

## Влияние разных режимов криоконсервирования на способность суспензии плаценты проявлять иммунокорректирующую активность при лечении адьювантного артрита у мышей

И.В. Рассоха, А.Н. Гольцев, Т.М. Гурина

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Effect of Different Cryopreservation Regimens on Capability of Placenta Suspension to Manifest an Immune-Correcting Activity When Treating Adjuvant Arthritis in Mice

I.V. RASSOKHA, A.N. GOLTSEV, T.M. GURINA

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

На модели адьювантного артрита (АА) у мышей исследован терапевтический потенциал криоконсервированной в разных режимах суспензии плаценты (СП). Разработан метод криоконсервирования СП, позволяющий максимально сохранить естественную гетерогенность популяций клеток плаценты и их корректирующий эффект относительно клинико-лабораторных показателей и восстановления структурно-функциональной организации центральных и периферических органов лимфогемопоезического комплекса (ЛГПК) при развитии аутоиммунной патологии.

**Ключевые слова:** криоконсервированная суспензия плаценты, адьювантный артрит, лимфогемопоезический комплекс.

На моделі ад'ювантного артриту у мишей досліджено терапевтичний потенціал криоконсервованої у різних режимах суспензії плаценти (СП). Розроблено метод криоконсервування СП, що дозволяє максимально зберегти природню гетерогенність популяцій клітин плаценти та їх корегуючий ефект щодо клініко-лабораторних показників і відновлення структурно-функціональної організації центральних і периферійних органів лімфогемопоезичного комплексу (ЛГПК) в умовах розвитку аутоімунної патології.

**Ключові слова:** криоконсервована суспензія плаценти, ад'ювантний артрит, лімфогемопоезичний комплекс.

Therapeutic potential of placenta suspension (PS), cryopreserved under different regimens, in the model of adjuvant arthritis (AA) was investigated in mice. We have developed the method of PS cryopreservation, enabling a maximum preservation of natural heterogeneity in placenta cell populations and their correcting effect in respect of clinical and laboratory indices and recovery of structural and functional organisation of central and peripheric organs of lymphohemopoietic complex (LHPC) under autoimmune pathology development.

**Key-words:** cryopreserved placenta suspension, adjuvant arthritis, lymphohemopoietic complex.

В течение последних десятилетий ведется интенсивная работа по поиску эффективных режимов криоконсервирования ткани и суспензии плаценты [5, 6, 8]. Однако существующие режимы имеют некоторые недостатки [11]. В настоящее время очевидна необходимость проведения работ по оптимизации методов криоконсервирования плаценты, поскольку создание запасов полноценного криоконсервированного материала, являющегося своего рода препаратом-корректором патологического состояния организма, позволит решить проблемы, связанные с лечением многих заболеваний.

Функциональная полноценность криоконсервированного биологического объекта в виде органно-тканевого субстрата базируется на сохранении индивидуальных клеток в его гетерогенной популяции. В состав плаценты входят клетки, отличающиеся по своим морфологическим и

An intensive work in searching efficient regimens for cryopreservation of placenta tissue and suspension has been carried-out within the recent decades [5, 6, 8]. However the existing regimens have certain disadvantages [11]. Nowadays the necessity to perform the works on optimising methods for placenta cryopreservation is evident, since the establishing of stocks of integral cryopreserved material, being a sort of correcting preparation of an organism's pathological state, will enable solving the problems of treatment in many diseases.

Functional integrity of cryopreserved biological object as an organ-tissue substrate is based on the preservation of individual cells in its heterogeneous population [16]. Placenta comprises cells, differing by their morphological and functional characteristics [2, 7, 13, 14]. These cells realise an inter-regulatory potential, generally determining their functional status. The fact, that cells as a part of placenta structure,

**Адрес для корреспонденции:** Гольцев А.Н., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.:+38 (057) 772-10-39, 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.:+38 057 772 1039, fax: +380 57 772 0084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

функциональным характеристикам [2, 7, 13, 14]. Эти клетки реализуют взаиморегуляторный потенциал, определяющий в целом их функциональный статус. Не вызывает сомнений, что клетки, входящие в структуру плаценты, имеют различную резистентность к факторам криоконсервирования. Исходя из этого, целью данной работы является разработка режимов криоконсервирования плаценты, обеспечивающих максимальное сохранение ее компонентного состава и иммунокорректирующую активность при лечении АА у мышей.

### Материалы и методы

Эксперименты проведены на мышках-самцах линии СВА массой 18-20 г. Для приготовления СП [6] выделенную в стерильных условиях плаценту помещали в чашку Петри с физиологическим раствором, трижды отмывали от слизи и крови, после чего измельчали в гомогенизаторе Поттера в соотношении 1:2 (плацента:физиологический раствор) до получения однородной массы. Полученную суспензию пропускали через капроновый фильтр и иглы уменьшающегося диаметра. Количество клеток в суспензии подсчитывали в камере Горяева. Для определения морфологического состава клеток плаценты делали мазки, фиксировали их метанолом и окрашивали по методу Романовского.

Согласно данным [6], скорость 1°C/мин является оптимальной для замораживания СП. Исходя из этого, в 1-й серии экспериментов после 20-минутной эквilibрации СП с криопротектором при комнатной температуре образец замораживали со скоростью 1°C/мин до -40°C, затем погружали в жидкий азот (режим К1). Во 2-й серии был применен аналогичный режим замораживания с некоторыми модификациями процесса подготовки образца к криоконсервированию:

1. Вместо перемешивания клетки СП “наслаивали” на криопротектор.

2. Приготовленный “сэндвич” клетки-криопротектор без предварительной эквilibрации при комнатной температуре погружали в программируемый замораживатель (“Cryoson”, Германия) и охлаждали до 0°C. Скорость охлаждения СП подбирали таким образом, чтобы продолжительность этого температурного интервала совпадала с рекомендуемым временем эквilibрации клеток СП с криопротектором (режим К2).

Суспензию плаценты отогревали в водяной бане при температуре 42-45°C в течение 45-50 с при постоянном перемешивании до полного исчезновения кристаллов льда.

Сохранность клеток СП после гомогенизации и криоконсервирования оценивали общепринятым

have different resistance to cryopreservation factors, is of no doubt. Therefore our work was aimed to the development of cryopreservation regimens for placenta, providing a maximum preservation of its component composition and immune correcting activity during AA treatment in mice.

### Materials and methods

The experiments were carried-out in 18-20 g CBA male mice. For PS preparing [6], the isolated under sterile conditions placenta was placed into Petri dish with physiological solution, thrice washed-out of mucus and blood, then dispersed in Potter's homogenizer in 1:2 ratio (placenta: physiological solution) up to homogenous mass. The obtained suspension was passed through a capron filter and needles with reducing diameter. The amount of cells in a suspension was calculated in Goryaev's chamber. In order to determine a morphological composition of placenta cells we made the smears, fixed them in methanol and stained by Romanovsky's method.

According to the data [6] the rate of 1°C/min is the optimal for PS freezing. Proceeding from this in the 1<sup>st</sup> session of experiments after 20-min PS equilibration with a cryoprotectant at room temperature the sample was frozen with 1°C/min rate down to -40°C, then immersed into liquid nitrogen (C1 regimen). In the 2<sup>nd</sup> session there was applied the analogous regimen of freezing with some modifications of the process of sample's preparation for cryopreservation:

1. Instead of mixing, the PS cells were “layered” on a cryoprotectant.

2. The prepared “sandwich” of cryoprotectant-cells without preliminary equilibration at room temperature was immersed into a programmable freezer (“Cryoson, Germany”) and cooled down to 0°C. The cooling rate for PS was selected by such a way that the time of this temperature interval coincide with the recommended time of PS cell equilibration with a cryoprotectant (regimen C2).

Placenta suspension was thawed on water bath at 42-45°C for 45-50 seconds with a constant mixing up to complete disappearance of ice crystals.

The PS cell integrity after homogenising and cryopreservation was estimated using the routine “express-method” by means of 20% trypan blue aqueous solution [10].

The adjuvant arthritis was induced according to Pearson's method by a subcutaneous introduction of a complete Freund's adjuvant [16]. Native and cryopreserved placenta suspensions (NPS, CPS) of 19 gestation days were introduced on the day of pathology induction in 1×10<sup>6</sup> cells/ml volume. The estimation of LHPC state of experimental animals was carried-out to the 21<sup>st</sup> day (chronic phase) after pathology induction.

“экспресс-методом” с помощью 0,2%-го водного раствора трипанового синего [10].

Адьювантный артрит индуцировали по методу Пирсона субплантарным введением полного адьюванта Фрейнда [16]. Нативную и криоконсервированную суспензии плаценты (НСП, КСП) 19-х суток гестации вводили в день индукции патологии в объеме 0,2 мл, который содержал  $1 \times 10^6$  кл/мл. Оценку состояния ЛГПК экспериментальных животных проводили на 21-е сутки (хроническая фаза) после индукции патологии.

При исследовании ЛГПК животных умерщвляли путем цервикальной дислокации, соблюдая положения Европейской конвенции по охране позвоночных животных и национального законодательства по гуманному обращению с животными [15].

Мыши были разделены на 5 групп (в каждой  $n=20$ ). Контролем служили интактные животные - 1-я группа. У мышей 2-5-й групп индуцировали АА. Мыши, при лечении которых использовали НСП, составили 3-ю группу. Животным 4-й и 5-й групп вводили СП, криоконсервированную в соответствии с режимами К1 и К2 (КСП-К1, КСП-К2).

Степень тяжести заболевания оценивали с помощью индекса артрита (ИА) [4]. Отек сустава определяли методом онкометрии [9]. Эффективность трансплантации КСП и НСП в отношении подавления развития отека оценивали по показателю степени угнетения воспаления (СУВ) [9].

$$\text{СУВ} = \frac{V_a - V_o}{V_a} \times 100\%,$$

где  $V_a$  – объем сустава у мышей с АА;  $V_o$  – среднее увеличение объема сустава у животных, которых лечили.

Для оценки характера изменений ЛГПК экспериментальных животных, а также для верификации терапевтического эффекта после применения СП был использован индекс суммарной степени отклонения показателей (ССО) [4].

Идентификацию апоптоза клеток перитонеальной полости (ПП) и нейтрофильных гранулоцитов периферической крови (ПК) осуществляли на мазках, окрашенных по Романовскому-Гимза, с последующим подсчетом процента клеток с характерными для апоптоза морфологическими изменениями, а именно с конденсацией хроматина и фрагментацией ядра [10, 12]. Для количественной оценки содержания апоптотических клеток использовали индекс апоптоза [12]. Все контрольные показатели были приняты за 100%.

Статистическую обработку полученных данных проводили по методу Стьюдента-Фишера. Достоверность различий оценивали с помощью t-критерия с уровнем значимости 5% [1].

When studying PHPC the animals were devitalised by means of cervical dislocation according to the statements of the European Convention on the Vertebrate Protection and National Law on humane treatment with animals [15].

The mice were divided into 5 groups ( $n=20$  in each). The intact animals served as the control: the 1<sup>st</sup> group. In the mice of the 2<sup>nd</sup>-5<sup>th</sup> groups we induced AA. The NPS-treated mice made the 3<sup>rd</sup> group. To the animals of the 4<sup>th</sup> and 5<sup>th</sup> groups we introduced PS, cryo-preserved according to C1 and C2 regimens (CPS-C1, CPS-C2).

The disease severity degree was estimated using the arthritis index (AI) [4]. Joint oedema was found using the oncometry method [9]. The CPS and NPS efficiency in respect of suppressing the oedema development was evaluated according to the index of the inflammation suppression extent (ISE) [9]:

$$\text{ISE} = \frac{V_a - V_o}{V_a} \times 100\%,$$

where  $V_a$  is joint dimension in mice with AA;  $V_o$  is an average increase of joint dimension in the treated animals.

In order to estimate the character of LHPC changes in the experimental animals, as well as to verify a therapeutic effect after PS application we used the index of total extent of deviation (TED) in the indices [4].

The identification of apoptosis in the peritoneal cavity (PC) cells and neutrophil granulocytes of peripheral blood (PB) was carried-out in the smears, stained according to Romanovsky-Gimza with following counting of percentage of cells with typical for apoptosis morphological changes, namely with chromatin condensation and nucleus fragmentation [10, 12].

The apoptosis index was used for a quantitative estimation of apoptotic cells [12]. All control indices were assumed as 100%.

The data obtained were statistically processed by Student-Fisher's method. The statistical significance was estimated using the t-criterion with 5% significance level [1].

## Results and discussion

The performed analysis of cellular composition of native placenta demonstrated, that the Kaschenko-Hofbauer macrophage-like cells (KHCs) made 20-23%, as for mesenchymal and plasmatic cells, fibroblasts, reticulocytes it was 77-80%. According to the literature data [2, 13] the mesenchymal, plasmatic, reticular cells have small sizes and cytoplasm with a small amount of organoids. With an increase in gestation term in fibroblasts of villi connective tissue there is noted a decrease in a number of ribosomes, mitochondria and endoplasmatic small channels. This

## Результаты и обсуждение

Проведенный анализ клеточного состава нативной плаценты показал, что 20-23% составляют макрофагоподобные клетки Кащенко-Гофбауэра (ККГ), 77-80% – мезенхимальные и плазматические клетки, фибробласты, ретикулоциты. Согласно данным [2, 13], мезенхимальные, плазматические, ретикулярные клетки имеют малые размеры и цитоплазму с небольшим количеством органоидов. В фибробластах соединительной ткани ворсин по мере увеличения гестационного срока отмечается снижение количества рибосом, митохондрий и эндоплазматических канальцев. Данный факт свидетельствует о том, что эти клетки имеют низкую ферментативную активность и, следовательно, сниженный уровень метаболизма, обуславливающий повышенную их устойчивость к факторам криповреждения. Напротив, в ККГ с увеличением гестационного срока нарастает количество рибосом и вакуолей, а также разветвлений эндоплазматических канальцев [14], т.е. очевидно, что ККГ – это крупные клетки (диаметр 10-30 мкм) с различной степенью вакуолизации, развитым комплексом Гольджи, системой лизосом и каналов эндоплазматической сети [2, 13, 14]. Они обладают фагоцитарной активностью, которая в 3-м триместре возрастает, что подтверждается повышением уровня экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости II [7], способны синтезировать IgG, лизоцим и защищать плод от экзогенных антигенов. Кроме этого, ККГ могут играть роль тканевого стимулятора ангиогенеза [14]. Функциональный статус ККГ свидетельствует о том, что этим клеткам свойственен высокий уровень метаболической активности и, следовательно, именно они являются наиболее криочувствительными.

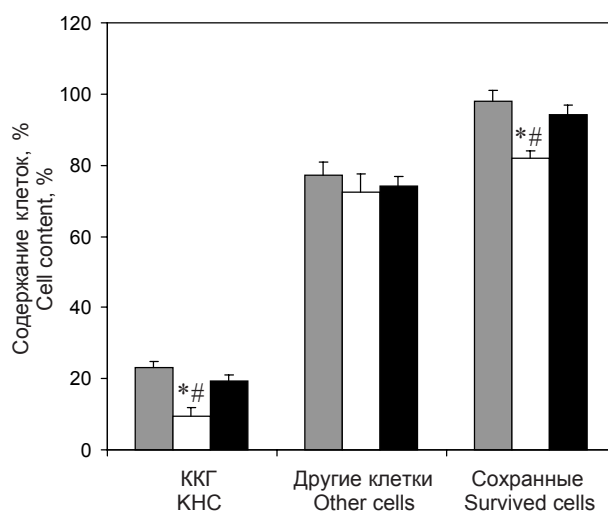
На рис. 1 приведены данные морфологического состава и сохранности выделенных клеток нативной, а также криоконсервированной в соответствии с режимами К1 и К2 плаценты.

Как видно из рис. 1, ККГ в суспензии нативной плаценты составляли  $23 \pm 1,94\%$ . Криоконсервирование СП в режиме К1 не обеспечивало такой сохранности ККГ, концентрация которых в суспензии была достоверно ниже по сравнению с их концентрацией в НСП и составляла  $9,5 \pm 2,3\%$ . Замораживание плаценты в режиме К2 достоверно не изменяло, по сравнению с НСП, концентрацию ККГ, которая составляла  $19,5 \pm 1,66\%$ . При этом и сохранность клеток, криоконсервированных в режиме К2, была выше по сравнению с сохранностью клеток после применения режима К1 ( $94 \pm 2,8$  и  $82 \pm 1,5\%$  соответственно,  $p < 0,05$ ). Следовательно, криоконсервирование СП по методу в нашей модификации обеспечивало более высокую

testifies to the fact, that these cells have low enzyme activity and, consequently, a decreased level of metabolism, stipulating their increased resistance to cryodamage factors. In contrast, in KHCs with an increase in gestation term there is the augmentation of ribosome and vacuole amount, as well as the branching of endoplasmatic small channels [14]. That is the KHCs are obviously big cells (10-30 $\mu$ m diameter) with different extent of vacuolisation, developed Golgi apparatus, lysosome system and channels of endoplasmatic reticulum [2, 13, 14]. They possess a phagocyte activity, which increases in the 3<sup>rd</sup> trimester, that is confirmed by the augmentation of the MHC-II expression level [7], they are capable of synthesising IgG, lysozyme and protecting the fetus against exogenous antigens. In addition, KHCs may play the role of tissue stimulator of angiogenesis [14]. The KHCs functional status testifies to the fact, that a high level of metabolic activity is inherent to these cells, and, consequently, they are exactly the most cryosensitive ones.

The Fig.1 shows the data of morphological composition and integrity of isolated cells of both native and cryopreserved according to C1 and C2 regimens placenta.

The Fig.1 demonstrates that the KHCs in the suspension of native placenta made  $23 \pm 1,94\%$ . The cryopreservation of PS in C1 regimen did not provide such KHCs integrity, which concentration in a suspension was statistically and significantly lower in comparison



**Рис. 1.** Влияние разных режимов криоконсервирования на количественное содержание различных популяций клеток плаценты и их сохранность. ■ – НСП; □ – КСП-К1; ■ – КСП-К2; \* – различия достоверны ( $p < 0,05$ ) по сравнению с НСП; # – различия достоверны ( $p < 0,05$ ) по сравнению с КСП-К2.

**Fig. 1.** Effect of various cryopreservation regimens on content of placenta cell populations and cell survival. ■ – NPS; □ – CPS-C1; ■ – CPS-C2; \* – significant difference ( $p < 0,05$ ) comparing to data of NPS; # – significant difference ( $p < 0,05$ ) comparing to data of CPC-C2.

сохранность как всей популяции клеток плаценты, так и ККГ, являющихся регуляторно-эффекторным звеном иммунитета плацентарной ткани [14].

Очевидно, реализация в условиях *in vivo* функции криоконсервированного материала является единственным надежным тестом аттестации полноценности трансплантируемого биологического объекта. В связи с этим в сравнительном аспекте была исследована терапевтическая эффективность СП, криоконсервированной по двум режимам, в отношении восстановления структурно-функциональной организации центральных и периферических органов ЛГПК, а также ее способность модулировать апоптотические процессы иммунокомпетентных клеток у животных с АА.

Динамика изменения отека суставов у животных (рис. 2), которым вводили в качестве терапевтического средства КСП-К2 (5-я группа) на протяжении всего периода наблюдения, была достоверно ниже по сравнению с динамикой изменения у мышей-реципиентов КСП-К1 (4-я группа) и мышей, которых лечили НСП (3-я группа).

При этом необходимо отметить, что СУВ после введения мышам КСП-К1 на 21-е сутки наблюдения составила всего лишь  $7,4 \pm 0,82\%$ , а после введения КСП-К2 –  $18 \pm 1,5\%$ , что превышало данный показатель в группе животных, которых лечили НСП и СУВ у них составила  $13 \pm 0,99\%$  (рис. 2). Причем к 21-м суткам наблюдения ИА в 5-й группе животных снижался до 1, т.е. соответствовал значению этого показателя у контрольных мышей. Следовательно, терапевтическая эффективность СП, криоконсервированной по режиму К2, была более высокой по сравнению не только с КСП-К1, но и с НСП.

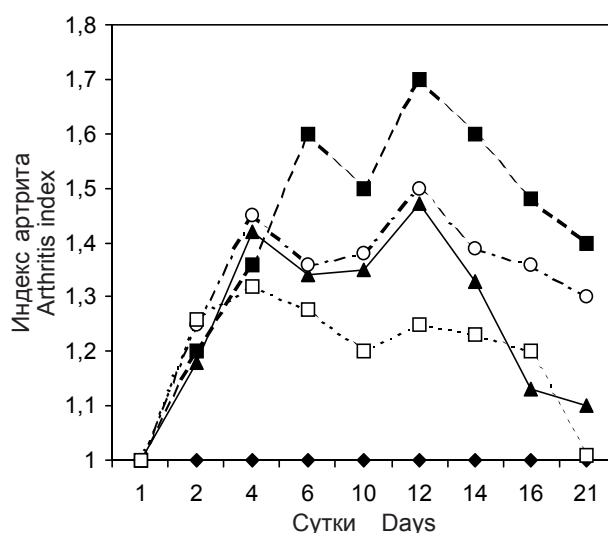
Способность СП проявлять иммунокорректирующую активность была оценена при исследовании изменений массы, содержания клеток в центральных и периферических лимфоидных органах, а также их индексов при АА до и после введения препаратов плаценты.

Как видно из данных, представленных в таблице, наиболее значительные изменения массы и количества клеток на 21-е сутки развития АА были отмечены в тимусе и лимфоузлах, региональных к месту введения ПАФ. У животных, которые получили лечение, вводимые препараты проявляли коррегирующий эффект. Криоконсервированный в обоих режимах материал, как и нативный, сохранял иммуномодулирующую активность, что характеризовалось, прежде всего, существенным ингибированием развития гиперплазии исследуемых органов. Однако НСП оказалась более эффективной в отношении восстановления исследуемых показателей в лимфатических узлах по сравнению КСП-К1 и КСП-К2. Сравнение двух режимов

with their concentration in NPS and made  $9.5 \pm 2.3\%$ . Placenta freezing with C2 regimen did not statistically and significantly change the KHCs concentration, if comparing with NPS, which made  $19.5 \pm 1.66\%$ . At the same time the cell integrity, cryopreserved under C2 regimen was higher in comparison with that after C1 regimen application ( $94 \pm 2.8$  and  $82 \pm 1.5\%$ , correspondingly,  $P < 0.05$ ). Consequently, the PS cryopreservation according to the method in our modification provided a higher integrity for all population of placenta cells and KHCs as well, being a regulatory-effector link of placenta tissue immunity [14].

The realisation of cryopreserved material function under *in vivo* conditions is obviously the unique reliable test to attest a transplanted biological material integrity. Owing to this we have studied comparatively a therapeutic efficiency of PS cryopreserved by two regimens in respect of the recovery of structural and functional organisation of central and peripheric LHPC organs, as well as its capability to modulate the apoptotic processes of immunocompetent cells in the animals with AA. The dynamics of joint oedema in the animals (Fig. 2) with CPS-C2 therapy (the 5<sup>th</sup> group) within all observation term, was statistically and significantly lower in comparison with dynamics in mice-recipients of CPS-C1 (the 4<sup>th</sup> group) and in NPS-treated mice (the 3<sup>rd</sup> group).

At the same time we should note, that ISE after introducing CPS-C1 to mice to the 21<sup>st</sup> day of observation made only 7.4% but after CPS-C2 introduction it was 18%, that exceeded this index in the group of NPS-treated animals and the ISE in them



**Рис. 2.** Динамика изменения индекса артрита у мышей с АА до и после введения НСП и СП, криоконсервированной в режимах К1 и К2. ◆ – интактная группа; ▲ – АА+НСП; ○ – АА+КСП-К2; ■ – АА; □ – АА+КСП-К1.

**Fig. 2.** Dynamics of changes in arthritis index in mice with AA before and after introduction of NPS and PS cryopreserved with C1 and C2 regimens. ◆ – intact group; ▲ – AA+NPS; ○ – AA+CPS-C2; ■ – AA; □ – AA+CPS-C1.

замораживания показало, что СП, криоконсервированная в режиме К2, обеспечивала достоверное снижение массы и количества клеток в тимусе, а также в лимфатических узлах по сравнению с СП, криоконсервированной в режиме К1. Это привело к приближению индексов исследуемых органов к контрольным значениям (индексы органов контрольных животных приняты за 1). Так, индекс тимуса после введения мышам КСП-К2 составлял  $0,95 \pm 0,03$ , а после введения КСП-К1 –  $1,35 \pm 0,02$ , индекс лимфоузлов –  $1,02 \pm 0,05$  и  $1,36 \pm 0,06$  соответственно. Достоверных отличий между 4-й и 5-й группами животных по восстановлению массы и количества клеток в селезенке выявлено не было.

Необходимо отметить, что ССО изучаемых показателей (масса органов, количество клеток на орган, индексы органов) в группе животных с АА составляла 4,5 ед. После лечения животных нативным препаратом ССО этих показателей снижалась до 1,6, после введения КСП-К1 – до 2,3, тогда как после введения КСП-К2 до 0,9 ед. Следовательно, СП криоконсервированная в режиме К2, проявляла более выраженный корректирующий эффект, по сравнению с НСП и плацентой, криоконсервированной в режиме К1.

made 13% (Fig.2). Moreover, to the 21<sup>st</sup> day of observation the AI in the 5<sup>th</sup> group of animals reduced down to 1, *i.e.* corresponded to this index value in the control mice. As a result, a therapeutic effect of PS, cryopreserved under C2 regimen was higher in comparison with not only CPS-C1, but NPS as well.

The capability of PS to manifest an immune-correcting activity was estimated when studying the changes in a mass, cell content in central and peripheric lymphoid organs, as well as their indices at AA before and after introducing placenta preparations.

The data presented in the Table show that the most significant changes in mass and cell amount to the 21<sup>st</sup> day of AA development were noted in thymus and lymph nodes, regional to the place of CFA introduction. In the treated animals the introduced preparations manifested a correcting effect. The cryopreserved under both regimens material, as well as a native one, kept an immune-modulating activity, that was characterised, first of all, by a considerable inhibition of hyperplasia development in the studied organs. However the NPS occurred to be more efficient in respect of the recovery of studied indices in lymph nodes in comparison with CPS-C1 and CPS-C2. The comparison of two freezing regimens demonstrated, that the PS, cryopreserved under C2 regimen, provided

Влияние КСП-К1 и КСП-К2 на изменение массы, содержания клеток и индексы органов лимфогемопозитического комплекса при АА  
Effect CPS-C1 and CPS-C2 on mass changes, cell content and indices of the organs from lymphohemopoietic complex at AA

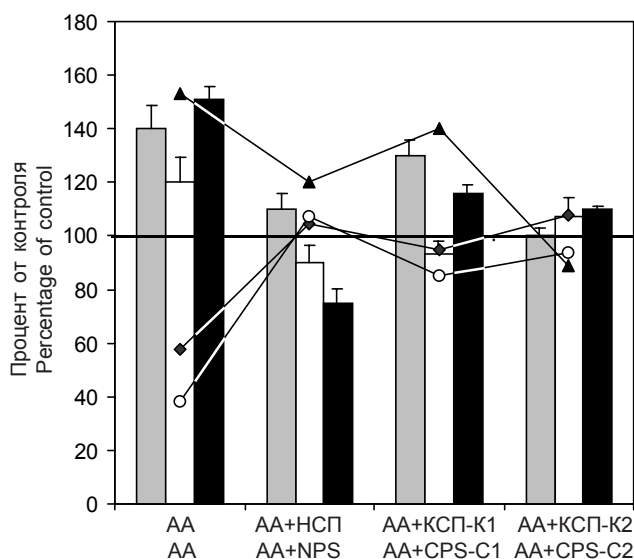
Показатели Indices	Органы Organs	АА (2-я группа) AA (2nd group)	АА+НСП (3-я группа) AA+NPS (3rd group)	АА+КСП-К1 (4-я группа) AA+CPS-C1 (4th group)	АА+КСП-К2 (5-я группа) AA+CPS-C2 (5th group)
Масса органов,% Mass of the organs,%	Тимус Thymus	$204 \pm 12,7^2$	$104 \pm 9,7^3$	$120 \pm 11,2^{1,2,3}$	$93 \pm 5,6^3$
	Селезенка Spleen	$120 \pm 9,2$	$112 \pm 5,2$	$91 \pm 4,6^{2,3}$	$91 \pm 8,1^{2,3}$
	Лимфоузлы Lymph nodes	$164 \pm 10,5^2$	$94 \pm 4,9^3$	$129 \pm 4,8^{1,2,3}$	$120 \pm 3,2^{2,3}$
Содержание клеток в органе,% Cell content in the organ,%	Тимус Thymus	$133 \pm 6,5$	$117 \pm 11,2$	$124 \pm 8,5^{1,2}$	$102 \pm 3,2^3$
	Селезенка Spleen	$110 \pm 9,9^2$	$94 \pm 3,3$	$93 \pm 8,8$	$104 \pm 8^3$
	Лимфоузлы Lymph nodes	$320 \pm 18,3^2$	$112 \pm 10,2^3$	$240 \pm 12,6^{1,2,3}$	$140 \pm 9,99^{2,3}$
Индексы органов Organ indices	Тимус Thymus	$2,3 \pm 0,09^2$	$1,35 \pm 0,9^3$	$1,35 \pm 0,02^{1,3}$	$0,95 \pm 0,03^{2,3}$
	Селезенка Spleen	$1,4 \pm 0,01^2$	$1,2 \pm 0,09^3$	$1,3 \pm 0,09^{2,3}$	$0,91 \pm 0,03^3$
	Лимфоузлы Lymph nodes	$1,78 \pm 0,11^2$	$0,9 \pm 0,06^3$	$1,36 \pm 0,06^{1,2,3}$	$1,02 \pm 0,05^3$

**Примечания:** Показатели 1-й группы контрольных мышей приняты за 100%; различия достоверны (при  $P < 0,05$ ): <sup>1</sup> – между 4-й и 5-й группами; <sup>2</sup> – по сравнению с 3-й группой; <sup>3</sup> – по сравнению со 2-й группой.

**Notes:** Indices of the 1st group are considered as 100%; significant changes (at  $P < 0.05$ ): <sup>1</sup> – between data of 4th and 5th groups; <sup>2</sup> – comparing to data of 3rd group; <sup>3</sup> – comparing to data of 2nd group.

При изучении апоптоза ИКК животных с АА [4] мы обнаружили существенное повышение индекса апоптоза на 7-е и 14-е сутки после трансплантации КСП с последующим его снижением и параллельным нарастанием выраженности клинических симптомов АА к 21-м суткам наблюдения. Снижение проапоптотического потенциала КСП в отдаленные сроки может быть обусловлено его "истощением" в плаценте, криоконсервированной в режиме К1. Поэтому мы изучили в сравнительном аспекте влияние СП, криоконсервированной в режимах К1 и К2, на апоптоз ИКК, а также на степень проявления воспалительного процесса.

Как видно из рис. 3, после трансплантации НСП у мышей (3-я группа) прослеживалась четкая тенденция к снижению (по сравнению с животными, которых не лечили) таких показателей, как ИА и количества адгезивных клеток. Отмечалось снижение количества лейкоцитов и клеток в ПП на 30 и 76% соответственно. При этом в ПП и ПК у животных 3-й группы достоверно повышалось содержание находящихся в апоптозе клеток в сравнении с мышами 2-й группы, которых не лечили



**Рис. 3.** Влияние трансплантации СП, криоконсервированной в разных режимах, на степень выраженности воспалительного процесса и апоптоза ИКК при АА; 21-е сутки наблюдения (показатели интактных мышей приняты за 100%). ■ – ИА; □ – количество лейкоцитов; ■ – количество клеток в ПП; ▲ – количество АК; ○ – индекс апоптоза клеток ПП; ◆ – индекс апоптоза нейтрофильных гранулоцитов.

**Fig. 3.** Effect of transplantation of PS cryopreserved in various regimens of the manifestation extent of inflammation process and ICC apoptosis at AA; 21st day of observation (data of intact animals were considered as 100%). ■ – IA; □ – leukocyte number; ■ – cell number in PC; ▲ – AC number; ○ – apoptosis index in PC cells; ◆ – apoptosis index of neutrophilic granulocytes.

a statistically significant decrease in mass and cell amount in thymus, as well as in lymph nodes in comparison with that, cryopreserved under C1 regimen. This resulted in the approaching of studied organs indices to the control values (the organ indices of control animals were accepted for 1). Thus, the thymus index after CPS-C2 introduction to mice made  $0.95 \pm 0.03$ , and after CPS-C1 introduction it was  $1.35 \pm 0.02$ , the lymph nodes index made  $1.02 \pm 0.05$  and  $1.36 \pm 0.06\%$ , correspondingly. No statistically significant differences between the 4<sup>th</sup> and 5<sup>th</sup> groups of animals on mass and cell amount recovery in spleen were revealed.

It should be noted that TED of studied indices (organs mass, cell amount per organ, organ indices) in the group of animals with AA made 4.5 units. After treating animals with native preparation the TED of these indices reduced down to 1.6, after CPS-C1 introduction it did down to 2.3, whereas after CPS-C2 introduction it reduced down to 0.9 units. Consequently, the cryopreserved under C2 regimen PS demonstrated more manifested correcting effect, in comparison with NPS and placenta, cryopreserved under C1 regimen.

When studying the ICC apoptosis of animals with AA [14] we have found out a considerable increase in apoptosis index to the 7<sup>th</sup> and 14<sup>th</sup> day after CPS transplantation with following its decrease and parallel growth of manifestation of AA clinical symptoms to the 21<sup>st</sup> observation day. A decrease in CPS proapoptotic potential in distant terms can be stipulated by its "exhausting" in C1-cryopreserved placenta. Therefore we have studied in a comparative aspect the effect of PS, cryopreserved under C1 and C2 regimens, on ICC apoptosis, as well as on the manifestation degree of inflammation process.

The Fig. 3 demonstrates that after NPS transplantation to mice (3<sup>rd</sup> group) there was traced a distinct tendency to a decrease (in comparison with non-treated animals) in such indices as AI and a number of adhesive cells. A reduction of leukocyte number and PC cells by 30 and 76%, correspondingly, was noted. At the same time in PC and PB in the 3<sup>rd</sup> group's animals there was a statistically significant increase in the content of cells in apoptosis in comparison with non-treated mice of the 2<sup>nd</sup> group (the 3<sup>rd</sup> group: the index of apoptosis of PC was 104 and 107% for PB; the 2<sup>nd</sup> group: the index of apoptosis of PC was 57.6 and 38.4% for PB).

It should be noted, that TED of studied indices in animals with AA made 4.8 and after NPS introduction it was 1.3 units.

The mice treatment with PS, cryopreserved by C1 regimen (4<sup>th</sup> group) resulted in not statistically significant AI decrease, in comparison with the non-

(3-я группа индекс апоптоза ПП 104, ПК 107%; 2-я группа индекс апоптоза ПП 57,6, ПК 38,4%).

Важно отметить, что ССО исследуемых показателей у животных с АА составила 4,8, а после введения НСП 1,3 ед.

Лечение мышей СП, криоконсервированной в режиме К1 (4-я группа), приводило к достоверному снижению ИА, количества адгезивных клеток и достоверному снижению количества лейкоцитов, клеток в ПП по сравнению с животными, которых не лечили. Трансплантация КСП-К1 повышала по сравнению со 2-й группой процент клеток, находящихся в апоптозе (4-я группа индекс апоптоза ПП 94,6, ПК 85%). Однако индекс апоптоза клеток в ПП и ПК в данной группе был ниже по сравнению с группой мышей, которых лечили НСП. При этом ССО исследуемых показателей в 4-й группе составила 1,9 ед.

После лечения мышей с АА КСП-К2 (5-я группа) наблюдалась еще более выраженная коррекция (по сравнению с 3-й группой) ИА, процента АК, количества клеток в ПП. При этом достоверно повышался индекс апоптоза клеток, который в ПП составлял 108%, а в ПК – 94% и был соответственно на 13,4 и 9% выше по сравнению с 4-й группой. Это отразилось на изменении показателя ССО, который в 5-й группе мышей составил 0,7 ед. Индекс апоптоза после применения КСП-К2 был выше на 6-7%, чем после введения НСП, что подчеркивает более выраженную проапоптотическую активность КСП-К2 в сравнении с НСП.

## Выводы

Таким образом, представленные экспериментальные данные свидетельствуют, что метод криоконсервирования суспензии плаценты в нашей модификации (режим К2) за счет обеспечения высокой сохранности гетерогенного состава плаценты и способности в течение длительного времени модулировать апоптотические процессы иммунокомпетентных клеток, сохраняет иммуномодулирующую активность в отношении восстановления структурно-функциональной полноценности органов лимфогемопоетического комплекса, проявляющуюся в выраженном терапевтическом эффекте.

## Литература

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы микробиологических исследований. – Л.: Медицина, 1972. – 180 с.
2. Введение в клиническую морфологию плаценты человека / С.А. Степанов, М. И. Исакова. – Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 1991. – 168 с.

treated animals, adhesive cell number and a statistically significant decrease in leukocyte number, cells in PC. The CPS-C1 transplantation increased, in comparison with the 2<sup>nd</sup> group, the percentage of cells, being in apoptosis (4<sup>th</sup> group: the index of apoptosis of PC was 94.6 and 85% for PB). However the index of apoptosis of cells in PC and PB in this group was lower in comparison with the group of NPS-treated mice. At the same time the TED of studied indices in the 4<sup>th</sup> group made 1.9 units.

After CPS-C2 treating mice with adjuvant arthritis (5<sup>th</sup> group) a much more manifested correction (in comparison with 3<sup>rd</sup> group) of adhesive cell percentage, cell number in PC was observed. At the same time there was a statistically significant increase in apoptotic index of cells: in PC it made 108 but 94% in PB and it was higher by 13.4 and 9%, correspondingly, in comparison with the 4<sup>th</sup> group. This affected a change in TED index, which in the 5<sup>th</sup> group of mice made 0.7 units. The apoptotic index after CPS-C2 application was higher by 6-7% than after NPS introduction, that emphasised a more manifested CPS-C2 proapoptotic activity in comparison with NPS.

## Conclusions

Thus, the presented experimental data testify to the fact, that the method of PS cryopreservation in our modification (C2 regimen) due to providing a high integrity of heterogeneous placenta composition and the capability to modulate apoptotic processes of immune-competent cells within a long time period, preserved an immune-modulating activity in respect of the recovery of structural and functional integrity of LHPC organs, manifesting in an apparent therapeutic effect.

## References

1. Ashmarin I.P., Vorobyev A.A. Statistical methods of microbiological studies. – Leningrad: Meditsina, 1972. – 180 p.
2. Introduction in clinical morphology of human placenta / Edited by S.A. Stepanov, M.I. Isakova. – Saratov: Publishing House of Saratov University, 1991. – 168 p.
3. 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.
4. Goltsev A.N., Grischenko V.I., Rassokha I.V., Ostankov M.V. Possibility of using the embryo fetoplacental complex products to correct apoptotic processes under autoimmune diseases // Problems of Cryobiology. – 2003. – N4. – P.41-49.
5. Goltsev A.N., Ostankova L.V., Lutsenko E.D. et al. Response of lymphohemopoietic system of the organism on the injection of the products of the fetoplacental complex // Problems of Cryobiology. – 2000. – N2. – P. 15-31.
6. Grischenko V.I., Morozova T.F., Vorotilin O.M. et al. Preparation and storage of cryopreserved placenta suspension for clinical application: Methodical recommendations. – Kharkiv, 1997. – 14 p.



3. 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. Гольцев А.Н., Грищенко В.И., Рассоха И.В., Останков М.В. Возможность использования продуктов эмбриофето-плацентарного комплекса как корректора апоптотических процессов при аутоиммунных заболеваниях // Пробл. криобиологии.– 2003.– №4.– С. 41-49.
5. Гольцев А. Н., Останкова Л.В., Луценко Е.Д. и др. Ответ лимфогемопозитической системы на введение продуктов фетоплацентарного комплекса // Пробл. криобиологии.– 2000.– №2.– С. 15-31.
6. Грищенко В.И., Морозова Т.Ф., Воротилин О.М. та ін. Приготування та зберігання кріоконсервованої суспензії плаценти для клінічного використання: Метод. рекомендації.– Харків, 1997.– 14 с.
7. Павлов О.В., Сельков С.А., Селютин А.В. и др. Морфо-функциональные характеристики плацентарных макрофагов *in vitro* при различных исходах беременности // Бюл. эксперим. биол. и мед.– 1999.– №4.– С. 429-432.
8. Прибылова О.В. Возможности использования гетеротической трансплантации криоконсервированной плацентарной ткани при лечении климактерического синдрома // Медицина сегодня и завтра.– 1997.– Вып.2.– С. 109.
9. Саратиков А.С., Венгеровский А.И., Прищепин Т.П. Адьювантная болезнь (морфология, патогенез, экспериментальная терапия).– Томск: Изд-во Томск. ун-та, 1983.–101 с.
10. Справочник по клиническим лабораторным методам исследования / Под. ред. Е. А. Костенко.– М.: Медицина, 1968.– 437 с.
11. Строна В.И., Прокопюк В.Ю., Прибылова О.В. Морфологическая оценка сохранности плацентарной ткани человека после различных схем криоконсервирования // Медицина сегодня и завтра.– 1997.– Вып.2.– С. 109-110.
12. Фильченков А.А., Стойка Р.С. Апоптоз и рак.– Киев: Морион, 1999.– 184 с.
13. Цирельников Н.И. Гистофизиология плаценты человека.– Новосибирск: Наука, 1980.– 184 с.
14. Шатилова И.Г., Миланов А.П., Кадыров М. Плацентарные макрофаги (клетки Кащенко-Гофбауэра) и их роль в патологии // Архив патологии.– 1997.– №5.– С. 70-74.
15. Commission of European Communities. Council Directive of 24 November 1988 on the approximation of laws: regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. 1986. 86/609/EES. ISSN 037806978.
16. 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.
7. Pavlov O.V., Selkov S.A., Selyutin A.V. et al. Morphofunctional characteristics of placental macrophages in vitro at different issues of pregnancy // Bull. Eksp. Biol. i Med.– 1999.– N4.– P. 429-432.
8. Pribylova O.V. Possibilities of usage of cryopreserved placental tissue heterotopic transplantation when treating climacteric syndrome//Meditsina segodnya i zavtra.- 1997.- Issue 2.- P.109.
9. Saratikov A.S., Vengerovsky A.I., Prischepin T.A. Adjuvant disease (morphology, pathogenesis, experimental therapy).– Tomsk, 1983.– 101 p.
10. Reference book on clinical laboratory methods of investigations/Edited by E.A. Kostenko.- Moscow: Meditsina, 1968.- 437p.
11. Strona V.I., Prokopyuk V.Yu., Pribylova O.V. Morphological evaluation of human placental tissue integrity after different schemes of cryopreservation // Meditsina segodnya i zavtra.– 1997.– Issue 2.– P. 109-110.
12. Filchenko A.A., Stoika R.S. Apoptois and cancer.– Kiev: Morion, 1999.– 184 p.
13. Tsirelnikov N.I. Human placenta histophysiology.– Novosibirsk: Nauka, 1980.– 184 p.
14. Shatilova I.G., Milanov A.P., Kadyrov M. Placental macrophages (Kaschenko-Hofbauer cells) and their role in pathology // Arkhiv patologii.– 1997.– N5.– P. 70-74.
15. Commission of European Communities. Council Directive of 24 November 1988 on the approximation of laws: regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. 1986. 86/609/EES. ISSN 037806978.
16. 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.

Accepted in 24.11.2004

Поступила 24.11.2004