damage, and could induce SCs to transmigration through an endothelial barrier. There was demonstrated [19, 21], that even within the first hours after intravenous administration the SCs were found virtually in all the organs, but two days later their number in the recipient body was decreased. Since the migration of progenitor cells are closely associated with their subsequent proliferation and differentiation, A.O. Solovieva *et al.* [17] suggested an increase of HMGB1 markers number in the organs after 1 h and 24 hrs as occurred due to the migration of donor cells, and in 1 and 3 months it was explained by flexibility of transplanted cells due to their proliferation and differentiation.

Thus, basing on our findings of a positive correcting impact of cCBNCs on the dynamics of destructive processes in murine spleen, resulting from a toxic effect of the 5-FU antimetabolite, the main role in this process may be assumed to belong to the cryopreserved stem cells of cord blood.

Conclusions

A single intraperitoneal administration of the 5-FU antimetabolite of nucleic metabolism at the maximum tolerated dose causes the destructive changes in murine spleen tissue during the observation period (16 days), resulting in its exhaustion. The revealed changes are typical for the toxic injury, these are congestion, exudation, necrotic changes in tissue elements of the pulp and follicles, clusters of macrophages with either phagocytized lymphocytes or their fragments.

The administration of cryopreserved cord blood nucleated cells leads to the structural rearrangements in spleen even to day 2 of observation and promote a full normalization of its structure to day 10 after a toxic damage of mice with 5-FU.

Further research of the administration impact of cryopreserved cord blood nucleated cells to correct the functional state of body organs and systems under experimental hemo- and immunosuppression is promising.



муляции // Журнал клін. та експеримент. мед. досліджень. – 2013. – Т. 1, №3. – С. 315–321.

4. Гольдбергер Е.Д., Дыгай А.М., Жданов В.В. Роль гемопозидирующего микроокружения в регуляции кроветворения при цитостатических миелосупрессиях. – Томск: СТТ, 1999. – 114 с.
5. Григор'єва К. В. Морфофункціональний стан органів імунної системи під впливом сполуки Флудинат // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2013. – Т. 35, №4–5. – С. 31–33.
6. Иванова С.А. Психоземональний стресс и иммунитет // Сибир. вестник психиатрии и наркологии. – 2000. – №1. – С. 31–37.
7. Кащенко С.А., Золотаревская М.В. Морфометрические показатели селезенки крыс после введения циклофосфана // Укр. мед. альманах. – 2011. – Т. 9, №2. – С. 31–33.
8. Крыжановский Г.Н., Магаева С.В., Макаров С.В. Нейроиммунопатология. – М.: Ин-т общей патологии и патофизиологии РАМН, 1997. – 282 с.
9. 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.
10. Кудокоцева О.В., Ломакин И.И., Бабийчук Г.А. Купирование фторурациловой миелодепрессии у мышей путем введения криоконсервированных препаратов кордовой крови // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2015. – Т. 25, №4. – С. 359–370.
11. Макалиш Т.П. Морфофункціональні особливості селезенки при впливі на організм факторів різного генеза (Обзор літератури) // Тавричеський медико-біолог. вестник. – 2013. – Т. 16, №1, ч. 1. – С. 265–269.
12. Машковский М.Д. Лекарственные средства (15-е изд., перераб., испр. и доп.). – М.: Новая Волна, 2006. – 1206 с.
13. Морозова О.В. Селезенка как орган, осуществляющий взаимосвязь систем кровообращения и кроветворения // Клініч. та експеримент. патологія. – 2015. – Т. 14, №2. – С. 130–134.
14. Савин Е.И., Исаева Н.М., Субботина Т.И. и др. Воздействие модулирующих факторов на формирование равновесных состояний в условиях необратимого патологического процесса (экспериментальное исследование). – Тула: Изд-во ТулГУ, 2012. – 168 с.
15. Соловьева А.О., Повещенко А.Ф., Повещенко О.В. и др. Сравнительное исследование миграции и распределения донорских клеток костного мозга и селезенки в лимфоидные и нелімфоидные органы в разные сроки после трансплантации in vivo у мышей СВА // Бюл. СО РАМН. – 2013. – Т. 33, №4. – С. 35–41.
16. Стаценко Е.А. Современные представления об анатомии селезенки человека // Укр. мед. альманах. – 2009. – Т. 12, №3. – С. 229–232.
17. Фролов В.М., Дранник Г.М. Клінічна імунологія синдрому підвищеної втомлюваності у мешканців регіону Донбасу: показники клітинної ланки імунітету // Укр. мед. альманах. – 2003. – Т. 6, №3. – С. 169–172.
18. Хайтов Р.М., Пинегин Б.В. Современные иммуномодуляторы: основные принципы их применения // Иммунология. – 2000. – №5. – С. 4–7.
19. Li Z.H., Liao W., Cui X.L. et al. Intravenous transplantation of allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells and its directional migration to the necrotic femoral head // Int. J. Med. Sci. – 2011. – Vol. 8, №1. – P. 74–83.
20. Palumbo R., Bianchi M.E. High mobility group box 1 protein, a cue for stem cell recruitment // Biochem. Pharmacol. – 2004. – Vol. 68, №6. – P. 1165–1170.
21. Tomita Y., Makino S., Hakuno D. et al. Application of mesenchymal stem cell-derived cardiomyocytes as bio-pacemakers: current status and problems to be solved // Med. Biol. Eng. Comput. – 2007. – Vol. 45, №2. – P. 209–220.

References

1. Babijchuk L.A., Kudokotseva O.V., Zubov P.M., Zubova O.L. New approaches to cryopreservation of cord blood nucleated cells and assessment of their viability. *Ukrainskiy Khimioterapevticheskiy Zhurnal* 2008; (1–2): 85–88.
2. Babijchuk L.A., Zubov P.M., Ryazantsev V.V. et al. Cord blood as an alternative source of stem cells for regenerative medicine: new approaches to problem of cryopreservation. *Buk Med Herald* 2009; 13(4): 23–26.
3. Bobrysheva I.V. Morphological reactivity of rat spleen during different ages at immunostimulation. *Journal of Clinical and Experimental Medical Research* 2013; 1(3): 315–321.
4. Frolov V.M., Drannik G.M. Clinical immunology of increased fatigability syndrome in Donbass region residents: indices of cellular immunity. *Ukr Med Almanakh* 2003; 6(3): 169–172.
5. Goldberg E.D., Dygai A.M., Zhdanov V.V. Role of hemopoiesis-inducing microenvironment in regulation of hematopoiesis under cytostatic myelosuppressions. *Tomsk: STT; 1999.*
6. Grigorieva K.V. Morphofunctional state of immune system organs under Fludinat compound effect. *Pharmacology and Drug Toxicology* 2013; 35(4–5): 31–33.
7. Ivanova S.A. Psychoemotional stress and immunity. *Siberian Herald of Psychiatry and Addiction Psychiatry* 2000; (1): 31–37.
8. Kaschenko S.A., Zolotarevskaya M.V. Morphometric indices of rat spleen after cyclophosphan administration. *Ukr Med Almanakh* 2011; 9(2): 31–33.
9. Khaitov R.M., Pinegin B.V. Modern immunomodulators: the basic principles of their application. *Immunologiya* 2000; (5): 4–7.
10. Kryzhanovsky G.N., Magayeva S.V., Makarov S.V. Neuroimmunopathology. *Moscow: Institute of General Pathology and Pathophysiology; 1997.*
11. 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. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine* 2014; 24(4): 312–312.
12. Kudokotseva O.V., Lomakin I.I., Babijchuk G.A. Cryopreserved cord blood products mitigate fluorouracil myelodepression in mice. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine* 2015; 25(4): 359–370.
13. Makalish T.P. Morphofunctional features of spleen under influence of factors of various genesis. *Tavrisheskiy Med Biol Vestnik* 2013; 16(1): 265–269.
14. Mashkovsky M.D. *Drugs*. Moscow: Novaya Volna; 2006.
15. Morozova O.V. Spleen as the organ implementing relationship between circulation and hematopoiesis systems. *Clinical & Experimental Pathology* 2015; 14(2): 130–134.
16. Savin E.I., Isayeva N.M., Subbotina T.I. et al. Effect of modulating factors on formation of equilibrium conditions in terms of irreversible pathological process (experimental research). *Tula: Publishing House of Tula State University; 2012.*
17. Solovieva A.O., Poveschenko A.F., Poveschenko O.V. et al. Comparative study of migration and distribution of bone marrow and spleen donor cells into lymphoid and non-lymphoid organs of CBA mice in vitro in different terms after transplantation. *Bull of SBRAMS* 2013; 33(4): 35–41.
18. Statsenko E.A. Current concepts of human spleen anatomy. *Ukr Med Almanakh* 2003; 6(3): 169–172.
19. Li Z.H., Liao W., Cui X.L. et al. Intravenous transplantation of allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells and its directional migration to the necrotic femoral head. *Int J Med Sci* 2011; 8(1): 74–83.
20. Palumbo R., Bianchi M.E. High mobility group box 1 protein, a cue for stem cell recruitment. *Biochem Pharmacol* 2004; 68(6): 1165–1170.
21. Tomita Y., Makino S., Hakuno D. et al. Application of mesenchymal stem cell-derived cardiomyocytes as bio-pacemakers: current status and problem to be solved. *Med Biol Eng Comput* 2007; 45(2): 209–220.

