

## Криоконсервирование – фактор оптимизации терапевтического эффекта продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса (ПЭФПК)

Часть I. Патология аутоиммунного генеза как модель оценки терапевтического эффекта применения ПЭФПК

UDC 615.014.41:611.013.3/8.08.612.017

A.N. GOLTSEV\*, K.N. POPOVA, M.A. SIROUS

## Cryopreservation as Optimizing Factor in Therapeutic Effect of Products of Embryofetoplacental Complex (PEFPC)

Part 1. Pathology of autoimmune genesis as assessment model of therapeutic effect of PEFPC application

Обосновывается возможность использования модельных аутоиммунных заболеваний для оценки терапевтической эффективности криоконсервированных продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса (ПЭФПК). На примере аутоиммунной гемолитической анемии показано многопрофильное изменение состояния лимфогемопоэтического комплекса животных с данной патологией. Акцентируется внимание на взаимообусловленных изменениях в различных звеньях иммунной системы при развитии патологии. Отмечается возможная зависимость степени их проявления от нарушения гармоничного взаимодействия в нейроиммуноэндокринном блоке организма, что обуславливает необходимость лечения такого рода заболеваний препаратами с полифункциональной направленностью действия, а именно ПЭФПК.

**Ключевые слова:** аутоиммунные заболевания, аутоиммунная гемолитическая анемия, этиопатогенез, лимфогемопоэтический комплекс, продукты эмбриофетоплацентарного комплекса, криоконсервирование.

Обґрунтовується можливість використання модельних аутоімунних захворювань для оцінки терапевтичної ефективності криоконсервованих продуктів ембріофетоплацентарного комплексу (ПЕФПК). На прикладі аутоімунної гемолітичної анемії показано многопрофільну зміну стану лімфогемопоетичного комплексу тварин з цією патологією. Акцентується увага на взаємообумовлених змінах на різних ланках імунної системи при розвитку патології. Визначається можлива залежність ступеня їхнього прояву від порушення гармонійної взаємодії в нейроіммуноендокринному блоці організму, що обумовлює необхідність лікування такого роду захворювань препаратами з поліфункціональною спрямованістю дії, а саме ПЕФПК.

**Ключові слова:** аутоімунні захворювання, аутоімунна гемолітична анемія, етіопатогенез, лімфогемопоетичний комплекс, продукти ембріофетоплацентарного комплексу, криоконсервування.

The possibility of using model autoimmune diseases for estimating a therapeutic efficiency of cryopreserved products of embryofetoplacental complex (PEFPC) is substantiated. With the example of autoimmune hemolytic anemia there has been shown a multi-profile change of the state of lymphohemopoietic complex of the animals with this pathology. The changes in various links of immune system during pathology development are emphasized. There is noted a possible dependence of their manifestation extent on disorder of harmonic interaction in neuroimmune endocrine block of an organism that stipulates the necessity of treatment of such diseases by preparations with a polyfunctional orientation effect, namely PEFPC.

**Key words:** autoimmune diseases, autoimmune hemolytic anemia, ethyopathogenesis, lymphohemopoietic complex, products of embryofetoplacental complex, cryopreservation

Существенным компонентом клеточной и тканевой терапии являются клеточно-тканевые препараты эмбриофетоплацентарного комплекса (ПЭФПК) [10, 19].

Целесообразность применения эмбрионального материала как компонента комплексных программ терапии различных патологических состояний организма базируется на идентификации в них

Essential component of cells and tissue therapy are the preparations of embryofetoplacental complex (PEFPC) [10, 19].

The expediency of this material application as a component of complex programs for therapy of various pathological states of an organism is based on the presence in it of a wide spectrum of biologically active substances [10, 17]. However the scopes of PEFPC

Институт проблем криобиологии и криомедицины  
НАН Украины, г. Харьков

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 61015; тел.: +38 (057) 373-30-39, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

\* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3039, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

широкого спектра биологически активных субстанций [10, 17]. Однако и в настоящее время клиническое использование ПЭФПК опережает темпы проведения работ по изучению механизмов действия такого вида терапии в лечебной практике. Многие механизмы реализации модифицирующей активности ПЭФПК и их влияния на клинический статус больного до конца не выяснены. Существенный вклад в решение этой проблемы могут внести экспериментальные исследования, позволяющие оценить не только характер, но и степень эффекта ПЭФПК на разные системы организма [6, 9, 10,]. При этом особую значимость приобретают вопросы выбора методологических и методических подходов.

Известно, что развитие патологического процесса в организме человека является следствием разбалансировки гармоничного взаимодействия субстратов нейроиммуноэндокринного блока (НИЭБ), т.е. базовых систем обеспечения постоянства внутренней среды организма – бодигомеостаза [5, 10]. Такого рода изменения приводят к дальнейшему снижению порога устойчивости организма к действию неблагоприятных факторов внешней и внутренней среды. На этом фоне острый период ответной реакции организма на возмущающий фактор пролонгируется, часто переходя в хроническую форму ее проявления. Примером развития подобных событий на уровне иммунной системы (ИС) является ее несостоятельность реализовать иммуно-воспалительную реакцию в пределах острого периода, хронизация процесса, что создает предпосылки и ассоциируется с развитием аутоиммунной агрессии, манифестируемой в форме аутоиммунных заболеваний (АИЗ) [10].

Аутоиммунные заболевания занимают одно из ведущих мест в общем спектре патологических состояний организма человека. В последние годы предложены объяснения механизмов, индуцирующих или вносящих существенный вклад в развитие АИЗ [3, 28]. Несмотря на достаточную вариабильность первопричин АИЗ, признается безусловная их мультифакториальность, включая как эндогенные, так и экзогенные факторы. Аутоиммунные реакции приобретают деструктивную активность в отношении клеточно-тканевых структур собственного организма в условиях снижения или развития какого-либо скомпроментированного состояния естественной толерантности до уровня, когда начинают проявляться клинически определяемые изменения функции тканей и метаболизма [3, 10]. Полученные данные свидетельствуют о том, что при развитии АИЗ существенно изменяются направленность и характер медиаторных взаимодействий в системе регуляторных Т-клеток [5, 21].

clinical use anticipate the research terms on studying the effect mechanisms of this therapy type. Many mechanisms of realization of PEFPC modifying activity and their effect on clinical status of a patient have not been completely elucidated. Significant contribution into this problem solving may be made by the experiments allowing to estimate not only the character but also an extent of PEFPC on various organism systems [6, 9, 10]. Herewith the questions of a choice of methodological and methodical approaches are of a special value.

It is known that the development of pathological process in human organism is the consequence of misbalancing of harmonic interaction of neuroimmune endocrine block (NIEB) substrates, that is basic system of providing a constant inner medium of an organism, body homeostasis [5, 10]. These changes result in further reduction of stability threshold of an organism to the effect of environment and inner medium unfavorable factors. On this back ground an acute period of an organism response to exciting factor is prolonged and frequently transforming into chronic form of its manifestation. The example of development of these events on the level of immune system (IS) is its failure to realize immune inflammatory reaction within the limits of an acute period, process chronization, creating the preconditions and is associated with the development of autoimmune aggression, manifested as autoimmune diseases (AIDs) [10].

Autoimmune diseases take one of leading places in general spectrum of human organism pathological states. Recently the explanations of the mechanisms either inducing or contributing to the development of AIDs have been proposed [3, 28]. In spite of insufficient variability of primary causes of AIDs development their evident multi-factor origin is admitted including both endogenous and exogenous factors. Autoimmune reaction gain destructive activity in respect of cell-tissue structures of own organism under conditions of decrease or development of any compromised state of natural tolerance up to the level when clinically found changes in the function of tissues and metabolism appear to be manifested [3, 10]. The obtained data testify to the fact that during development of AIDs the orientation and character of mediator interactions in the system of regulatory T-cells [5, 21] are considerably altered.

Developing in such a manner the pathology in one of the components of NIEB will stipulate dysfunctional state of its other systems. Just the misbalance of their synchronized interaction on the background of distorted cytokine profile in each of these systems is one of the main causes of the development of many pathological states of an organism [5, 10]. Significant also is the fact that absolute majority of AIDs proceeds with the participation of IS substrates, including immune

Развивающаяся в такой форме патология в одной из составляющих НИЭБ будет обуславливать дисфункциональное состояние других его систем. Именно разбалансировка их синхронизированного взаимодействия на фоне искаженного цитокинового профиля в каждой из этих систем является одной из основных причин развития многих патологических состояний организма [5, 10]. Существенно также, что абсолютное большинство АИЗ протекает с участием субстратов ИС, включая иммунокомпетентные клетки (ИКК), которые помимо сугубо иммунной функции реализуют важнейший трофический и гистогенетический потенциал [10]. Нарушение взаиморегулирующей активности различных их популяций и субпопуляций, отклонение от физиологического уровня продуцируемых ими плейотропных цитокинов могут вносить весомый вклад в искажение и этих функциональных характеристик ИКК в отношении любых систем организма, включая нейроэндокринную. Подобной активностью в отношении к ИС обладают и медиаторы, продуцируемые нервной и эндокринной системами [1, 12]. Очевидно, для коррекции функционального статуса систем обеспечения гомеостаза и соответственно лечения заболевания перспективными являются апробация и внедрение в клиническую практику препаратов не локальной клональной направленности, а надклональной системной регуляции. Такая постановка вопроса соответствует концепции, предложенной немецким врачом, профессором Гансом Рейкевегом, который еще в 30-е годы прошлого столетия сказал, что "...для излечения любых болезней необходимо воздействие на организм сразу нескольких лекарственных средств, восстанавливающих согласованное взаимодействие иммунной, эндокринной и нервной систем..." [16]. С нашей точки зрения, оптимальным в этом плане может быть применение именно "полифункциональных" препаратов, относящихся к ПЭФПК. Их биологическая активность ассоциирована с присутствующими в клетках и тканях, так называемых белков зоны беременности, классифицируемых по происхождению как эмбриофетальные и трофобластические белок-пептидные структуры, а по функции – реализующие гормональную, ферментную, или пока еще не установленную активность [23]. Важно, что клеточно-тканевая терапия в виде ПЭФПК предусматривает введение в организм не только важных медиаторов, но и живых, функционально активных клеток, среди которых присутствуют малодифференцированные стволовые элементы. Адаптируясь к условиям микроокружения и отвечая на местные органо- и тканеспецифические регуляторные сигналы, обладая высочайшей степени функциональной

competent cells (ICCs), which in addition to immune function itself realize the most important trophic and histogenetic potential [10]. Damage of inter-regulating activity of their various populations and subpopulations, deviation from physiological level of pleiotropic cytokines produced by them may contribute greatly into distortion of these ICCs functional characteristics in the action on any organism's systems, including neuroendocrine. In respect of IS the similar activity is possessed by the mediators produced by nerve and endocrine systems [1, 12]. It is evident that for the correction of functional status of the systems of body homeostasis providing and correspondingly of treating the disease the approbation and introduction into clinical practice of the preparations of non-local clonal direction but overclonal system regulation are perspective. This statement corresponds to the conception proposed by German physician, professor Hans Reckeweg, who in the 30<sup>th</sup> of past century said: "...to treat any disease the effect on an organism of several medicines recovering a coordinated interaction of immune, endocrine and nerve systems is necessary.." [16].

We believe, in this aspect an optimal one may be the application of exactly "polyfunctional" preparations referred to PEFPC. Their biological activity is associated to the present in cells and tissues so-called proteins of pregnancy zone, classified by the origin as embryo-fetal and trophoblast protein-peptide structures and on function the ones, realizing either hormonal, enzyme or not established yet activity [23]. It is important that cell and tissue therapy as PEFPC foresees the introduction of not only important mediators into an organism but also living functionally active cells, comprising slightly differentiated stem elements.

When adapting to the microenvironment conditions and responding to local organ- and tissue-specific regulatory signals, having in a great extent functional plasticity, they may play a role of "constructive" material realizing morphogenetic potential with renewal of organism structures [10].

With multi-vector correction of dysfunctional state of body homeostasis fundamental systems providing (NIEB) the use of PEFPC may be alternative of many pharmacotherapy types. However up to now the predominant value of the use of various PEFPC forms at a pathology has not been clarified yet, confirming their multi-vector correcting effect.

Due to the fact that AIDs is multifactor pathology, namely on the example of this group of diseases we may trace both general regularities of therapeutic effect of PEFPC and the peculiarities of various representatives. In manifestation of therapeutic effect the value of material procurement, i.e. its gestation terms with accounting significant changes in embryogenesis of structural and functional characteristics of embryo-

пластичностью, они могут выступать в роли “строительного” материала, реализующего морфогенетический потенциал, обновляя поврежденные структуры организма [10].

С точки зрения многовекторной коррекции дисфункционального состояния фундаментальных систем обеспечения гомеостаза, т.е. НИЭБ, применение ПЭФПК может быть альтернативой многих видов фармакотерапии. Однако до сих пор не ясны преимущественная значимость применения той или иной формы ПЭФПК при какой-либо патологии, доказательство их многовекторного корректирующего эффекта.

Поскольку АИЗ являются мультифакторными патологиями, именно на примере этой группы заболеваний можно проследить как общие закономерности терапевтического эффекта ПЭФПК, так и особенности того или иного их представителя. В плане проявления лечебного эффекта весьма актуальна значимость времени получения материала, т.е. его сроков гестации, учитывая факт существенных изменений в эмбриогенезе структурно-функциональных характеристик эмбриофетальных структур. Например, для клеток эмбриональной печени (КЭП) установлены четкие изменения качественного и количественного состава стволовых гемопоэтических и стромальных клеток. Для этой же ткани отмечены характерные изменения профиля регуляторных медиаторов и экспрессии генов пролиферации и дифференцировки клеток стволового компартмента [27, 29].

Даже эта краткая информация ориентирует на то, что по мере изменения сроков гестации КЭП могут изменять свой потенциальный “функционально-терапевтический” статус. Аппликация такого метода терапии в клинической практике предусматривает необходимость долгосрочного хранения ПЭФПК. Вместе с тем особенности влияния факторов криоконсервирования на структурно-функциональную организацию ПЭФПК разных сроков гестации мало изучены, в частности изменение их свойств как модуляторов НИЭБ.

Цель работы – сравнительное исследование терапевтического эффекта криоконсервированных и нативных клеток фетальной печени разных сроков гестации на модели аутоиммунной гемолитической анемии (АИГА).

### Материалы и методы

Эксперименты выполнены на мышцах линии C57Bl 5-месячного возраста массой 20 г. Аутоиммунную гемолитическую анемию индуцировали однократным внутрибрюшинным введением  $3 \times 10^9$ /мышь сингенных эритроцитов, предварительно прогретых при  $49,5^\circ\text{C}$  в течение 30 мин, в 0,5 мл физиологического раствора. Интенсивность образования антиэритроцитарных аутоантител

fetal structures is very actual. For instance, for embryonic liver cells (ELCs) distinct alterations of qualitative and quantitative compositions of stem hemopoietic and stromal cells were found. For the same tissue there were found characteristic changes in the profile of regulatory mediators and gene expression of proliferation and cell differentiation of stem compartment [27, 29].

Even this short information emphasizes the fact that with the change in gestation terms the ELCs may alter their potential “functional-therapeutic” status. Application of this therapeutic method in clinical practice foresees the need in long-term storage of PEFPC. Along with this the peculiarities of cryopreservation factor effect on structural and functional organization of PEFPC of different gestation terms have been poorly studied yet, in particular the change of their properties as NIEB modulators.

The research aim was to compare therapeutic effect of cryopreserved and native cells of fetal liver of various gestation terms with the model of autoimmune hemolytic anemia (AIHA).

### Materials and methods

The experiments are made in 20g C57Bl mice of 5month's age. Autoimmune hemolytic anemia was induced by single intraperitoneal introduction of  $3 \times 10^9$ /mouse with syngeneic erythrocytes preliminary heated at  $49.5^\circ\text{C}$  for 30 min in 0.5 ml of physiological solution. Intensity of the formation of anti-erythrocyte antibodies was determined by a direct Coomb's test to the 13<sup>th</sup> day after erythrocyte introduction [20]. At the same terms the mice of experimental and control groups were mortified to determine blood indices and state of the structures of lymphohemopoietic complex (LHPC). The number of leucocytes, lymphocytes, granulocytes, erythrocytes, content of hemoglobin was found with Abacus hem-analyzer (Diatron, Austria). Detailed blood analysis (content of reticulocytes, eosinophils, basophils etc.) was performed using prepared on the standard method [18] blood smears. Erythrocyte sedimentation rate (ESR) was calculated as described [18].

As the research objects in LHPC thymus, spleen, lymph nodes and bone marrow were selected. Mass of organs and number of nucleated cells in them were estimated as reported [9]. Weight index of an organ represented the ratio of organ mass to the one of an animal.

Adhesive properties of the cells of peritoneal cavity (PC) were examined by incubation of cell suspension in plastic plates at  $37^\circ\text{C}$  for an hour and non-adhered cells were removed [14]. The percentage of adhesive cells was counted on the difference of the amount of introduced into a cell and non-adhered cells. For estimation of phagocyte activity the PC cells were incubated with dead culture *Staphylococcus aureus*



определяли с помощью прямой реакции Кумбса на 13-е сутки после введения эритроцитов [20]. В эти же сроки мышей опытной и контрольной групп забивали для определения показателей крови и состояния структур лимфогемопозитического комплекса (ЛГПК). Количество лейкоцитов, лимфоцитов, гранулоцитов, эритроцитов, содержание гемоглобина определяли на геманализаторе Abacus (Diatron, Австрия). Более детальный анализ крови (содержание ретикулоцитов, эозинофилов, базофилов и др.) осуществляли на приготовленных по общепризнанному методу [18] мазках крови. Скорость оседания эритроцитов (СОЭ) определяли, как указано в [18].

Объектом исследований в ЛГПК были выбраны тимус, селезенка, лимфатические узлы и костный мозг. Массу органов, количество ядерных клеток в них оценивали, как указано в [9]. Весовой индекс органа представлял собой отношение массы органа к массе животного.

Адгезивные свойства клеток перитонеальной полости (ПП) определяли путем инкубирования суспензии клеток в пластиковых чашках при температуре 37°C в течение часа с дальнейшим удалением неприкрепившихся клеток [14]. Процент адгезивных клеток рассчитывали по разнице количества внесенных в чашку и неприкрепившихся клеток. Для оценки фагоцитарной активности клетки ПП инкубировали с убитой культурой *Staphylococcus aureus* (1 млрд в 1 мл) в течение часа при 37°C в пенициллиновых флаконах со стеклом [14]. Процент фагоцитирующих клеток (фагоцитарный индекс – ФИ) и число захваченных одной клеткой микроорганизмов (фагоцитарное число – ФЧ) определяли при микроскопическом исследовании стекол, окрашенных по Романовскому-Гимза. Абсолютный показатель фагоцитарной активности (АПФА) клеток ПП определяли по [18].

Содержание в селезенке клеток, экспрессирующих маркеры CD3 (Т-общие лимфоциты), CD4 (Т-хелперы) и CD8 (Т-супрессоры/цитотоксические), определяли методом проточной цитофлуориметрии (FACS Calibur, BD, США), используя антитела фирмы Biologend (USA).

Все манипуляции с животными выполняли согласно принципам Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 1985).

Статистическую обработку полученных данных осуществляли по методу Стьюдента-Фишера [2].

## Результаты и обсуждение

Аутоиммунная гемолитическая анемия – типичное АИЗ, в основе которого лежит срыв

(1 billion per 1 ml) for an hour at 37°C in penicillin flasks with glass [14]. Percent of phagocytosed cells (phagocyte index, FI) and number of microorganism captured by one cell (phagocyte number, FN) was found under microscopic study of the glasses stained by Romanovsky-Giemsa. Absolute index of phagocyte activity (AIPhA) of PC cells was found as reported [18].

Content of cells expressing CD3 markers (T-general lymphocytes), CD4 (T-helpers) and CD8 (T-suppressors/cytotoxic) in spleen was examined with flow cytofluorimetry (FACS Calibur, BD, USA) with using the antibodies (Biologend, USA).

All the manipulations with animals were done according to principles of European convention on protection of vertebrate animals used for experiments and other scientific purposes (Strasbourg, 1985).

The obtained data were statistically processed with Student-Fisher's method [2].

## Results and discussion

Autoimmune haemolytic anaemia is typical AIDs in the base of which there is a natural failure of immunological tolerance to own antigens. As well as for other AIDs the distinct causes of this failure of regulatory mechanisms of IS at AIHA is not completely clear though their multifactor bases are evident. There is noted a significance of antigen (immunogenic) spectrum change of own erythrocytes and response to humoral link of immunity with appearance of aggressive antibodies [25]. The development of dysfunctional state of regulatory T-lymphocytes at this pathology is pointed to [5, 21]. These changes are noted also in experimental models of AIHA, induced with the introduction to the mice of related in an antigen respect rat's erythrocytes [8]. Obtained by other authors [20] and our own results presented show that for elucidating many questions of aetiology, pathogenesis and that is the main thing: the ones of estimation therapy efficiency for this pathology experimental model with using both immunogenic factor and thermally treated syngeneic erythrocytes is quite acceptable.

Single immunization of mice with modified thermally treated syngeneic erythrocytes was accompanied with the appearance of anti-erythrocyte antibodies under quite high titres (Table 1) in blood serum to the 13-14<sup>th</sup> days for practically all animals. Simultaneously in these animals haematological indices considerably change in particular almost in 8 times the concentration of reticulocytes in peripheral blood increased, that is explained by compensatory release of immature erythrocyte's forms out of bone marrow in response to their increased death at AIHA [15, 24]. This is confirmed not only by lower content of erythrocytes in the animals with AIHA but also by the reduced haemoglobin level in blood. Thus immunization of mice

естественной иммунологической толерантности к собственным антигенам. Как и для многих других АИЗ, точные причины срыва регуляторных механизмов ИС при АИГА до конца не ясны, хотя мультифакторные их основы очевидны. Отмечена значимость изменения антигенного (иммуногенного) спектра собственных эритроцитов и ответной реакции гуморального звена иммунитета с появлением агрессивных аутоантител [25]. Указывается на развитие дисфункционального состояния при этой патологии регуляторных Т-лимфоцитов [5, 21]. Такого рода изменения отмечены и в экспериментальных моделях АИГА, индуцированных введением мышам родственных в антигенном отношении эритроцитов крыс [8]. Полученные другими авторами [20] и представленные нами результаты показывают, что для выяснения многих вопросов этиологии, патогенеза и главное оценки эффективности терапии данной патологии вполне приемлема экспериментальная модель с использованием в качестве иммуногенного фактора термообработанных сингенных эритроцитов.

Однократная иммунизация мышей модифицированными термообработанными сингенными эритроцитами сопровождалась появлением в сыворотке крови на 13-14-е сутки практически у всех животных противозэритроцитарных аутоантител в достаточно высоких титрах (табл. 1). Одновременно у этих животных существенно изменялись гематологические показатели, в частности почти в 8 раз повышалась концентрация ретикулоцитов в периферической крови, что объясняют компенсаторным выбросом из костного мозга незрелых форм эритроцитов в ответ на повышенную их гибель при АИГА [15, 24]. Подтверждает это не только более низкое содержание эритроцитов у животных с АИГА, но и снижение уровня гемоглобина в крови. Таким образом, иммунизация мышей термообработанными сингенными эритроцитами в данных исследованиях выражается в симптоматике характерных для АИГА иммунологических и гематологических изменений.

Признается, что вне зависимости от характера этиопатогенетических факторов в осуществлении аутоиммунной агрессии задействованы те же иммуновоспалительные реакции, которые развиваются и в условиях физиологического состояния организма [3]. Именно с этих позиций необходимо

**Таблица 1.** Иммунологические и гематологические показатели мышей при развитии АИГА

**Table 1.** Immunological and hematological indices at AIHA development.

Показатели Indices	Интактные животные (контроль) Intact animals (control)	Животные с АИГА Animals with AIHA
Животные с прямой реакцией Кумбса, % Animals with direct Coombs reaction %	0	100±6,7*
Титр антиглобулиновой сыворотки (log <sub>2</sub> ) Titer of anti-globulin serum (log <sub>2</sub> )	0	5,8±0,7*
Содержание ретикуляцитов в периферической крови, % Content of reticulocytes in peripheral blood, %	0,54±0,1	4,1±0,5*
Уровень гемоглобина в периферической крови, г/л Hemoglobin level in peripheral blood, g/l	126,4±7,0	85,4±4,8*
Содержание эритроцитов в периферической крови (×10 <sup>6</sup> /мл) Content of erythrocytes in peripheral blood (×10 <sup>6</sup> /ml)	7,3±0,6	3,9±0,5*

**Примечание:** \* – различия достоверны по сравнению с контролем (p<0,05).

**Notes:** \* – statistically significant differences if compared with the control (p<0.05).

with thermally treated syngeneic erythrocytes in this research is manifested with the symptoms of immunological and haematological alterations characteristic for AIHA.

Independently of the character of aetio-pathogenetic factors in accomplishing autoimmune aggression the same immune inflammatory reactions as developing under an organism physiological state as known, are involved [3]. Just from these positions it is necessary to consider the data presented in Table 2. They depict the state of blood indices of the animals with AIHA. On the background of leucocytosis many of the indices under estimation of mice blood statistically and significantly decreased in comparison with the control. Manifested reduction in the content of granulocyte neutrophils developed in parallel with lymphopenia, eosino- and basophilia. In addition more than in 1.5 times the ESR increased, that may testify to the variation of not only erythrocyte structure, but also the spectrum of plasma proteins. The decrease in relative content of lymphocytes is important. It is not clear how and in what form the immune competent cells in general and lymphocytes in particular, are involved into the process of hyperhemolysis at AIHA. In the paper [22] the development of lymphopenia at AIHA is noted. According to the data of the authors in the process of AIHA development in a patient's organism autolymphocytotoxins referred to cold antibodies whose activity is determined by hyperhemolysis extent are formed. Therefore, also under experimental AIHA induced with the introduction of thermally treated syngeneic erythrocytes (Table 2)

рассматривать представленные в табл. 2 данные о состоянии показателей крови животных с АИГА. На фоне лейкоцитоза многие из оцениваемых показателей крови мышей достоверно снижались в сравнении с контролем. Выраженное снижение содержания гранулоцитарных нейтрофилов развивалось параллельно с лимфопенией, эозино- и базофилией. К тому же более чем в 1,5 раза повышалась СОЭ, что может свидетельствовать об изменении не только структуры эритроцитов, но и спектра белков плазмы. Важно снижение относительного содержания лимфоцитов. Насколько и в какой форме вовлекаются в процесс гипергемолиза при АИГА иммунокомпетентные клетки вообще и, в частности, лимфоциты – до конца не ясно. В [22] отмечается развитие лимфоцитопении при АИГА. По данным авторов, в процессе развития АИГА в организме больных формируются аутолимфоцитотоксины, относящиеся к холодовым антителам, активность которых определяется степенью гипергемолиза. Следовательно, и при экспериментальной АИГА, индуцированной введением термообработанных сингенных эритроцитов (табл. 2), также могут вырабатываться аутоантитела к лимфоцитам. Все эти изменения – характерные признаки определенных этапов активации иммунновоспалительных реакций [12].

Инициация и развитие всех иммунновоспалительных реакций, даже в рамках “физиологического коридора”, сопровождаются транзиторным всплеском продукции цитокинов с поддержанием их на каком-то определенном уровне [12, 21]. Длительно протекающие иммунновоспалительные процессы, включая и АИЗ, являются следствием развивающегося дисбаланса продуцируемых про- и противовоспалительных цитокинов, а также изменяющейся активности продукции аутореактивных Ig [21]. Важно то, что на изменяющиеся в этих условиях качественные и количественные характеристики цитокинового профиля отвечают практически все системы организма, включая его ЛГПК [9]. Это подтверждают данные, представленные в табл. 3. У мышей со сформировавшимися аутоантителами достоверно увеличивалась абсолютная и относительная масса тимуса, селезенки, паховых лимфоузлов. При этом количество ядросодержащих клеток в селезенке и тимусе оставалось неизменным. Такая феноменология может быть как следствием развития

**Таблица 2.** Показатели крови мышей с АИГА

**Table 2.** Blood indices of mice with АИГА

Показатели Indices	Интактные животные (контроль) Intact animals (control)	Животные с АИГА Animals with АИГА
Лейкоциты ( $\times 10^6$ /мл) Leukocytes ( $\times 10^6$ /ml)	3,35 $\pm$ 0,2	5,2 $\pm$ 0,6*
Эритроциты ( $\times 10^6$ /мл) Erythrocytes ( $\times 10^6$ /ml)	7,3 $\pm$ 0,6	3,9 $\pm$ 0,5*
Гемоглобин, г/л Hemoglobin, g/l	126,4 $\pm$ 7,0	85,4 $\pm$ 4,8*
Палочкоядерные гранулоциты, % Rod granulocytes, %	11,4 $\pm$ 0,8	3,8 $\pm$ 0,6*
Сегментоядерные гранулоциты, % Segmentated granulocytes, %	44,6 $\pm$ 3,3	33,3 $\pm$ 4,2*
Моноциты, % Monocytes, %	10,3 $\pm$ 0,6	15,8 $\pm$ 1,1*
Эозинофилы, % Eosinophils, %	0,6 $\pm$ 0,04	3,6 $\pm$ 0,27*
Базофилы, % Basophils, %	0,3 $\pm$ 0,015	1,1 $\pm$ 0,08*
Лимфоциты, % Lymphocytes, %	32,4 $\pm$ 4,1	22,1 $\pm$ 3,6*
СОЭ, мм/ч ESR, mm/hr	1,5 $\pm$ 0,07	2,4 $\pm$ 0,2*

**Примечание:** \* – различия достоверны по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ).

**Notes:** \* – statistically significant differences if compared with the control ( $p < 0.05$ ).

auto-antibodies to lymphocytes may be produced as well. All these changes are characteristic signs of the certain activation stages of immune inflammatory reactions [12].

Initiation and development of all immune inflammatory reactions even within “physiological corridor” is accompanied with transit burst of cytokine production with their keeping at a certain level [12, 21]. Proceeding for a long time immune inflammatory processes, including AIDs, are the result of developing misbalance of produced pro- and anti-inflammatory cytokines, as well as changing activity of the production of autoreactive Ig [21]. It is important that all organism systems, including LHPC [9] respond to altering under these conditions qualitative and quantitative characteristics of cytokine profile. This is confirmed by the data presented in Table 3. In mice with already formed auto-antibodies absolute and relative masses of thymus, spleen, inguinal lymph nodes statistically and significantly increased. Thereat the number of nucleated cells in spleen and thymus remained unchanged. This phenomenology may be the consequence of both developing blast reaction of lymphoid structures in these organs and extending of connective tissue elements in it. For instance, according to the data [20] the content of reticular cells in the spleen of mice with АИГА increased in 3-4 times in comparison with the control. In thymus cortex zone of mice with the same pathology the density of location

бластной реакции лимфоидных структур в этих органах, так и разрастанием соединительно-тканых элементов в них. Например, по данным [20] содержание ретикулярных клеток в селезенке мышей с АИГА увеличено в 3-4 раза по сравнению с контролем. В корковой зоне тимуса мышей с этой же патологией плотность расположения клеточных элементов в единице площади оставалась неизменной, но значительно увеличивалось содержание лимфобластов [8]. К тому же и в этом органе размеры ретикуло-эпителиальных элементов увеличивались. Ретикулярно-эпителиальные структуры тимуса являются важным составным компонентом его стромы и одновременно микроокружением формирующихся из стволовых элементов костно-мозгового происхождения лимфоидных элементов. Производимые ими гормоны участвуют как в индуктивно-продуктивном процессе формирования Т-лимфоцитов (например, направление их дифференцировки), так и в процессе положительной и отрицательной селекции их аутореактивных клонов [3]. В связи с этим важна установленная выраженная активация пролиферации стромальных элементов тимуса при АИГА (увеличение весового индекса органа почти на 30%). Анализируя состояние тимуса при АИГА, надо обратить внимание на некоторые особенности этих изменений. В широком спектре АИЗ выделяют патологии, в инициации и развитии которых первостепенную роль играют клеточное и (или) гуморальное звено иммунитета [3]. Представленные выше данные свидетельствуют о том, что АИГА действительно развивается на фоне гиперактивации антительного ответа, который при такой антигенной нагрузке является Т-зависимым процессом. Это подтверждается снижением количества Т-клеток в тимусе мышей данной группы, что может быть следствием выхода лимфоцитов из тимуса на периферию для реализации кооперативных реакций с другими ИКК. Хотя не исключена их гибель и за счет развития стрессорного состояния, инициированного введением антигена.

Сведения о структурно-функциональной организации ЛГПК при экспериментальных АИЗ, а тем более при АИГА единичны и противоречивы. Тем не менее указывается, что спленомегалия является

**Таблица 3.** Показатели состояния центральных и периферических органов ЛГПК мышей с АИГА

**Table 3.** Indices of the state of central and peripheral organs of LHPC for the mice with АИГА

Показатели Indices		Интактные животные (контроль) Intact animals (control)	Животные с АИГА Animals with АИГА
Тимус Thymus	Масса органа, мг Organ mass, mg	27,2±3,4	36,2±3,8*
	Количество ядерных клеток на орган (×10 <sup>7</sup> ) Number of nucleated cells per organ (×10 <sup>7</sup> )	4,4±0,5	3,4±0,4*
	Весовой индекс органа, мг/г Weight index of organ, mg/g	1,18±0,10	1,44±0,10*
Селезенка Spleen	Масса органа, мг Organ mass, mg	84,2±6,1	116,4±7,6*
	Количество ядерных клеток на орган (×10 <sup>7</sup> ) Number of nucleated cells per organ (×10 <sup>7</sup> )	8,67±0,78	10,9±1,0
	Весовой индекс органа, мг/г Weight index of organ, mg/g	3,6±0,4	4,67±0,30*
Лимфоузлы Lymph nodes	Масса органа, мг Organ mass, mg	7,5±0,9	17,3±2,0*
	Количество ядерных клеток на орган (×10 <sup>7</sup> ) Number of nucleated cells per organ (×10 <sup>7</sup> )	0,67±0,08	0,92±0,08*
	Весовой индекс органа, мг/г Weight index of organ, mg/g	0,3±0,04	0,64±0,08*
Костный мозг (×10 <sup>7</sup> на бедро) Bone marrow (×10 <sup>7</sup> per hype)		1,46±0,2	0,96±0,10*

**Примечание:** \* – различия достоверны по сравнению с контролем (p<0,05).

**Notes:** \* – statistically significant differences if compared with the control (p<0.05).

of cell elements in area unit remained stable but significantly the content of lymphoblasts enhanced [8]. As well, in this organ the sizes of reticulo-epithelial elements increased. Reticulo-epithelial thymus structures are its stroma important components and simultaneously microenvironment of forming from stem elements of bone marrow origin lymphoid elements. Produced by them hormones participate both in inductive-productive processes of T-lymphocyte formation (e.g. their differentiation lineages) and in the process of positive and negative selection of their autoreactive clones [3]. In this connection the found manifested activation of proliferation of thymus stromal elements at АИГА (increase in weight index of an organ by 30%) is important. By analysing the thymus state at АИГА the attention should be paid to some peculiarities of these changes. In a wide spectrum of АИЗ those pathologies in the initiation of which a primary role is played by cell and (or) humoral links of



ся характерным признаком АИГА [11]. Действительно, Fc-рецептор-зависимый фагоцитоз агглютинирующих эритроцитов, являющийся главным пусковым механизмом развития АИЗ, реализуется именно в селезенке [19]. Выраженный ответ лимфоидных и стромальных элементов этого органа вполне закономерен на фоне активации клеток моноцитарно-фагоцитарной системы и существенно изменяющегося в этой ситуации цитокинового профиля *in situ*. Вместе с тем нами получены оригинальные данные об изменениях этих показателей в региональных лимфоузлах. В отличие от тимуса и селезенки количество ядерных клеток в них достоверно повышалось. Это может свидетельствовать, во-первых, о клональной экспансии аутореактивных антигенраспознающих и эффекторных клеток в ближайшей к месту введения иммуногенного фактора структуре ЛГПК, во-вторых, о системном ответе ЛГПК на такого вида антигенную нагрузку, индуцирующую АИЗ в виде АИГА. В [6, 17] были отмечены подобного рода системные изменения в ЛГПК животных с другими видами АИЗ. Подтверждением системно манифестируемой иммуновоспалительной реакции при АИЗ вообще и в частности АИГА является и то, что в костном мозге ответная реакция на такого рода события проявлялась в снижении содержания миелокариоцитов в сравнении с контролем. Не исключено, что при АИГА часть миелокариоцитов выходит на периферию, например в лимфоузлы. К тому же при анализе миелограмм животных с АИГА установлено увеличение более чем в 2 раза количества молодых форм клеток эритроидного ростка, что является логическим ответом медулярного кроветворения на повышенный запрос эритроцитов, срок жизни которых при АИГА укорочен. Интересно, что снижение содержания ядерных клеток в костном мозге, отмечается в острый период проявления и таких АИЗ, как экспериментальный аллергический энцефаломиелит и адьювантный артрит [4, 17], подчеркивая возможность развития при аутоиммунных патологиях системной депрессии гемопоэза.

Оценка структурно-функциональных характеристик иммунокомпетентных клеток мышей с АИГА подтверждает явную “заинтересованность” Т-звена иммунитета в реализации данной патологии. Одним из ее признаков является перераспределение субпопуляционного состава регуляторных Т-лимфоцитов и общего их содержания. Причем указывается, что вариации этих изменений могут быть различными и определяются сроками развития патологии, особенностями иммунизации, линиями животных и т.д. [20]. В табл. 4 приведены результаты собственных исследований оценки некоторых характеристик состояния ИКК. Так, в

immunity, are emphasized [3]. The abovementioned data testify to the fact that АИГА actually develops on the background of hyperactivation of antibody response, which under such an antigen loading is T-dependent process. This is confirmed by a reduction of T-cell number in thymus of the mice of this group that may be the result of lymphocyte release out of thymus to the periphery for realization of cooperative reactions with other ICCs. Though their death is not excluded because of developing stress state, initiated by antigen introduction.

Information on structural and functional organization of LHPC under experimental AIDs and moreover at АИГА is single and contradictory. Nevertheless it is noticed that splenomyelia is a characteristic sign of АИГА [11]. Actually Fc is receptor-dependent phagocytosis of agglutinating erythrocytes is realized namely in spleen [19]. On the background of activation of monocyto-phagocyte system cells, significantly altering cytokine profile *in situ* a manifested response of lymphoid and this organ stromal elements is quite reasonable. Along with this we have obtained original data about the changes in these parameters in regional lymph nodes. In contrast to thymus and spleen the number of nucleated cells in them statistically and significantly increased. This may testify primarily to clonal expansion of autoreactive antigen-recognizing and effector cells in the closest to introduction site of immune factor LHPC structure and, secondly, on the system response of LHPC to such an antigen loading, inducing AIDs as АИГА. In the papers [6, 17] there were found similar system changes in LHPC of the animals with other AIDs types. The confirmation of systematically manifested immune inflammatory reaction at AIDs in general and in particular АИГА is the fact that in bone marrow a response to these events was manifested in a reduction of the content of myelocaryocytes in comparison with the control. It is not excluded that АИГА the part of myelocaryocytes comes to periphery e.g. into lymph nodes. In addition during analysis of myelograms of animals with АИГА a rise more than twice in the number of young forms of erythroid lineage cells has been established, this is a logic response of medullar hemopoiesis to a strengthened request in erythrocytes, the life span of which at АИГА is shortened. It is of interest that an acute period of manifestation of such AIDs as experimental allergic encephalomyelitis and adjuvant arthritis [4, 17], by emphasizing the possibility of development at autoimmune pathologies of hemopoiesis system depression.

Assessment of structural and functional characteristics of ICCs in LHPC of mice with АИГА confirms an evident “interest” of immunity T-link to this pathology realization. One of its signs is redistribution of subpopulation compositions of regulatory T-lymphocytes and their total content. Herewith it is pointed to

селезенке на 13-14-е сутки после индукции патологии, т. е. на ранних этапах ее развития, действительно изменяется содержание Т-клеток и происходит перераспределение их субпопуляционного состава. Достоверное снижение относительного содержания общих Т-клеток (CD3<sup>+</sup>) вполне логично на фоне манифестируемой лимфоцитопении. Этому может способствовать установленный факт накопления в крови больных АИГА антилимфоцитотоксических аутоантител, направленных к антигенам именно популяции Т-лимфоцитов [22].

На этом фоне снижалось содержание Т-хелперов (CD4<sup>+</sup>) и Т-супрессоров/цитотоксических (CD8<sup>+</sup>) клеток, хотя степень снижения этих субпопуляций была различна. Для CD4<sup>+</sup>-клеток прослеживалась только тенденция к снижению, тогда как содержание CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов снижалось в два раза. Иммунорегуляторный индекс (ИРИ) у опытных животных увеличивался до 4,2±0,5 по сравнению с 2,4±0,2 в контроле (p<0,05). Снижение концентрации Т-супрессоров – один из наиболее характерных признаков развития АИЗ [3]. Именно реализация функционального потенциала супрессорной субпопуляцией Т-клеток в условиях физиологического состояния организма является одним из важнейших факторов обеспечения толерантности, т.е. неответности ИКК на аутоантигены [3, 10]. Вместе с тем указывается, что предпосылкой развития АИЗ может быть и гиперактивация Т-хелперов [10]. Например, при индукции приходящей экспериментальной АИГА, патологии купирующейся самопроизвольно к 22-23 неделе после индукции, на ранних этапах отмечается активация хелперов при неизменном состоянии супрессоров. Отсутствие такого рода феноменологии в данных экспериментах может объясняться особенностями методических подходов иммунизации и, вероятно, использованием других линий мышей, иммунный ответ у которых, даже на один и тот же антиген, может быть различным.

Аутоиммунная гемолитическая анемия – один из вариантов аутоиммунной патологии, при которой среди факторов, играющих важную роль в патогенезе гемолитических процессов, могут быть те, которые связаны с функционированием системы мононуклеарных фагоцитов [7].

**Таблица 4.** Структурно-функциональные характеристики иммунокомпетентных клеток мышей с АИГА  
**Table 4.** Structural and functional characteristics of ICCs of the mice with АИГА

Показатели Indices		Интактные животные (контроль) Intact animals (control)	Животные с АИГА Animals with АИГА
Тимус Thymus	Общее количество Т-клеток (CD3 <sup>+</sup> ) T-cell total number (CD3 <sup>+</sup> )	27,3±2,1	19,6±2,7*
	Содержание Т-хелперов (CD4 <sup>+</sup> ) T-helper number (CD4 <sup>+</sup> )	19,4±1,9	16,1±1,9
	Содержание Т-супрессоров (CD8 <sup>+</sup> ) T-suppressor number (CD8 <sup>+</sup> )	8,1±0,8	3,9±0,4*
	ИРИ (CD4 <sup>+</sup> )/(CD8 <sup>+</sup> ) IRI (CD4 <sup>+</sup> )/(CD8 <sup>+</sup> )	2,4±0,2	4,2±0,5*
Перитонеальная полость Peritoneal cavity	Общее количество ядерных клеток (×10 <sup>6</sup> ) Total number of nucleated cells (×10 <sup>6</sup> )	4,9±0,5	2,9±0,3*
	Содержание адгезивных клеток, % Adhesive cell content, %	50,4±3,6	59,2±4,1*
	Фагоцитарный индекс Phagocyte index	51,6±5,6	18,6±2,4*
	Фагоцитарное число Phagocyte number	6,9±0,7	7,8±1,1
	АПФА (×10 <sup>6</sup> ) APPhA (×10 <sup>6</sup> )	17,4±1,4	4,2±0,6*

**Примечание:** \* – различия достоверны по сравнению с контролем (p<0,05).

**Notes:** \* – statistically significant differences if compared with the control (p<0.05).

the fact that alterations of these changes may be various and are determined by the development terms of pathology, peculiarities of immunization, lines of animals etc. [20]. Table 4 demonstrates the results of own studies on estimation of some ICCs state characteristics. Thus in spleen to the 13-14<sup>th</sup> day after pathology induction, i.e. at early stages of its development the content of T-cells actually changes and redistribution of their subpopulation composition takes place. Statistical and significant reduction of relative content of total T-cells (CD3<sup>+</sup>) is quite logic on the background of manifesting lymphocytopenia. Accumulation of anti-lymphocytotoxic antibodies directed to antigen by the population of T-lymphocytes in blood of patients with АИГА may contribute to this [22]. On this background the content of T-helpers (CD4<sup>+</sup>) and T-suppressors/cytotoxic (CD8<sup>+</sup>) cells reduced, though the decrease extent of these subpopulations was different. For CD4<sup>+</sup> cells only the tendency to a decrease was traced meanwhile the content of CD8<sup>+</sup>-lymphocytes reduced twice. Immune regulatory index (IRI) in experimental animals increased up to 4.2±0.5

Любая форма развития иммуновоспалительного процесса в организме млекопитающих предусматривает теснейшее взаимодействие в системе Т-, В-лимфоцит и фагоцит [3, 10, 12]. В роли последнего могут выступать различные клетки, в частности, фагоцит с профессиональной функцией антигенпрезентирующих клеток и ряд других клеток, включая нейтрофильные гранулоциты. При иммунизации мышей Т-зависимым антигеном, каким является модифицированный эритроцит, такое взаимодействие вполне закономерно. Во взаимодействии Т-лимфоцита и макрофага имеются нюансы, определяющие их функциональный статус. Продуцируемый макрофагом провоспалительный медиатор ИЛ-1 стимулирует функцию Т-хелперов, которые в такой ситуации повышают выработку  $\gamma$ -интерферона, определяющего функциональный статус макрофагов. Эти механизмы кооперативных взаимодействий реализуются при иммуновоспалительной реакции в рамках “физиологического коридора”, но могут существенно изменяться при каких-то ее нарушениях [3, 10]. Проведенные ранее исследования показали, что при развитии ряда АИЗ, структурно-функциональный статус клеток моноцитарно-фагоцитарной системы существенно изменяется, а экспериментальная АИГА в этом плане не является исключением (табл. 4). Прежде всего, это почти двукратное снижение общего количества ядерных клеток в ПП, т.е. в участке введения термообработанных сингенных эритроцитов. Внутривентральное введение антигена как иммуногенного фактора сопровождается подключением к иммунному ответу клеток ПП. Например, при развитии гемолитической анемии у мышей NZB аутоантитела продуцируются CD5<sup>+</sup> В-клетками [26]. Популяция этих клеток присутствует в повышенной концентрации в ПП, куда они мигрируют, избегая клональной делеции в костном мозге за счет ухода от апоптоза в силу повышенной экспрессии гена bcl-2. Вместе с тем в ПП присутствуют как CD5<sup>+</sup>, так и CD5<sup>-</sup> В-клетки, которые также способны продуцировать аутоантитела. В этом случае иммуногенным фактором для них являются введенные термомодифицированные эритроциты.

Формирование аутоантител при АИГА может быть связано с изменением клеточной мембраны и освобождением скрытого антигена. Строго моноспецифичных аутоантител к определенным эпитопам не выделено, большинство из них взаимодействует со многими эритроцитами. Это подтверждает и развитие АИГА, индуцированной гетерологичными эритроцитами [8]. Показано, что при АИГА основным иммуногенным фактором является белок, ответственный за транспорт анио-

in comparison with  $2.4 \pm 0.2$  in the control,  $p < 0.05$ . Reduction in concentration of T-suppressors is one of the most characteristic signs of AIDs development [3]. It is the realization of functional potential of suppressor subpopulation of T-cells under conditions of physiological state of an organism is one the most important factors of tolerance providing, i.e. ICCs not responding to autoantigens [3, 10]. Along with this hyperactivation of T-helpers may be the precondition of AIDs development [10]. For example, during the induction of subsiding experimental AIHA, the pathology which is spontaneously delimited to the 22-23<sup>rd</sup> week after induction at early stages there is noted an activation of helpers at constant quantity of suppressors [8]. The absence of this phenomenology in these experiments can be explained by the peculiarities of methodical approaches of immunization and probably by use of other mice lines, immune response of those even to the same antigen may be different.

Autoimmune haemolytic anaemia is one of the variants of autoimmune pathology under which among the factors playing an important role in pathogenesis of hemolytical processes may be those which are related to the functioning of the system of mononuclear phagocytes [7].

Any development form of immune inflammatory process in an organism of mammals foresees the tightest interaction of the system T-, B-lymphocyte and phagocyte [3, 10, 12]. In the role of latter different cells act, in particular phagocyte with professional function of antigen-presenting cells and some others, including neutrophil granulocytes. During immunization of the mice with T-dependent antigen, which is modified erythrocyte, such an interaction is quite reasonable. In interaction of T-lymphocyte and macrophage there are nuances determining their functional status. Macrophage-produced pro-inflammatory mediator IL-1 stimulates the function of T-helpers, which in this situation enhance the production of  $\gamma$ -interferon, determining functional status of macrophages. These mechanisms of cooperative interactions are realized at immune inflammatory reaction within “physiological corridor” but may significantly vary at any of its impairments [3, 10]. The researches performed previously have shown that under development of many AIDs, structural and functional status of cells of monocyte-phagocyte system considerably changes and experimental AIHA in this aspect is not an exception (Table 4). First of all, this is almost double reduction in total number of nucleated cells in PC, i.e. in the site of antigen introduction of thermally treated syngeneic erythrocytes. Intraperitoneal introduction of antigen as immunogenic factor is accompanied with supporting an immune response of PC cells. For example at the development of hemolytical anaemia in NZB mice the



нов в мембране эритроцитов – гликопротеин полосы 3. При тепловой обработке эритроцитов на фоне интегрального изменения белок-липидных структур их мембран могут изменяться те же характеристики указанного белка. При такой форме АИГА имеет место типичный пример “антигенной мимикрии”, когда сформировавшиеся на измененные участки мембраны эритроцита полифункциональные аутоантитела в дальнейшем начинают взаимодействовать с антигенными эпитопами мембраны нормальных эритроцитов, выступая в роли опсонов. Исследования на мышах показали, что именно Fc-рецептор-зависимый фагоцитоз и поглощение агглютинирующих эритроцитов в селезенке и печени являются главным механизмом развития АИГА [7]. Полученные нами данные по уменьшению количества ядерных клеток в ПП свидетельствуют об их гибели с участием описанных механизмов, что может быть следовой реакцией экстремального фагоцитоза эритроцитов, сопровождающегося повышением активности лизосомальных ферментов и аутолиза макрофагов. Кроме того, введение в ПП эритроцитов с иммуногенным потенциалом приводит к апоптозу аутореактивных CD5<sup>+</sup> В-лимфоцитов. Такое явление может быть обусловлено миграцией из ПП клеток с антигенпрезентирующей функцией в региональные лимфоузлы (увеличение количества клеток в которых нами отмечено) как индукторов иммунного ответа в них. Подобная миграция перитонеальных макрофагов характерна для многих АИЗ, включая острую форму РТПХ, экспериментального аллергического энцефаломиелимита, адьювантного артрита и др. [4, 7, 17].

Среди оставшихся к 13-м суткам после индукции АИГА в ПП клеток существенно повышается содержание клеток с адгезивным потенциалом. Эту функцию реализует широкий спектр молекул адгезии, степень экспрессии которых находится под контролем продуцируемых различными клетками организма цитокинов [10, 12]. Следовательно, отмеченное изменение адгезивного потенциала клеток ПП может косвенно свидетельствовать о модуляции цитокинового профиля в этом плацдарме ЛГПК при АИГА.

На этом фоне наблюдаются изменения не только структурных и количественных параметров, но и важных качественных характеристик клеток с фагоцитарной активностью. В частности, значительно изменялись как ФИ, так и ФЧ этих клеток. Например, ФИ снижался в сравнении с контролем в 2,5 раза ( $18,6 \pm 2,4$  и  $51,6 \pm 5,6$ ;  $p < 0,05$ ). Одновременно наблюдалось некоторое повышение фагоцитирующей активности каждой клетки (ФЧ), что может быть проявлением компенсаторной реакции фагоцитов в ответ на уменьшение их

autoantibodies are produced by CD5<sup>+</sup> B-cells [26]. Population of these cells is present under an increased concentration in PCs, whereto they migrate by avoiding the clonal deletion in bone marrow due to escaping apoptosis because of an enhanced gene bcl-2 expression.

Along with this in PC both CD5<sup>+</sup> and CD5<sup>-</sup> B-cells are present which are capable of producing autoantibodies. In this case immunogenic factor for them is introduced thermally differentiated erythrocytes.

Formation of antibodies at АИГА may be related to the alteration of cell membrane and release of latent antigen. Strictly mono-specific autoantibodies to certain epitopes were not found, the majority of them interacted with many erythrocytes. This confirms АИГА development, induced heterologic erythrocytes [8]. It has been shown that at АИГА the main immunogenic factor is the protein responsible for the transport of anions in erythrocyte membrane, “band 3 glycoprotein”. During heat treatment of erythrocytes on the background of integral change in protein-lipid structures of their membrane may change the same characteristics of the protein mentioned. At this АИГА form there is a typical example of “antigen mimicry”, when already formed on the altered membrane sites of erythrocyte “polyfunctional” autoantibodies start interaction with antigen epitopes of normal erythrocytes’ membrane acting as opsonions. Investigations in mice have shown that the Fc-receptor-dependent phagocytosis and absorption of agglutinating erythrocytes in spleen and liver are the main mechanisms of АИГА development [7]. Obtained by us data on decrease in the number of nucleated cells in PC testify to their death due to the described mechanisms that may be a trace reaction of extreme phagocytosis of erythrocytes accompanying by a rise in activity of lysosomal enzymes and autolysis of macrophages. In addition, introduction of PC erythrocytes with immunogenic potential results in apoptosis of autoreactive CD5<sup>+</sup> B-lymphocytes. This phenomenon can be stipulated by the migration out of PC the cells with antigen-presenting function into regional lymph nodes (an increase in the number of cells in those we noted) as the inducers of immune response in them. Similar migration of peritoneal macrophages is characteristic for many АИDs, including an acute form of GVHR, experimental allergic encephalomyelitis, adjuvant arthritis etc. [4, 7, 17].

Among the rest to the 13<sup>th</sup> day after induction of АИГА in PC of the cells the content of those with adhesive potential significantly enhances. This function is realized by a wide spectrum of adhesion molecules, the expression extent of which is under the control of produced by various cells of an organism cytokines [10, 12]. Therefore, the noted change in adhesive potential of PC cells may indirectly testify to



количества. Увеличение ФЧ коррелировало со степенью и характером экспансии адгезивных молекул на клетках ПП, подтверждая, что фагоцитарный потенциал клеток существенно зависит от их адгезивной способности. Интегральный показатель фагоцитарного потенциала клеток, т.е. АПФА, у мышей с АИГА снижался в сравнении с контролем в 4,5 раза ( $4,2 \pm 0,6$  и  $17,4 \pm 1,4$ ;  $p < 0,05$ ).

Система мононуклеарных фагоцитов является форпостом иммунного ответа организма на любую антигенную нагрузку [10, 12]. Характер и степень ее изменения, в силу тех или иных причин, определяет уровень дисфункционального состояния практически всех компартментов иммунного плацдарма организма. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что вне зависимости от того, какой составной компонент этого плацдарма входит в дисфункциональное состояние в определенные сроки после индукции АИГА (13-14-е сутки), в организме развивается генерализованный процесс модификации ЛГПК, выражающийся в изменениях в клеточном, гуморальном звеньях иммунной системы, а также моноцитарно-фагоцитарной системе. По-видимому, закономерным в этой ситуации является существенное изменение ряда гематологических показателей, которые могут быть не только результатом дисфункциональных состояний, развивающихся главным образом в иммунокомпетентной сфере организма, но и изменения морфогенетического потенциала клеток иммунной системы. В целом это определяет необходимость поиска таких терапевтических средств, которые обладают способностью если не устранять, то комплексно хотя бы минимизировать отмеченные проявления этой патологии. Данные вопросы будут рассмотрены во второй части работы.

### Литература

1. *Абрамов В.В.* Взаимодействие иммунной и нервной систем.— Новосибирск: Наука, 1988.— 166 с.
2. *Ашмарин И.П., Воробьев А.А.* Статистические методы микробиологических исследований.— Л.: Медицина, 1972.— 180 с.
3. *Гольцев А.Н.* Возможные причины развития аутоиммунной патологии и поиск путей её лечения // Пробл. мед. науки и освіти.— 2000.— №1.— С. 22-37.
4. *Гольцев А.Н., Бабенко Н.Н.* Обоснование возможности использования эмбриональных нервных клеток при лечении органоспецифических аутоиммунных заболеваний // Пробл. криобиологии.— 2003.— №2.— С. 49-61.
5. *Гольцев А.Н., Грищенко О.В., Кушниренко Н.Н. и др.* Патологические основы изменения иммунореактивности организма после введения продуктов фетоплацентарного комплекса // Вестн. проблем биол. и мед.— 1997.— №10.— С. 95-106.
6. *Гольцев А.Н., Дубрава Т.Г., Луценко Е.Д. и др.* Поиск альтернативных криоконсервированию путей модификации иммунореактивности алломиелотрансплантата. II.

modulation of cytokine profile in this base area of LHPC at AIHA.

On this background there are revealed the alterations of not only structural and qualitative parameters but also qualitative cell characteristics with phagocyte activity. In particular, both FI and FN of these cells were considerably changed. For instance, FI reduced in comparison with the control in 2.5 times ( $18.6 \pm 2.4$  and  $51.6 \pm 5.6$ ;  $p < 0.05$ ). Simultaneously there was observed some rise in phagocytosing activity of every cell (FN), which may be a manifestation of compensatory reaction of phagocytes in response to their number diminishing. FN rise correlated to the expansion extent and character of adhesive molecules on PC cells, confirming the believing that phagocyte potential of cell depends very much on their adhesive ability. Integral index of cell phagocyte potential in particular, AIPhA, in mice with AIHA reduced if compared with the control in 4.5 times ( $4.2 \pm 0.6$  and  $17.4 \pm 1.4$ ;  $p < 0.05$ ).

System of mononuclear phagocytes is outpost of immune response of an organism to any antigen loading [10, 12]. The character and extent of its alteration due to various causes determines the level of dysfunctional state of practically all compartments of immune base area of an organism. Our own data testify to the fact that independently on which component of this base area enters into dysfunctional state in certain terms after AIHA induction (13-14 days) in an organism a generalized process of LHPC modification develops. Their manifestation forms are expressed as the changes in cell, humoral link immune as well as monocyte-phagocyte system. Significant change in some haematological indices which may result from disfunctional states developing especially in immune competent sphere of an organism is likely regular in this situation, but the alterations of morphogenetic potential of IS cells as well. In a whole this determines the need in search of such therapies which are capable of not preventing but at least minimizing in a complex the manifestations of this pathology. To solving of these tasks our second part of the research will be devoted.

### References

1. *Abramov V.V.* Interaction of immune and nerve systems.— Novosibirsk: Nauka, 1988.— 166 p.
2. *Ashmarin I.P., Vorobyev A.A.* Statistical methods of microbiological studies. — Leningrad: Meditsina, 1972.— 180p.
3. *Goltsev A.N.* Possible causes of development of autoimmune pathology and search for the ways of its treatment // Probl. Med. Nauki i Osvity.— 2000.— N1.— P. 22-37.
4. *Goltsev A.N., Babenko N.N.* Stipulation of the possibility to use embryonic neuronal cells when treating organospecific autoimmune diseases // Problems of Cryobiology.— 2003.— N2.— P. 49-61.

- Возможность сотрансплантации клеток эмбриональной печени // Пробл. криобиологии.– 2000.– №1.– С. 10-22.
7. Гольцев А.Н., Останкова Л.В., Луценко Е.Д. и др. Этиопатогенез и перспективы лечения аутоиммунной гемолитической анемии // Пробл. криобиологии.– 2002.– №4.– С. 118-126.
  8. Гринцевич И.И., Григорьева З.Г., Максимов А.В. Морфологические изменения тимуса при экспериментальной аутоиммунной гемолитической анемии // Архив патол.– 1984.– Т. XLVI, №12. – С. 42-49.
  9. Грищенко В.И., Гольцев А.М. Модифікація стану лімфогемопоетичного комплексу організму в умовах застосування продуктів фетоплацентарного комплексу // Трансплантологія.– 2001.– Т. 2, №3.– С. 5-14.
  10. Грищенко В.И., Гольцев А.Н. Трансплантация продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса. От понимания механизма действия к повышению эффективности применения // Пробл. криобиологии.– 2002.– №1.– С. 54-85.
  11. Дягилева О.А., Дульцина С.М., Турбина Н.С. и др. Дифференциально-диагностическое значение цитохимических показателей в эритрокариоцитах при гемолитических анемиях различного генеза // Гематол. и трансфузиол.– 1987.– Т. 32, №4. – С. 32-38.
  12. Игнатъева Г.А. Иммунная система и патология // Журн. патофизиологии и эксперим. медицины.– 1997.– №4.– С. 26-37.
  13. Козлова Ю.А., Гольцев А.Н., Останков М.В. Влияние изолированных физико-химических факторов криоконсервирования на клетки костного мозга с различным исходным структурно-функциональным статусом // Пробл. криобиологии.– 2003.– №4.– С. 3-11.
  14. *Лимфоциты: Методы.* Пер. с англ. / Под ред. Дж. Клауса.– М.: Мир.– 1990.– 396 с.
  15. Подберезин М.М. Современные методы диагностики аутоиммунных гемолитических анемий // Гематол. и трансфузиол.– 1998.– Т. 43, №1.– С. 15-18.
  16. Полович С.А. Антигомтоксическая терапия – мост между традиционной терапией и гомеопатией // Доктор.– 2001.– №1.– С. 64-67.
  17. Рассоха И.В., Гольцев А.Н., Гурина Т.М. Влияние различных режимов криоконсервирования на способность суспензии плаценты проявлять иммунокорректирующую активность при лечении адьювантного артрита у мышей // Пробл. криобиологии.– 2004.– №4.– С. 21-29.
  18. *Справочник по клиническим лабораторным методам исследования* / Под ред. Е.А. Костенко.– М.: Медицина, 1968.– 437 с.
  19. Сухих Г.Т., Богданов И.М., Малайцев В.В. Иммунологические аспекты трансплантации фетальных клеток // Бюл. эксперим. биол. и мед.– 1998.– Т. 126, №1.– С. 178-181.
  20. Труфакин В.А., Лозовой Л.П. Влияние соматотропного гормона на аутоиммунные реакции, индуцированные у мышей разных генотипов сингенными прогретыми эритроцитами // Бюл. эксперим. биологии.– 1977.– №3.– С. 305-308.
  21. Утешев Б.С., Сергеев А.С., Коростелев С.А. Анализ современных направлений в создании иммунотропных средств // Эксперим. и клинич. фармакология.– 1995.– Т. 58, №3.– С. 3-7.
  22. Файнштейн Ф.Э., Зотиков Е.А., Турбина Н.С. и др. Новые данные о патогенезе аутоиммунной гемолитической анемии и их клиническом значении // Гематол. и трансфузиол.– 1983.– №6.– С. 9-12.
  23. Ширшев С.В. Белки фетоплацентарного комплекса в регуляции иммунных реакций // Успехи совр. биологии.– 1993.– Т. 113, №2.– С. 230-247.
  24. Шурхина Е.С., Нестеренко В.М., Лисовская И.Л. и др. Выявление этапов аутоиммунной гемолитической анемии с помощью исследования деформируемости и
  5. Goltsev A.N., Grischenko O.V., Kushnirenko N.N. et al. Pathophysiological grounds of the change of immune reactivity of an organism after introduction of products of fetoplacental complex // Vestn. Problem Biol. i Med.– 1997.– N10.– P. 95-106.
  6. Goltsev A.N., Dubrava T.G., Lutsenko E.D. et al. Search for the alternative to cryopreservation methods of modifying the immune reactivity of the allomelotransplant. II. Possible cotransplantation of embryonic liver cells // Problems of Cryobiology.– 2000.– N1.– P. 10-21.
  7. Goltsev A.N., Ostankova L.V., Lutsenko E.D. et al. Etiopathogenesis and perspectives for treatment of autoimmune haemolytic anemia // Problems of Cryobiology.– 2002.– N4.– P. 118-126.
  8. Grintsevich I.I., Grigoryeva Z.G., Maksimov A.V. Morphological changes of thymus under experimental autoimmune hemolytic anemia // Arkhiv Patologii.– 1984.– Vol. XLVI, N12.– P. 42-49.
  9. Grischenko V.I., Goltsev A.N. Modification of the state of lymphohemopoietic complex of organism under conditions of application of products fetoplacental complex // Transplantologiya.– 2001.– Vol. 2, N3.– P. 5-14.
  10. Grischenko V.I., Goltsev A.N. Transplantation of the products of embryofetoplacental complex from understanding of mechanism of the effect to increasing the efficiency of application // Problems of Cryobiology.– 2002.– N1.– P. 54-84.
  11. Dyagileva O.A., Dulitsina S.M., Turbina N.S. et al. Differential and diagnostic value of cytochemical indices in erythrocytes at hemolytic anemias of various genesis // Gematol. i Transfuziol.– 1987.– Vol. 32, N4.– P. 32-38.
  12. Ignatyeva G.A. Immune system and pathology // Zhurn. patofiziologii i eksperim. meditsyny.– 1997.– N4.– P. 26-37.
  13. Kozlova Yu. A., Goltsev A.N., Ostankov M.V. Influence of certain physical and chemical factors of cryopreservation on bone marrow cells various initial structural and functional status // Problems of Cryobiology.– 2003.– N4.– P. 3-11.
  14. *Lymphocytes: a practical approach* / Ed. By G. Klaus. – Moscow: Mir, 1990. – 396 p.
  15. Podberезin M.M. Contemporary methods of diagnostic of autoimmune hemolytic anemias // Gematol. Transfuziol.– 1998.– Vol. 43, N1.– P. 15-18.
  16. Popovich S.A. Anti-homeotoxic therapy is a bridge between traditional therapy and homeopathy // Doktor.– 2001.– N1.– P. 64-67.
  17. Rassokha I.V., Goltsev A.N., Gurina T.M. Effect of different cryopreservation regimens on capability of placenta suspension to manifest an immune-correcting activity when treating adjuvant arthritis in mice // Problems of Cryobiology.– 2004.– N4.– P. 21-29.
  18. *Reference book on clinical laboratory research methods* / Ed. by E.A. Kostenko.– Moscow: Meditsina, 1968.– 437p.
  19. Sukhikh G.T., Bogdanov I.M., Malajtsev V.V. Immunological aspects or transplantation of fetal cells // Bull. Experim. Biol. Med.– 1998.– Vol. 126, N1.– P. 178-181.
  20. Trufakin V.A., Lozovoy L.P. Effect of somatotropic hormone on autoimmune reactions induced in mice of various gene types with syngeneic warmed erythrocytes // Bull. Experim. Biol. Med. – 1977. – N3. – P. 305-308.
  21. Uteshev B.S., Sergeev A.S., Korostelev S.A. Analysis of current trends in creating immunotropic means // Experim. i klinich. farmakologiya.– 1995.– Vol. 58, N3.– P. 3-7.
  22. Fainshtein F.E., Zotikov E.A., Turbina N.S. et al. New data about pathogenesis of autoimmune hemolytic anemia and their clinical value // Gematol. Transfuziol.– 1983.– N6.– P. 9-12.
  23. Shirshov S.V. Proteins of fetoplacental complex in regulation of immune reactions // Uspekhi Sovr. Biologii.– 1993.– Vol. 113, N2.– P. 230-247.
  24. Shurkhina E.S., Nesterenko V.M., Lisovskaya I.L. et al. Revealing the stages of autoimmune hemolytic anemia by

- плотности эритроцитов // Бюл. эксперим. биол. и мед.– 2004. – Т. 138, №9.– С. 316-320.
25. Эдуш С.С. Этиология и патогенез аутоиммунных заболеваний // Гематол. и трансфузиол.– 1993.– №4.– С. 32-37.
26. Hardy R.R., Hayakawa K. Development and physiology of Ly-1 B and human homologous Leu-1 B // Immunol. Rev.– 1986.– Vol. 93, N1.– P. 53-79.
27. Morrison S.J., Hemmati H.D., Wandycz A.M., Weissman I.L. The purification and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.– 1995.– Vol. 92, N22.– P. 10302-10306.
28. Shevach E.M. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> suppressor T-cells: more questions than answers // Nat. Rev. Immunol.– 2002.– Vol. 2, N6.– P. 389-400.
29. Trigg M. Hematopoietic stem cells // Pediatrics.– 2004.– Vol. 113, N4 (suppl.).– P. 1051-1057.
- investigating the deformability and density of erythrocytes // Bull. Experim. Biol. Med.– 2004.– Vol. 138, N9.– P. 316-320.
25. Edush S.S. Etiology and pathogenesis of autoimmune diseases// Gematol. Transfuziol.– 1993.– N4.– P. 32-37.
26. Hardy R.R., Hayakawa K. Development and physiology of Ly-1 B and human homologous Leu-1 B // Immunol. Rev.– 1986.– Vol. 93, N1.– P. 53-79.
27. Morrison S.J., Hemmati H.D., Wandycz A.M., Weissman I.L. The purification and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.– 1995.– Vol. 92, N22.– P. 10302-10306.
28. Shevach E.M. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> suppressor T-cells: more questions than answers // Nat. Rev. Immunol.– 2002.– Vol. 2, N6.– P. 389-400.
29. Trigg M. Hematopoietic stem cells // Pediatrics.– 2004.– Vol. 113, N4 (suppl.).– P. 1051-1057.

*Поступила 21.03.2006.*

*Accepted in 21.03.2006.*