

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

Часть II. Коррекция состояния лимфогемопоэтического комплекса экспериментальных животных с АИГА клетками фетальной печени

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 II. Fetal Liver Cell Correction of Lymphohemopoietic Complex State in Experimental Animals with AИHA

Дана оценка терапевтической эффективности клеток фетальной печени (КФП) разных сроков гестации при лечении аутоиммунной гемолитической анемии (АИГА). Установлен факт корректирующего эффекта КФП в отношении различных компартментов лимфогемопоэтического комплекса (ЛГПК) животных с АИГА. Показано, что степень проявления активности КФП определяется сроком гестации и видом материала. Обобщение лечебного эффекта показало, что после криоконсервирования КФП определенных сроков гестации приобретали более высокий уровень интегрального терапевтического потенциала.

**Ключевые слова:** клетки фетальной печени, криоконсервирование, лимфогемопоэтический комплекс, коррекция, аутоиммунная гемолитическая анемия.

Дана оцінка терапевтичної ефективності клітин фетальної печінки (КФП) різних строків гестації при лікуванні аутоімунної гемолітичної анемії (АИГА). Установлено факт корегуючого ефекту КФП відносно різних компартментів лімфогемопоетичного комплексу тварин з АИГА. Показано, що ступінь виявлення активності КФП визначається строком гестації та видом матеріалу. Узагальнення лікувального ефекту показало, що після криоконсервування КФП певних строків гестації набували більш високого рівня інтегрального терапевтичного потенціалу.

**Ключові слова:** клітини фетальної печінки, криоконсервування, лімфогемопоетичний комплекс, корекція, аутоімунна гемолітична анемія.

Therapeutic efficiency of fetal liver cells (FLCs) of different gestation terms when treating autoimmune hemolytic anemia (AИHA) has been evaluated. The fact of manifested correcting effect of FLCs in respect of different compartments of lymphohemopoietic complex (LHPC) in AИHA animals has been established. Manifestation extent of FLCs activity was shown to be determined by gestation term and material type. When summarising therapeutic effect according to all evaluated systems there was demonstrated that FLCs of certain gestation terms gained higher level of integral therapeutic potential following cryopreservation.

**Key-words:** fetal liver cells, cryopreservation, lymphohemopoietic complex, correction, autoimmune hemolytic anemia.

При детальном анализе состояния лимфогемопоэтического комплекса (ЛГПК) мышей с аутоиммунной гемолитической анемией (АИГА) выявлены многопрофильные изменения его качественно-количественных характеристик. Как свидетельствуют полученные результаты, в основе развития данной формы аутоиммунной патологии, манифестируемой преимущественными нарушениями гематологического вектора [8], лежат сложные причинно-следственные взаимоотношения между субстратами иммунной системы. Такого рода

When thoroughly analysing lymphohemopoietic complex (LHPC) state in mice with autoimmune hemolytic anemia (AИHA) the versatile changes in its qualitative and quantitative characteristics have been revealed. The results obtained testify that the complex cause and effect interactions between immune system substrates are in the base of this type of autoimmune pathology development, mostly manifested in hematological vector disorders [8]. These changes may cause a misbalance in harmonic interactions between neuroimmunoendocrine block systems, i.e. those

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) 373-57-69, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryopato@rambler.ru

\* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 373 5769, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryopato@rambler.ru

изменения могут быть причиной разбалансировки гармоничного взаимодействия систем нейроиммуноэндокринного блока (НИЭБ), т.е. систем обеспечения бодигомеостаза. Для коррекции состояния полифункциональной структуры целесообразно применять такие же полифункциональные терапевтические средства, к которым можно отнести продукты эмбриофетоплацентарного комплекса (ПЭФПК) [5, 7], в частности клетки фетальной печени (КФП) [4]. В последнее время появились публикации, в новом свете характеризующие этот оригинальный биологический материал [7]. Показано, что основные элементы фетальной печени (ФП), например кроветворные предшественники, стромальные элементы и т.д., могут проявлять свой функциональный потенциал поразному в зависимости от сроков гестации [15]. Особую значимость имеют данные об иммунотропных и иммуномодулирующих свойствах мезенхимальных стволовых клеток ФП [14], которые они реализуют в зависимости от степени и формы манифестации патологического процесса в организме реципиента [4]. Другими словами, несмотря на, казалось бы, бесспорную логическую обоснованность применения КФП для лечения АИГА, необходимо экспериментально подтвердить целесообразность такого вида терапии.

Цель данной работы – оценить эффективность лечения АИГА нативными и криоконсервированными КФП разных сроков гестации.

### Материалы и методы

Работа выполнена на мышах линии C57Bl/6 массой 19-20 г.

Аутоиммунную гемолитическую анемию индуцировали путем однократного внутрибрюшинного введения  $3 \times 10^9$  на мышь сингенных эритроцитов, предварительно прогретых до  $49,5^\circ\text{C}$  в течение 30 мин в 0,5 мл физиологического раствора [12]. Интенсивность образования антиэритроцитарных аутоантител определяли с помощью прямой реакции Кумбса на 13-е сутки после введения эритроцитов. В эти же сроки мышей опытной и контрольной групп забивали для определения показателей крови и состояния структур ЛГПК. Содержание в периферической крови лейкоцитов, лимфоцитов, эритроцитов, гемоглобина определяли на гемализаторе Abacus фирмы Diatron (Австрия), ретикулоцитов, эозинофилов, базофилов – на приготовленных по общепринятому методу мазках крови. Скорость оседания эритроцитов (СОЭ) рассчитывали, как указано в [10].

Объектами исследований в ЛГПК были тимус, селезенка, лимфатические узлы и костный мозг. Массу органов, количество ядерных клеток в них оценивали, как указано в [9]. Индекс массы органа

providing body homeostasis. To correct the state of polyfunctional structure the application of polyfunctional therapeutic means is expedient; the products of embryofetoplacental complex (PEFPC) [5, 7], in particular, fetal liver cells (FLCs) [4] can be referred to such a means. The papers, characterising in a new way this original biological material [7] have been recently published. Main elements of fetal liver (FL), for example hemopoietic precursors, stromal elements etc; were demonstrated as capable to manifest in a different way their functional potential depending on gestation terms [15]. Data about immunotropic and immune-modulating properties of FL mesenchymal stem cells [14], they realise depending on extent and type of pathological process manifestation in a recipient's organism are of special importance [4]. By other words, the expediency of this therapy should be experimentally proved in spite of seemed doubtless logic substantiation of FLCs application for AIHA treatment.

This research was aimed to evaluate the efficiency of AIHA treatment with native and cryopreserved FLCs of different gestation terms.

### Materials and methods

The experiments were performed in 19-20g C57Bl/6 mice. Autoimmune hemolytic anemia was induced by single intraperitoneal introduction of  $3 \times 10^9$ /mouse syngeneic erythrocytes preliminary heated at  $49.5^\circ\text{C}$  for 30 min in 0.5 ml of physiological solution [12]. Intensity of the formation of anti-erythrocyte anti-bodies was determined by a direct Coomb's test to the 13<sup>th</sup> day after erythrocyte introduction. 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 leukocytes, 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 blood smears. Erythrocyte sedimentation rate (ESR) was calculated as described [10].

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 [9]. The percentage of adhesive cells was counted on the difference of the amount of introduced into a cell and non-adhered cells. For esti-

представлял собой отношение массы органа к массе животного.

Адгезивные свойства клеток перитонеальной полости (ПП) определяли инкубированием суспензии клеток в пластиковых чашках при температуре 37°C в течение часа, неприкрепившиеся клетки удаляли [9]. 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. Процент фагоцитированных клеток (фагоцитарный индекс) и число захваченных одной клеткой микроорганизмов (фагоцитарное число) определяли при микроскопическом исследовании препаратов, окрашенных по Романовскому-Гимза. Абсолютный показатель фагоцитарной активности (АПФА) клеток ПП определяли по [2].

Содержание в селезенке клеток, экспрессирующих маркеры CD3<sup>+</sup> (Т-общие лимфоциты), CD4<sup>+</sup> (Т-хелперы) и CD8<sup>+</sup> (Т-супрессоры/цитотоксические), определяли методом проточной цитофлуориметрии (FACS Calibur, США) с использованием антител фирмы "Biolegend" (США).

Клетки фетальной печени были получены у мышей линии СВА/Н на 15-е (КФП-15) и 19-е (КФП-19) сутки гестации. Суспензию КФП готовили как указано в [11]. Фетальный материал помещали в чашки Петри с физиологическим раствором и антибиотиками. После трехкратной отмывки ФП извлекали, помещали в стеклянный гомогенизатор Поттера, добавляли среду Хенкса из расчета 0,2-0,3 мл на одну ФП, механическим путем получали однородную массу, которую пропускали через капроновый фильтр. Количественный учет клеток ФП в суспензии проводили в камере Горяева [10]. Криоконсервирование клеток проводили по методу [13].

Клетки фетальной печени вводили мышам-реципиентам в дозе  $5 \times 10^6$  на мышь однократно внутривенно в день индукции АИГА. В качестве контроля использовали клетки взрослой печени (КВП), введенные в той же дозе. Для объективизации полученных данных при большом количестве показателей и возможности сравнения обобщенного лечебного эффекта КФП был использован индекс суммарной степени отклонения (ССО) – это сумма значений отклонений от контроля всех исследуемых показателей, разделенная на 100 и выраженная в условных единицах [13]. Статистическую обработку полученных результатов осуществляли по методу Стьюдента-Фишера [3].

Проведенные работы не противоречат "Общим принципам экспериментов на животных", одоб-

решения фагоцитарной активности клетки ПК были инкубированы с мертвой культурой *Staphylococcus aureus* (1 миллиард на 1 мл) в течение часа при 37°C в пенициллиновых флаконах со стеклом. Процент фагоцитированных клеток (фагоцитарный индекс, FI) и количество микроорганизмов, захваченных одной клеткой (фагоцитарное число, FN) были найдены при микроскопическом исследовании образцов, окрашенных по Романовскому-Гимза. Абсолютный индекс фагоцитарной активности (АИПА) клеток ПК был найден, как сообщается [2].

Содержание клеток, экспрессирующих маркеры CD3 (Т-общие лимфоциты), CD4 (Т-хелперы) и CD8 (Т-супрессоры/цитотоксические) в селезенке было исследовано с помощью проточной цитофлуориметрии (FACS Calibur, BD, USA) с использованием антител (Biolegend, USA).

Клетки фетальной печени были получены у мышей линии СВА/Н на 15<sup>th</sup> (FLCs-15) и 19<sup>th</sup> (FLCs-19) дни гестации. FLCs суспензия была подготовлена, как сообщается [11]. Фетальный материал был помещен в чашки Петри с физиологическим раствором и антибиотиками. После трехкратной отмывки ФЛ была удалена, помещена в стеклянный гомогенизатор, в который был добавлен раствор Хенкса в объеме 0,2-0,3 мл на одну ФЛ. Однородная масса была механически получена и пропущена через капроновый фильтр. Подсчет клеток в суспензии был проведен в камере Горяева [10]. Криоконсервация была проведена в соответствии с методом [13].

Клетки фетальной печени были интравенно введены мышам-реципиентам в дозе  $5 \times 10^6$  на мышь однократно в день индукции АИГА. Клетки взрослой печени (АЛС), введенные в той же дозе, были использованы в качестве контроля. Индекс суммарного отклонения (SDE), который является суммой значений отклонения от контроля всех изученных показателей, деленный на 100 и выраженный в относительных единицах, был использован для получения истинных данных, полученных при большом количестве показателей и возможном сравнении обобщенного терапевтического эффекта FLCs [13]. Полученные данные были статистически обработаны с помощью метода Стьюдента-Фишера [3].

Все манипуляции с животными были выполнены в соответствии с "Общими принципами экспериментов на животных", одобренными Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2001) и заявлениями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и других научных целей (Страсбург, 1985).

## Results and discussion

Иммунизация мышей с термообработанными сингенными эритроцитами проявляется признаками, типичными для АИГА [12]. Универсальная оценка состояния ЛНП в этих животных продемонстрировала многообразные изменения, в основном в различных звеньях иммунной системы (ИС). На основании собственных результатов и опыта применения ПЕФП к FLCs с широким спектром биологической активности, включая иммунокорректирующую, они были использованы в качестве терапевтической подготовки [1, 4, 14].

ренным Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2001) и согласуются с положениями “Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей” (Страсбург, 1985).

### Результаты и обсуждение

Иммунизация мышей термообработанными сингенными эритроцитами манифестируется признаками, характерными для АИГА [12]. Всесторонняя оценка состояния ЛГПК таких животных показала многопрофильные его изменения, прежде всего нарушения в различных звеньях иммунной системы (ИС). На основании обобщения результатов собственных исследований и имеющегося опыта применения ПЭФПК в качестве лечебного препарата были использованы КФП с широким спектром биологической активности, включая иммунокорректирующую [1, 4, 14].

Представленные в табл. 1 данные свидетельствуют о разной степени корректирующего эффекта КФП в отношении иммунологических и гематологических показателей животных с АИГА. Актив-

Data presented in Table 1 testify to a different correcting effect of FLCs towards immunological and haematological indices of AIHA animals. FLCs activity was determined by gestation terms and type, i.e. they were applied either in native state or after cryopreservation. Primarily, when using FLCs in any form a percentage of animals with direct Coombs' test (DCT) considerably reduced. At the same time native and cryopreserved FLCs-15 were statistically and significantly more active than FLCs-19. Differences between indices were found out when determining anti-globulin serum titer in animals with positive Coombs' test as well. This index was also minimum and similar in mice after introducing both native and cryopreserved FLCs-15. FLCs-19, moreover only cryopreserved ones had less manifested correcting effect.

An increased content of reticulocytes in peripheral blood as the index of AIHA development [10] maximally approached to the norm (control 1) after animal treatment with cryopreserved FLCs-19. Reticulocyte content was approximately at the same level after native FLCs-15 introduction as well. Either

**Таблица 1.** Иммунологические и гематологические показатели мышей с АИГА до и после лечения КФП  
**Table 1.** Immunological and hematological indices in AIHA mice prior to and after FLCs treatment

Показатели Indices	Интактные мыши (контроль 1) Intact mice (control 1)	Мыши с АИГА до лечения Mice with AIHA before treating	Мыши после лечения КФП Mice after treatment with FLCs				Мыши с АИГА + КВП (контроль 2) Mice with AIHA + ALCs (control 2)
			Нативные Native		Криоконсервированные Cryopreserved		
			Сутки гестации Gestation day		Сутки гестации Gestation day		
			15	19	15	19	
Животные с ПРК, % Animals with DCT, %	0	100 ± 6,7 <sup>1</sup>	44,8 ± 5,6 <sup>1,3,4</sup>	67,6 ± 5,4 <sup>1,4</sup>	48,6 ± 3,9 <sup>1,2,3,4</sup>	60,1 ± 4,1 <sup>1,4</sup>	100 ± 5,4 <sup>1</sup>
Титр антиглобулиновой сыворотки (log <sub>2</sub> ) Antiglobulin serum titer (log <sub>2</sub> )	0	5,8 ± 0,7 <sup>1</sup>	2,1 ± 0,4 <sup>1,3,4</sup>	5,2 ± 0,6 <sup>1</sup>	2,0 ± 0,9 <sup>2,3,4</sup>	3,7 ± 0,5 <sup>1,2,4</sup>	5,3 ± 0,8 <sup>1</sup>
Содержание ретикулоцитов в периферической крови, % Reticulocyte content in peripheral blood, %	0,54 ± 0,1	4,1 ± 0,5 <sup>1</sup>	1,05 ± 0,05 <sup>1,3,4</sup>	2,25 ± 0,3 <sup>1,4</sup>	1,72 ± 0,23 <sup>1,2,3,4</sup>	0,93 ± 0,12 <sup>1,2,4</sup>	3,23 ± 0,7 <sup>1</sup>
Уровень гемоглобулина в периферической крови, г/л Hemoglobin level in peripheral blood, g/l	126,4 ± 7,0	85,4 ± 4,8 <sup>1</sup>	112,5 ± 6,0 <sup>1,4</sup>	108,7 ± 6,4 <sup>1,4</sup>	119,4 ± 6,2 <sup>2,3,4</sup>	133,2 ± 7,1 <sup>2,4</sup>	98,6 ± 6,7 <sup>1,4</sup>
Содержание эритроцитов в периферической крови (×10 <sup>6</sup> /мл) Erythrocyte content in peripheral blood (×10 <sup>6</sup> /ml), %	7,3 ± 0,6	3,9 ± 0,5 <sup>1</sup>	6,6 ± 0,4 <sup>1,3,4</sup>	7,0 ± 0,6 <sup>1</sup>	6,3 ± 0,4 <sup>1</sup>	7,2 ± 0,6 <sup>1</sup>	5,6 ± 0,7 <sup>1,4</sup>
ССО, усл. ед. SDE, rel. units	–	8,45 ± 0,62 <sup>1</sup>	1,61 ± 0,21 <sup>1,3,4</sup>	4,07 ± 0,49 <sup>1,4</sup>	3,04 ± 0,24 <sup>1,2,3,4</sup>	1,42 ± 0,11 <sup>1,2,4</sup>	6,31 ± 1,43 <sup>1</sup>

**Примечания:** P – степень достоверности различия (<0,05): 1 – в сравнении с интактным контролем; 2 – криоконсервированного материала в сравнении с нативным на соответствующие сутки; 3 – материала 15 суток гестации в сравнении с материалом 19 суток в каждой группе препаратов (нативные или криоконсервированные); 4 – в сравнении с АИГА до лечения. Затемненным фоном выделены лучшие результаты по каждому показателю.

**Notes:** P is the extent of statistically significant difference (<0.05): 1 – in comparison with intact control; 2 – cryopreserved material compared with native one to the corresponding days; 3 – material of the 15<sup>th</sup> gestation day compared with that of the 19<sup>th</sup> day in each preparation group (native and cryopreserved ones); 4 – in comparison with AIHA prior to treatment. The highest results in each index are shaded.



ность КФП определялась сроками гестации и видом, т.е. они применялись в нативном состоянии или после криоконсервирования. Прежде всего, при использовании КФП в любом виде значительно снижался процент животных с прямой реакцией Кумбса (ПРК). При этом нативные и криоконсервированные КФП-15 были достоверно более активны, чем КФП-19. Различия между показателями были обнаружены и при определении титра антиглобулиновой сыворотки у животных с положительной реакцией Кумбса. Этот показатель также был минимальным и одинаковым у мышей после введения как нативных, так и криоконсервированных КФП-15. Менее выраженным корригирующим эффектом обладали КФП-19, причем только криоконсервированные.

Повышенное содержание ретикулоцитов в периферической крови как показателя развития АИГА [10] максимально приближалось к норме (контроль 1) после лечения животных криоконсервированными КФП-19. Примерно на этом же уровне было содержание ретикулоцитов и после введения нативных КФП-15. Криоконсервированные КФП-15, а также нативные КФП-19 в меньшей степени снижали содержание ретикулоцитов, хотя и их терапевтический эффект был очевиден.

Уровень гемоглобина периферической крови (табл. 2) наиболее выражено приближался к показателям интактных животных также после лечения АИГА криоконсервированными КФП, хотя в большей степени он подвергался коррекции после введения КФП-19.

Наиболее манифестно различия терапевтического эффекта применяемого биоматериала проявлялись при определении ССО как интегрального критерия степени отклонения показателя [13]. Снижение ССО в каждой опытной группе в сравнении с ССО в группе животных без лечения характеризует степень терапевтического эффекта КФП. Как видно из табл. 1, по данному спектру показателей криоконсервированные КФП-19 обеспечивали наилучший результат, даже несколько превосходя нативные КФП-15.

Характер изменения показателей крови животных с АИГА после лечения КФП (табл. 2) также зависел от исходного состояния препарата. Судя по содержанию лейкоцитов, минимизацию воспалительного процесса обеспечивали только нативные КФП-19, тогда как СОЭ более выражено снижалась после введения криоконсервированных КФП обоих сроков гестации. Динамика остальных показателей этой группы в сторону нормализации в большей степени проявлялась после применения криоконсервированных КФП-15, тогда как для нативного материала такой закономерности не было обнаружено. Складывается впечатление, что

cryopreserved FLCs-15 or native FLCs-19 reduced in a less extent a reticulocyte content although their therapeutic effect was evident.

Hemoglobin level of peripheral blood (Table 2) mostly approached to the indices of intact animals after AIHA treatment with cryopreserved FLCs, although it was mostly corrected after FLCs-19 introduction.

Differences in therapeutic effect of applied biomaterial were most manifested when determining SDE as an integral criterion of index deviation extent [13]. SDE decrease in each experimental group in comparison with SDE in non-treated animal group characterizes the degree of FLCs therapeutic effect. Table 1 shows that according to this spectrum of indices the cryopreserved FLCs-19 provided the highest result, even slightly exceeding the native FLCs-15.

Character of blood indices change in AIHA animals after FLCs treatment (Table 2) depended also on the initial state of preparation. Judging by leukocyte content, the minimisation of inflammatory process was provided only by native FLCs-19, meanwhile ESR decreased more manifestly after introducing cryopreserved FLCs of both gestation terms. Dynamics of other indices in this group towards normalisation was mostly manifested after applying cryopreserved FLCs-15, meanwhile for native material this regularity was not revealed. Blood indices at AIHA are seemed to be able to reflect a kind of "specific" responses of organism either to native or cryopreserved material. Indeed, the SDE improvement was evident after introducing native FLCs of both gestation terms, although its manifestation extent after applying cryopreserved FLCs was more expressed. This may testify to the fact, that after cryopreservation there are the changes not only in functional activity of introduced FLCs towards regulated by them substrates of recipient's organism, but in response character of these structures (for example LHPC) on changing immunogenic characteristics of introduced material as well.

Thymus was most manifested to respond by changing the parameter of mass index, which maximally approached to the norm after applying cryopreserved FLCs-15 (Table 3). Independently on gestation term the cryopreserved FLCs normalised spleen mass. Manifestation rate of the response on introduced material in lymphonoduses emphasised the advantage of therapeutic effect of cryopreserved FLCs as well.

Response of hemopoietic "place d'armes" of animals, namely bone marrow, to FLCs of the same gestation terms independently on type of introduced material was practically similar. Nevertheless, only FLCs-15 provided the recovery of nucleated cells up to the control 1 level. Both types of FLCs-19 stipulated hyperexpansion of myelocaryocyte proliferation, that might testify to the changes in gestation process of qualitative characteristics of FL hemopoietic stem cell

показатели крови при АИГА могут отражать как бы “специфические” реакции организма на нативный или криоконсервированный материал. Действительно, после введения нативных КФП обоих сроков гестации улучшение ССО было очевидным, хотя степень его проявления после применения криоконсервированных КФП была более выражена. Это может свидетельствовать о том, что после криоконсервирования изменяется не только функциональная активность вводимых КФП в отношении регулируемых ими субстратов организма реципиента, но и характер ответа этих структур (например, ЛГПК) на изменяющиеся иммуногенные характеристики вводимого материала.

Тимус наиболее демонстративно отвечал изменением показателя индекса массы, который максимально приближался к норме после применения криоконсервированных КФП-15 (табл. 3). Вне за-

compartment, as well as hemopoietic regulators, produced by its microenvironment cells. With an increase in gestation terms there is a real augmentation in FL of mediators content with a directed differentiated function [15], that may strengthen the proliferation-differentiation processes in bone marrow. The absence of this phenomenon in spleen, other hemopoietic organ of rodents, emphasises various characters of FL mediator effect on hemopoietic “place d’armes” of recipient with different initial status at АИГА. In spleen, being a key organ in realising immune responses under this pathology [8], a distinct tendency to increase in the amount of nucleated cells (Table 3) is traced, under possible “pressing” of inflammatory cytokines *in situ*. Their exceeded activity, as a result of misbalance in IS substrate state under АИГА is confirmed by a manifested splenomegalia and increase in mass index of organ. In this case the SDE index

**Таблица 2.** Показатели крови мышей с АИГА до и после лечения КФП

**Table 2.** Blood indices in АИГА mice prior to and after FLCs treatment

Показатели Indices	Интактные мыши (контроль 1) Intact mice (control 1)	Мыши с АИГА до лечения Mice with АИГА before treating	Мыши после лечения КФП Mice after treatment with FLCs				Мыши с АИГА + КВП (контроль 2) Mice with АИГА + ALCs (control 2)
			Нативные Native		Криоконсервированные Cryopreserved		
			Сутки гестации Gestation day		Сутки гестации Gestation day		
			15	19	15	19	
Лейкоциты ( $\times 10^6$ /мл) Leucocytes ( $\times 10^6$ /ml)	3,35 $\pm$ 0,2	5,2 $\pm$ 0,6 <sup>1</sup>	4,5 $\pm$ 0,5 <sup>1,3,4</sup>	3,7 $\pm$ 0,5 <sup>4</sup>	6,2 $\pm$ 0,4 <sup>1,2</sup>	5,3 $\pm$ 0,6 <sup>1,2</sup>	8,8 $\pm$ 0,5
Эритроциты ( $\times 10^6$ /мл) Eythrocytes ( $\times 10^6$ /ml)	7,3 $\pm$ 0,6	3,9 $\pm$ 0,5 <sup>1</sup>	5,6 $\pm$ 0,4 <sup>1,3,4</sup>	7,0 $\pm$ 0,6 <sup>4</sup>	6,3 $\pm$ 0,4 <sup>4</sup>	7,2 $\pm$ 0,6 <sup>4</sup>	5,6 $\pm$ 0,7 <sup>1,4</sup>
Гемоглобин, г/л Hemoglobin, g/l	126,4 $\pm$ 7,0	85,4 $\pm$ 4,8 <sup>1</sup>	112,5 $\pm$ 6,0 <sup>1,4</sup>	108,7 $\pm$ 6,4 <sup>1,4</sup>	100,4 $\pm$ 6,2 <sup>3,4</sup>	133,2 $\pm$ 7,1 <sup>2,4</sup>	98,6 $\pm$ 6,7 <sup>1,4</sup>
Палочкоядерные гранулоциты, % Stab granulocytes, %	11,4 $\pm$ 0,8	3,8 $\pm$ 0,6 <sup>1</sup>	6,4 $\pm$ 0,5 <sup>1,3</sup>	7,2 $\pm$ 0,4 <sup>1,4</sup>	10,1 $\pm$ 0,9 <sup>2,4</sup>	10,5 $\pm$ 1,0	2,5 $\pm$ 0,5 <sup>1,4</sup>
Сегментоядерные гранулоциты, % Segmented granulocytes, %	44,6 $\pm$ 3,3	33,3 $\pm$ 4,2 <sup>1</sup>	22,2 $\pm$ 3,1 <sup>1,3,4</sup>	15,8 $\pm$ 2,6 <sup>1,4</sup>	50,6 $\pm$ 4,7 <sup>2,3,4</sup>	37,5 $\pm$ 4,0 <sup>2</sup>	17,5 $\pm$ 2,3 <sup>1,4</sup>
Моноциты, % Monocytes, %	10,3 $\pm$ 0,6	15,8 $\pm$ 1,1 <sup>1</sup>	17,8 $\pm$ 1,8 <sup>1,3</sup>	26,1 $\pm$ 2,2 <sup>1,4</sup>	19,6 $\pm$ 1,4 <sup>1,3,4</sup>	15,8 $\pm$ 1,6 <sup>1,2</sup>	12,5 $\pm$ 1,1 <sup>1,4</sup>
Эозинофилы, % Eosinophiles, %	0,60 $\pm$ 0,04	3,6 $\pm$ 0,27 <sup>1</sup>	0,9 $\pm$ 0,08 <sup>1,3,4</sup>	1,3 $\pm$ 0,1 <sup>1,4</sup>	0,30 $\pm$ 0,08 <sup>1,2,3,4</sup>	0,9 $\pm$ 0,07 <sup>1,2,4</sup>	3,2 $\pm$ 0,2 <sup>1</sup>
Базофилы, % Basophils, %	0,300 $\pm$ 0,015	1,1 $\pm$ 0,08 <sup>1</sup>	1,0 $\pm$ 0,11 <sup>1,4</sup>	1,2 $\pm$ 0,13 <sup>1,4</sup>	0,80 $\pm$ 0,09 <sup>1,2,4</sup>	1,0 $\pm$ 0,09 <sup>1,2</sup>	1,0 $\pm$ 0,08 <sup>1</sup>
Лимфоциты, % Lymphocytes, %	32,4 $\pm$ 4,1	22,1 $\pm$ 3,6 <sup>1</sup>	37,6 $\pm$ 4,1 <sup>4</sup>	45,2 $\pm$ 4,8 <sup>4</sup>	28,3 $\pm$ 3,6 <sup>2,3</sup>	41,1 $\pm$ 5,6 <sup>4</sup>	12,5 $\pm$ 3,6 <sup>1,4</sup>
СОЭ, мм/ч ESR, mm/hr	1,5 $\pm$ 0,07	2,4 $\pm$ 0,2 <sup>1</sup>	2,1 $\pm$ 0,16 <sup>1</sup>	1,9 $\pm$ 0,12 <sup>1,4</sup>	1,30 $\pm$ 0,09 <sup>1,2,4</sup>	1,3 $\pm$ 0,1 <sup>1,2,4</sup>	1,95 $\pm$ 0,18 <sup>1,4</sup>
ССО, усл. ед. SDE, rel. units	–	11,38 $\pm$ 1,2 <sup>1</sup>	5,45 $\pm$ 0,42 <sup>1,4</sup>	7,75 $\pm$ 0,88 <sup>1,4</sup>	4,78 $\pm$ 0,54 <sup>1,4</sup>	4,52 $\pm$ 0,47 <sup>1,2,4</sup>	11,26 $\pm$ 1,3 <sup>1</sup>

**Примечания:** P – степень достоверности различия (<0,05): 1 – в сравнении с интактным контролем; 2 – криоконсервированного материала в сравнении с нативным на соответствующие сутки; 3 – материала 15 суток гестации в сравнении с материалом 19 суток в каждой группе препаратов (нативные или криоконсервированные); 4 – в сравнении с АИГА до лечения. Затемненным фоном выделены лучшие результаты по каждому показателю.

**Notes:** P is the extent of statistically significant difference (<0.05): 1 – in comparison with intact control; 2 – cryopreserved material compared with native one to the corresponding days; 3 – material of the 15<sup>th</sup> gestation day compared with that of the 19<sup>th</sup> day in each preparation group (native and cryopreserved ones); 4 – in comparison with АИГА prior to treatment. The highest results in each index are shaded.

висимости от срока гестации криоконсервированные КФП нормализовали массу селезенки. В лимфоузлах выраженность ответной реакции на вводимый материал также подчеркивала преимущество лечебного эффекта криоконсервированных КФП.

demonstrates the extent of correcting animal LHPC block state by each of the applied FLCs types for AИHA treatment as well. Assuming that FLCs-15 had an advantage over FLCs-19, the cryopreserved material was maximally efficient.

**Таблица 3.** Показатели состояния органов ЛГПК мышей с АИГА до и после лечения КФП  
**Table 3.** Indices of LHPC organs state in AИHA mice prior to and after FLCs treatment

Показатели Indices	Интактные мыши (контроль 1) Intact mice (control 1)	Мыши с АИГА до лечения Mice with AИHA before treating	Мыши после лечения КФП Mice after treatment with FLCs				Мыши с АИГА+ КВП (контроль 2) Mice with AИHA + ALCs (control 2)	
			Нативные Native		Криоконсервированные Cryopreserved			
			Сутки гестации Gestation day		Сутки гестации Gestation day			
			15	19	15	19		
Тимус Thymus	Масса органа, мг Organ mass, mg	27,2±3,4	36,2±3,8 <sup>1</sup>	37,0±4,3 <sup>1</sup>	29,5±3,0	24,8±2,9 <sup>2,3,4</sup>	32,4±3,3	39,6±3,4 <sup>1</sup>
	Количество ядерных клеток на орган (×10 <sup>7</sup> ) Amount of nucleated cells per organ (×10 <sup>7</sup> )	4,4±0,5	3,4±0,4	3,9±0,4	4,2±0,4	4,6±0,3 <sup>3,4</sup>	6,2±0,5 <sup>1,4</sup>	4,2±0,5
	Индекс массы органа, мг/г Mass index of the organ, mg/g	1,18±0,1	1,44±0,1 <sup>1</sup>	1,5±0,08 <sup>1</sup>	1,3±0,1	1,1±0,07 <sup>2,3,4</sup>	1,4±0,17 <sup>1</sup>	1,51±0,2 <sup>1</sup>
Селезенка Spleen	Масса органа, мг Organ mass, mg	84,2±6,1	116,4±7,6 <sup>1</sup>	111,2±9,4 <sup>1,3</sup>	61,8±5,9 <sup>1,4</sup>	80,8±9,3 <sup>2,4</sup>	77,0±8,1 <sup>4</sup>	109,0±11,2 <sup>1</sup>
	Количество ядерных клеток на орган (×10 <sup>7</sup> ) Amount of nucleated cells per organ (×10 <sup>7</sup> )	8,67±0,78	10,9±1,0	6,28±0,56 <sup>1,4</sup>	6,33±0,7 <sup>1,4</sup>	8,9±0,7 <sup>2</sup>	9,8±0,8 <sup>2</sup>	9,6±0,1
	Индекс массы органа, мг/г Mass index of the organ, mg/g	3,6±0,4	4,67±0,3 <sup>1</sup>	4,4±0,4 <sup>3</sup>	2,6±0,3 <sup>1,4</sup>	3,9±0,2 <sup>4</sup>	3,0±0,5 <sup>4</sup>	5,1±0,6 <sup>1</sup>
Лимфоузлы Lymph nodes	Масса органа, мг Organ mass, mg	7,5±0,9	17,3±2,0 <sup>1</sup>	10,0±1,1 <sup>1,3,4</sup>	14,5±1,6 <sup>1</sup>	10,1±0,9 <sup>1,3,4</sup>	8,0±0,9 <sup>2,4</sup>	15,1±1,6 <sup>1</sup>
	Количество ядерных клеток на орган (×10 <sup>7</sup> ) Amount of nucleated cells per organ (×10 <sup>7</sup> )	0,67±0,08	0,92±0,08 <sup>1</sup>	0,82±0,1	1,06±0,18 <sup>1</sup>	1,12±0,08 <sup>1,2,3</sup>	0,74±0,06 <sup>2,4</sup>	1,02±0,1 <sup>1</sup>
	Индекс массы органа, мг/г Mass index of the organ, mg/g	0,3±0,04	0,64±0,08 <sup>1</sup>	0,4±0,06	0,63±0,08 <sup>1</sup>	0,46±0,05 <sup>1</sup>	0,41±0,03 <sup>1,3,4</sup>	0,72±0,6 <sup>1,4</sup>
Костный мозг ×10 <sup>7</sup> на бедро Bone marrow ×10 <sup>7</sup> per femur	1,46±0,2	0,96±0,1 <sup>1</sup>	1,45±0,2 <sup>3,4</sup>	1,95±0,2 <sup>4</sup>	1,4±0,12 <sup>4</sup>	2,37±0,3 <sup>1,2,4</sup>	1,19±0,2	
CCO, усл. ед. SDE, rel. units	–	4,87±0,52 <sup>1</sup>	2,48±0,19 <sup>1,3,4</sup>	3,99±0,14 <sup>1</sup>	1,62±0,14 <sup>1,2,3,4</sup>	2,33±0,28 <sup>1,2,4</sup>	4,72±0,51 <sup>1</sup>	

**Примечания:** P – степень достоверности различия (<0,05): 1 – в сравнении с интактным контролем; 2 – криоконсервированного материала в сравнении с нативным на соответствующие сутки; 3 – материала 15 суток гестации в сравнении с материалом 19 суток в каждой группе препаратов (нативные или криоконсервированные); 4 – в сравнении с АИГА до лечения. Затемненным фоном выделены лучшие результаты по каждому показателю.

**Notes:** P is the extent of statistically significant difference (<0.05): 1 – in comparison with intact control; 2 – cryopreserved material compared with native one to the corresponding days; 3 – material of the 15<sup>th</sup> gestation day compared with that of the 19<sup>th</sup> day in each preparation group (native and cryopreserved ones); 4 – in comparison with AИHA prior to treatment. The highest results in each index are shaded.

Гемопоэтический плацдарм животных, а именно костный мозг, отвечал практически идентично на КФП одних и тех же сроков гестации вне зависимости от вида вводимого материала. Тем не менее только КФП-15 обеспечивали восстановление количества ядерных клеток до уровня контроля 1. Оба вида КФП-19 обуславливали гиперэкспансию пролиферации миелокариоцитов, что может свидетельствовать об изменении в процессе гестации качественных характеристик компартамента стволовых кроветворных клеток ФП, а также гемопоэтических регуляторов, продуцируемых клетками ее микроокружения. Действительно по мере увеличения сроков гестации в ФП повышается содержание медиаторов с направленной дифференцировочной функцией [15], которые могут усиливать пролиферативно-дифференцировочные процессы в костном мозге. Отсутствие такого же явления в селезенке, другом гемопоэтическом органе грызунов, подчеркивает неидентичный характер влияния медиаторов ФП на разные участки гемопоэтического плацдарма реципиента с различным исходным статусом при АИГА. В селезенке, являющейся ключевым органом реализации иммунных реакций при данной патологии [8], прослеживается явная тенденция к увеличению количества ядерных клеток (табл. 3), возможно, в условиях “прессинга” воспалительных цитокинов *in situ*. Их чрезмерную активность как результат разбалансировки состояния субстратов ИС при АИГА подтверждают манифестируемая спленомегалия и увеличение индекса массы органа. В данном случае индекс ССО также демонстрирует, насколько корректирует состояние этого блока ЛГПК животных каждый из применяемых для лечения АИГА видов КФП. При том, что КФП-15 имели преимущество перед КФП-19, криоконсервированный материал был максимально эффективен.

Иммунорегулирующая активность КФП также зависела от срока получения материала и его вида (табл. 4). Терапевтический потенциал в отношении содержания общих Т-клеток ( $CD3^+$ ) и субпопуляции регуляторных Т-хелперов ( $CD4^+$ ) был присут в равной степени нативным КФП обоих сроков гестации и криоконсервированным КФП-19. Показатели другой регуляторной субпопуляции, а именно Т-супрессоров ( $CD8^+$ ), к норме приближались после применения нативных КФП-15, а также криоконсервированных КФП-19. Очевидно, что коррекция этой субпопуляции Т-клеток играет ключевую роль в нормализации профиля регуляторных субпопуляций ИС, что подтверждается коррекцией иммунорегуляторного индекса (ИРИ) при таком же варианте использования КФП.

FLCs immune-correcting activity was also dependent on the term of material procurement and its type (Table 4). Therapeutic potential in respect of the content of total T-cells ( $CD3^+$ ) and regulatory T-helpers ( $CD4^+$ ) subpopulation was equally inherent either to native FLCs of both gestation terms or cryopreserved FLCs-19. The indices of other regulatory subpopulation, namely T-suppressors ( $CD8^+$ ) approached to the norm after applying native FLCs-15 and cryopreserved FLCs-19 as well. Correction of this T-cell subpopulation is evident to play a key role in normalising the IS regulatory subpopulation profile, that is confirmed by immune regulation index (IRI) correction under the same variant of FLCs usage.

State indices of monocyte-macrophage system cells, estimated by PC cells, were maximally achieved the norm after applying native FLCs-15. Cryopreserved material of the same gestation term showed a similar correcting effect. The comparison of different types of FLCs-19 confirmed the advantage of cryopreserved cells as well. Generally, according to five indices of PC cell state, four of those were statistically and significantly changed under AIHA in comparison with the control, the cryopreserved FLCs-15 normalised four, but three of them achieved the norm after introducing cryopreserved FLCs-19. The efficiency of correcting immune-competent sphere, estimated by SDE indices had certain peculiarities. The highest were cryopreserved FLCs-19 with slightly inferior native FLCs-15. Cryopreserved FLCs-15 and native FLCs-19 corrected quite equally but weaker than the previous ones this compartment state of animal organism with pathology.

Variations of PEFPC therapeutic effect depending on protocols of their application and identified indices in different LHPC systems of animals with other pathologies of autoimmune genesis were noted in papers [4, 13]. To obtain an integral response concerning the character of therapeutic effect of different FLCs forms on AIHA animal organism the SDE indices was summarised by all systems. Table 5 shows that in each system (Table 1-4) SDE of indices was significantly decreased after applying one of FLCs type, that was confirmed by estimation of integral SDE as well. By other words, each of the approved forms of FLCs had a therapeutic effect inherent to the fetal material, because the introduction of mature liver cells into AIHA mice did not statistically and significantly change either integral SDE or its components.

Of note are some significant differences of integral SDE between groups, that is the FLCs correcting effect appearance. Among the native material the FLCs-15 had the advantage with almost twice inferior FLCs-19. Following cryopreservation FLCs-19 gained the same therapeutic effect as the native FLCs-15. Moreover,



Показатели состояния клеток моноцитарно-фагоцитарной системы, оцененные по клеткам ПП, максимально приближались к норме после применения нативных КФП-15. Криоконсервированный материал этого же срока гестации проявлял аналогичный корректирующий эффект. Сравнение разных видов КФП-19 также подтвердило преимущество криоконсервированных клеток. В общем по пяти показателям состояния клеток ПП, из которых четыре были достоверно изменены при АИГА в сравнении с контролем, криоконсервированные КФП-15 нормализовали все четыре, а три – достигали нормы после введения криоконсервированных КФП-19. Оцененная же по показателям

this result was higher, than if treating animals with cryopreserved FLCs-15.

Thus, the cryopreservation provided higher therapeutic effect to FLCs of that gestation term, which manifested it at the least extent in native form. This confirms the validity of supposition that cryo-preservation can provide not only a long-term storage for bioobject, but qualitatively improve some of its characteristics [16]. Mechanisms for realising this cryopreservation effect may be different: from change in composition of introduced suspension, to that in mediator-producing potential of functionally important components, being its part [13]. The appearance of FLCs feature to superactivate the expression of

**Таблица 4.** Структурно-функциональные характеристики иммунокомпетентных клеток мышей с АИГА до и после лечения КФП

**Table 4.** Structural and functional characteristics of immune-competent cells in AИHA mice prior to and after FLCs treatment

Показатели Indices		Интактные мыши (контроль 1) Intact mice (control 1)	Мыши с АИГА до лечения Mice with AИHA before treating	Мыши после лечения КФП Mice after treating with FLCs				Мыши с АИГА + КВП (контроль 2) Mice with AИHA + ALCs (control 2)
				Нативные Native		Криоконсервированные Cryopreserved		
				Сутки гестации Gestation day		Сутки гестации Gestation day		
				15	19	15	19	
Селезенка Spleen	T-общие (CD3 <sup>+</sup> ) T-total (CD3 <sup>+</sup> )	27,3±2,1	19,6±2,7 <sup>1</sup>	29,4±4,2 <sup>1,3,4</sup>	26,9±3,6 <sup>4</sup>	40,2±5,3 <sup>1</sup>	30,9±3,3 <sup>4</sup>	1,81±2,4 <sup>1</sup>
	T-хелперы (CD4 <sup>+</sup> ) T-helpers (CD4 <sup>+</sup> )	19,4±1,9	16,1±1,9	23,8±3,0 <sup>1,3,4</sup>	19,7±2,2	26,3±3,1 <sup>1,4</sup>	21,7±2,9	15,7±1,9 <sup>1</sup>
	T-супрессоры (CD8 <sup>+</sup> ) T-suppressors (CD8 <sup>+</sup> )	8,1±0,8	3,9±0,4 <sup>1</sup>	9,6±1,1 <sup>3,4</sup>	5,2±0,6 <sup>1</sup>	13,8±2,0 <sup>1,2,3,4</sup>	8,3±1,0 <sup>2,4</sup>	4,7±0,6 <sup>1</sup>
	ИРИ Тх/Тс IRI Th/Ts	2,4±0,2	4,2±0,5 <sup>1</sup>	3,0±0,4 <sup>4</sup>	3,8±0,5 <sup>1</sup>	1,9±0,3 <sup>2,4</sup>	2,6±0,3 <sup>2,4</sup>	3,4±0,5 <sup>1</sup>
Перитонеальная полость Peritoneal cavity	Общее количество ядерных клеток (×10 <sup>6</sup> ) Total amount of nucleated cells (×10 <sup>6</sup> )	4,9±0,5	2,9±0,3 <sup>1</sup>	5,5±0,6 <sup>3,4</sup>	2,3±0,5 <sup>1</sup>	4,5±0,3 <sup>4</sup>	4,5±0,5 <sup>2,4</sup>	4,0±0,5 <sup>4</sup>
	Адгезивные клетки,% Adhesive cells,%	50,4±3,6	59,2±4,1 <sup>1</sup>	43,3±4,7 <sup>4</sup>	41,8±3,6 <sup>4</sup>	61,3±6,7 <sup>2</sup>	50,6±4,2	26,1±4,3 <sup>1,4</sup>
	Фагоцитарный индекс Phagocyte index	51,6±5,6	18,6±2,4 <sup>1</sup>	46,3±4,3 <sup>4</sup>	40,1±5,1 <sup>4</sup>	50,6±4,9 <sup>4</sup>	38,2±4,1 <sup>1,4</sup>	23,2±3,0 <sup>1</sup>
	Фагоцитарное число Phagocyte number	6,9±0,7	7,8±1,1	7,1±0,8 <sup>3</sup>	10,2±1,4 <sup>1</sup>	6,4±0,8	7,0±0,8 <sup>2</sup>	7,4±0,9
	АПФА ×10 <sup>6</sup> AIPA ×10 <sup>6</sup>	17,4±1,4	4,2±0,6 <sup>1</sup>	17,9±1,6 <sup>3,4</sup>	9,4±1,1 <sup>1,4</sup>	16,6±1,8 <sup>3,4</sup>	12,1±1,4 <sup>1,4</sup>	6,9±0,8 <sup>1,4</sup>
ССО, усл. ед SDE, rel. units	–	3,93±0,32 <sup>1</sup>	1,17±0,14 <sup>1,3,4</sup>	2,61±0,30 <sup>1,4</sup>	2,17±0,19 <sup>1,3,4</sup>	1,02±0,12 <sup>1,2,4</sup>	3,26±0,39 <sup>1</sup>	

**Примечания:** P – степень достоверности различия (<0,05): 1 – в сравнении с интактным контролем; 2 – криоконсервированного материала в сравнении с нативным на соответствующие сутки; 3 – материала 15 суток гестации в сравнении с материалом 19 суток в каждой группе препаратов (нативные или криоконсервированные); 4 – в сравнении с АИГА до лечения. Затемненным фоном выделены лучшие результаты по каждому показателю.

**Notes:** P is the extent of statistically significant difference (<0.05): 1 – in comparison with intact control; 2 – cryopreserved material compared with native one to the corresponding days; 3 – material of the 15<sup>th</sup> gestation day compared with that of the 19<sup>th</sup> days in each preparation group (native and cryopreserved ones); 4 – in comparison with AИHA prior to treatment. The highest results in each index are shaded.

ССО эффективность коррекции иммунокомпетентной сферы имела определенные особенности. Лучшими были криоконсервированные КФП-19, которым незначительно уступали нативные КФП-15. Криоконсервированные КФП-15 и нативные КФП-19 почти в равной степени, но более слабо, чем предыдущие, коррегировали состояние этого компартмента организма животных с патологией.

Вариации терапевтического эффекта ПЭФПК в зависимости от схем их применения и идентифицируемых показателей в разных системах ЛГПК животных с другими патологиями аутоиммунного генеза были отмечены в [4, 13]. Для получения

интегрального ответа относительно характера терапевтического эффекта разных форм КФП на организм животных с АИГА была обобщена ССО показателей по всем системам в целом. Как видно из табл. 5, в каждой системе (табл. 1-4) ССО показателей существенно снижалась после применения одного из видов КФП, что подтверждалось и оценкой интегральной ССО. Другими словами, каждая из апробированных форм КФП обладала терапевтическим эффектом, присущим именно фетальному материалу, так как введение мышам с АИГА клеток взрослой печени достоверно не изменяло ни интегральную ССО, ни ее составляющие компоненты.

Важно отметить ряд существенных различий интегральной ССО между группами, а именно проявления коррегирующего эффекта КФП. Среди нативного материала преимущество имели КФП-15, которым почти в два раза уступали КФП-19. Но после криоконсервирования КФП-19 приобретали такой же лечебный эффект, как и нативные КФП-15. Более того, этот результат был лучше, чем при лечении животных криоконсервированными КФП-15.

Таким образом, криоконсервирование придавало более высокий терапевтический эффект КФП того срока гестации, которые в нативной форме

**Таблица 5.** Интегральная ССО показателей, представленных в табл. 1-4  
**Table 5.** Integral SDE of indices, presented in Tables 1-4.

Показатели Indices	Мыши с АИГА до лечения Mice with АИГА before treating	Мыши после лечения КФП Mice after treating with FLCs				Мыши с АИГА+КВП Mice with АИГА + АLCs
		Нативные Native		Криоконсервированные Cryopreserved		
		Сутки гестации Gestation day		Сутки гестации Gestation day		
		15	19	15	19	
ССО (табл. 1) SDE (Table 1)	8,45±0,62 <sup>1</sup>	1,61±0,21 <sup>1,3,4</sup>	4,07±0,49 <sup>1,4</sup>	3,04±0,24 <sup>1,2,3,4</sup>	1,42±0,11 <sup>1,2,4</sup>	6,31±1,43 <sup>1</sup>
ССО (табл. 2) SDE (Table 2)	11,38±1,2 <sup>1</sup>	5,45±0,48 <sup>1,4</sup>	7,75±0,88 <sup>1,4</sup>	4,78±0,54 <sup>1,4</sup>	4,52±0,47 <sup>1,2,4</sup>	11,26±1,3 <sup>1</sup>
ССО (табл. 3) SDE (Table 3)	4,87±0,52 <sup>1</sup>	2,48±0,19 <sup>1,3,4</sup>	3,99±0,41 <sup>1</sup>	1,62±0,14 <sup>1,2,3,4</sup>	2,33±0,28 <sup>1,2,4</sup>	4,72±0,51 <sup>1</sup>
ССО (табл. 4) SDE (Table 4)	3,93±0,32 <sup>1</sup>	1,17±0,14 <sup>1,3,4</sup>	2,61±0,30 <sup>1,4</sup>	2,17±0,19 <sup>1,3,4</sup>	1,02±0,12 <sup>1,2,4</sup>	3,26±0,39 <sup>1</sup>
<b>Интегральная ССО, усл. ед. Integral SDE, rel. units</b>	<b>28,63±2,18</b>	<b>10,71±1,21<sup>1,4</sup></b>	<b>18,42±1,36<sup>1,4</sup></b>	<b>11,61±0,94<sup>1,3,4</sup></b>	<b>9,29±0,78<sup>1,2,4</sup></b>	<b>25,55±2,74<sup>1</sup></b>

**Примечания:** P – степень достоверности различия (<0,05): 1 – в сравнении с интактным контролем; 2 – криоконсервированного материала в сравнении с нативным на соответствующие сутки; 3 – материала 15 суток гестации в сравнении с материалом 19 суток в каждой группе препаратов (нативные или криоконсервированные); 4 – в сравнении с АИГА до лечения. Затеменным фоном выделены лучшие результаты по каждому показателю.

**Notes:** P is the extent of statistically significant difference (<0.05): 1 – in comparison with intact control; 2 – cryopreserved material compared with native one to the corresponding days; 3 – material of the 15<sup>th</sup> gestation day compared with that of the 19<sup>th</sup> days in each preparation group (native and cryopreserved ones); 4 – in comparison with АИГА prior to treatment. The highest results in each index are shaded.

suppressor (CD8<sup>+</sup>) cell subpopulation in recipients' spleen can serve as confirmation (Table 4). At the same time this activity occurred only in FLCs-15. Consequently, therapeutic efficiency of various PFLC was confirmed to depend on their initial status, that besides determines a bioobject sensitivity to the effect of cryopreservation factors.

## Conclusions

Independently on gestation terms FLCs correct LHPC state in АИГА mice.

Manifestation extent of FLCs therapeutic effect is determined by gestation term and is differently manifested in various LHPS compartments.

Cryopreservation provides higher level of therapeutic potential to FLCs of that gestation term, which manifestation was minimum in native form.

## References

1. Abelev G.I. Alpha-fetoprotein: biology, biochemistry, molecular genetics // Immunologiya.– 1994.– N3.– P. 4-10.
2. Aleksandrov M.G., Kudryavitsky A.I., Rumyantseva E.G. et al. Method for calculating absolute phagocytosis indices // Lab. Delo.– 1988.– N9.– P. 30-33.
3. Ashmarin I.P., Vorobiev A.A. Statistical methods in microbiological studies.– Leningrad: Meditsina, 1972.– 180 p.

проявляли его минимально. Это подтверждает правомочность предположения, что криоконсервирование может обеспечивать не только долгосрочное хранение биообъекта, но и качественно улучшать некоторые его характеристики [16]. Механизмы реализации такого рода эффекта криоконсервирования могут быть различными: от изменения компонентного состава вводимой суспензии, до изменения медиаторпродуцирующего потенциала входящих в ее состав функционально значимых компонентов [13]. Подтверждением может быть (табл. 4) появление у КФП свойства суперактивировать экспрессию субпопуляции супрессорных (CD8<sup>+</sup>) клеток в селезенке реципиентов. При этом такая активность появлялась только у КФП-15. Следовательно, подтверждено, что терапевтическая эффективность различных ПЭФПК зависит от их исходного статуса, который к тому же определяет чувствительность биообъекта к действию факторов криоконсервирования.

### Выводы

1. Вне зависимости от сроков гестации КФП корректируют состояние ЛГПК мышей с АИГА.

2. Выраженность лечебного эффекта КФП определяется сроком гестации и манифестируется в разных компартментах ЛГПК в различной степени.

3. Криоконсервирование придает более высокий уровень терапевтического потенциала КФП того срока гестации, которые в нативной форме проявляли его минимально.

### Литература

1. *Абелев Г.И.* Альфа-фетопротеин: биология, биохимия, молекулярная генетика // Иммунология.– 1994.– №3.– С. 4-10.
2. *Александров М.Г., Кудрявицкий А.И., Румянцева Е.Г. и др.* Метод вычисления абсолютных показателей фагоцитоза // Лаб. дело.– 1988.– №9.– С. 30-33.
3. *Ашмарин И.П., Воробьев А.А.* Статистические методы микробиологических исследований. – Л.: Медицина, 1972.– 180 с.
4. *Гольцев А.Н., Останкова Л.В., Луценко Е.Д. и др.* Ответ лимфогемопозитической системы организма на введение продуктов фетоплацентарного комплекса // Пробл. криобиологии.– 2000.– №2.– С. 15-31.
5. *Гольцев А.Н., Дубрава Т.Г., Луценко Е.Д., Останкова Л.В.* Коррекция эмбриофетоплацентарными препаратами лимфогемопозитического комплекса при детерминированном развитии патологии, обусловленной старением организма // Сб. тезисов V Междунар. симпозиума "Биологические механизмы старения".– Харьков, 2002.– С. 86.
6. *Горская А.Ю., Гольцев А.Н., Луценко Е.Д.* Что мы еще не знаем о криоконсервированных эритроцитах? // Пробл. криобиологии.– 2004.– №2.– С. 42-49.
7. *Грищенко В.И., Гольцев А.Н.* Трансплантация продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса. От понимания механизма действия к повышению эффективности применения // Пробл. криобиологии.– 2002.– №1.– С. 54-84.

4. *Goltsev A.N., Ostankova L.V., Lutsenko E.D. et al.* Response of the lymphohemopoietic system of the organism on the injection of the products of the fetoplacental complex // Problems of Cryobiology.– 2000.– N2.– P. 15-30.
5. *Goltsev A.N., Dubrava T.G., Lutsenko E.D., Ostankova L.V.* Correction with embryofetoplacental preparations of lymphohemopoietic complex under determined development of pathology, stipulated with organism aging // Coll. of abstracts of the 5th International Symposium "Biological mechanisms in aging".– Kharkov, 2002.– P. 86.
6. *Gorskaya A.Yu., Goltsev A.N., Lutsenko E.D.* What else we do not know about cryopreserved erythrocytes? // Problems of Cryobiology.– 2004.– N2.– P. 42-49.
7. *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.
8. *Guseva S.A., Gonchakov Ya.N.* Anemias.– Kiev: Logos, 2004.– 408 p.
9. *Immunology: Manual / E.U. Paster, V.V. Ovod, V.K. Pozur, N.E. Vikhot.*– Kiev: Vyshcha shkola, 1989.– 304 p.
10. *Laboratory research methods in clinic: Reference book / V.V. Menshikov, L.N. Delektorskaya.*– Moscow: Meditsina, 1987.– 386 p.
11. *Lymphocytes: Methods / Ed. by J. Claus.*– Moscow: Mir, 1990.– 396 p.
12. *Trufakin V.A., Lozovoy L.P.* Effect of somatotrophic hormone on autoimmune responses, induced in mice of different genotype with syngeneic heated erythrocytes // Bull. Eksperim. Biol. Med.– 1977.– N3.– P. 305-308.
13. *Patent N 3761 Ukraine, IPC7 A61B5/00.* Way for a comparative evaluation of treatment efficiency / A.M. Goltsev, L.V. Ostankova, O.D. Lutsenko, T.G. Dubrava, N.M. Babenko, I.V. Rassokha, A.Yu. Gorska, Yu.O. Kozlova. Applied 09.03.04; N 2004031694. Published 15.12.2004.– Bull. N12.– P. 3.12.
14. *Le Blanc K.* Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells // Cytotherapy.– 2003. – Vol. 5, N6.– P. 485-489.
15. *Sennikov S.V., Krysov S.V., Injelevskaya T.V. et al.* Production of cytokines by immature erythroid cells derived from human embryonic liver // European Cytokine Network.– 2001.– Vol. 12, N2.– P. 274-279.
16. *Venkataraman M.* Cryopreservation induced enhancement of IL-2 production in human peripheral blood mononuclear cells // Cryobiology.– 1992.– Vol. 29, N2.– P. 165-175.

Accepted in 29.08.2006

8. Гусева С.А., Гончаков Я.Н. Анемии.– Киев: Логос, 2004.– 408 с.
9. *Иммунология: Практикум*/ Е.У.Пастер, В.В.Овод, В.К. Позур, Н.Е.Вихоть.– Киев: Вища шк. 1989.– 304 с.
10. *Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник* / В.В. Меньшиков, Л.Н. Делекторская.– М.: Медицина, 1987.– 386 с.
11. *Лимфоциты: Методы* / Под ред. Дж. Клауса.– М.: Мир, 1990.– 396 с.
12. Труфакин В.А., Лозовой Л.П. Влияние соматотропного гормона на аутоиммунные реакции, индуцированные у мышей разных генотипов сингенными програтетыми эритроцитами // Бюл. эксперим. биол. мед.– 1977.– №3.– С. 305-308.
13. Пат. України №3761, МПК 7 А61В5/00 Спосіб порівняльної оцінки ефективності лікування / А.М. Гольцев, Л.В. Останкова, О.Д. Луценко, Т.Г. Дубрава, Н.М. Бабенко, І.В. Рассоха, А.Ю. Горська, Ю.О. Козлова. Заявлено 09.03.04; №2004031694 Публ. 15.12.2004.– Бюл. №12.– С. 3.12
14. Le Blanc K. Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells // *Cytotherapy*.– 2003. – Vol. 5, N6.– P. 485-489.
15. Sennikov S. V., Krysov S. V., Injelevskaya T. V. et al. Production of cytokines by immature erythroid cells derived from human embryonic liver // *European Cytokine Network*.– 2001.– Vol. 12, N2.– P. 274-279.
16. Venkataraman M. Cryopreservation induced enhancement of IL-2 production in human peripheral blood mononuclear cells // *Cryobiology*.– 1992.– Vol. 29, N2.– P. 165-175.

*Поступила 29.08.2006.*