

## Возможность использования продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса как корректора апоптотических процессов при аутоиммунных заболеваниях

А.Н. ГОЛЬЦЕВ, В.И. ГРИШЕНКО, И.В. РАССОХА, М.В. ОСТАНКОВ  
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Possibility of Using the Embryo Fetoplacental Complex Products to Correct Apoptotic Processes under Autoimmune Diseases

GOLTSEV A.N., GRISCHENKO V.I., RASSOKHA I.V., OSTANKOV M.V.  
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

Изучена апоптотическая активность иммунокомпетентных клеток в экспериментальной модели ревматоидного артрита у мышей. Продемонстрирована возможность применения продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса (ПЭФПК) как модуляторов апоптотических процессов при аутоиммунных заболеваниях (АИЗ).

**Ключевые слова:** апоптоз, ревматоидный артрит, продукты эмбриофетоплацентарного комплекса.

Вивчено апоптотичну активність імунікомпетентних клітин в експериментальній моделі ревматоїдного артриту у мишей. Продемонстрована можливість застосування продуктів ембріофетоплацентарного комплексу як модуляторів апоптотичних процесів при аутоімунних захворюваннях.

**Ключові слова:** апоптоз, ревматоїдний артрит, продукти ембріофетоплацентарного комплексу.

The authors have studied the activity of immune competent cells in an experimental model of rheumatoid arthritis in mice. There was demonstrated the possibility to apply the products of embryo fetoplacental complex (PEFPC) to modulate the apoptotic processes under autoimmune diseases (AIDs).

Key-words: apoptosis, rheumatoid arthritis, products of embryo fetoplacental complex.

Ревматоидный артрит (РА), характеризующийся иммунологически обусловленным воспалением, относится к наиболее тяжелым и распространенным формам АИЗ. Несмотря на существование огромного количества антиревматических препаратов на мировом фармацевтическом рынке, а также на определенные успехи в разработке различных схем по комбинированному их применению, терапия РА является актуальной проблемой.

В иницировании и поддержании аутоиммунного процесса при РА принимают участие множество факторов [9,15]. Одной из возможных причин заболевания является дисрегуляция сигнальных систем, обеспечивающих баланс между процессами апоптоза и пролиферации. Действительно в многоклеточном организме неотъемлемым компонентом поддержания клеточного гомеостаза выступает апоптоз, генетические и метаболические нарушения которого вносят весомый вклад в патогенез ряда патологий, в том числе и РА [7]. На этом фоне отмечается инфильтрация синовиальной оболочки лимфоцитами, моноцитами, плазматическими клетками, которые при кооперативном взаимодействии высвобождают

Rheumatoid arthritis (RA), characterising with immunologically stipulated inflammation, is referred to the most severe and widely spread forms of AIDs. In spite of the existence of a large number of anti-rheumatoid preparations on a world pharmaceutical market, as well as certain successes in developing different protocols on their combined application, RA therapy is an actual task.

Many factors are engaged in initiation and maintenance of autoimmune process at RA [9,15]. One of possible causes of the disease is dysregulation of signal systems, providing the balance between the processes of apoptosis and proliferation. Actually, in multicellular organism the apoptosis acts as an integral component. Its genetic and metabolic impairments contribute greatly into pathogenesis of some pathologies, including RA [7]. At this background there was noted an infiltration of synovial membrane with lymphocytes, monocytes, plasmatic cells, which under co-operative interaction release the mediators, provoking an inflammatory reaction and destruction of tissues.

The data on intensity of apoptosis at RA are not numerous and do not reflect a true picture of the events, occurring with immune competent cells (ICCs)

**Адрес для корреспонденции:** Гольцев А.Н. Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 772-01-04, факс: +38 (057) 772-00-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

**Address for correspondence:** Goltsev A.N., 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

медиаторы, провоцирующие воспалительную реакцию и деструкцию тканей.

Данные об интенсивности апоптоза при РА немногочисленны и не отражают истинной картины событий, происходящих с иммунокомпетентными клетками (ИКК) в условиях развития этой патологии. Выяснение причин нарушений реализации апоптоза при РА может иметь особую значимость как в изучении патогенеза данного заболевания, так и в выборе стратегии его лечения.

Цель данной работы – определение взаимосвязи между апоптотической активностью ИКК и интенсивностью воспалительного процесса в динамике развития РА до и после применения ПЭФПК.

### Материалы и методы

Эксперименты проведены на 3-месячных мышах-самцах линии СВА массой 20-25 г. Животные были разделены на 4 группы (в каждой n=20). Контролем являлась 1-я группа интактных животных. У мышей 2-, 3- и 4-й групп индуцировали адьювантный артрит (АА) субплантарным введением полного адьюванта Фрейнда (ПАФ). Выбранная экспериментальная модель адекватна клинической форме РА [8,11]. Животным 3- и 4-й групп внутривенно вводили 0,2 мл соответственно нативной и криоконсервированной суспензии плаценты (НСП, КСП) мышей 19 суток гестации с концентрацией белка 6 мг/мышь. Применение СП предопределено ее потенциальной способностью изменять цитокиновый профиль и в целом состояние иммунокомпетентной сферы реципиентов, восстанавливать баланс хелперно-супрессорного звена иммунитета, искаженного при АИЗ [2]. Криоконсервирование СП проводили согласно [3]. Оценку интенсивности воспалительного процесса при АА осуществляли по интегральному показателю, а именно по динамике отека сустава, который выражался как индекс артрита (отношение окружности опытного сустава к контрольному). Для оценки тяжести течения АА был рассчитан индекс суммарной степени отклонения показателей, который представляет собой сумму отклонений исследуемых показателей в экспериментальных группах животных от показателей контрольной группы, принятых за 100%.

Для количественной оценки содержания апоптотических клеток в тимусе, лимфоузлах, региональных к месту введения ПАФ, и перитонеальной полости (ПП) использовали апоптотический индекс (АИ), который рассчитывали по формуле [10]:

$$AI = \frac{\text{количество апоптотических клеток}}{\text{общее количество клеток}} \times 100\%$$

under development of this pathology. The revealing of the causes of apoptosis realisation disorders at RA can be of a special value both when studying the pathogenesis of this disease and the selection of strategy for its treatment.

The aim of this work was to determine the relationship between apoptotic activity of ICCs and the intensity of inflammatory process in the dynamics of RA development before and after PEFPC application.

### Materials and methods

The experiments were carried out in 3-months' CBA male mice of 20-25g. The animals were divided into 4 groups (for each n=20). The control group was the 1<sup>st</sup> one of intact animals. We induced the adjuvant arthritis (AA) by subplantar injection of a complete Freund's adjuvant (CFA) in mice of 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> groups. Chosen experimental model is adequate to RA clinical form [8, 11]. Animals of the 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> group were intravenously injected with 0.2 ml, correspondingly, of native and cryopreserved placenta suspension (NPS, CPS) of 19 days' gestation with the protein concentration of 6 mg/mouse. Placenta suspension (PS) application is pre-conditioned by its potential ability to change cytokine profile and in an entire state of immune competent sphere of recipients, to recover the balance of helper-suppressor link of immunity, distorted at AIDs [2]. PS cryopreservation was performed according to the method [3]. The estimation of the intensity of inflammatory process at AA was accomplished on an integral index, namely on the dynamics of joint oedema, which was expressed as arthritis index (ratio between experimental joint circumference to the control one). To estimate the severity of AA proceeding there was calculated the index of total degree of parameter deviation, which represents the sum of deviations of the studied indices in experimental groups of animals from those of the control group, assumed as 100%.

To qualitatively estimate the content of apoptotic cells in thymus, lymph nodes in the region of CFA injection site and peritoneal cavity (PC) we used in apoptotic index (AI), which was calculated according to the formula [10]:

$$AI = \frac{\text{the number of apoptotic cells}}{\text{total number of cells}} \times 100\%$$

Apoptosis of PC cells was evaluated by the method of light microscopy, allowing to reveal the morphological changes of this process (Fig. 1). To visualise the nuclei of apoptotic cells in cells in thymus and lymphocytes of regional lymph nodes the method of luminescent analysis was applied. With this purpose the tested cells were incubated with DNA-tropic dye, Hoechst-33342 [10, 13]. Simultaneously with the

Апоптоз клеток ПП оценивали методом световой микроскопии, позволяющим выявить морфологические изменения данного процесса (рис. 1). Для визуализации ядер апоптотических клеток в тимусе и лимфоцитах региональных лимфоузлов применяли метод люминесцентного анализа. Для этого тестируемые клетки инкубировали с ДНК-тропным красителем – Хехст-33342 [10,13]. Параллельно с вышеуказанными методами для оценки апоптотических клеток был применен также метод пульс-электорофореза, который позволяет выявлять межнуклеосомную фрагментацию ДНК [6,11]. Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК осуществляли в 1%-м агарозном геле при напряжении 75 V с длительностью фореа 8 ч. Визуализацию результатов разгонки ДНК проводили с помощью ультрафиолетовой лампы “Флускоп” с последующим выводением информации на монитор через видеокамеру “Panasonic”.

Экспрессию антиапоптотического белка Bcl-2 в клетках определяли методом люминесцентной микроскопии с использованием антимышиных моноклональных антител [14].

Оценку исследуемых показателей проводили на 7-е (острая фаза), 14-е и 21-е сутки (хроническая фаза) после индукции патологии [8]. Полученные результаты обрабатывали статистически с применением критерия Стьюдента [1].

### Результаты и обсуждение

Установлено, что после введения ПАФ у животных на 7-,14- и 21-е сутки развития АА (2-я группа) отмечается достоверное по сравнению с контролем снижение количества Хехст<sup>+</sup>-клеток в тимусе на 44±2,68; 47±1,8; 83±3,4% соответственно и в лимфоцитах региональных узлов на 67±5,1; 36±2,6 и 66±3,5% соответственно (рис. 2). При этом на фоне такого снижения содержания Хехст<sup>+</sup>-клеток наблюдается повышение уровня содержания клеток, экспрессирующих белок Bcl-2, в тимусе на 50±4,9; 25±1,8; 39±3,9% соответственно и в лимфоцитах региональных узлов – на 78±6; 18±1,5; 36±2,9% соответственно. Данный факт свидетельствует о том, что угнетение апоптоза в тестируемых клетках при АА происходит на фоне активации антиапоптотического каскада, что подтверждается увеличением содержания в них антиапоптотического белка Bcl-2. Этот белок, как известно, кооперируясь с различными онкогенами, предотвращает апоптотическую гибель клеток, ингибируя деградацию ДНК и проницаемость мембран [7,14,15]. Возможно, по этой причине при электрофорезе в геле фрагментации ДНК тимоцитов у животных с АА нами выявлено не было (рис. 3).

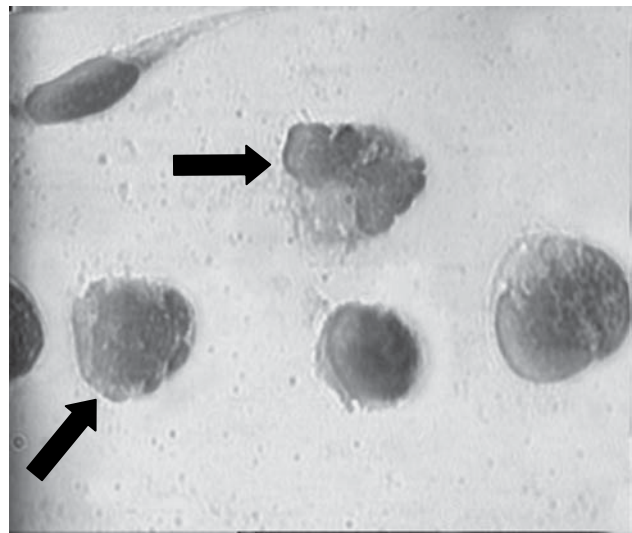


Рис. 1. Апоптоз клеток перитонеальной полости (клетки в апоптозе обозначены стрелками).

Fig. 1. Apoptosis of cells from peritoneal cavity (cells in apoptosis are pointed by arrows).

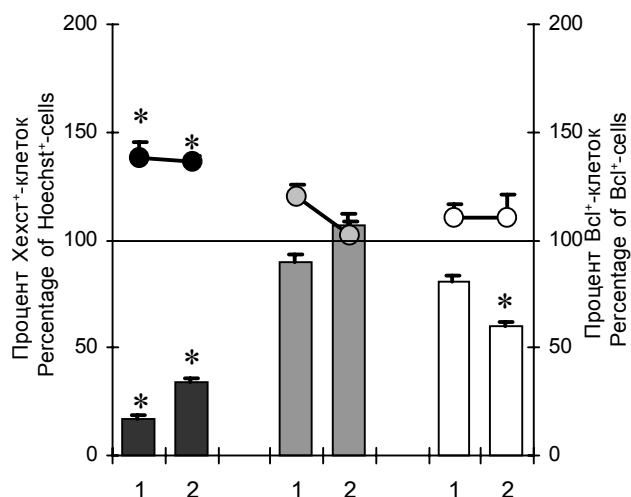
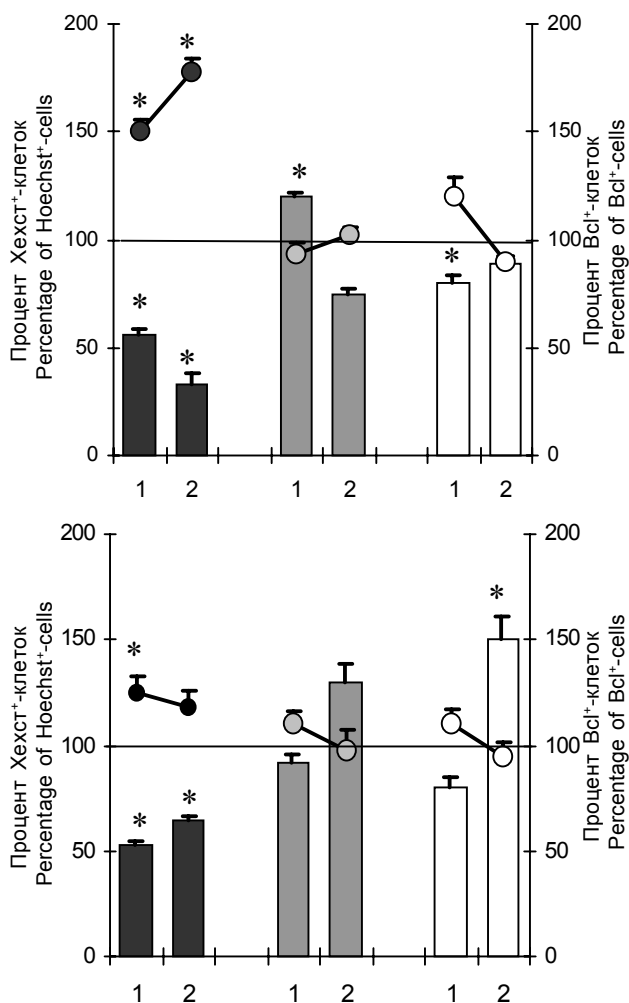
mentioned above methods to estimate the apoptotic cells there was applied as well the method of pulse-electrophoresis, which allows of revealing the DNA internucleosome fragmentation [6, 11]. Electrophoretic separation of DNA fragments was accomplished in 1%-agarose gel at the voltage of 75 V, with the phoresis duration of 8 hr. Visualisation of the results of DNA separation was performed using “Fluskop” UV lamp with further information presentation via “Panasonic” video camera.

The expression of antiapoptotic protein Bcl-2 in cells was investigated with the method of luminescent microscopy using antimurine monoclonal antibodies [14].

The assessment of studied indices was carried out to the 7<sup>th</sup> (acute phase), 14<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> days (chronic phase) after pathology induction [8]. The obtained results were processed statistically using Student’s criterion [1].

### Results and discussion

CFA was established to cause a significant decrease of Hoechst<sup>+</sup> cells amount in thymus if compared to the control to the 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> day of development by 44±2,68; 47±1,8 and in lymphocytes of regional lymphatic nodes by 67±5,1%, correspondingly (Fig. 2). In this case at the background of such a reduction of Hoechst cells’ content there have been observed the increase of the level of the cells expressing the Bcl-2 protein in thymus by 50±4.9; 25±1.8; 39±3.9% correspondingly. This fact testifies that the apoptosis suppression in the cells tested at АА occurs at the background of the antiapoptotic cascade activation, that is confirmed by the increase of Bcl-2 antiapoptotic protein. This protein is known



**Рис. 2.** Динамика количества Хехст<sup>+</sup>-клеток и клеток, экспрессирующих белок Bcl-2 при АА до и после введения НСП и КСП: 1 – тимус; 2 – лимфоузлы; ■ – АА; ■ – АА+НСП; □ – АА+КСП; \* – различия достоверны при P<0,05 по сравнению с показателями контрольной группы мышей, принятых за 100%.

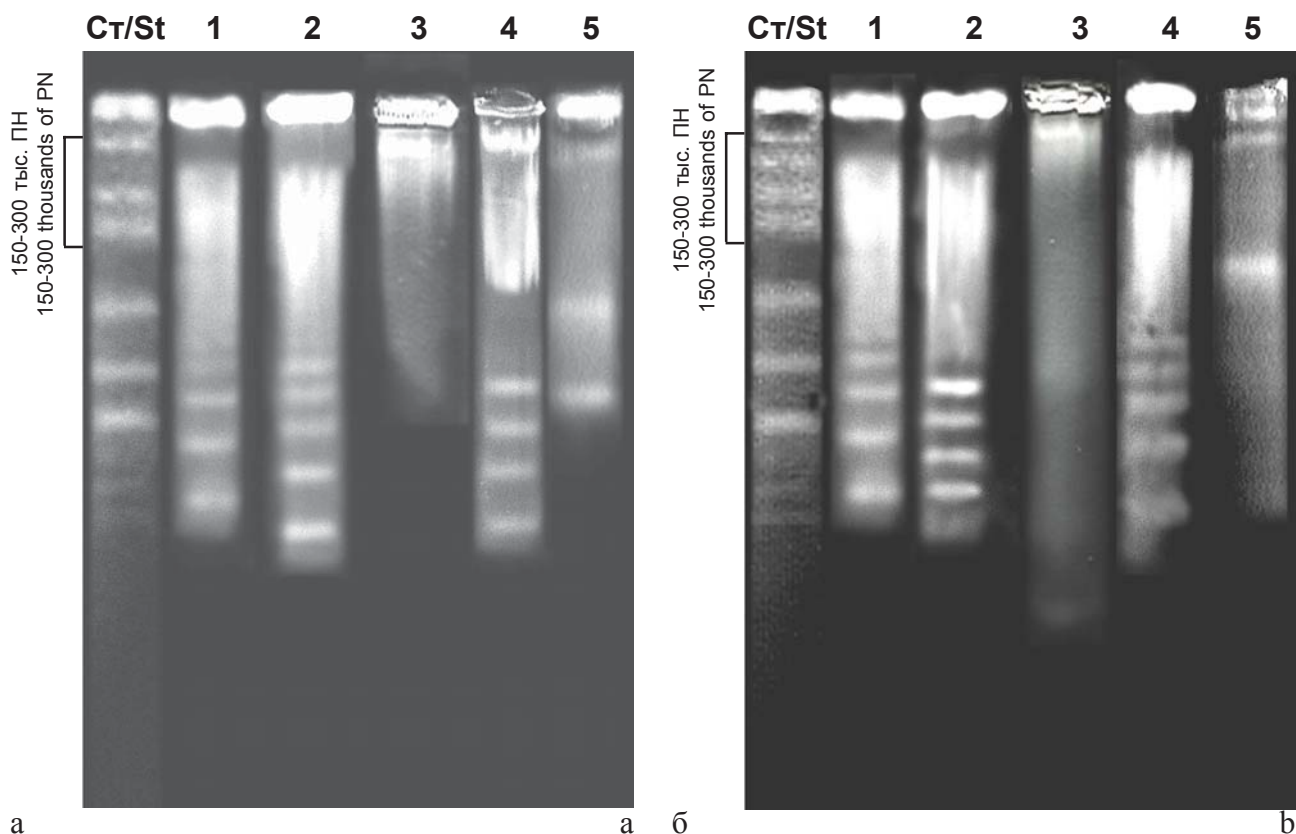
**Fig. 2.** Dynamics in number of Hoechst<sup>+</sup>-cells and Bcl-2 protein expressing cells at AA before and after NPS and CPS introduction: 1 – thymus; 2 – lymph nodes; ■ – AA; ■ – AA+NPS; □ – AA+CPS; \* – differences are statistically true at P<0.05 in comparison with the indices of the control group of mice, assumed for 100%.

После введения как НСП, так и КСП в течение всего срока наблюдения имеет место стимуляция апоптотических процессов, которая выражается в повышении содержания Хехст<sup>+</sup>-клеток в исследуемых органах. Причем, как видно из рис. 2, после лечения животных с адьювантным артритом НСП (3-я группа) количество Хехст<sup>+</sup>-клеток в тимусе на 7-е сутки наблюдения увеличивается на 64% по сравнению с животными 2-й группы, а после введения КСП – на 24% (4-я группа). Эти результаты коррелировали с данными по электрофорезу, представленными на рис.3 и 4. Как видно (рис. 3, а), однократное введение НСП к 7-м суткам наблюдения вызывает фрагментацию ДНК на низкомолекулярные фрагменты, характеризующие завершающий этап апоптоза [11,13]. Причем, 3-часовая инкубация тимоцитов с глюкокортикоидами вызывает аналогичное усиление апоптотической гибели клеток. Данный факт свидетельствует о мощном апоптотическом потенциале НСП. После введения криоконсервированного материала фрагментация ДНК имеет менее выраженный характер.

to prevent the cell apoptotic death by inhibiting the DNA degradation and membrane permeabilization [7, 14, 15] due to the cooperation with different oncogenes. Possibly because of this reason no DNA fragmentation of thymocytes in AA animals was revealed in gel during electrophoresis (Fig. 3).

Following the injection of both CPS and NPS the stimulation of the apoptotic processes manifested in the rise of Hoechst<sup>+</sup> cells in the organs under study occurs within the entire observation term. As the Figure 2 shows after the NSP treatment of the animals with adjuvant arthritis the amount of Hoechst<sup>+</sup>-cells in thymus increases to the 7<sup>th</sup> day by 64% comparing to the 2<sup>nd</sup> group animals, and after the CPS injection there was a 24% rise (the 4<sup>th</sup> group). These results correlated with the electrophoresis data presented in Fig. 3 and 4. As the Fig. 3a shows a single NPS injection by the 7<sup>th</sup> day of observation causes the DNA fragmentation onto low molecular fragments, which characterize the final apoptosis stage [11, 13]. A 3hrs' thymocyte incubation with glucocorticoids causes an analogous increase of cell apoptotic death. Such a fact testifies to a strong apoptotic potential of NPS. Following the cryo-preserved material injection the DNA fragmentation has less manifested character.

It is also important that following the placenta preparations therapy the Bcl-2 expression was



**Рис. 3.** Результаты электрофоретического анализа фрагментации ДНК тимоцитов: 1 – интактных животных; 2 – после 3-часовой инкубации с глюкокортикоидами; 3 – мышей с АА на 7-е (а) и 21-е (б) сутки наблюдения; 4 – мышей с АА после введения НСП на 7-е (а) и 21-е (б) сутки наблюдения; 5 – мышей с АА после введения КСП на 7-е (а) и 21-е (б) сутки наблюдения; Ст – стандарт.

**Fig. 3.** Results of electroforetic analysis of fragmentation in thymocyte DNA from 1 – intact animals; 2 – cells after 3 hrs incubation with glucocorticoids; 3 – mice with AA on the 7th (a) and 21st (b) day of observation; 4 – mice with AA after NPS introduction on the 7th (a) and 21st (b) day of observation; 5 – mice with AA after CPS introduction on the 7th (a) and 21st (b) day of observation; St – standard.

Важно также, что после терапии препаратами плаценты экспрессия белка Bcl-2 приближалась к контрольным значениям. Повышение количества Хехст<sup>+</sup>-клеток и снижение уровня экспрессии белка Bcl-2 могут быть обусловлены действием присутствующего в плаценте  $\alpha$ -фетопротеина, способного самостоятельно активировать каспазу-3, индуцировать апоптоз и, естественно, минимизировать экспрессию белка Bcl-2 [4].

На этапе хронического развития АА (21-е сутки) характер влияния вводимых препаратов несколько изменялся. Если НСП сохраняла свою активность в отношении стимуляции апоптотических процессов, то активность КСП существенно снижалась как в тимусе, так и в лимфоцитах региональных лимфоузлов и это выразилось в уменьшении количества Хехст<sup>+</sup>-клеток (см. рис. 2) и наличии очень слабой, возможно обратимой, фрагментации ДНК (рис. 3, б).

На рис. 4 представлены результаты изучения в сравнительном аспекте выраженности воспалительного процесса и степени проявления апоптоза.

approaching to the control values. The rise in Hoechst<sup>+</sup> cells amount and the fall in Bcl-2 expression level may be stipulated by the effect of  $\alpha$ -fetoprotein present in placenta, which is capable of caspase-3 activating, the apoptosis reducing and, definitely, minimizing the Bcl-2 protein expression [4].

At the stage of chronic AA development (the 21<sup>st</sup> day) the character of the effect of the preparations injected was slightly changing. The CPS activity considerably decreased both in thymus and lymphocytes of regional lymphonodes if NPS kept its activity in terms of apoptotic processes and it manifested in the reduction of Hoechst<sup>+</sup> cells (see Fig.2) as well as in the presence of a slight, possibly reversible DNA fragmentation (Fig.3b).

Fig. 4 presents the comparative study results of an inflammatory process and apoptosis level manifestation. In AA animals at all the observation terms at the background of the AI rise (on the 7<sup>th</sup> day by 60±4.3%; the 14<sup>th</sup> day by 61±5.8%, the 21<sup>st</sup> day by 45±1.2%) and the increase of the adhesive cells percentage in PP (on the 7<sup>th</sup> by 25±3.4%; the 14<sup>th</sup>

У животных с АА во все сроки наблюдения на фоне достоверного увеличения индекса артрита (7-е сутки на  $60 \pm 4,3$ ; 14-е – на  $61 \pm 5,8$ ; 21-е – на  $45 \pm 1,2\%$ ) и повышения по сравнению с контролем процента адгезивных клеток в ПП (7-е сутки на  $25 \pm 3,4$ ; 14-е – на  $46 \pm 2,5$ ; 21-е – на  $53 \pm 2,8\%$ ) отмечается снижение их АИ соответственно на  $46 \pm 3,2$ ;  $40 \pm 2,5$ ;  $42 \pm 3,3\%$ . При этом суммарная степень отклонения индекса артрита и процента адгезивных клеток у животных с АА на 7-е сутки составляла 0,85; на 14-е – 1,06; на 21-е – 0,98%. Возможно, снижение количества апоптотических клеток в ПП, как и в других субстратах ИС, происходит за счет характерного для РА повышения концентрации гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора, способствующего ингибции апоптоза нейтрофилов и моноцитов, которые мигрируют в очаг воспаления, накапливаются там с сохранением полноценного арсенала своих функций [5].

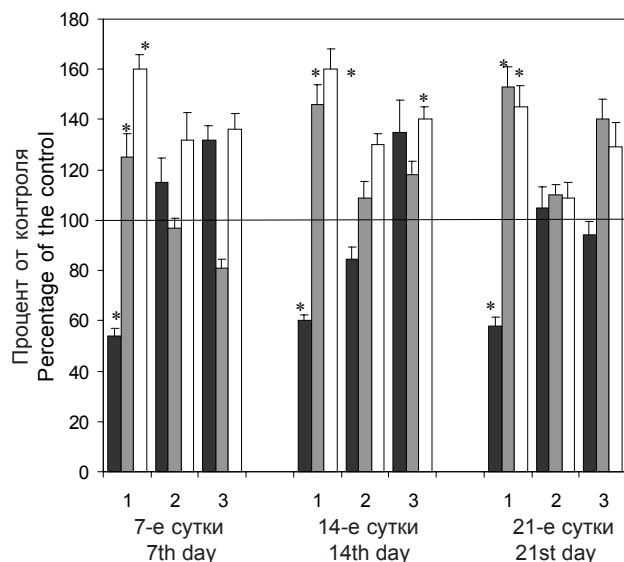
Введение НСП и КСП во все исследуемые сроки (7-, 14- и 21-е сутки) повышало по сравнению со 2-й группой процент апоптотических клеток в ПП на  $61 \pm 5,4$ ;  $25 \pm 1,5$ ;  $47 \pm 3,8$  и на  $66 \pm 3,9$ ;  $75 \pm 5,2$ ;  $36 \pm 3,3\%$  соответственно. Одновременно уменьшалась выраженность воспалительного процесса, что проявлялось в снижении содержания адгезивных клеток (соответственно на  $25 \pm 1,2$ ;  $37 \pm 3,4$ ;  $43 \pm 2,2$  и  $44 \pm 3,8$ ;  $48 \pm 2,1$ ;  $13 \pm 1,1\%$ ), индекс артрита (соответственно на  $28 \pm 2,5$ ;  $30 \pm 3,3$ ;  $36 \pm 2,4$  и  $24 \pm 1,6$ ;  $20 \pm 1,3$ ;  $16 \pm 1,1\%$ ) и характеризовалось уменьшением суммарной степени отклонения, которая составила в 3-й группе на 7-е сутки 0,32; 14-е – 0,39; 21-е – 0,19%, и в 4-й группе на 7-е сутки – 0,55; 14-е – 0,48; 21-е – 0,69%.

Следовательно, СП может реализовывать терапевтический эффект через включение механизмов управления интенсивностью апоптотических процессов. И в данном случае к 21-м суткам наблюдения НСП в большей степени обладал такого рода активностью, обеспечивая почти полное восстановление исследуемых показателей.

### Выводы

На основании электрофоретического анализа фрагментации ДНК и количественного учета Хехст<sup>+</sup>-, Vcl-2<sup>+</sup>-клеток установлено, что в период манифестации основных клинических показателей АА отмечается выраженное угнетение апоптотической активности ИКК в тимусе, региональных лимфоузлах, а также в перитонеальной полости.

Выявлена отрицательная корреляция между интенсивностью воспалительных реакций и изменением выраженности апоптоза.



**Рис. 4.** Динамика выраженности воспалительного процесса и апоптотической активности клеток перитонеальной полости при АА до и после введения НСП и КСП: 1 – АА; 2 – АА + НСП; 3 – АА + КСП: ■ – апоптотический индекс клеток перитонеальной полости; ■ – количество адгезивных клеток; □ – индекс артрита; \* – различия достоверны при  $P < 0,05$  по сравнению с показателями контрольной группы мышей, принятых за 100%.

**Fig. 4.** Dynamics of manifestation of inflammatory process and apoptotic activity of peritoneal cavity cells at AA before and after NPS and CPS introduction: 1 – AA; 2 – AA+NPS; 3 – AA+CPS: ■ – apoptotic index of peritoneal cavity cells; ■ – number of adhesive cells; □ – index of arthritis; \* – differences are statistically true at  $P < 0.05$  in comparison with indices of the control group of mice, assumed for 100%.

day by  $46 \pm 2.5\%$ , the 21<sup>st</sup> day by  $53 \pm 2.8\%$ ) there have been noted their AI decrease by  $46 \pm 3.2\%$ ,  $40 \pm 2.5\%$ ,  $42 \pm 3.3\%$ , correspondingly. In this case the total deviation degree of AI and adhesive cell percentage in AA animals by the 7<sup>th</sup> day made 0.85, by the 14<sup>th</sup> day it was 1.06%, by the 21<sup>st</sup> day it made 0.98%. The decrease of apoptotic cell number both in PP and other IS substrates may occur due to the increase of granulocyte-macrophagal colony forming factor characteristic for RA, which promotes the apoptosis inhibition in neutrophils and monocytes, which migrate into the inflammation focus, accumulate there with keeping the main stock of their functions [5].

The NPS and CPS injection at all the studied terms (the 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> day) increased the percentage of apoptotic cells in PP comparing to the 2<sup>nd</sup> group by  $61 \pm 5.4\%$ ;  $25 \pm 1.5$ ;  $47 \pm 3.8$  and by  $66 \pm 3.9\%$ ;  $75 \pm 5.2\%$ ;  $36 \pm 3.3\%$ , correspondingly. At the same time the manifestation degree of the inflammatory process significantly decreased, that manifested in the reduction of adhesive cells content (by  $25 \pm 1.2\%$ ;  $37 \pm 3.4\%$ ;  $43 \pm 2.2\%$  and  $44 \pm 3.8\%$ ;  $48 \pm 2.1\%$ ;  $13 \pm 1.1\%$ , correspondingly), of the arthritis index: by  $28 \pm 2.5\%$ ;  $30 \pm 3.3\%$ ;  $36 \pm 2.4\%$  and  $24 \pm 1.6\%$ ;  $20 \pm 1.3$ ;  $16 \pm 1.1\%$  and

Введение суспензии плаценты способствовало усилению апоптотических процессов ИКК и снижению проявления клинических симптомов АА.

Суспензия плаценты обладает способностью коррегировать состояние иммунокомпетентной сферы и усиливать апоптотические процессы в ИКК при АА. При этом активность КСП отличается от НСП, что может быть следствием изменения функциональной активности клеток после криоконсервирования.

*Авторы выражают благодарность сотруднику института микробиологии и иммунологии им. Мечникова АМН Украины Колотовой Т.Ю. за методическую помощь.*

### Литература

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы микробиологических исследований.– Л.: Медицина, 1972.– 180 с.
2. Гольцев А.Н., Останкова Л.В., Луценко Е.Д. и др. Ответ лимфогемopoэтической системы организма на введение продуктов фетоплацентарного комплекса // Пробл. криобиологии.– 2000.– №2.– С. 15-31.
3. Грищенко В.І., Морозова Т.Ф., Воротілін О.М. та ін. Приготування та зберігання криоконсервованої суспензії плаценти для клінічного використання: Метод. рекомендації.– Харків, 1997.– 14 с.
4. Дудичь Е.И., Семенов Л.Н., Дудичь И.В. и др. Роль  $\alpha$ -фетопротеина в индукции апоптоза и в регуляции апоптотических сигналов, генерируемых другими факторами // Бюл. эксперим. биол. и мед.– 1998.– Т.126.– Прил. 1.– С. 141-146.
5. Маянский Н.А. Состояние каспазы-3 при подавлении апоптоза нейтрофилов гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором // Иммунология.– 2001.– №2.– С. 22-25.
6. Молекулярная клиническая диагностика. Методы: Пер. с англ. / Под ред. С. Херрингтона, Дж. Макги.– М.: Мир, 1992.– 558 с.
7. Самуилов В.Д., Олескин А.В., Лагунова Е.М. Программируемая клеточная гибель // Биохимия.– 2000.– Т.65.– Вып. 8.– С. 1029-1046.
8. Саратиков А.С., Венгеровский А.М. Адьювантная болезнь.– Томск: Изд-во Томск. ун-та.– 1993.– 103 с.
9. Труфакин В.А. Иммунологические аспекты аутоиммунных процессов.– Новосибирск: Наука, 1983.– 132 с.
10. Фильченков А.А., Стойка Р.С. Апоптоз и рак.– Киев: Морион, 1999.– 184 с.
11. Lagarkova M.A., Ivanova O.V., Razin S.V. Large-scale fragmentation of mammalian DNA in the course of apoptosis proceeds via excision of chromosomal DNA loops and their oligomers // The Journal of Biological Chemistry.– 1995.– Vol.270, N35.– P. 20239-20241.
12. Pearson C.M., Wood F.D. Studies of arthritis and other lesions induced in rats by the injection of mycobacterial adjuvant // American J. Pharmacology.– 1963.– Vol.42.– P. 73-95.
13. Shapiro H.M. Flow cytometric estimation of DNA and RNA content in intact cells stained with Hoechst 33342 and pyronin // J. Cytometry.– 1981.– Vol.2.– N143.– P. 231-240.
14. Vies D.J., Sentman C.L., Bach E.A. et al. Expression of the Bcl-2 protein in murine and human thymocytes and in peripheral T lymphocytes // J. Immunology.– 1993.– Vol.151.– N5.– P. 2546-2554.

characterized by the reduction of a total deviation degree, which at the 7<sup>th</sup> day in the 2<sup>nd</sup> group made 0.32%, at the 14<sup>th</sup> day this index made 0.39% and by the 21<sup>st</sup> day: 0.19%; in the 4<sup>th</sup> group it made 0.55% on the 7<sup>th</sup> day, 0.48% to the 14<sup>th</sup> day and 0.69% by the 21<sup>st</sup> day.

PS therefore may realize the therapeutic effect via inclusion of the controlling mechanisms of the apoptotic processes intensity. In this case the NPS in a greater extent possessed such an activity providing a nearly complete recovery of the indices studied.

### Conclusions

Basing on electrophoretic analysis of the DNA fragmentation and quantitative counting of Hoechst<sup>+</sup>, Bcl-2<sup>+</sup> cells it has been established that during the manifestation period of the AA main clinical indices it is noted the manifested suppression of ICCs apoptotic activity in thymus, lymphocytes of regional lymph nodes and peritoneal cavity.

It has been found a negative correlation between the intensity of inflammatory reactions and the change of the apoptosis manifestation.

Injection of the placenta suspension contributed to the strengthening of apoptotic processes of ICCs and reduction in manifestation of AA clinical symptoms.

Placenta suspension is capable of correcting the state of immune competent sphere and strengthening apoptotic processes in ICCs at AA. In this case the activity of CPS differs from NPS, that can result from the change in functional activity of cells after cryopreservation.

*Authors aknowledge Kolotova T. Yu, research worker of Mechnikov's Institute of Microbiology and Immunology, for her methodical help.*

### References

1. Ashmarin A.N., Vorobiev A.A. Statistical methods of microbiological investigations.– Leningrad: Meditsina.– 1972.– 180 p.
2. 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. 15-31.
3. Grischenko V.I., Morozova T.F., Vorotilin O.M. et al. Preparing and preserving of cryopreserved placenta suspension for clinical application: Methodical recommendations.– Kharkov, 1997.– 14 p.
4. Dudich E.I., Semenov L.N., Dudich I.V. et al. Role of  $\alpha$ -protein in apoptosis induction and in regulation of apoptotic signals, generated by other factors // Bul. Exp. Biol. I Med.– 1998.– Vol.126.– Suppl.1.– P. 141-146.
5. Mayansky N.A. State of caspase-3 when suppressing apoptosis of neutrophils with granulocyte-macrophage colony-forming factor// Immunologiya.– 2001.– N2.– P. 22-25.
6. Molecular clinical diagnostics. Methods: Translated from English / Ed. By S. Herrington, J. Macgy.– Moscow: Mir, 1992.– 558 p.

15. *Willams G.T.* Apoptosis in the immune system // *J. Pathol.*– Vol.173.– P. 1-4.

*Поступила 29.07.2003*

7. *Samuilov V.D., Oleskin A.V., Lagunova E.M.* Programmable cell death // *Biokhimiya.*– 2000.– Vol.65.– Issue 8.– P. 1029-1046.
8. *Saratikov A.S., Vengerovsky A.M.* Adjuvant disease. – Tomsk: Publ. House of Tomsk University, 1993.– 103 p.
9. *Trufakin V.A.* Immunological aspects of autoimmune processes. – Novosibirsk: Nauka, 1983 – P.
10. *Filchenkov A.A., Stojka R.S.* Apoptosis and cancer. – Kiev: Morion, 1999.– 184 p.
11. *Lagarkova M.A., Ivanova O.V., Razin S.V.* Large-scale fragmentation of mammalian DNA in the course of apoptosis proceeds via excision of chromosomal DNA loops and their oligomers // *The Journal of Biological Chemistry.*– 1995.– Vol.270.– N35.– P. 20239-20241.
12. *Pearson C.M., Wood F.D.* Studies of arthrosis and other lesions induced in rats by the injection of mycobacterial adjuvant // *Americal. J. Pharmacology.*– 1963.– Vol.42.– P. 73-95.
13. *Shapiro H.M.* Flow cytometric estimation of DNA and RNA content in intact cells stained with Hoechst 33342 and pyronin // *J. Cytometry.*– 1981.– Vol.2.– N143.– P. 231-240.
14. *Vies D.J., Sentman C.L., Bach E.A., et al.* Expression of the Bcl-2 protein in murine and human thymocytes and in peripheral T lymphocytes // *J. Immunology.*– 1993.– Vol.151.– N5.– P. 2546-2554.
15. *Willams G.T.* Apoptosis in the immune system // *J. Pathol.*– Vol.173.– P. 1-4.

*Accepted in 29.07.2003*