

УДК 361.36.013.014.41:616.441-002-092.4

Д.П. ГЛАДКИХ, А.Н. ГОЛЬЦЕВ*

Оценка терапевтического потенциала криоконсервированных клеток фетальной печени в модели экспериментального аутоиммунного тиреоидита

UDC 361.36.013.014.41:616.441-002-092.4

D.P. GLADKIKH, A.N. GOLTSEV*

Estimation of Therapeutic Potential of Fetal Liver Cryopreserved Cells in Model of Experimental Autoimmune Thyroiditis

В экспериментальной модели аутоиммунного тиреоидита продемонстрирована терапевтическая эффективность нативных и криоконсервированных клеток фетальной печени (КФП). Рассмотрены преимущества и возможные механизмы лечебного действия препаратов фетоплацентарного комплекса и в частности КФП.

Ключевые слова: аутоиммунный тиреоидит, клетки фетальной печени, терапевтический потенциал препаратов фетоплацентарного комплекса.

В експериментальній моделі аутоімунного тиреоїдиту продемонстрована терапевтична ефективність нативних та криоконсервованих клітин фетальної печінки (КФП). Розглянуті переваги та можливі механізми лікувальної дії препаратів фетоплацентарного комплексу і зокрема КФП.

Ключові слова: аутоімунний тиреоїдит, клітини фетальної печінки, терапевтичний потенціал препаратів фетоплацентарного комплексу.

In experimental model of autoimmune thyroiditis a therapeutic efficiency of native and cryopreserved fetal liver cells (FLCs) was demonstrated. The advantages and possible mechanisms of therapeutic effect of fetoplacental complex preparations and FLCs, in particular, were envisaged.

Key-words: autoimmune thyroiditis, fetal liver cells, therapeutic potential of fetoplacental complex preparations.

Развитие аутоиммунных заболеваний (АИЗ) является частой причиной разбалансировки гармоничного взаимодействия систем нейроиммунно-эндокринного блока (НИЭБ) [2, 32]. Очевидно, что для коррекции его состояния должны использоваться препараты надклональной системной регуляции. Комплексные исследования разного уровня показали, что такой активностью обладают продукты фетоплацентарного комплекса (ПФПК) [2, 10, 15, 29, 36]. Целесообразность их применения обоснована идентификацией в ПФПК широкого спектра биологически активных субстанций, включая клетки стволового компартмента, а также различные медиаторы химической природы [10, 36]. При этом очевидна необходимость проведения экспериментальных исследований механизма их лечебного эффекта. Дальнейшей конкретизации и подтверждения требует тезис о том, что полифункциональность ПФПК объясняется их способностью в усло-

Autoimmune diseases (AIDs) development is a frequent cause in misbalancing a harmonic interaction of neuroimmunoendocrine block (NIEB) systems [2, 32]. It is evident, that the preparations of supraclonal system regulation should be used for its state correction. Combined studies of different levels demonstrated the products of fetoplacental complex (PFPC) to possess such an activity [2, 10, 15, 29, 36]. The expediency of their application is substantiated by identifying a wide range of biologically active substances in PFPC, including stem compartment cells, as well as different mediators of chemical origin [10, 36]. At the same time the need in experimental studies of their therapeutic effect mechanism is evident. The statement about the fact, that the PFPC polyfunctionality is explained by their capability to respond to the "case request" under special pathology, needs further specification and confirmation [10]. Actually, the PFPC cell component with a powerful regulatory potential imple-

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

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

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.:+38
(057) 373-57-89, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта:
cryo@online.kharkov.ua

* To whom correspondence should be addressed: 23,
Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 373
5789, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

виях развития конкретной патологии отвечать на “запрос ситуации” [10]. Действительно, клеточный компонент ПФПК, обладая мощным регуляторным потенциалом, реализует его в зависимости от конкретного цитокинового профиля организма реципиента [5, 10]. Следовательно, широкий диапазон активности ПФПК в организме реципиента будет определяться не только потенциалом каждого компонента донорской гетерогенной клеточной популяции, но и характером изменения цитокинового профиля при какой-либо патологии [5, 6, 29]. В полной мере этот тезис справедлив и в отношении большинства ПФПК, в частности и фетальной печени (ФП).

В ракурсе рассматриваемой в данной работе темы особую значимость имеет иммуномоделирующий потенциал клеток ФП (КФП), оценка которого в различных системах и условиях была начата более 20 лет назад [5, 6, 31, 34, 36] и продолжается до настоящего времени.

Криоконсервирование биологических объектов – обязательный компонент технологического процесса их применения в клинической практике [3, 9, 15]. Известно, что криоконсервирование оказывает многовекторное влияние на биообъект. Степень такого влияния определяется не только особенностями и спектром физико-химических факторов, реализуемых в процессе криоконсервирования, но и исходным состоянием биообъекта [13]. Например, для КФП важна зависимость криоустойчивости от срока гестации [3], стадии дифференцировки стволовых кроветворных (СКК) и некроветворных мезенхимальных стволовых клеток (МСК), степени экспрессии мембранных маркеров, стадии клеточного цикла и т. д. [9]. Таким образом, после криоконсервирования не исключена модификация каждой из этих структурно-функциональных характеристик КФП и, следовательно, их терапевтический потенциал при лечении различных форм АИЗ. Однако объективное подтверждение (либо несостоятельность) этого тезиса возможно при адекватном выборе моделей АИЗ и спектра оцениваемых показателей, характеризующих состояние того или иного компонента НИЭБ.

Цель данной работы – оценка терапевтического потенциала криоконсервированных КФП в экспериментальной модели аутоиммунного тиреоидита.

Материалы и методы

Эксперименты выполняли на мышках-самках линии C57Bl/6J 5-месячного возраста массой 20 г, которые были представлены питомником РАМН “Столбовая” и содержались в стандартных условиях вивария ИПКиК НАНУ.

ments it depending on a specific cytokine profile of recipient’s organism [5, 10]. Consequently, a wide range of PFPC activity in recipient’s organism will be determined not only by potential of each component of donor heterogenic cell population, but the character of cytokine profile change under any pathology as well [5, 6, 29]. This statement is entirely correct in respect to the most PFPC, particularly, fetal liver (FL) as well.

Considering aspect of this paper of especial importance is an immune-modelling potential of FL cells (FLCs), the estimation of which in different systems and conditions has started more than 20 years ago [5, 6, 31, 34, 36] and lasted until now.

Cryopreservation of biological objects is a mandatory component of technological process of their application in clinical practice [3, 9, 15]. Cryopreservation is known to cause a multi-vector effects on a bioobject. The degree of such an effect is determined not only by the peculiarities and range of physical and chemical factors, realised during cryopreservation, but bioobject’s initial state as well [13]. As an example, for FLCs of importance is the dependency of cryoresistance on gestation term [3], differentiation stage of hemopoietic stem cells (HSCs) and non-hemopoietic mesenchymal stem cells (MSCs), expression degree of membrane markers, cell cycle stage *etc.* [9]. Thus, after cryopreservation the modification of each of these structural and functional FLCs characteristics and, consequently, their therapeutic potential, when treating different AIDs forms, is quite possible. However, an objective confirmation (or failure) of this statement is possible under an adequate selection of AIDs models and the range of estimated indices, characterising the state of this or that NIEB component.

This research was aimed to assess a therapeutic potential of cryopreserved FLCs in experimental model of autoimmune thyroiditis.

Materials and methods

Experiments were carried out in 5 months’ C57Bl/6J male mice of 20 g, provided the nursery of the Russian Academy of Medical Sciences “Stolbovaya” and maintained under the standard conditions of vivarium of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine.

Animals were immunised with thyroid antigen as a part of thyroid gland (TG) tissue homogenate, prepared via a mild mechanical organ destruction in Potter homogenizer with adding physiological solution in respect of 1 ml/100 mg, with further filtration through a capron filter and centrifugation within 5 min at 1,000 rot/min [37]. The content of total protein was determined in the obtained supernatant liquid as an immunogenic substrate using biuret reaction [16].

Животных иммунизировали тиреоидным антигеном в составе гомогената ткани щитовидной железы (ЩЖ), приготовленного путем мягкой механической деструкции органа в гомогенизаторе Поттера с добавлением физиологического раствора из расчета 1 мл/100 мг, с дальнейшей фильтрацией через капроновый фильтр и центрифугированием в течение 5 мин при 1000 об/мин [37]. В полученной надосадочной жидкости как иммуногенном субстрате определяли содержание общего белка при помощи биуретовой реакции [16].

Аутоиммунный тиреодит (АИТ) индуцировали введением полученного тиреоидного антигена (1–1,5 мг/мл по общему белку) с полным адьювантом Фрейнда в соотношении 1:1 в дозе 0,1 мл/мышь подкожно в основание хвоста дважды с интервалом 14 суток [26, 37].

Интенсивность образования аутоантител (ААТ) к ткани щитовидной железы в сыворотке крови мышей определяли реакцией пассивной гематоглиниции (РПГА) с модифицированными бараными эритроцитами [17, 19].

Гормонопродуцирующую активность ЩЖ косвенно оценивали по уровню свободного тироксина (T_4) и свободного трийодтиронина (T_3) в сыворотке крови животных с помощью иммуноферментного метода с использованием наборов Тироед-ИФА-свободный T_4 (“Алкор Био”, Россия) и ИммуноФА-Св T_3 (“НВО Иммунотех”, Россия).

Для определения иммунного статуса была проведена оценка клеточного звена иммунитета (КЗИ). Для этого в селезенке мышей опытных и контрольных групп определяли содержание клеток, экспрессирующих фенотипические маркеры CD3 (Т-общие лимфоциты), CD4 (Т-хелперы, T_h), CD8 (Т-супрессоры/цитотоксические, T_c), CD19 (В-лимфоциты) методом проточной цитофлуориметрии (FACS Calibur, BD, США) с использованием моноклональных антител фирм Biologend (США) и BD (США).

Определяли КЗИ, содержание ААТ и гормонов ЩЖ на 14, 21, 28 и 35-е сутки после повторной иммунизации животных

Клетки фетальной печени получали у мышей линии СВА/Н на 14-е сутки гестации. Выделенные в стерильных условиях эмбрионы трижды промывали в чашке Петри физиологическим раствором с канамицином (100 Ед/мл). Выделенную ФП дезинтегрировали в гомогенизаторе Поттера с добавлением среды 199 (Sigma, Германия), содержащей 3% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) и 2% цитрата натрия (рабочая среда), ресуспендировали шприцем через иглы уменьшающегося диаметра и пропускали через многослойный капроновый фильтр.

Autoimmune thyroiditis (AIT) was induced by introducing the procured thyroid antigen (1–1.5 mg/ml by total protein) with Freund adjuvant in 1:1 ratio in the dose of 0.1 ml/mouse subcutaneously into the caudal base twice with 14 days' interval [26, 37].

The intensity of formation of autoantibodies (AABs) vs. thyroid gland tissue in murine blood serum was determined with the reaction of passive hemagglutination (RPHA) with modified sheep erythrocytes [17, 19].

Hormone-producing activity of TG was indirectly estimated by the level of free thyroxine (T_4) and free triiodothyronine (T_3) in animal blood serum with the immune-enzyme method using the Thyroid-IEA-free T_4 (“Alkor Bio”, Russia) and ImmunoEA-Fr T_3 kits (“Immunotek”, Russia).

Cell link of immunity (CLI) was estimated to determine the immune status. For this purpose in experimental and control mice spleen we determined the cell content, expressing phenotypic markers of CD3 (T-total lymphocytes), CD4 (T-helpers, T_h), CD8 (T-suppressors/cytotoxic, T_s), CD19 (B-lymphocytes) using the flow cytometry (FACS Calibur, BD, USA) with monoclonal antibodies (Biologend, USA and BD, USA).

The CLI, AAB and TG hormone content were determined to the 14th, 21st, 28th and 35th days after repeated immunisation of animals.

Fetal liver cells (FLCs) were derived in CBA/H mice to the 14th gestation day. The embryos, isolated under sterile conditions, were three-fold washed in Petri dishes using physiological solution with kanamycin (100 Units/ml). The isolated FL was disintegrated in Potter homogenizer with adding medium 199 (Sigma, Germany), containing 3% fetal bovine serum (FBS) and 2% sodium citrate (handling medium), resuspended with syringe via needles of reducing diameter and passed through a multilayered capron filter.

Cryopreservative solution was prepared of medium 199, containing 20% dimethyl sulfoxide (DMSO) (v/v), 10% FBS and 2% sodium citrate.

FLCs in 1×10^6 /ml concentration were cryopreserved in 1.8 ml plastic vials (Nunc, Germany) with UOP-6 device (Special Designing and Technical Bureau with Experimental Unit of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine) by the two-step program with 1°C/min freezing rate down to -25°C and following immersion into liquid nitrogen (-196°C) according to the method [14]. Samples were thawed on water bath at $40\text{--}41^\circ\text{C}$ within 45–50 min under a constant vial shuttling [14].

DMSO was removed from suspension after thawing using a single slow adding of an equal volume of handling medium with following centrifugation (400 g, 10 min). Cell number in the suspension prior to and

Криоконсервирующий раствор был приготовлен на основе среды 199, содержащей 20% диметилсульфоксида (ДМСО) (v/v), 10% ЭТС и 2% цитрата натрия.

КФП в концентрации 1×10^6 /мл криоконсервировали в пластиковых ампулах Nunc (Германия) объемом 1,8 мл на установке УОП-6 (СКТБ с ОП ИПКиК НАН Украины) по двухэтапной программе со скоростью замораживания $1^\circ\text{C}/\text{мин}$ до -25°C на 1-м этапе и последующим погружением в жидкий азот (-196°C) в соответствии с методом [14]. Оттаивание образцов проводили на водяной бане при температуре $40\text{--}41^\circ\text{C}$ в течение $45\text{--}50$ с при постоянном шутелировании ампул [14]. Удаление ДМСО из суспензии после отогрева осуществляли путем однократного медленного добавления равного объема рабочей среды с последующим центрифугированием (400 g, 10 мин). Количество клеток в суспензии до и после криоконсервирования подсчитывали в камере Горяева [16]. Сохранность КФП определяли методом суправитального окрашивания трипановым синим [16].

КФП, сохранность которых составляла не менее 80%, вводили мышам-реципиентам C57Bl/6J в дозе 5×10^6 /мышь однократно внутривенно через 7 суток после окончания индукции АИТ. В качестве контроля использовали клетки взрослой печени (КВП) той же линии мышей, что и КФП, введенные в указанной дозе.

Животные были разделены на следующие группы: 1 – интактные животные (контроль 1) ($n = 10$); 2 – животные после индукции АИТ без лечения ($n = 20$); 3 – животные после индукции АИТ и введения нативных КФП (нКФП) ($n = 20$); 4 – животные после индукции АИТ и введения криоконсервированных КФП (кКФП) ($n = 20$); 5 – животные после индукции АИТ и введения КВП (контроль 2) ($n = 20$).

Все выполняемые в работе манипуляции с мышами не противоречат “Общим принципам экспериментов на животных”, одобренным II Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2004) и согласуются с положениями “Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей” (Страсбург, 1985).

Полученные экспериментальные данные статистически обработаны в электронных таблицах “Microsoft Excel 2000” с использованием критерия Стьюдента-Фишера.

Результаты и обсуждение

Аутоиммунный тиреоидит относят к АИЗ, развитие которых обусловлено срывом естественной толерантности к собственным антигенам ЩЖ [1, 26, 27]. Мультифакторность и этиология АИТ

after cryopreservation was calculated in Goryaev’s chamber [16]. FLCs integrity was determined using the method of trypan blue supravital staining [16].

FLCs, which integrity made not less, than 80%, were once intravenously introduced into the C57Bl/6J mice-recipients in the dose of 5×10^6 /mouse 7 days after finishing the AIT induction. The adult liver cells (ALCs) of the same murine line as for FLCs, introduced in the mentioned dose, were used as the control.

The animals were divided into the following groups: 1 – intact animals (control 1) ($n = 10$); 2 – animals after AIT induction without treatment ($n = 20$); 3 – those after AIT induction and native FLCs (nFLCs) introduction ($n = 20$); 4 – those after AIT induction and cryopreserved FLCs (cFLCs) introduction ($n = 20$); 5 – those after AIT induction and ALCs introduction (control 2) ($n=20$).

All the manipulations with mice, performed in the research, do not contradict with the “General ethical principles of experiments in animals”, approved by the 2st National Congress on Bioethics (Kiev, 2004) and agreed with the statements of the “European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes” (Strasbourg, 1985).

The obtained experimental data were statistically processed with “Microsoft Excel 2000” using Student-Fisher criterion.

Results and discussion

Autoimmune thyroiditis is referred to the AIDs, which development is stipulated by the failure of natural tolerance to own TG antigens [1, 26, 27]. The multifactor nature and etiology of AIT are stipulated by hereditary, genetic determination, aggravation of this pathology manifestation under “layering” of unfavourable factors (stress-inducible factors, different infectious forms, ionising irradiation, intoxication with poisons and other toxic substances) [12].

The question is mostly in disorder of hematothyroid barrier and autoimmune response development to the “sequestered” native TG antigens [1]. Of note is the value of modification of native and protein structure of thyroglobulin (viral infection *etc.*) with changing the profile of its immunologic epitopes (“epitope distribution”) [11]. In spite of this fact, an immunogenic potential of TG proteins, especially, thyroglobulin, is the base of experimental reproduction of TG autoimmune genesis pathology [26, 37]. Generally, both correct methodological approaches of AIT induction and objective methods for its diagnostics have still remained actual [18]. Of perspective is, for example, the widening of the range of the indices, characterising not only the TG morphofunctional state under AIT, but the status of systems, participating in its development as well. Such an approach is admissible to objectify the esti-

закljučаются в наследственной, генетической детерминированности, аггравации манифестации данной патологии при “наслоении” неблагоприятных факторов (стрессиндуцибельные факторы, различные формы инфекции, ионизирующее излучение, отравление ядами и другими токсическими веществами) [12].

Преимущественно речь идет о нарушении гематотиреоидного барьера и развитии аутоиммунной реакции на “секвестрированные” нативные антигены ЩЖ [1]. Следует отметить значимость модификации нативной белковой структуры тиреоглобулина (вирусная инфекция и др.) с изменением профиля иммунологических его эпителипов (“эпитопное распространение”) [11]. Несмотря на это, иммуногенный потенциал белков ЩЖ, особенно тиреоглобулина, лежит в основе экспериментального воспроизведения патологии аутоиммунного генеза ЩЖ [26, 37]. В общем, корректные методологические подходы индукции АИТ, как и объективные методы его диагностики, остаются актуальными [18]. Перспективно, например, расширение спектра показателей, характеризующих не только морфофункциональное состояние ЩЖ при АИТ, но и статуса систем, причастных к его развитию. Такой подход приемлем и для объективизации оценки эффективности проводимой терапии ПФПК, а именно КФП, при данной патологии.

Результаты исследований показали, что иммунизация мышей субстратом, содержащим тиреоидный антиген, сопровождалась появлением в сыворотке крови всех животных ААТ. На 14-е сутки после последней иммунизации они определялись в максимальном титре (разведение сыворотки 1:512) и оставались на достаточно высоком уровне до 35-х суток (табл. 1). На этом фоне существенно изменялась гормонопродуцирующая активность ЩЖ. При этом изменение концентрации тироксина (T_4) (рис. а) и трийодтиронина (T_3) (рис. б) после индукции АИТ имело волнообразный характер. Так, содержание T_4 на 14-е сутки было достоверно ниже нормы, но уже к 21-м суткам превышало ее в два раза. К 28-м суткам концентрация T_4 снижалась до уровня нормы и снова достоверно повышалась к 35-м суткам.

Концентрация T_3 в течение 14–28 суток была достоверно ниже нормы и только к 35-м суткам приблизилась к ее уровню. Эти данные подтверждают характерное для АИТ нарушение гормонопродуцирующей активности ЩЖ [1, 27]. Существенно, что гиперпродукция T_4 отмечалась на 21 и 35-е сутки, т.е. через 7 суток после наиболее выраженного накопления антител (14 и 28-е сутки).

Таблица 1. Титры антитиреоидных антител в сыворотке крови животных с АИТ до и после применения КФП

Table 1. Titers of antithyroid antibodies of animal blood serum with АИТ prior to and after use of FLCs

| Группы животных Animal groups | Период после иммунизации, сутки Post immunization period, days | | | |
|----------------------------------|---|---------------|---------------|---------------|
| | 14 | 21 | 28 | 35 |
| АИТ AIT | 1:512 | 1:128 – 1:256 | 1:256 – 1:512 | 1:128 – 1:256 |
| АИТ + нКФП AIT + nFLCs | 1:32 – 1:64 | 1:4 – 1:8 | 1:32 – 1:64 | 1:32 – 1:64 |
| АИТ + кКФП AIT + cFLCs | 1:32 – 1:64 | 1:32 – 1:64 | 1:64 – 1:128 | 1:64 |
| АИТ + КВП AIT + ALCS | 1:256 – 1:512 | 1:128 – 1:256 | 1:256 – 1:512 | 1:256 – 1:512 |

Примечание: приведено последнее разведение сыворотки, при котором определяется активность антител.

Note: final serum dilution, whereat antibody activity is determined, has been shown.

mation of the performed PFPC therapy efficiency as well, namely FLCs, under this pathology.

Our findings demonstrated the mice immunisation with the substrate, containing thyroid antigen, as accompanying with AAB appearance in blood serum of all the animals. To the 14th day after last immunisation they were detected in the maximum titer (1:512 serum dilution) and remained at quite a high level to the 35th day (Table 1). At this background the TG hormone-producing activity significantly changed. Herewith a change in thyroxine (T_4) (Fig. a) and triiodothyronine (T_3) concentrations (Fig. b) after АИТ induction had a wave-like character. Thus, the T_4 content to the 14th day was statistically and significantly lower, compared to the norm, but even to the 21st day exceeded it twice. To the 28th day the T_4 concentration reduced to the norm level and statistically and significantly increased once again to the 35th one. These data confirm a typical for АИТ disorder in the TG hormone-producing activity [1, 27]. Essentially, that the T_4 hyperproduction was noted to the 21st and 35th days, that is 7 days later the most manifested accumulation of antibodies (14 and 28 days). It is known that produced during АИТ ААBs are not initially cytotoxic, since they are directed against intercellular antigens [1]. Moreover the group of these antibodies comprises thyroid-stimulating ААBs (LATS-antibodies), binding the receptors on thyrocytes and stimulating the production of thyroid hormones, that is the most frequent cause of hyperthyroidism development [18].

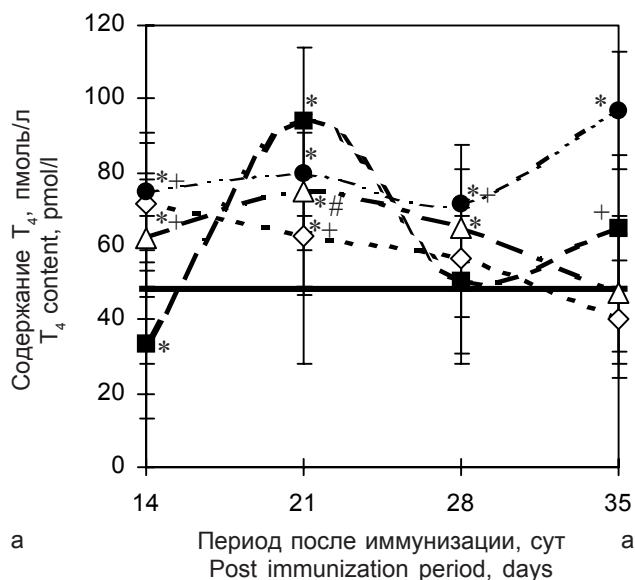
It is known that in initiation and maintenance of АИТs independently on the type of etiological factors the IS substrates implementing immune inflammatory reaction within the frames of “physiological corridor” participate [1, 2, 6, 29], that was confirmed with the assessment results of T-cell content (Table 2). So, the

Известно, что вырабатываемые ААТ при АИТ не являются первоначально цитотоксическими, так как направлены против внутриклеточных антигенов [1]. Более того, в группу этих антител входят тиреоид-стимулирующие ААТ (LATS-антитела), которые связываются с рецепторами на тироцитах и стимулируют выработку тиреоидных гормонов, что является наиболее частой причиной развития гипертиреоза [18].

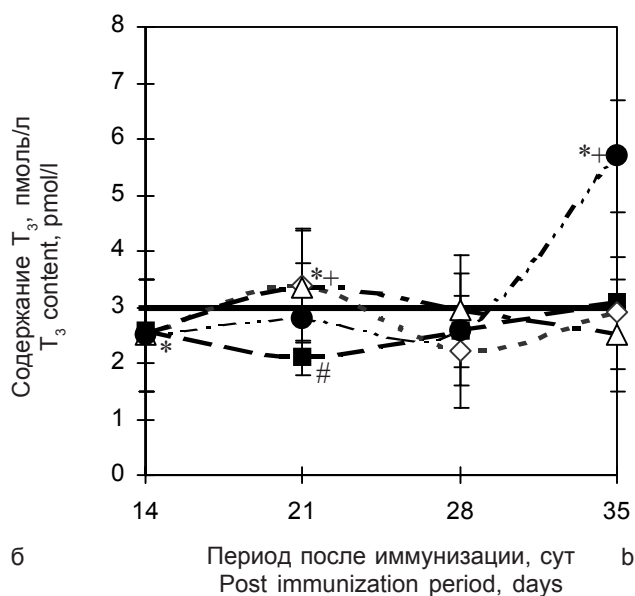
Известно, что в инициации и поддержании АИЗ независимо от вида этиологических факторов принимают участие субстраты иммунной системы (ИС), которые реализуют иммуновоспалительную реакцию в рамках “физиологического коридора” [1, 2, 6, 29], что было подтверждено результатами оценки содержания клеток Т-ряда (табл. 2). Так, содержание общих Т-лимфоцитов ($CD3^+$) снижалось уже с 14-х суток, а на 21 и 35-е сутки оно было в 2 раза ниже нормы. Снижение концентрации общих Т-лимфоцитов ($CD3^+$) подтверждает дисфункциональное состояние ИС и является характерным признаком манифестации многих видов АИЗ [5, 6, 32]. После индукции АИТ было отмечено также перераспределение субпопуляций регуляторных Т-хелперов ($CD4^+$) и Т-супрессоров/цитотоксических ($CD8^+$) лимфоцитов. На протяжении всего срока наблюдения отмечалось более выраженное, чем в норме, превалирование содержания Т-хелперов ($CD4^+$) над Т-супрессорами ($CD8^+$). В результате иммунорегуляторный индекс (ИРИ), отражающий соотношение T_x и T_c ($CD4^+/CD8^+$) весь период наблюдения, существенно превышал контроль 1. При этом важно, что, несмотря на нормализацию к 35-м суткам уровня Т-хелперов, концентрация Т-супрессоров оставалась достоверно ниже контроля 1. Факт развития многих АИЗ на фоне нарушения гармоничного соотношения этих двух регуляторных субпопуляций Т-клеток является общепризнанным и для него характерно либо преобладание (по сравнению с контролем 1) Т-хелперов ($CD4^+$), либо снижение субпопуляции Т-супрессоров ($CD8^+$) [1, 12, 29].

Другой особенностью дисфункционального состояния ИС мышей с АИТ явилось существенное изменение содержания $CD19^+$ клеток (В-лимфоцитов). Их концентрация весь период наблюдения за исключением 14-х суток достоверно превышала норму. Возможно, что повышение содержания пула этих клеток в периферическом русле связано с инфильтрацией ЩЖ В-лимфоцитами, наблюдаемой при определенных формах тиреоидитов, например хроническом лимфоцитарном тиреоидите Хашимото [18].

Очевидно, что при индукции выбранным способом АИТ в организме развивается дисрегуляторное состояние иммунной системы и ее компо-



а



б

Содержание T_4 (а) и T_3 (б) в сыворотке крови животных с АИТ до и после применения КФП: — — интактные животные; ■ — АИТ; ◇ — АИТ + нКФП; △ — АИТ + кКФП; ● — АИТ + КВП; * — различия достоверны в сравнении с данными для интактных животных ($p < 0,05$); # — при сравнении криоконсервированного материала с нативным на соответствующие сутки ($p < 0,05$); + — в сравнении с данными для животных с АИТ на соответствующие сутки ($p < 0,05$).

Content of T_4 (a) and T_3 (b) in animal blood serum with AIT prior to and after use of FLCs: — — intact animals; ■ — AIT; ◇ — AIT + nFLC; △ — AIT + cFLC; ● — AIT + ALC; * — differences are statistically significant comparing with intact animals ($p < 0.05$); # — when comparing cryopreserved cells with native ones to corresponding day ($p < 0.05$); + — when comparing with data for animals with AIT to corresponding day ($p < 0.05$).

content of total T-lymphocytes ($CD3^+$) reduced even to the 14th day, and to the 21 and 35th days it was twice lower than the norm. The reduction of concentration of total T-lymphocytes ($CD3^+$) confirm the dysfunctional state of IS and is the characteristic sign

Таблица 2. Иммунный статус животных с АИТ до и после применения КФП
Table 2. Immune status of animals with AIT prior to and after use of FLCs

| Период после иммунизации, сут Post immunization term, days | Группа животных Animal group | Содержание клеток, % Cell content, % | | | | ИРИ (CD4/CD8) IRI (CD4/CD8) |
|---|---------------------------------|---|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| | | CD3 ⁺ | CD4 ⁺ | CD8 ⁺ | CD19 ⁺ | |
| Интактный контроль Intact control | | 28,9 ± 0,3 | 18,2 ± 1,5 | 12,6 ± 0,1 | 52,6 ± 4,2 | 1,4 ± 0,1 |
| 14 | АИТ AIT | 25,5 ± 2,0 | 11,8 ± 0,8 ¹ | 5,6 ± 0,4 ¹ | 49,7 ± 3,5 | 2,1 ± 0,1 ¹ |
| | АИТ + нКФП AIT + nFLC | 43,7 ± 3,1 ^{1,3} | 30,6 ± 0,3 ^{1,3} | 15,0 ± 1,1 ³ | 73,7 ± 5,9 ^{1,3} | 2,03 ± 0,2 ¹ |
| | АИТ + кКФП AIT + cFLC | 13,5 ± 1,1 ^{1,2,3} | 23,4 ± 1,9 ³ | 9,9 ± 0,1 ^{1,3} | 35,8 ± 2,5 ^{1,2,3} | 2,2 ± 0,2 ¹ |
| | АИТ + КВП AIT + ALC | 27,5 ± 2,2 | 11,3 ± 0,9 ¹ | 8,2 ± 0,7 ¹ | 51,6 ± 4,1 | 1,4 ± 0,1 ² |
| 21 | АИТ AIT | 13,2 ± 1,1 ¹ | 18,7 ± 1,5 | 9,7 ± 0,8 ¹ | 74,5 ± 6,7 ¹ | 1,9 ± 0,2 ¹ |
| | АИТ + нКФП AIT + nFLC | 29,1 ± 2,3 ³ | 22,1 ± 0,2 | 13,0 ± 1,0 | 74,4 ± 5,2 ¹ | 1,7 ± 0,1 |
| | АИТ + кКФП AIT + cFLC | 31,2 ± 2,5 ^{1,3} | 17,8 ± 1,4 | 10,1 ± 0,1 | 57,3 ± 4,6 ^{2,3} | 1,8 ± 0,1 |
| | АИТ + КВП AIT + ALC | 24,2 ± 1,9 ^{1,3} | 19,6 ± 1,6 | 8,5 ± 0,7 ¹ | 72,5 ± 5,8 ^{1,3} | 2,1 ± 0,2 ¹ |
| 28 | АИТ AIT | 29,2 ± 2,3 | 23,9 ± 1,9 | 13,3 ± 1,06 | 79,5 ± 6,4 ¹ | 1,8 ± 0,1 |
| | АИТ + нКФП AIT + nFLC | 39,1 ± 3,1 ^{1,3} | 21,3 ± 1,9 | 13,54 ± 1,1 | 45,4 ± 3,6 ³ | 1,6 ± 0,1 |
| | АИТ + кКФП AIT + cFLC | 29,0 ± 2,3 | 26,2 ± 2,1 ^{1,3} | 24,8 ± 2,0 ^{1,2,3} | 61,3 ± 4,9 ^{2,3} | 1,01 ± 0,1 ^{2,3} |
| | АИТ + КВП AIT + ALC | 34,9 ± 0,4 ^{1,3} | 23,2 ± 1,9 | 11,6 ± 1,0 | 73,3 ± 5,1 ¹ | 2,0 ± 0,2 ¹ |
| 35 | АИТ AIT | 13,8 ± 1,2 ¹ | 18,7 ± 1,4 | 9,7 ± 0,8 | 74,5 ± 6,0 ¹ | 1,9 ± 0,1 |
| | АИТ + нКФП AIT + nFLC | 32,9 ± 2,6 ^{1,3} | 18,4 ± 1,5 | 11,5 ± 0,9 | 33,7 ± 2,4 ^{1,3} | 1,6 ± 0,1 ¹ |
| | АИТ + кКФП AIT + cFLC | 34,5 ± 2,1 ^{1,3} | 24,5 ± 2,0 ^{1,3} | 14,9 ± 1,2 ³ | 45,6 ± 3,7 ^{2,3} | 1,6 ± 0,1 ³ |
| | АИТ + КВП AIT + ALC | 36,5 ± 2,9 ^{1,3} | 23,3 ± 1,9 | 11,6 ± 0,9 | 48,2 ± 3,4 ³ | 2,1 ± 0,2 ¹ |

Примечания: ¹ – различия достоверны в сравнении с данными для интактных животных ($p < 0,05$); ² – при сравнении криоконсервированного материала с нативным на соответствующие сутки ($p < 0,05$); ³ – в сравнении с данными для животных с АИТ на соответствующие сутки ($p < 0,05$).

Notes: ¹ – differences are statistically significant comparing with intact animals ($p < 0.05$); ² – when comparing cryopreserved cells with native ones for corresponding day ($p < 0.05$); ³ – when comparing with data for animals with AIT for corresponding day ($p < 0.05$).

нентов. Прежде всего, речь идет о разбалансировке регуляторных субпопуляций Т-клеток и на этом фоне выраженном формировании аутоантител к антигенам ЩЖ с возможной их кооперацией с В-лимфоцитами и агрессии в отношении ЩЖ. Интегрированным ответом органа-мишени является нарушение его гормонопродуцирующей функции. В условиях теснейшего взаимодействия систем НИЭБ создается “порочный” круг дисрегуляторного его состояния, что определяет необходимость лечения АИТ терапевтическими средствами с полифункциональной (надсистемной) активностью.

of manifestation of many AIDs types [5, 6, 32]. After AIT induction there was noted also the redistribution of subpopulations of regulatory T-helpers (CD4⁺) and T-suppressors/cytotoxic (CD8⁺) lymphocytes. During the whole observation term there was found more manifested versus the norm, predominance of the content of T-helpers (CD4⁺) over T-suppressors (CD8⁺). As a result the immune regulatory index (IRI) reflecting the ratio of T_h and T_s (CD4⁺/CD8⁺) during the whole observation period significantly exceeded the control 1. Herewith it is important that in spite of normalization to the 35th day in the level of T-helpers, the concen-

Полученные результаты показали, что КФП обладают такого рода активностью. После применения криоконсервированных КФП была отмечена ингибция аутоиммунной агрессии в отношении ЩЖ, что выражалось в снижении продукции ААТ на протяжении всего срока наблюдения (табл. 1). При этом даже на 35-е сутки их титр у животных опытных групп был в 4 раза ниже, чем у животных, не подвергавшихся лечению. В сравнительном аспекте представляет интерес тот факт, что на 21- и 28-е сутки ингибция продукции ААТ нативными КФП была выше, чем криоконсервированными. Полученные результаты соответствуют данным [29]. В экспериментальной модели аутоиммунной гемолитической анемии (АИГА) авторы продемонстрировали способность введенных КФП ингибировать продукцию аутоантител против эритроцитов. При этом криоконсервированные КФП в меньшей степени, чем нативные, ингибировали продукцию ААТ, что может быть связано с изменением после криоконсервирования как компонентного состава КФП, так и функционального статуса клеток-продуцентов иммуотропных медиаторов.

Действительно, иммуносупрессивный эффект КФП может проявляться в отношении различных иммунокомпетентных клеток (ИКК) реципиента, но, прежде всего, регуляторных субпопуляций Т-лимфоцитов. Представленные в табл. 2 данные подтверждают выраженную коррекцию состояния популяций и субпопуляций Т-клеток после применения КФП.

Судя по ИРИ, корригирующий эффект нативных КФП в отношении субпопуляции CD8⁺-супрессоров начал проявляться с 21-х суток. Такой эффект криоконсервированных КФП был максимальным в более поздние сроки. Характеру выраженности активации супрессорной субпопуляции Т-клеток была четко соподчинена и динамика снижения гиперпродукции В-лимфоцитов (CD19⁺). Нормализация этого показателя после введения нативных КФП была отмечена на 28-е сутки эксперимента, тогда как после применения криоконсервированных КФП только на 35-е сутки.

Восстановление баланса ИКК после применения КФП в итоге отражалось и на характере изменения функционального статуса ЩЖ. Однако гормонопродуцирующая функция ЩЖ после введения КФП имела некоторые особенности. Так, уровень T₄ на 14-е сутки после введения КФП повышался в 1,5–2 раза относительно контроля 1 и группы животных с АИТ, не подвергавшихся лечению. На 21 и 28-е сутки еще сохранялась повышенная продукция гормона по сравнению с интактной группой, но уже намечалась четкая тенденция проявления лечебного эффекта в виде снижения концентрации гормона по сравнению с группой животных,

tration of T-suppressors remained significantly lower than the control 1. The fact of development of many AIDs on the background of disorder of harmonic ratio of these two regulatory subpopulations of T-cells is well known and it is characteristic for it either predominance (versus the control 1) of T-helpers (CD4⁺) or reduction of T-suppressor subpopulation (CD8⁺) [1, 12, 29].

Other feature of dysfunctional state of IS of mice with AIT is significant change in the content of CD19⁺ cells (B-lymphocytes). Their concentration within the whole observation period excluding the 14th day statistically and significantly exceeded the norm. The rise in the pool content for these cells in peripheral channel is likely related to infiltration of thyroid gland with B-lymphocytes, observed under certain forms of thyroidites, for instance at chronic lymphocyte Hashimoto's thyroiditis [18].

It is evident that during induction of AIT with the chosen way in an organism there is developed dysregulatory state of immune system and its components. First of all, the matter is in misbalancing of regulatory T-cell subpopulations and on this background the manifested formation of autoantibodies to antigens of TG with possible their cooperation with B-lymphocytes and aggression in respect of TG. The integrated response of target organ is the impairment of its hormone producing function. Under the tightest interaction of NIEB systems the "vicious circle" of its dysregulatory state is created, that determines the need in treatment of AIT with therapeutic means with polyfunctional (supersystem) activity.

The findings have shown that FLCs possess such an activity. After application of cryopreserved FLCs there was found the inhibition of autoimmune aggression in respect of TG, that manifested in the reduction of AABs production during the whole observation term (Table 1). Herewith even to the 35th day their titre in animals of experimental groups was 4 times lower than in non-treated ones. In comparative aspect of interest is the fact that to the 21st and 28th days the inhibition of AABs production with native FLCs was higher versus the cryopreserved ones. The obtained results correspond to the data [29]. In experimental model of autoimmune hemolytical anaemia (AIGA) the authors reported about the ability of introduced FLCs to inhibit the production of autoantibodies against the erythrocytes. Herewith the cryopreserved FLCs in less extent than native ones inhibited the production of AABs, that may be related both to the post-cryopreservation composition change in FLCs and functional status of immune tropic mediators producing cells.

Actually immune suppressive effect of FLCs may be manifested in respect of different immune competent cells (ICCs) of a recipient, but first of all regu-

которых не лечили. Корректирующий эффект КФП в отношении T_3 был отмечен несколько раньше. Так, на 21-е сутки его уровень был даже несколько выше контрольных показателей. В дальнейшем концентрация T_3 изменялась волнообразно, что, видимо, определялось характером изменения функционального статуса ЩЖ при патологии и степенью влияния каждой из форм КФП.

Интегральная оценка полученных результатов дает основание считать, что выбранная экспериментальная модель АИТ является адекватной для оценки терапевтического потенциала КФП при этой патологии. В этих условиях возможна аттестация патогенетически значимых изменений состояния систем, которые, собственно, и характеризуют развитие данной патологии: развитие дисрегуляторного состояния пула Т-клеток и его регуляторных субпопуляций, а также гиперэкспансия В-лимфоцитов, продукция в этих условиях ААТ к антигену ЩЖ и изменение гормонопродуцирующей активности ЩЖ.

Используя представленные методологические и методические подходы, можно корректно оценить способность КФП проявлять корректирующий эффект в отношении каждого из оцененных элементов общей патогенетической цепи развития АИТ и, прежде всего, иммунного статуса реципиента.

Иммуномодулирующий потенциал КФП был продемонстрирован нами ранее в других модельных системах [5, 6, 29]. Наибольший интерес представляет способность КФП при лечении АИЗ активировать супрессорное звено иммунитета вырабатываемыми в ней иммунотропными медиаторами [6]. К таковым можно отнести альфафетопротеин (АФП), который индуцирует продукцию ТРФ- β и активацию клеток супрессоров [34].

К иммуномодулирующему потенциалу ФП имеют непосредственное отношение МСК [33]. В системе *in vivo* они обеспечивают пролонгацию сроков приживления гистонесовместимых органов [25], а при сотрансплантации с аллогенным костным мозгом (КМ) минимизируют степень проявления иммунного конфликта в виде болезни "трансплантат против хозяина" [4, 7]. Показано, что их иммуносупрессивный эффект в отношении как клеток индукторов, так и эффекторов, например при развитии АИГА, реализуется даже при малой концентрации в общем пуле КФП [29]. Индукторами их иммуносупрессивной активности при многих АИЗ являются воспалительные медиаторы (ФНО- α , ИЛ-2, γ -ИФ и др.) [2, 8, 23, 36].

Важным компонентом аппликации клеточной и тканевой терапии в клинической практике являются криобиологические технологии. Результаты многих работ показали, что криоконсервирование – не только метод длительного хранения биологических

latory subpopulations of T-lymphocytes. The presented in Table 2 data confirm the manifested correction of the state of populations and subpopulations of T-cells after application of FLCs.

Judging on IRI the correcting effect of native FLCs in respect of subpopulation of $CD8^+$ suppressors started to be manifested from the 21st day. Such an effect of cryopreserved FLCs was maximal at later terms. The manifestation character of activation of suppressor subpopulation of T-cells was distinctly co-subjected and the dynamics of the reduction of hyperproduction of B-lymphocytes ($CD19^+$). Normalization of this index after introduction of native FLCs was noted to the 28th day of the experiment meanwhile after application of cryopreserved FLCs only to the 25th days.

The recovery of the balance of ICC after application of FLCs finally affected also the character of the change in TG functional state. However hormone-producing function of TG after introduction of FLCs had some peculiarities. So, the level of T_4 to the 14th day after FLCs injection increased in 1.5–2.0 times in respect of the control 1 and group of animals with AIT, not subjected to treatment. To the 21st and 28th days the increased production of hormones has still kept if compared to the intact group, but already there has appeared the distinct tendency of manifesting the therapeutic effect as the reduction of hormone concentration versus the group of non-treated animals. Correcting effect of FLCs in respect of T_3 was revealed a little bit earlier. So, to the 21st day its level there was even slightly higher than the control indices. Later the concentration of T_3 altered wave-like that was probably determined changes of functional status of TG at pathology and the effect degree of each FLCs forms.

Integral estimation of the findings enables to believe that the chosen experimental model of AIT is adequate to assess the therapeutic potential of FLCs at this pathology. Under these conditions there is possible the attestation of pathogenetically valuable alterations of the state of systems, mainly characterizing the development of this pathology: the development of dysregulatory state of T-cell pool and its regulatory subpopulations, as well as hyperexpansion of B-lymphocytes, the production of AABs under these conditions to the antigen of TG and the change in hormone-producing activity of TG.

Using the presented approaches one may correctly estimate the ability of FLCs to manifest the correcting effect in respect of each from the elements of total pathogenetical chain of AIT development and first of all, of a recipient's immune status.

Immune modulating potential of FLCs was demonstrated by us previously in other model systems [5, 6, 29]. The highest interest is paid to the ability of FLCs

объектов, но и фактор изменения внутреннего состояния (intrinsic state) биообъекта [28]. В связи с этим особый интерес представляет исследование возможных изменений после криоконсервирования состояния биообъектов, относящихся к субстратам клеточной и тканевой терапии, и, следовательно, лечебного эффекта. Например, нелетальные повреждения кроветворных предшественников криоконсервированного КМ отрицательно влияют на темпы восстановления гемопоэза в организме реципиента [2, 21]. В то же время установленный факт снижения иммуногенных характеристик различных тканей, например тканей кожи, поджелудочной железы, является положительным моментом в обеспечении их приживляемости и пролонгации сроков функционирования [22–24, 35]. В отношении криоконсервированного костного мозга такого рода изменения способствуют минимизации степени проявления его иммунореактивности [4, 7, 8]. Вполне возможно, что после криоконсервирования состояние наиболее значимых субпопуляций КФП с иммуномоделирующими характеристиками (стволовые кроветворные клетки; мезенхимальные стволовые клетки; гепатобласты; овальные клетки, клетки, трансформированные из эпителиальных в мезенхимальные и т. д.) также изменяется [30]. Можно считать, что после криоконсервирования изменяется не только компонентный состав КФП, но и спектр продуцируемых ими регуляторных медиаторов. Физико-химические факторы криоконсервирования, являясь стрессиндуцибельными факторами, действительно играют роль триггера нарушений метаболизма и экспрессии генов как в клетках млекопитающих-гибернаторов [20], так и тех, у которых такая холоддовая “адаптивность” эволюционно не развилась. Установлена, например, экспрессия в криоконсервированных фибробластах млекопитающих транскриптов, ответственных за наработку васкулярного эндотелиального ростового фактора (vascular endothelial growth factor – VEGF) и тромбоцит-продуцируемого (platelet-derived growth factor – PDGF) фактора. Холодовая гипоксия и отогрев индуцировали позитивную регуляцию экспрессии мРНК ICAM-молекулами в культивируемой линии взрослой печени [20]. В [9] показано, что при замораживании-отогреве нейтрофилов увеличивалась экспрессия LFA-1 – структур, которая сопровождалась усилением их адгезии к сосудистому эпителию. С этими данными совпадают результаты работы [17], в которой демонстрируется усиление после криоконсервирования экспрессии интегринов на КФП. Разные изменения могут иметь место в КФП с наработкой такого протеинового профиля, который и обуславливает ту феноменологию их поведения, которая манифестируется у животных с АИТ.

during treatment of AIDs to activate the suppressor immunity link with produced in it immune tropic mediators [6]. Alpha fetoprotein (AFP), inducing the production of TGF- β and activation of cell suppressors may be referred to those [34].

MSCs have a direct relation to immune modulating potential of foetal liver [33]. They provide the prolongation of the terms of histoincompatible organs *in vivo* [25] and during co-transplantation with allogeneic bone marrow (BM) minimize the manifestation degree of immune conflict as the graft-versus-host disease [4, 7]. It has been shown that their immune suppressive effect in respect of both cells-inducers and the effectors, for example during the development of AIHA are implemented even under low concentration in total pool of FLCs [29]. Their immune suppressive activity inducing agents under many AIDS are inflammatory mediators (TNF- α , IL-2, γ -IF etc.) [2, 8, 23, 36].

Cryobiological techniques are the important component of application of cell and tissue therapy in clinical practice. The results of numerous researches have shown that cryopreservation is not only the method of long-term storage of biological objects, but also the factor of the change in biological object intrinsic state [28]. In this connection of a special interest is the study of the problem of possible post-cryopreservation changes in biological objects referring to the substrates of cell and tissue therapy and consequently of therapeutic effect. For example, non-lethal damages of hematopoietic precursors of cryopreserved BM negatively affect the recovery rates of hemopoiesis in a recipient's organism [2, 21]. At the same time the established fact of reduction of immunogenic characteristics of different tissues, for instance of skin, pancreas, is a positive moment in providing their grafting and prolongation of functioning terms [22–24, 35]. In respect of cryopreserved bone marrow these changes contribute to minimization of the manifestation rate of its immune reactivity [4, 7, 8]. It is quite real that after cryopreservation the state of the most valuable subpopulations of FLCs with immune modelling characteristics (HSCs, MSCs, hepatoblasts, OCs, EMT-cells etc.) also changes [30]. One may consider that after cryopreservation not only composition of FLCs, but also the spectrum of produced by them regulatory mediators change. Physical and chemical cryopreservation factors being stress-inducible actually play the role of trigger of disorders of metabolism and gene expression both in cells of hibernating mammals [20] and in those which evolutionally did not develop such a cold “adaptivity”. For example it has been established the expression in cryopreserved mammalian fibroblasts of the transcripts, responsible for the accumulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) and platelet-derived growth factor (PDGF). Cold hypoxia

Очевидно, что КФП обладают корригирующим потенциалом в отношении базовых систем “бодигомеостаза” при лечении АИТ и сохраняют его после криоконсервирования.

Выводы

Двукратное введение тиреоидного антигена, приготовленного из ткани гомологичной щитовидной железы с полным адьювантом Фрейнда приводит к появлению основных признаков АИТ, что свидетельствует об адекватности использованной в работе модели данной патологии для аттестации адекватности лечебного действия КФП.

Показано, что КФП при внутривенном введении мышам с АИТ проявляет лечебный эффект, который манифестируется снижением титра аутоантител, нормализацией продукции гормонов T_3 и T_4 , а также показателей иммунного статуса животных. Эффективность криоконсервированных КФП существенно не отличается от нативных, хотя криоконсервирование придает КФП новые иммунологические свойства.

Литература

1. Андросова Д.С., Баракат М.Ю., Пругло Ю.В. Патоморфологический и иммунологический анализ аутоиммунных процессов в щитовидной железе // БЭБим.– 2007.– Т. 143, №6.– С. 704–708.
2. Гольцев А.Н. Возможные причины развития аутоиммунной патологии и поиск путей её лечения // Пробл. мед. науки і освіти.– 2000.– №1.– С. 22–37.
3. Гольцев А.Н., Дубрава Т.Г., Останкова Л.В. и др. Особенности влияния криоконсервирования на функциональный потенциал стволовых кроветворных клеток фетальной печени разных сроков гестации // Пробл. криобиологии.– 2009.– Т. 19, №2.– С. 186–199.
4. Гольцев А.Н., Дубрава Т.Г., Козлова Ю.А. и др. Влияние различных режимов криоконсервирования на сохранность стволовых кроветворных клеток костного мозга животных с аутоиммунными заболеваниями. Часть 2. Оценка *in vivo* функционального статуса кроветворных предшественников криоконсервированного костного мозга // Пробл. криобиологии.– 2007.– Т. 17, №2.– С. 126–140.
5. Гольцев А.Н., Останкова Л.В., Луценко Е.Д. и др. Ответ лимфогемопоетической системы организма на введение продуктов фетоплацентарного комплекса // Пробл. криобиологии.– 2000.– №2.– С. 15–30.
6. Гольцев А.Н., Рассоха И.В., Луценко Е.Д. и др. Межклеточные взаимодействия в иммунокомпетентной сфере при ревматоидном артрите после применения гемопоетических клеток эмбриональной печени // Пробл. криобиологии.– 2003.– №3.– С. 45–53.
7. Гольцев А.Н., Цуцаева А.А. Особенности течения “вторичной болезни” у реципиентов с трансплантатом криоконсервированного костного мозга // Криобиология и криомедицина.– 1984.– №5.– С. 60–65.
8. Гольцев А.Н., Цуцаева А.А., Останкова Л.В. и др. Использование экзогенной ДНК с целью ускорения репаративных процессов в деконсервированных миелокарио-

and thawing induced positive regulation of mRNA expression of ICAM molecules in adult liver cultured line [20]. The paper [9] reported that during freeze-thawing of neutrophils there was increased the expression of LFA-1 structures, accompanied with strengthening of their adhesion to vascular epithelium. The research results [17], wherein there is demonstrated the strengthening of integrin expression on FLCs after cryopreservation, coincide with these data. Similar changes or of other character may take place in FLCs with accumulation of this protein profile, stipulating that phenomenology of their behaviour, manifesting in the animals with AIT. In general, it is evident that FLCs has a correcting potential in respect of base systems of “body homeostasis” when treating AIT and preserve this property after cryopreservation.

Conclusions

Two-fold injection of thyroid antigen derived from the tissue of homologous thyroid gland with a complete Freund adjuvant leads to the appearance of main signs of AIT, that testifies to an adequacy of the used in the research model of this pathology for attestation of the efficiency of therapeutic effect of FLCs.

It has been shown that FLCs at intravenous injection to mice with AIT render the therapeutic effect, manifesting in the reduction of the titre of AABs, normalizing the production of hormones T_3 and T_4 as well as the indices of immune status of animals. The effectiveness of cryopreserved FLCs does not significantly differ from native ones, though cryopreservation assigns to the FLCs new immune modulating characteristics.

References

1. Androsova D.S., Barakat M.Yu., Pruglo Yu.V. Pathomorphologic and immunologic analysis of autoimmunological processes in thyroid gland // Bull. Experim. Biol. Med.– 2007.– Vol. 143, N6.– P. 704–708.
2. Goltsev A.N. Possible causes of autoimmune pathology and search of its treatment methods// Problemy Med. Nauki i Obrazovaniya.– 2000.– N1.– P. 22–37.
3. Goltsev A.N., Dubrava T.G., Ostankova L.V. et al. Peculiarities of cryopreservation effect on functional potential of fetal liver hemopoietic stem cells of various gestation terms // Problems of Cryobiology.– 2009.– Vol. 19, N2.– P. 186–199.
4. Goltsev A.N., Dubrava T.G., Kozlova Yu.A. et al. Effect of different cryopreservation regimens on bone marrow hemopoietic stem cells integrity in animals with autoimmune diseases. Part 2. *In vivo* estimation of functional status of cryopreserved bone marrow hemopoietic progenitors// Problems of Cryobiology.– 2007.– Vol. 17, N2.– P. 126–140.
5. Goltsev A.N., Ostankova L.V., Lutsenko E.D. et al. Response of the lymphohemopoietic system of the organism to the injection of the products of the fetoplacental complex// Problems of Cryobiology.– 2000.– N2.– P. 15–30.
6. Goltsev A.N., Rassokha I.V., Lutsenko E.D. et al. Intercellular interactions in immunocompetent sphere at rheumatoid arthritis following the application of hematopoietic embryonic liver cells// Problems of Cryobiology.– 2003.– N3.– P. 45–53.

- цитах, имплантированных облученным реципиентам // Кробиология и криомедицина.– 1977.– №3.– С. 59–62.
9. *Гольцев А.Н., Ямпольская Е.Е., Дубрава Т.Г.* Идентификация фенотипических характеристик и оценка влияния различных режимов криоконсервирования на функциональный потенциал клеток фетальной печени // Вісник ХНУ ім. В.Н. Каразіна. Серія: біологія.– 2006.– №748.– С. 121–127.
 10. *Грищенко В.И., Гольцев А.Н.* Трансплантация продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса. От понимания механизма действия к повышению эффективности применения // Пробл. кробиологии.– 2002.– № 1.– С. 54–85.
 11. *Йегер Л.* Клиническая иммунология и аллергология.– М.: Медицина, 1990.– Т. 3.– 529 с.
 12. *Каминский А.В.* Хронический аутоиммунный тиреоидит (этиология, патогенез, радиационные аспекты) // Український медичний часопис.– 1999.– №1.– С. 16–21.
 13. *Козлова Ю.А., Гольцев А.Н., Останков М.В.* Влияние изолированных физико-химических факторов криоконсервирования на клетки костного мозга с различным исходным структурно-функциональным статусом // Пробл. кробиологии.– 2003.– №4.– С. 3–11.
 14. *Криоконсервирование клеточных суспензий* / Под ред. Цуцаева А.А.– К.: Наук. думка, 1983.– 240 с.
 15. *Малова Н.Г., Караченцев Ю.И., Божко Т.С., Комарова И.В.* Перспективы применения криоконсервированных препаратов эмбриофетоплацентарного комплекса при тиреоидной патологии // Пробл. ендокринної патології.– 2006.– №3.– С. 63–68.
 16. *Меньшиков В.В.* Лабораторные методы исследования. Справочник. – М.: Медицина, 1987. – 368 с.
 17. *Николаев А.И., Артемова Е.П.* Дальнейшие исследования агрессивности антитиреоидных антител (экспериментальное исследование) // Пробл. эндокринологии.– 1968.– №2.– С. 82–85.
 18. *Петунина Н.А.* Клиника, диагностика и лечение аутоиммунного тиреоидита // Пробл. эндокринологии.– 2002.– Т.48, №6.– С. 16–21.
 19. *Справочник по клиническим лабораторным методам исследования* / Под ред. Е.А. Костенко.– М.: Медицина, 1968.– 437 с.
 20. *Фуллер Б., Грин К., Грищенко В.И.* Охлаждение, криоконсервирование и экспрессия генов в клетках млекопитающих // Пробл. кробиологии.– 2004.– №3.– С. 58–71.
 21. *Цуцаева А.А., Гольцев А.Н.* “Хоминг” и пролиферация кроветворных клеток (КОЕ_с) криоконсервированного костного мозга в селезенке и костном мозге реципиентов // Кробиология.– 1987.– №4.– С. 9–15.
 22. *Цуцаева А.А., Гольцев А.Н., Микулинский Ю.Е., Останкова Л.В.* Иммунологические свойства деконсервированных миелокариоцитов и влияние некоторых биологически активных веществ на течение репаративных процессов в них // Кробиология и криомедицина.– 1979.– №5.– С. 57–69.
 23. *Цуцаева А.А., Лобасенко Н.П., Маркова В.М.* Сравнительное изучение активности нативной и деконсервированной антимикрофагальной и антилимфоцитарной сывороток // Кробиология и криомедицина.– 1975.– №1.– С. 70–74.
 24. *Цуцаева А.А., Попов Н.Н.* Влияние трансплантации аллогенных криоконсервированных лимфоидных клеток на выживаемость облученных животных // Кробиология и криомедицина.– 1980.– №7.– С. 63–66.
 25. *Bartholomew A., Sturgeon C., Siatskas M. et al.* Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vitro // Exp. Hematol.– 2002.– Vol. 30, N1.– P. 42–48.
 7. *Goltsev A.N., Tsutsayeva A.A.* Peculiarities in the “Secondary Disease” course in recipients with cryopreserved bone marrow graft // Kriobiologiya i Kriomedicina.– 1984.– N5.– P. 60–65.
 8. *Goltsev A.N., Tsutsayeva A.A., Ostankova L.V. et al.* Utilization of exogenous DNA aimed at accelerating reparative processes in deconserved myelocaryocytes implanted to irradiated recipients// Kriobiologiya i Kriomedicina.– 1977.– N3.– P. 59–62.
 9. *Goltsev A.N., Yampol'skaya E.E., Dubrava T.G.* Identification of phenotypic characteristics and evaluation of effect of different cryopreservation regimens on functional potential of fetal liver cells // Bull. of V.N. Karazin Kharkov National University. Part: Biology.– 2006.– N748.– P. 121–127.
 10. *Grischenko V.I., Goltsev A.N.* Transplantation of the products of embryofetoplacental complex. From understanding of mechanism of the effect to increasing the efficiency of application // Problems of Cryobiology.– 2002.– N1.– P. 54–85.
 11. *Yegeer L.* Clinic immunology and allergology.– Moscow: Meditsina, 1990.– Vol. 3.– 529 p.
 12. *Kaminskiy A.V.* Chronic autoimmune thyroiditis (etiology, pathogenesis, radioactive aspects) // Ukrainiyskiy Medychnyy chasopys.– 1999.– N1.– P. 16–21.
 13. *Kozlova Yu.A., Goltsev A.N., Ostankov M.V.* Influence of certain physical and chemical factors of cryopreservation on bone marrow cells with various initial structural and functional status // Problems of Cryobiology.– 2003.– N4.– P. 3–11.
 14. *Cryopreservation of cell suspensions* / Ed. by A.A. Tsutsayeva.– Kiev: Naukova dumka, 1983.– 240 p.
 15. *Malova N.G., Karachentsev Yu.I., Bozhko T.S., Komarova I.V.* Perspectives of use of embryofetoplacental complex cryopreserved preparations at thyroid pathology// Problemy Endokrinnoy Patologii.– 2006.– N3.– P. 63–68.
 16. *Men'shikov V.V.* Laboratory methods of investigations. Manual.– Moscow: Medicine, 1987.– 368 p.
 17. *Nikolaev A.I., Artemova E.P.* Further studies of antithyroid antibodies' aggression (experimental research)// Problemy endokrinologii.- 1968.- N2.- P. 82-85.
 18. *Petunina N.A.* Clinic, diagnostic and treatment of autoimmune thyroiditis // Problemy Endokrinologii.– 2002.– Vol. 48, N6.– P. 16–21.
 19. *Manual of clinical laboratory research methods* / Ed. by E.A. Kostenko.– Moscow: Medicine, 1968.– 437 p.
 20. *Fuller B., Green C., Grischenko V.I.* Cooling, cryopreservation and gene expression in mammalian cells // Problems of Cryobiology.– 2004.– N3.– P. 58–71.
 21. *Tsutsaeva A.A., Goltsev A.N.* Homing and proliferation of haemopoietic cells (CFUs) of cryopreserved bone marrow in recipient spleen and bone marrow// Kriobiologiya.– 1987.– N4.– P. 9–15.
 22. *Tsutsaeva A.A., Goltsev A.N., Mikulinskiy Yu.E., Ostankova L.V.* The immunological capacity of thawed myelocaryocytes and the effect of certain biologically active substances on their recovery// Kriobiologiya i Kriomeditsina.– 1979.– N5.– P. 57–69.
 23. *Tsutsaeva A.A., Lobasenko N.P., Markova V.M.* Comparative study of activity of native and frozen-thawed antimicrophage and antilymphocyte sera // Kriobiologiya i Kriomeditsina.– 1975.– N1.– P. 70–74.
 24. *Tsutsaeva A.A., Popov N.N.* Effect of transplantation of allogenic cryopreserved lymphoid cells on survival of irradiated animals// Kriobiologiya i Kriomedicina.– 1980.– N7.– P. 63–66.
 25. *Bartholomew A., Sturgeon C., Siatskas M. et al.* Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vitro // Exp. Hematol.– 2002.– Vol. 30, N1.– P. 42–48.

26. *Chen K., Wei Y., Sharp G.C., Braley-Mullen H.* Induction of experimental autoimmune thyroiditis in IL-12^{-/-} mice // *J. Immunol.*– 2001.– Vol. 167, N3.– P. 1720–1727.
27. *Fistfalen M.E., De Groot Z.J.* *Molecular Endocrinology. Basic Concepts and Clinical Correlation* / Ed. B.D. Weintraub.– New York, 1995.– P. 319–370.
28. *Goltsev A.N., Babenko N.N., Dubrava T.G. et al.* Modification of the state of bone marrow hematopoietic cells after cryopreservation // *International Journal of Refrigeration.*– 2006.– Vol. 29, N3.– P. 358–367.
29. *Goltsev A.N., Grischenko V.I., Sirous M.A. et al.* Cryopreservation: an optimizing factor for therapeutic potential of fetoplacental complex products // *Biopreservation and Biobanking.*– 2009.– Vol. 7, N1.– P. 29–38.
30. *Kvanstrom M., Jenmalm M.C., Ekerfelt C.* Effect of cryopreservation on expression of Th1 and Th2 cytokines in blood mononuclear cells from patients with different cytokine profiles, analysed with three common assays: an overall decrease of interleukin-4 // *Cryobiology.*– 2004.– Vol. 49, N2.– P. 157–168.
31. *Morrison S., Hemmati H., Wandyez A., Weissmon I.* The purification characterization of fetal liver hematopoietic stem cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*– 1995.– Vol. 92, N22.– P. 10302–10306.
32. *Parish N.M., Cooke A.* Mechanisms of autoimmune thyroid disease // *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms.*– 2004.– Vol. 1, N3.– P. 337–344.
33. *Ringden O., Uzunel M., Rasmusson I. et al.* Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease // *Transplantation.*– 2006.– Vol. 81, N10.– P. 1390–1397.
34. *Sanchez A., Pagan R., Alvarez A.M. et al.* Transforming growth factor- β (TGF- β) and EGF promote cord-like structures that indicate terminal differentiation of fetal hepatocytes in primary culture // *Exp. Cell Res.*– 1998.– Vol. 242, N1.– P. 27–37.
35. *Taylor M.J., Duffy T.J., Hunt C.J. et al.* Transplantation and *in vitro* perfusion of rat islets of Langerhans after slow cooling and warming in the presence of either glycerol or dimethyl sulfoxide // *Cryobiology.*– 1983.– Vol. 2, N2.– P. 185–204.
36. *Tyndall A., Passweg J., Gratwohl A.* Haemopoietic stem cell transplantation in the treatment of severe autoimmune diseases 2000 // *Ann. Rheum. Dis.*– 2001.– Vol. 60, N7.– P. 702–707.
37. *Witebsky E., Rose N.R., Terplan K., Rain J.R.* Chronic thyroiditis and autoimmunization // *J.A.M.A.*– 1957.– Vol. 164, N13.– P. 1439–1447.

Поступила 19.05.2009

Accepted in 19.05.2009