

## Аутоиммунная патология как предрасполагающий фактор изменения криочувствительности клеток лимфогемопоэтической системы

А.Н. ГОЛЬЦЕВ, Ю.А. КОЗЛОВА

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

## Autoimmune Pathology as Predisposing Factor of the Change in Cryosensitivity of Lymphohemopoietic Complex Cells

GOLTSEV A.N., KOZLOVA YU.A.

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

Приведены данные литературы об изменении ряда структурно-функциональных параметров клеток лимфогемопоэтической системы (ЛГПС) при развитии и поддержании в организме патологического процесса. Обращено внимание на значительную модуляцию исходного состояния клеток ЛГПС на молекулярном, клеточном уровнях при развитии аутоиммунных заболеваний (АИЗ). Эти данные должны быть учтены при разработке режимов криоконсервирования для клеток организма без и с развивающейся в той или иной форме патологии.

**Ключевые слова:** костный мозг, аутоиммунные заболевания, лимфогемопоэтическая система.

Наведено дані літератури про зміни ряду структурно-функціональних параметрів клітин ліфогемопоетичної системи (ЛГПС) в умовах розвитку та підтримки в організмі патологічного процесу. Звернено увагу на значну модуляцію початкового стану клітин ЛГПС на молекулярному, клітинному рівнях при розвитку аутоімунних захворювань. Ці дані повинні бути враховані при розробці режимів криоконсервування для клітин організму без та з розвинутою в тій чи іншій формі патології.

**Ключові слова:** кістковий мозок, аутоімунні захворювання, ліфогемопоетична система.

There are presented data on the changes in structural and functional parameters of cells of lymphohemopoietic complex (LHPC) under the development and maintaining in an organism of pathological process. The attention was paid to the fact of considerable modulation of initial state of LHPC cells at molecular, cellular levels during the development of autoimmune diseases (AIDs). These data should be taken into account when elaborating the cryopreservation regimens for the cells in an organism and with developing pathology of any form.

**Key-words:** bone marrow, autoimmune diseases, lymphohemopoietic system.

В последние годы наблюдается тенденция к росту патологий, имеющих аутоиммунный генез и представляющих серьезную медико-социальную проблему. Особое место среди них занимают такие “жесткие”, часто не управляемые и не поддающиеся традиционным методам лечения АИЗ, как рассеянный склероз (РС), ревматоидный артрит (РА), склеродермия, системная красная волчанка (СКВ) и др. [10, 16-18], для эффективной терапии которых необходимо разрабатывать концептуально новые подходы.

Анализируя общие патогенетические основы аутоиммунных патологий, следует отметить, что индукторами их развития являются различные механизмы, например, связанные с нарушением естественной толерантности иммунной системы (ИС) к антигенам собственных органов и тканей, недостаточностью контроля аутореактивных клонов лимфоцитов со стороны иммунорегуляторной системы и др. [1, 7, 12].

АИЗ могут протекать в самых разнообразных формах, однако в основе любого их проявления лежит

Recently there has been observed a tendency to the growth of pathologies of autoimmune genesis and which are of serious medical and social problem. The special place among them is taken by such “rigid”, frequently uncontrolled and unable to be traditionally treated AIDs, such as multiple sclerosis (MS), rheumatoid arthritis (RA), sclerodermia, systemic lupus erythematosus (SLE) etc. [10, 16-18], for the efficient therapy of which it is necessary to develop the conceptually new approaches.

When analyzing the pathogenetic bases of autoimmune pathologies, it should be noted that different mechanisms are their inductors, for instance, related to the damage in natural tolerance of immune system (IS) to antigen of own organs and tissues, insufficiency in the control of autoreactive clones of lymphocytes from a side of immune regulatory system etc. [1, 7, 12].

AIDs can proceed under various forms, but in the base of any of them there is an usual immune inflammatory reaction, accompanying with the releasing of a surplus amount of one type of

**Адрес для корреспонденции:** Козлова Ю.А. Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 7720104, факс: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

**Address for correspondence:** Kozlova Yu.A. Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +38 (057) 7720104, fax: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

обычная иммуновоспалительная реакция, сопровождающаяся выделением избыточного количества одних медиаторов и недостатком других, что приводит к структурным изменениям клеточно-тканевых субстратов не только в очаге поражения, но и других участках организма.

Детальный анализ состояния организма при развитии АИЗ позволяет говорить о возможных изменениях структурной организации, клеток ЛГПС. Так, проведенные исследования на суспензии лимфоцитов периферической крови больных РА с использованием флуоресцентного зонда АБМ (производное 3-амино-бензантрона) показали различную интенсивность его флуоресценции, микровязкость мембраны и функциональную активность лимфоцитов больных с различным титром ревматоидного фактора (РФ) крови. Данный факт может свидетельствовать об изменении физико-химических свойств мембраны и конформационного расположения ее компонентов, так как доказано, что АБМ локализуется в фосфолипидном бислое мембраны, в ее полярном микроокружении [9]. Важно также, что в крови больных с серопозитивным РА наблюдается снижение функциональной активности лимфоцитов и их общего количества. При серонегативном РА дефицит лимфоцитов в определенной мере компенсируется их повышенной функциональной активностью, т.е. по мере прогрессирования патологии и появления в сыворотке крови этих больных субстратов гуморального звена иммунитета в виде РФ наблюдаются более глубокие нарушения иммунорегуляторных процессов. Действительно IgM, в состав которого входит и РФ [10], может либо непосредственно, взаимодействуя с гликокаликсом мембран лимфоцитов, либо опосредованно влиять на их структурную организацию и функциональный статус. Этим может объясняться и то, что интенсивность флуоресценции АБМ коррелирует не только с микровязкостью мембран ( $r = -0,972$ ), но и с пролиферативной активностью лимфоцитов ( $r = +0,987$ ) [9]. Изменение конформационного состояния фосфолипидного бислоя мембран и индикаторной флуоресценции АБМ, по видимому, является универсальным "ответом" иммунокомпетентных клеток на изменения их микроокружения. Это предположение базируется на результатах исследований изменения состояния тех же клеток при таких патологиях, как развитие опухолей желудочно-кишечного тракта, РС и др. [23].

При исследовании мононуклеарных клеток (МНК) крови крыс в условиях экспериментального артрита также выявлено нарушение структурно-функциональной организации биомембран. Структурная пертурбация в белковых молекулах (снижение концентрации положительно заряженных Е-аминогрупп остатков лизина) и накопление продуктов

медиаторов и lack of others, that results in structural changes of cell-tissue substrates not only in the damage focus, but in other sites of an organism.

The detailed analysis of organism's state under the development of AIDs allows the speaking about possible changes in structural organization of the cells of LHPC. So, the carried-out studies in the suspension of lymphocytes from peripheric blood of patients with RA using fluorescent probe, ABM (derivative of 3-amino-benzantrone), have shown a various intensity of its fluorescence, membrane microviscosity and functional activity of lymphocytes of patients with different titer of rheumatoid factor (RhF) of blood. This fact may testify to the change in physical and chemical properties of membrane and conformational location of its components, because the ABM is proved to be localized in phospholipids bilayer of membrane, in its polar microenvironment [9]. As well it is important, that in blood of patients with seropositive RA there is observed a reduction of functional activity of lymphocytes and their total number. For seronegative RA the deficit of lymphocytes in a certain extent is compensated with their increased functional activity, i.e. with the progressing of pathology and appearing in blood serum of the substrates of humoral link of immunity as RhF more deep impairments are observed for immune regulatory processes in these patients. Actually IgM which comprises the RhF [1] can either directly by interaction with glycocalyx of lymphocytes' membranes or indirectly affect their structural organization and functional status. This can confirm as well that the ABM fluorescence intensity correlates not only with microviscosity of membranes ( $r = -0.972$ ), but also with proliferative activity of lymphocytes ( $r = +0.987$ ) [9]. The change in conformation state of phospholipids bilayer of membrane and ABM indicator fluorescence, maybe, is uniform "response" of immune competent cells on the changes in their microenvironment. This supposition is based on the investigation results of the state of the same cells under such pathologies as development of tumours of gastroenteric tract, MS and others [23].

When studying mononuclear cells (MNC) of rat's blood under experimental arthritis the disorder in structural and functional organization of biomembranes has been revealed as well. Structural perturbation in protein molecules (reduction in concentration of positively charged E-aminogroups of lysine rests) and accumulation of the products of free-radical lipid peroxidation decrease a positive charge of membrane surface. The condensation on this background of protein structure of membrane makes difficult the building-in of anion ANS (1-

свободнорадикального переокисления липидов снижают положительный заряд поверхности мембран. Уплотнение на этом фоне белковой структуры мембран затрудняет встраивание анионного АНС (1-анилино-нафталин-сульфонат аммония) зонда [4]. Используя метод флуоресцентного зондирования МНК, Ю.И. Губский и др. исследовали индуктивно-резонансный перенос энергии (ИРПЭ) с молекул белка (донора электронов) на пирен (акцептор). О характере состояния белково-липидного контакта в мембранах МНК судили по значению показателя вероятности  $W$  [5]. Оказалось, что при артрите вероятность ИРПЭ значительно повышается, свидетельствуя об уменьшении расстояния белок-липид и усилении белково-липидного контакта.

В сравнительном аспекте [11] изучено влияние ганглиозидов на пролиферацию и синтез антител клетками периферической крови пациентов с АИЗ (неспецифическим язвенным колитом, РС, РА, СКВ), с гнойной хирургической инфекцией и здоровых доноров. Ганглиозиды относятся к семейству кислых гликофинголипидов и являются структурным элементом плазматических мембран клеток эукариот. Они участвуют в процессах межклеточной кооперации, как рецепторы и корецепторы для таких цитокинов, как интерфероны, интерлейкины 1, 2, 6, 10, фактор некроза опухоли, а также как гормоны, бактериальные токсины и вирусы. Являясь структурной единицей мембраны клетки, ганглиозиды, тем не менее, могут диссоциировать из нее и циркулировать в сыворотке крови. В этом случае они приобретают свойства регуляторных цитокинов, модифицируя функциональную активность клеток [20]. Предполагается, что как эндогенные сывороточные, так и экзогенные ганглиозиды могут влиять на интенсивность продукции и степень взаимодействия других цитокинов с их рецепторами [11,20]. В данном случае феноменология их действия проявляется в различных формах: от супрессии до активации иммунного ответа [28]. В последние годы появились данные о возможной патогенетической роли ганглиозидов при развитии патологии. Изменение при АИЗ конформационной структуры мембраны клетки и ганглиозидов индуцирует выработку аутоантител к ним, причем у больных с различными формами АИЗ антитела к ганглиозидам присутствуют в различных концентрациях [22]. Так, авторы [11] отмечают, что МНК периферической крови пациентов с различными АИЗ и здоровых доноров в системе *in vitro* в присутствии одних и тех же экзогенных ганглиозидов по-разному изменяют пролиферативную активность в ответ на митогенный стимул и способность синтезировать иммуноглобулины А, М и G. Характер патологического процесса оказывает влияние на чувствительность клеток к экзогенным ганглиозидам, а сывороточные

анилинонафталин-8-сульфонат аммония) of the probe [4]. Using the method of fluorescent probe Yu.I. Gubsky et al. have studied the inductive resonance energy transfer (IRET) from the protein molecule (electron donor) to pyrene (acceptor). The character of the state of protein-lipid contact in MNC membranes was judged using the  $W$  value of probability index [5]. At arthritis the probability of IRET is occurred to be significantly increased, testifying to the reduction of the protein-lipid distance and strengthening of protein-lipid contact.

In comparative aspect [11] there was studied the effect of gangliosides on proliferation and synthesis of antibodies by the cells of peripheric blood of the patients with AIDs (non-specific ulcerous colitis, MS, RA, SLE), the ones with purulent surgical infection and healthy donors. Gangliosides are referred to the family of acid glycosingolipids and structural elements of plasmatic membrane of eukaryote cells. They participate in the processes of intercellular cooperation both as the receptors and co-receptors for such cytokines as interferons, interleukines 1, 2, 6, 10, tumor necrosis factor as well as hormones, bacterial toxins and viruses. Being the structural unit of cells membrane, gangliosides, nevertheless, can dissociate out of it and circulate in blood serum. In this case they gain the properties of regulatory cytokines, by modifying a functional activity of cells [2]. It is supposed that both endogenous serum and exogenous gangliosides can affect the intensity of the production and interaction rate of other cytokines with their receptors [11, 20]. In this case the phenomenology of their effect is manifested in various forms: from suppression to activation of immune response [28]. Recently there have been appeared the data about possible pathogenetic role of gangliosides during development of the pathology. The change at AIDs of conformation structure of cell membrane and gangliosides induces the production of antibodies to them, moreover in patients with various forms of AIDs the antibodies to gangliosides are present under different concentrations [22]. So, the authors [11] note that MNCs of peripheric blood of the patients with different AIDs and healthy donors *in vitro* in the presence of the same exogenous gangliosides change a proliferative activity in different ways in response to mitogenic stimulus and capability of synthesizing immunoglobulins A, M, and G. The character of pathological process affects the cell sensitivity to exogenous gangliosides, and serum antibodies to gangliosides of membranes change this sensitivity. One can suppose that both exogenous gangliosides and antibodies to them as a part of cell membrane may modify in different ways the receptor repertoire of the cells derived from healthy

аутоантитела к ганглиозидам мембран изменяют эту чувствительность. Можно предположить, что как экзогенные ганглиозиды, так и антитела к ним в составе клеточной мембраны могут по-разному модифицировать рецепторный репертуар клеток, полученных от здоровых лиц и с АИЗ, отвечающих на бластогенный стимул. Вполне логичным результатом этого процесса может быть изменение структурной организации как собственно ганглиозидов, так и интегральной структуры поверхностных мембран клеток пациентов с АИЗ.

Об изменении физико-химического статуса клеток ЛГПС в условиях развития патологического и пропатологического состояния организма свидетельствуют и результаты работ, проведенных с использованием других методов исследований. Так при оценке потенциала поверхности и мембранного потенциала  $\mu$  тимоцитов мышей [3] показано, что поверхность лимфоцитов животных с экспериментально индуцированными состояниями (канцерогенез, общая реакция организма на повреждение) существенно изменена по сравнению с поверхностью лимфоцитов контрольных животных. В работе [8] проведены сравнительные исследования кинетики адаптации объема и  $\mu$  тимоцитов в гипотонической среде интактных животных и с развивающимся асептическим воспалительным процессом и канцерогенезом. Показано, что кинетика регуляции объема и мембранного потенциала во всех случаях носит немонотонный характер. За 5 мин происходит практически полная адаптация клеток контрольных животных по объему и мембранному потенциалу, которые после адаптации только на 6% были больше, чем в изотонической среде. У Т-клеток животных с асептическим воспалением период адаптации к гипотонии увеличивался, а объем и мембранный потенциал оставались на 28% больше их значений в изотонической среде. В процессе развития канцерогенеза, индуцированного однократным введением уретана, через 10 мин после помещения клеток в гипотоническую среду размер клеток становился равным их размеру в точке максимального набухания, а мембранный потенциал имел на 20% меньшее значение, чем для клеток в изотонической среде. Причины таких адаптационных способностей Т-лимфоцитов могут быть различными. В роли индукторов будут: увеличение концентрации кортикостероидов в процессе развития воспаления, уменьшение концентрации внутриклеточного  $K^+$ , увеличение числа внутриклеточных макромолекулярных соединений и повышение мембранного потенциала плазматической мембраны клеток, что и приводит к замедлению процесса адаптации. К тому же отсутствие регуляции объема Т-лимфоцитами млекопитающих, в организме которых развивается канцерогенез, свидетельствует, что в этом случае

persons and those with AIDs responding to blastogenic stimulus. The change of structural organization of both the gangliosides themselves and integral structure of surface cell membranes of the patients with AIDs could be quite logic result of this process.

The results of the works performed using other research methods testify to the change in physical and chemical status of LHPC cells under the development of pathological and pro pathological state of an organism as well. So, when estimating the potential of surface and membrane potential  $\mu$  of mice thymocytes [3] there has been shown that the surface of animals' lymphocytes with experimentally induced states (cancerogenesis, general response of an organism to the damage) is significantly altered in comaprison with the one of control animals' lymphocytes. In the paper [8] there were performed the comparative studies of the adaptation kinetics of volume and thymocytes'  $\mu$  in hypotonic medium of intact animals and those with developing aseptic inflammatory process and cancerogenesis. It has been demonstrated that the kinetics of volume and membrane potential regulation in all cases has non-monotonous character. Within 5 min practically complete cell adaptation of control animals' cells on volume and membrane potential, which were after adaptation only by 6% higher than in isotonic medium, takes place. In T-cells of animals with aseptic inflammation the adaptation period to hypotonia increased and the volume and membrane potential remained by 28% higher than their values in isotonic medium. In the process of cancerogenesis development, induced with single urethane injection in 10 min after cells being placed into hypotonic medium the size of cells became equal to their size in the site of maximum swelling and membrane potential had by 20% less value than for the cells in isotonic medium. The causes of these adaptational capabilities of T-lymphocytes can be various. The increase in the concentration of corticosteroides in the process of inflammation development, reduction of the concentration of intracellular  $K^+$ , enhancement in the number of intracellular macromolecular compounds and a rise in membrane potential of plasmatic membrane cells, that results in the slowing-down of adaptation process will act as the inductors. In addition, the absence of volume regulation by mammalian T-lymphocytes, in organism of which the cancerogenesis develops, testifies to the fact that in this case the cells lose adaptability to the varying environmental conditions. At the same time it is known that the changes in the surface potential, membrane one and other cell parameters can be stipulated by the change in structural organization of glycocalyx and namely

клетки теряют адаптационную способность к изменяющимся внешним условиям. Вместе с тем известно, что изменения потенциала поверхности, мембранного потенциала и других характеристик клеток могут быть обусловлены изменением структурной организации гликокаликса и, собственно, структуры мембраны в целом [3,8]. Можно предположить, что в клетках кроветворных органов при развитии иммуно - и гематопатологических состояний происходят аналогичные изменения структуры мембраны.

У здоровых пациентов и людей, страдающих пернициозной или аутоиммунной гемолитической анемией изучены параметры распределения миелокариоцитов по стадиям клеточного цикла [13]. Этот показатель отражает состояние пролиферативной активности гетерогенной популяции клеток костного мозга (КМ). Отмечено, что в норме показатель варьирует в сравнительно узких пределах и характеризуется достаточно высоким постоянством. Относительное содержание клеток в S-фазе цикла составило  $12,24 \pm 0,21\%$ ; ( $G_2+M$ ) -  $3,71 \pm 0,12\%$  [13]. При изучении костномозговых пунктатов больных с анемиями наблюдалось резкое увеличение доли клеток в S-фазе (медиана  $35,8 \pm 2,4\%$ ). Содержание миелокариоцитов в фазе  $G_2+M$  повышалось примерно в 1,5 раза, в результате чего наблюдалось более чем двукратное увеличение отношения  $S/(G_2+M)$ . Это следует расценивать как блокирование пролиферации клеток КМ в фазе синтеза ДНК. Кроме того, нельзя исключать и повышенный запрос на пролиферацию миелокариоцитов, прежде всего компартмента эритропоэза, поскольку имеются данные о том, что некоторые анемии могут быть обусловлены неэффективным эритропоэзом. Установлено, что нарушение пролиферации клеток КМ при пернициозной анемии приводит к компенсаторному увеличению размеров эритроцитов, а снижение синтеза гемоглобина при дефиците железа в условиях сохранения основных параметров клеточного цикла – к снижению корпускулярного объема клеток. Усиление пролиферативной активности миелокариоцитов у пациентов с аутоиммунной гемолитической анемией имеет, видимо, регуляторно-компенсаторный характер [13].

Независимо от этиологического фактора инициации повышенного пролиферативного потенциала миелокариоцитов представленная информация имеет интерес и в другом плане. Известно, что клетки в S-фазе клеточного цикла обладают повышенной чувствительностью к действию ряда физико-химических факторов, в частности ионизирующего излучения, магнитного поля и т.д. [6]. В общем спектре возможных причин этих явлений следует остановиться на данных об экспрессии на мембране клеток, так называемых дифференцировочных

by the structure of membrane in a whole [3, 8]. It could be supposed that in cells of hemopoietic organs during the development of immune and hematopathologic states the analogous changes in membrane structure occur.

In healthy patients and the persons suffering from pernicious or autoimmune hemolytic anemias there have been studied the parameters of myelokaryocyte distribution on the stages of cellular cycle [13]. This index reflects the state of proliferative activity of heterogeneic population of bone marrow (BM) cells. It has been noted that in the norm the index varies in comparatively narrow limits and is characterised with quite a high constancy. Relative content of cells in S-phase of the cycle made  $12.24 \pm 0.21\%$ , ( $G_2+M$ ) –  $3.71 \pm 0.12\%$  [13]. When studying bone marrow punctates of patients with anemias there was observed a sharp rise in the share of the cells in S-phase (median  $35.8 \pm 2.4\%$ ). The content of myelokaryocytes in the  $G_2+M$  phase increased approximately in 1.5 times that resulted in the observed more than two-fold rise in the  $S/G_2+M$  ratio. This should be considered as the blocking of BM cell proliferation in the phase of DNA synthesis. In addition, no one can exclude an increased request for myelokaryocyte proliferation as well, first of all, of the erythropoiesis compartment, because there are available data that some anemias may be stipulated by inefficient erythropoiesis. It has been established that impairment of BM cell proliferation at pernicious anemia results in compensatory increase of erythrocyte sizes and the decrease in hemoglobin synthesis at iron deficit under conditions of keeping the main parameters of cell cycle leads to a reduction of corpuscular cell volume. The strengthening of proliferative activity of myelokaryocytes in patients with autoimmune hemolytic anemia is of probably regulatory and compensatory character [13].

Independently on etiologic factor of initiation of an increased proliferative potential of myelokaryocytes, the presented information is of some interest in another aspect as well. It is known that the cells being on the S-phase of cell cycle have an increased sensitivity to the effect of some physical and chemical factors, in particular irradiation, magnetic field ect. [6]. In a total spectrum of possible causes of these phenomena one should emphasize the data about the expression on the membrane of cells, so-called differentiative stage-specific antigens [27, 29]. Their number, qualitative composition, localization site vary in membrane during the process of cell proliferation and differentiation and may entirely change the membrane structural organization. Therefore, there are preconditions that the change of proliferative

стадиоспецифических антигенах [27,29]. Их количество, качественный состав, место локализации меняются на мембране в процессе пролиферации и дифференцировки клеток и могут в целом изменять структурную организацию мембраны. Следовательно, существуют предпосылки, что изменение пролиферативного потенциала клеток кроветворных тканей при развитии тех или иных АИЗ может изменить их чувствительность к действию возмущающих факторов.

При разработке эффективных методов лечения гемо- и иммунодепрессивных состояний различного генеза необходимо стремиться к нормализации структурно-функционального состояния “извращенных” клеток ЛГПС. Одним из таких методов является трансплантация лимфогемопоэтических тканей [15,24,30,31]. В настоящее время ведутся более углубленные исследования, направленные на расшифровку механизма лечебного действия вводимого материала и обоснование возможности его применения при тех патологических состояниях, терапия которых ранее основывалась на иных концептуальных подходах и принципах. Установленный в последнее время факт причастности к развитию АИЗ дефекта стволовых кроветворных предшественников послужил толчком для проведения “реконструктивной” терапии в виде трансплантаций КМ, кордовой крови, клеток эмбриональной печени, изолированных стволовых гемопоэтических клеток и т.д. [16,19,25,32]. Известно, что трансплантация гемопоэтических стволовых клеток совместно с клетками стромы КМ животных с АИЗ здоровым донорам может привести к индукции АИЗ у последних [21,26]. В то же время введение клеток стромы, взятых от здоровых животных, реципиентам с АИЗ приводило к развитию анемии и в итоге к их смерти [18,21]. Данный факт подчеркивает значимость и определенное “индуктивное” начало в развитии АИЗ стромальных элементов КМ. Кроме того, обнаружены некоторые различия и между плюрипотентными гемопоэтическими стволовыми клетками (пГПСК) животных с АИЗ и здоровых реципиентов [21]. Так, нормальные пГПСК рестриктированы в способности пролиферировать *in vitro* при наличии несовместимого по МНС микроокружения (стромы), в то время как аномальные – пролиферируют. Это показывает, что для пГПСК животных с АИЗ существует отличающийся от нормальных клеток принцип лиганд-рецепторных взаимодействий, определяемый, видимо, их внутренним состоянием и характеристиками мембранных структур.

Параллельно с решением различных аспектов проблемы лечения АИЗ посредством трансплантации кроветворных клеток родилась новая проблема – создание запасов и надежных способов долгосрочного хранения гемопоэтических клеток.

potential of cells of hemopoietic tissues during the development of these or those AIDs can change their sensitivity to the effect of exciting factors.

When developing efficient treatment methods of hemo- and immune depressive states of various genesis it is necessary to seek the normalization of structural and functional state of “pathologically changed” LHPC cells. One of these methods is transplantation of lymphohemopoietic tissues [15, 24, 30, 31]. Nowadays more profound investigations aimed to the decoding of the mechanism of therapeutic effect of the material, substantiation of the feasibility of its application under these or those pathological states, the therapy of which previously was based on other conceptual approaches and principles, are in progress. The recently found fact of the participation in the AIDs development of the defect of stem hemopoietic precursors served as an impact for performing “reconstructive” therapy as the transplantation of BM, cord blood, embryonic liver cells, isolated stem hemopoietic cells etc [16, 19, 25, 32].

It is known that transplantation of hemopoietic stem cells together with the BM stroma cells of animals with AIDs to healthy donors may result in the induction of AIDs in the latter [21, 26]. At the same time the introduction of stroma cells, derived from healthy animals to the recipients with AIDs, resulted in the development of anemia and finally to the death [18, 22]. This fact underlines the value and certain “inductive” onset in the development of AIDs of BM stromal elements. Besides, there have been found some differences between pluripotent hemopoietic stem cells (pHPSCs) animals with AIDs and healthy recipients [21]. Thus, normal pHPSCs are restricted in the capability to proliferate *in vitro* in the presence of incompatible on MHC microenvironment (stroma), meanwhile abnormal ones proliferate. This demonstrates that for pHPSCs of animals with AIDs there is the different from normal cells principle of ligand-receptor interactions, determined probably by their intrinsic state and characteristics of membrane structures.

Simultaneously with solving various aspects of the AIDs treatment problem via transplantation of hemopoietic cells there has appeared a new task: the creation of stocks and reliable ways of long-term storage of hemopoietic cells. The solving of this problem became possible due to the working-out of technical means, theoretical and experimental substantiation of the usage of different chemical compounds as cryoprotectants. But it is that? There is no doubt, that initial structural and functional state of myelokaryocytes determines the peculiarities of their susceptibility to the effect of physical and chemical factors, being realized in the process of

Решение этой проблемы стало возможным благодаря разработке технических средств, теоретическому и экспериментальному обоснованию использования различных химических соединений как криопротекторов и т.д. Но так ли это? Не вызывает сомнения, что исходное структурно-функциональное состояние миелокарицитов определяет особенности их восприимчивости к действию физико-химических факторов, реализуемых в процессе криоконсервирования [2,14,33]. При инициации и поддержании в организме патологии в самых различных формах ее проявления, в том числе с признаками АИЗ, происходят существенные изменения ряда структурно-функциональных параметров клеток ЛГПС, включая иммунокомпетентную сферу, определяющую их физиологическое состояние. Эти изменения являются следствием развивающихся на молекулярном, клеточном, тканевом уровнях процессов в центральных и периферических отделах ЛГПС. Имеют ли такого рода изменения принципиальную значимость в интегральном ответе клеток ЛГПС на действие физико-химических факторов, реализуемых в процессе криоконсервирования? Актуальность этого вопроса определяется тем, что в клинической практике часто возникает необходимость низкотемпературного консервирования и создания запасов клеточно-тканевых структур ЛГПС пациентов с АИЗ. В связи с этим возникают следующие сугубо криобиологические вопросы: являются ли оптимальными одни и те же режимы криоконсервирования для клеток ЛГПС организма без и с развивающейся в той или иной форме патологией, существует ли корреляция между изменением определенных показателей структурно-функциональной организации клеток ЛГПС при развитии в организме патологии и их криочувствительностью? Представленные данные литературы позволяют говорить о том, что, по крайней мере, на некоторые из поставленных вопросов можно получить ответ в модельных системах на животных.

### Литература

1. Гольцев А.Н. Возможные причины развития аутоиммунной патологии и поиск путей ее лечения // Сучасні пробл. мед. та освіти.–1999.– №1.– С. 46-52.
2. Гольцев А.Н., Луценко Е.Д., Останкова Л.В. и др. Мембранные структуры, определяющие фенотипические характеристики и функциональное состояние кровяных клеток; возможная их модификация под действием факторов криоконсервирования. Часть 1 // Пробл. криобиологии.– 1995.– №3.– С. 19-30.
3. Горкин П.Н., Зацепина Г.Н., Тарасова И.М. Корреляции между потенциалом поверхности лимфоцитов и мембранным потенциалом в физиологически различных состояниях организма // Биофизика.– 1990.– №4.– С. 628-630.
4. Губский Ю.И., Тринус Ф.П., Бухтиярова Т.А., Горюшко А.Г. и др. Структурная модификация мембран мононуклеарных

cryopreservation [2, 14, 33]. During initiation and maintaining of the pathology in very different forms of its manifestation, including the AIDs signs, there are appeared the considerable changes of some of structural and functional parameters of LHPC cells, including immune competent sphere, determining their functional state. These changes are the consequence of developing processes at molecular, cellular, tissue levels in central and peripheric parts of LHPC. Are such changes of principal value in integral response of LHPC cells to the effect of physical and chemical factors, being realized in cryopreservation process? The actuality of this question is determined by the fact, that in clinical practice frequently there is a necessity of low temperature preservation and creation of the stocks of cell-tissue structures of LHPC for the patients with AIDs. In this connection the following very cryobiological question rises: are the same cryopreservation regimens optimal for the LHPC cells of an organism without and with developing pathology; is there any correlation between the change of certain indices of structural and functional organization of LHPC cells under development of pathology in an organism and their cryosensitivity? Presented literature data allows to answer at least some of the questions set in animal model systems.

### References

1. Goltsev A.N. Probable causes of the development of autoimmune pathology and search for the ways of its treatment // Such. Probl. Med. ta Osv. – 1999. – N1. – P. 46-52.
2. Goltsev A.N., Lutsenko E.D., Ostankova L.V. et al. Membrane structures, determining phenotypical characteristics and functional state of hemopoietic cells; their possible modification under the action of cryopreservation factors. Part II.// Problems of cryobiology. 1995.– N 3.– P. 19-29.
3. Gorkin P.N., Zatsepina G.N., Tarasova I.M. Correlation between potential of lymphocyte surface and membrane potential in physiologically different states of an organism// Biofizika.– 1990.– N4.– P. 628-630.
4. Gubsky Yu.I., Trinus F.P., Bukhtiyarova T.A., Goryushko A.G. et al. Structural modification of membranes of mononuclear cells of rat's blood under conditions of experimental arthritis and pharmacotherapy with non-steroid anti-inflammatory means// Zhurn. AMN Ukrainy.– 1999.– N1.– P. 110-120.
5. Demchenko A.P. Luminescence and structure of proteins.– Kiev: Naukova Dumka.– 1988.– 280 p.
6. Dubrava T.G. Cryopreservation efficiency of hemopoietic cells depending on their initial properties: Author's abstract of the thesis for obtaining the degree of candidate of biological sciences.– Kharkov.– 1986.– 25 p.
7. Efuni S.S. Etiology and pathogenesis of autoimmune diseases// Gematologiya i transfuziologiya.– 1993.– N4.– P. 32-37.
8. Zatsepina G.N., Egudina S.V. Tarnopolskaya O.V. Change in adaptability and adaptation kinetics of T-lymphocytes to hypotonia under pathological state of mammalian organism// Biofizika.– 1992.– N 1.– P. 142-148.

- клеток крови крыс в условиях экспериментального артрита и фармакотерапии нестероидными противовоспалительными средствами // Журн. АМН України.– 1999.– №1.– С. 110-120.
5. Демченко А.П. Люминесценция и структура белков.- Киев: Наук. думка.– 1988.– 280 с.
  6. Дубрава Т.Г. Эффективность криоконсервирования кроветворных клеток в зависимости от их исходных свойств: Автореф. дис.... канд. биол. наук.– Харьков, 1986.– 25 с.
  7. Ефуни С.С. Этиология и патогенез аутоиммунных заболеваний // Гематология и трансфузиология.– 1993.– №4.– С. 32-37.
  8. Зацепина Г.Н., Егудина С.В., Тарнопольская О.В. Изменение адаптационной способности и кинетики адаптации Т-лимфоцитов к гипотонии в патологических состояниях организма млекопитающих // Биофизика.– 1992.– №1.– С. 142-148.
  9. Калнина И.Э., Мейровиц И.А. Структурно-функциональные изменения мембран лимфоцитов у больных ревматоидным артритом: исследования с помощью нового флуоресцентного зонда АБМ // Биол. мембраны.– 2001.– №4.– С. 283-286
  10. Лула А.М., Мазуров В.И., Блохин М.П. Иммунологические исследования при ревматоидном артрите (обзор литературы) // Клин. лаб. диагностика.– 1993.– №6.– С. 55-59.
  11. Степаненко Р.Н., Скопцова С.В., Кондрашова М.М. Влияние ганглиозидов на пролиферацию и синтез антител лимфоцитами периферической крови больных аутоиммунными заболеваниями // Иммунология.– 2001.– №1.– С. 26-30.
  12. Чеботарев В.Ф. Современные представления о механизмах аутоиммунного процесса. Аутоагрессия и проблема иммунореабилитации при эндокринной патологии // Иммунология та алергологія.– 1998.– №1.– С. 59-63.
  13. Шмаров Д.А. Оценка пролиферативной активности клеток костного мозга методом проточной цитофлуориметрии // Клин. лаб. диагностика.– 1993.– №5.– С. 40-43.
  14. Balint B., Ivanovic Z., Petakov M. The cryopreservation protocol optimal for progenitor recovery is not optimal for preservation of marrow repopulating // Vojnosanit. Pregl.– 1999.– № 6.– P. 577-585.
  15. Burt R.K. BTM for severe autoimmune diseases: an idea whose time has come // Oncology.– 1997.– №11.– P. 1001-1014.
  16. Burt R.K., Burns W.H., Mille S.D. Bone marrow transplantation for multiple sclerosis: returning to Pandoras box // Immunol. Today.– 1997.– №5.– P. 559-561.
  17. Burt R.K., Fassas A., Snowden J.A. et al. Collection of hematopoietic cells from patients with autoimmune diseases // Bone Marrow Transplantation.– 2001.– №1.– P. 1-12.
  18. Ikehara S. Autoimmune diseases as stem cell disorders: normal stem cell transplant for their treatment // Int. J. Mol. Med.– 1998.– №1.– P. 5-16.
  19. Joske D.J., Ma D.T., Langlands D.R. Autologous bone marrow transplantation for rheumatoid arthritis // Lancet.– 1997; №3.– P. 337-338.
  20. Kanda N. Ganglioside GT1b suppresses immunoglobulin production by human peripheral blood mononuclear cells // Biochem. Biophys. Res. Commun.– 1999.– №1.– P. 41-44.
  21. Kawamura M., Hisha H., Lia Y., et al. Distinct qualitative differences between normal and abnormal hemopoietic stem cells in vivo and in vitro // Stem cells.– 1997.– №1.– P. 56-62.
  22. Kimata H., Yoshida A. Differential effect of gangliosides on Ig production and proliferation by human B-cells // Blood.– 1994.– № 4.– P. 1193-1200.
  23. Klimkane K., Kalnina I., Engele L. et al. Gastrointestinal tumors: membrane as a new criterion in diagnostics of immune status in
  9. Kalnina I.E., Meirovits I.A. Structural and functional changes in membranes of lymphocytes in patients with rheumatoid arthritis: investigations with the help of new fluorescent probe ABM// Biol. Membrany.– 2001.– N 4.– P. 283-286.
  10. Lila A.M., Mazurov V.I., Blokhin M.P. Immunological investigations at rheumatoid arthritis (literature review)// Klin. Lab. Diagnostika.– 1993.– N 6.– P. 55-59.
  11. Stepanenko R.N., Skoptsova S.V., Kondrashova M.M. Effect of gangliosides on proliferation and synthesis of antibodies with lymphocytes of peripheric blood of patients with autoimmune diseases// Immunologiya.– 2001.– N1.– P. 26-30.
  12. Chebotarev V.F. Current notions about the mechanisms of autoimmune process. Autoaggression and the problem of immune rehabilitation under endocrine pathology// Immunologiya ta alergologiya.– 1998.– N 1.– P. 59-63.
  13. Shmarov D.A. Estimation of proliferative activity of bone marrow cells by the method of flow cytometry//Klin. Lab. Diagnostika.– 1993.– N 5.– P. 40-43.
  14. Balint B., Ivanovic Z., Petakov M. The cryopreservation protocol optimal for progenitor recovery is not optimal for preservation of marrow repopulating // Vojnosanit. Pregl.– 1999.– № 6.– P. 577-585.
  15. Burt R.K. BTM for severe autoimmune diseases: an idea whose time has come // Oncology.– 1997.– №11.– P. 1001-1014.
  16. Burt R.K., Burns W.H., Mille S.D. Bone marrow transplantation for multiple sclerosis: returning to Pandoras box // Immunol. Today.– 1997.– №5.– P. 559-561.
  17. Burt R.K., Fassas A., Snowden J.A. et al. Collection of hematopoietic cells from patients with autoimmune diseases // Bone Marrow Transplantation.– 2001.– №1.– P.1-12.
  18. Ikehara S. Autoimmune diseases as stem cell disorders: normal stem cell transplant for their treatment // Int. J. Mol. Med.– 1998.– №1.– P. 5-16.
  19. Joske D.J., Ma D.T., Langlands D.R. Autologous bone marrow transplantation for rheumatoid arthritis // Lancet.– 1997; №3.– P. 337-338.
  20. Kanda N. Ganglioside GT1b suppresses immunoglobulin production by human peripheral blood mononuclear cells // Biochem. Biophys. Res. Commun.– 1999.– №1.– P. 41- 44.
  21. Kawamura M., Hisha H., Lia Y., et al. Distinct qualitative differences between normal and abnormal hemopoietic stem cells in vivo and in vitro // Stem cells.– 1997.– №1.– P.56-62.
  22. Kimata H., Yoshida A. Differential effect of gangliosides on Ig production and proliferation by human B-cells // Blood.– 1994.– № 4.– P. 1193-1200
  23. Klimkane K., Kalnina I., Engele L. et al. Gastrointestinal tumors: membrane as a new criterion in diagnostics of immune status in
  24. Kushida T., Inaba M., Hisha H. Intra-bone marrow injection of allogeneic bone marrow cells: a powerful new strategy for treatment of intractable autoimmune diseases in MRL / lpr mice // Blood.– 2001.– №10.– P. 3292-3299.
  25. McColl G., Kohsaka H., Szer J. High-dose chemotherapy and syngeneic hemopoietic stem-cells transplantation for severe, seronegative rheumatoid arthritis // Ann. Intern. Med.– 1999.– №2.– P. 507-509.
  26. Miyashima S., Nagata N., Nakagatwa T. et al. Prevention lpr-graft - versus - host disease and transfer of autoimmune disease in normal C57Bl / 6 mice by transplantation of bone marrow cells plus bones (stromal cells) from MRL/ lpr mice // J. Immunol.– 1996.– №1.– P. 79-84.
  27. Ramshaw H., Haylock D., Swart B. Monoclonal antibody BB9 raised against bone marrow stromal cells identifies a cell-surface glycoprotein expressed by primitive human hemopoietic progenitors // Exp. Hematol.– 2001.– №8.– P. 981-992.
  28. Repke H., Rossow N., Savoly S. Monoclonal antibodies against rat mast cells differentiate between subtypes // Agents and



- gastrointestinal cancer patients // *Ann. Oncol.*– 1998.– №1.– P. 55-60.
24. *Kushida T., Inaba M., Hisha H.* Intra-bone marrow injection of allogeneic bone marrow cells: a powerful new strategy for treatment of intractable autoimmune diseases in MRL / lpr mice // *Blood.*– 2001.– №10.– P. 3292-3299.
  25. *McCull G., Kohsaka H., Szer J.* High-dose chemotherapy and syngeneic hemopoietic stem-cells transplantation for severe, seronegative rheumatoid arthritis // *Ann. Intern. Med.*– 1999.– №2.– P. 507-509.
  26. *Miyashima S., Nagata N., Nakagawa T. et al.* Prevention lpr-graft - versus - host disease and transfer of autoimmune disease in normal C57Bl / 6 mice by transplantation of bone marrow cells plus bones (stromal cells) from MRL / lpr mice // *J. Immunol.*– 1996.– №1.– P. 79-84.
  27. *Ramshaw H., Haylock D., Swart B.* Monoclonal antibody BB9 raised against bone marrow stromal cells identifies a cell-surface glycoprotein expressed by primitive human hemopoietic progenitors // *Exp. Hematol.*– 2001.– №8.– P. 981-992.
  28. *Repke H., Rossow N., Savoly S.* Monoclonal antibodies against rat mast cells differentiate between subtypes // *Agents and Actions.*– 1987.– №2.– P. 216-218.
  29. *Saeland S., Duvert V., Caux C., Pandrau D.* Distribution of surface-membrane molecules on bone marrow and cord blood CD 34<sup>+</sup> hematopoietic cells // *Exp. Hematol.*– 1992.– №1.– P. 24-33.
  30. *Snowden J.A., Brooks P.M., Biggs J.C.* Haematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases // *Br. J. Hematol.*– 1997.– №1.– P. 9-22.
  31. *Traynor A., Schroeder J., Rosa R. et al.* Treatment of severe lupus erythematosus with high-dose intense chemotherapy and hematopoietic cell transplantation: a phase 1 study // *Lancet.*– 2000.– №7.– P. 701-707.
  32. *Tyndall A., Gratwohl A.* Hemopoietic blood and marrow transplants in the treatment of severe autoimmune diseases // *Curr. Opin. Hematol.*– 1997.– №4.– P. 390-394.
  33. *Zaheer H.A., Gibson FM, Bagnara M. et al.* Differential sensitivity to cryopreservation of clonogenic progenitor cells and stromal precursors from leukemic and normal bone marrow // *Stem cells.*– 1994.– №2.– P. 180-186.
- Accepted in 24.12.2002.*

*Поступила 24.12.2002*