

УДК: 612.35.014.2-053.1: 615.014.41: 616.72-002.77

## Регуляция иммуновоспалительного процесса у животных с адъювантным артритом криоконсервированными клетками фетальной печени Е.Е.Ямпольская, М.А.Кравченко, Т.Г.Дубрава, А.Н.Гольцев

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (Харьков, Украина)  
yampri@ukr.net*

С помощью биохимических методов исследования была изучена возможность коррекции криоконсервированными клетками фетальной печени (кКФП) иммуновоспалительного процесса у животных с адъювантным артритом (АА). Установлены существенные различия в проявлении терапевтической активности нативных и кКФП в зависимости от сроков их введения. Полученные данные свидетельствуют о селективном воздействии факторов криоконсервирования на определенные субпопуляции КФП и, соответственно, спектр продуцируемых ими регуляторных медиаторов.

**Ключевые слова:** адъювантный артрит, криоконсервирование, клетки фетальной печени, индекс артрита, сиаловые кислоты, серомукоиды, СРБ, иммуномодуляция.

## Вплив криоконсервованих клітин фетальної печінки на активність імунзапального процесу у тварин з ревматоїдним артритом К.Є.Ямпольська, М.О.Кравченко, Т.Г.Дубрава, А.М.Гольцев

За допомогою біохімічних методів дослідження була вивчена можливість корекції криоконсервованими клітинами фетальної печінки (кКФП) імунзапального процесу у тварин з ад'ювантним артритом (АА). Встановлені суттєві відмінності в прояві терапевтичної активності нативних і кКФП в залежності від термінів їхнього введення. Отримані дані свідчать про селективний вплив факторів криоконсервування на певні субпопуляції КФП і, відповідно, спектр продукуваних ними регуляторних медіаторів.

**Ключові слова:** ад'ювантний артрит, криоконсервування, клітини фетальної печінки, індекс артриту, сиалові кислоти, серомукоїди, СРБ, імунотимізація.

## Influence of cryopreserved fetal liver cells on immunoinflammatory process activity in rheumatic arthritis animals Ye.Ye.Yampolskaya, M.A.Kravchenko, T.G.Dubrava, A.N.Goltsev

Using biochemical methods of investigation there was studied possibility to correct the immunoinflammatory process by cryopreserved fetal liver cells (cFLCs) in animals with adjuvant arthritis (AA). Essential differences in the manifestation of the therapeutic activity of native and cFLCs depending on the time of their introduction were established. Obtained data demonstrate selective effect of cryopreservation factors on certain FLCs subpopulations and, respectively, the spectrum of regulatory mediators produced by them.

**Key words:** adjuvant arthritis, cryopreservation, fetal liver cells, index of arthritis, sialic acids, seromukoides, CRP, immunomodulation.

### Введение

Ревматоидный артрит (РА) является достаточно распространенным аутоиммунным заболеванием (АИЗ), которым в Украине страдает более 120 тысяч человек. Для РА характерно многолетнее персистирующее воспаление, которое манифестируется разрушением структур суставов и поражением околосуставных тканей (Коваленко та ін., 2002). Мультифакториальность развития РА признается специалистами как экспериментальной, так и клинической иммунологии. Тем не менее, считается, что одним из главных нарушений функций иммунной системы (ИС) при РА является ослабление супрессорных механизмов и развивающаяся на этом фоне гиперактивация В-лимфоцитов, многообразные проявления которой определяются избыточной антигенной стимуляцией (Гольцев, 2000). Об аутоиммунной природе заболевания свидетельствует ряд признаков: повышение концентрации сывороточных иммуноглобулинов, среди которых манифестно увеличивается концентрация ревматоидного фактора, иммунных комплексов, лимфоцитов, сенсibilизированных к

компонентам соединительной ткани, сходство патогистологических изменений с проявлениями иммунного воспаления и т.д. (Vittecoq et al., 2003; Harris, 1990).

При всех условностях аналогий как характера поведения ИС, так и клинических проявлений, адьювантный артрит (АА) представляет собой одну из апробированных и хорошо изученных экспериментальных моделей РА. Именно эта модель широко используется для изучения патогенеза воспалительного процесса в виде артрита, а также для оценки действия противовоспалительных и противоревматических препаратов (Bendele, 2001; Marques, Müller, 2000). Адьюванты используются для усиления иммунного ответа (от латинского «*adjuvare*» – помогать) и способны неспецифически повышать иммуногенность антигена. Эффекты адьювантов обусловлены по крайней мере двумя механизмами: созданием депо антигена и активацией антигенпрезентирующих клеток, приводящей к выработке цитокинов, которые регулируют направленность дифференцировки Т-хелперов.

Несмотря на большое количество научных исследований, посвященных проблеме РА, успехи современной медицины в лечении больных с этой патологией относительно невелики. Для большинства специалистов оказались неожиданными результаты статистических исследований, свидетельствующие о том, что на фоне субъективного и объективного улучшения состояния больных под влиянием проводимой фармакотерапии конечные результаты лечения РА были явно неудовлетворительными. Применяемые в настоящее время три группы противоревматических средств – нестероидные противовоспалительные средства (НПВС), глюкокортикостероидные гормоны и медленно действующие иммуносупрессивные препараты – улучшают в основном качество жизни пациентов. Однако эти препараты не способны существенно воздействовать на прогрессирование деструктивных изменений в суставах и на нарастание функциональных нарушений. Только у 10% леченных таким образом больных имеет место доброкачественное течение РА с редкими обострениями, у 65–70% заболевание характеризуется хотя и медленным, но неуклонным прогрессированием с частыми обострениями и неполными ремиссиями. У остальных развивается «злокачественный» вариант течения с множественным поражением суставов, резистентностью к проводимой фармакотерапии и тяжелыми, потенциально смертельными нарушениями функций внутренних органов (Токарева, Сизякина, 2002; Bathon et al., 2000). Такая неблагоприятная статистика говорит о необходимости оптимизации методов терапии РА, базирующихся на понимании его патогенеза и механизмов аутоиммунного воспалительного процесса в такой форме.

Многогранность возможных вариантов нарушения как качественных, так и количественных характеристик взаимодействия в этом многоступенчатом, каскадно развивающемся процессе при РА определяет необходимость применения лечебных препаратов с потенциалом надсистемных регуляторов поведения ИС (Грищенко, Гольцев, 2002). В широком спектре препаратов с такой активностью перспективными, с нашей точки зрения, могут быть продукты фетоплацентарного комплекса (ПФПК), в том числе клетки фетальной печени (КФП). Считается, что такого рода феноменология обусловлена продукцией КФП биологически активных субстанций с супрессорной активностью. Факторы естественной иммунной супрессии включают в себя альфа фетопротин, фетуин, трансформирующий фактор роста  $\beta$  (ТРФ- $\beta$ ), оксид азота (NO), эритроидный супрессорный фактор и т.д. (Бельский и др., 2005; Черешнев и др., 2003; Stopka et al., 1998). В гетерогенной популяции КФП основными компонентами, проявляющими иммуномодулирующую активность, являются стволовые кроветворные (СКК) и мезенхимальные стволовые клетки (МСК) (Le Blank, 2003). Важно, что МСК даже в малой концентрации в общем пуле КФП способны реализовать иммуносупрессивный эффект в отношении клеток индукторов (эффекторов) развития АИЗ за счет продукции таких цитокинов, как ТРФ- $\beta$ , простагландин Е, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-10 и др. Известно, что механизм иммуносупрессии реализуется также через индукцию в МСК экспрессии триптофан-катаболизирующего фермента индоламин-2,3-дезоксигеназы (ИДО) с образованием L-кинурина, пиколиновой и квинолиновой кислот (Mellor et al., 2002). Супрессивный эффект этих катаболитов триптофана распространяется в основном на активированные и пролиферирующие иммунокомпетентные клетки.

Криоконсервирование является не только методом долгосрочного хранения КФП, но и одним из основных этапов дальнейшего их использования в клинике (Грищенко, Гольцев, 2002; Гольцев и др., 2009; Петренко и др., 2005). Более того, в ряде случаев продемонстрированы преимущества криоконсервированного биоматериала по сравнению с нативным, выражающиеся в снижении его иммуногенности (Сироус и др., 2009; Arnaud, Merutyan, 2003) и иммунореактивности (Гольцев и др., 2010; Мацевитая, Останков, 2008). После криоконсервирования КФП установлен факт

перераспределения в них клеточных элементов, сопровождающийся увеличением содержания в общей популяции недифференцированных бластов (Гольцев и др., 2009). В работе (Ямпольская и др., 2007) показано изменение после криоконсервирования экспрессии поверхностных рецепторов на КФП, в частности интегринов. Кроме того, криоконсервирование способно изменять компонентный состав КФП, повышая концентрацию в них стволовых элементов (Ямпольская и др., 2007). В процессе криоконсервирования КФП, как и в других биообъектах, могут проходить и другие качественные изменения. Ранее M.Venkatarman на мононуклеарах периферической крови продемонстрировал значительное возрастание после криоконсервирования продукции ими цитокинов, таких как ФНО- $\alpha$ , ИФН- $\gamma$ , ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-10 (Venkatarman, 1995). Не исключено, что криоконсервирование, как стресс-индуцирующий фактор, способно изменять профиль продуцируемых и КФП медиаторов. Получены убедительные доказательства того, что такого рода модифицирующее влияние криоконсервирования на функциональное состояние биообъекта определяет его терапевтический потенциал (Goltsev et al., 2009; Keethesan et al., 2004). Принципиально важным при этом является зависимость степени проявления терапевтического потенциала криоконсервированных клеток и тканей от их исходного структурно-функционального состояния перед криоконсервированием. Например, криоконсервирование практически не влияет на терапевтический эффект используемых для лечения гемолитической анемии КФП ранних сроков гестации, но положительно воздействует на клетки более поздних сроков гестации, которые в нативном виде проявляют минимальный терапевтический потенциал (Гольцев и др., 2006; Сироус и др., 2008). На примере экспериментального аллергического энцефаломиелита (ЭАЭ) показано, что эффективность его лечения криоконсервированными фетальными нервными клетками (ФНК) существенно зависит не только от условий криоконсервирования используемых клеток, но и срока их введения после индукции ЭАЭ (Гольцев та ін., 2003). Ранее полученные данные показали, что терапевтический эффект КФП в отношении клеток моноцитарно-фагоцитарной системы может проявляться в различной степени, в зависимости от характера антигенной нагрузки на ИС реципиента в конкретный период развития заболевания (Ямпольская, Гольцев, 2011).

Другими словами, при всей очевидности зависимости эффективности применения различных видов ПФПК от условий их криоконсервирования возникает необходимость более детального исследования зависимости положительного результата от сроков их применения.

В связи с этим, целью данной работы была сравнительная оценка терапевтического эффекта применения криоконсервированных КФП животным с АА в зависимости от фазы развития иммуновоспалительного процесса.

#### **Объекты и методы исследования**

Эксперименты выполнены на мышах линии С57В1/6J и СВА/Н 3-месячного возраста массой 18–20 гр. Животные были получены из питомника РАМН «Столбовая» с последующим содержанием в стандартных условиях вивария ИПКиК НАНУ. В каждой исследуемой группе использовалось не менее 7 особей. Патологию индуцировали у мышей СВА/Н субплантарным введением полного адьюванта Фрейнда в дозе 0,05 мл/мышь (Мищенко, Котвіцька, 2001). Величину отека характеризовал индекс артрита (ИА), представляющий собой отношение окружности опытного сустава к окружности контрольного. Наличие С-реактивного белка (СРБ) в сыворотке животных определяли с помощью диагностического набора реагентов для качественного определения содержания СРБ в сыворотке крови методом латекс-агглютинации (ООО НПФ Филисит-диагностика, Украина) (Friedman, Young, 1997). Содержание серомукоида определяли турбодиметрическим методом с помощью набора реактивов (ООО НПФ Филисит-диагностика, Украина) в соответствии с инструкцией производителя и оценивали в единицах помутнения (S-H) по Shank и Hoagland. Количество сиаловых кислот определяли по методу Гессе и оценивали в условных единицах (Камышников, 2000). Криоконсервирующий раствор был приготовлен на основе среды 199, содержащей 20% диметилсульфоксида (ДМСО) (v/v), 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 2% цитрата натрия. Клетки фетальной печени были получены у мышей линии С57В1/6J на 13-е сутки гестации. КФП выделялись на среде 199 с 3% эмбриональной телячьей сывороткой и 2% цитратом натрия. К суспензии КФП с концентрацией  $1 \times 10^6$  кл/мл по каплям добавляли криоконсервирующий раствор в соотношении 1:1 (конечная концентрация криопротектора составляла 5%). Экспозицию КФП с криоконсервирующим раствором проводили при температуре 4°C в течение 10 мин. Криоконсервирование клеток осуществляли в пластиковых ампулах Nunc (Германия) в объеме 1,8 мл

с концентрацией  $1 \times 10^6$  кл/мл на программном замораживателе "Cryoson" (Германия). Скорость охлаждения на первом этапе составляла  $1^\circ\text{C}/\text{мин}$  до  $-40^\circ\text{C}$ , 10-минутная экспозиция, затем охлаждение со скоростью  $10^\circ\text{C}/\text{мин}$  до  $-80^\circ\text{C}$  с последующим погружением образцов в жидкий азот. Оттаивание образцов проводили на водяной бане при температуре  $40^\circ\text{C}$  до  $0^\circ\text{C}$  в течение 1–3 минут. Клетки отмывали от ДМСО однократным медленным добавлением равного объема рабочей среды с последующим центрифугированием (400 g, 10 мин). Сохранность КФП определяли при помощи йодида пропидия (Sigma, США) (Riccardi, Nicoletti, 2006) методом цитофлуориметрии с использованием программы CellQuest 3.1. КФП, сохранность которых составляла не менее 80%, вводили мышам-реципиентам СВА/Н однократно внутривенно в дозе  $5 \times 10^6$  кл/мышь, в объеме 0,3 мл на 7 или 14 сутки после индукции АА. Выраженная иммуномодулирующая активность такой дозы и данного термина гестации КФП была подтверждена результатами наших предыдущих исследований (Гольцев и др., 1996). В качестве позитивного контроля терапии АА использовали глюкокортикоид (ГК) дексаметозон в дозе 0,002 мл/мышь, который является основным препаратом базовой терапии РА. Оценку исследуемых показателей проводили через 7 и 14 суток после каждого введения КФП или ГК.

Полученные экспериментальные данные статистически обрабатывались в электронных таблицах "Microsoft Excel 2000".

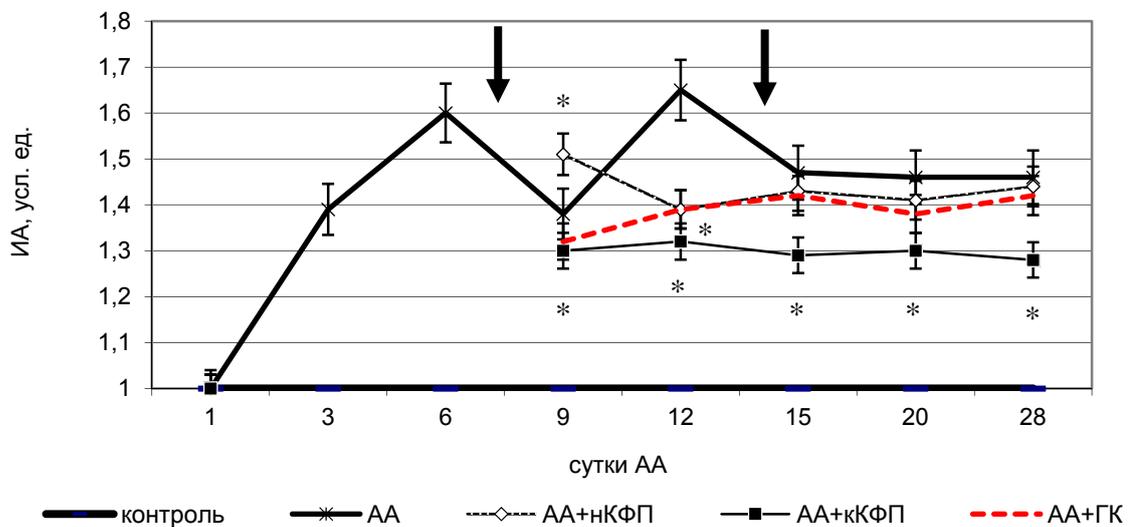
Проведенные эксперименты не противоречили «Общим принципам экспериментов на животных», одобренным Национальным конгрессом по биоэтике (20.09.01 г., Киев, Украина) и согласуются с положениями «Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей» (Страсбург, 1985 г.).

### Результаты и обсуждение

Как известно, наиболее манифестным признаком начала развития АА у грызунов является отек пораженной, т.е. региональной к месту введения полного адьюванта Фрейнда (ПАФ) конечности (Мищенко, Котвицька, 2001; Marques, 2000). Появление отека объясняется воспалением синовиальной оболочки и увеличением количества синовиальной жидкости (Давлетова и др., 2002; Silverman et al., 1993; Ushiyama et al., 2003). Данное явление обусловлено прежде всего гиперактивацией отдельных компонентов ИС *in situ*, что ведет к образованию патогенных иммунных комплексов, имеющих высокую тропность к синовиальной оболочке сустава, увеличению продукции определенных цитокинов и экспрессии адгезивных молекул на клетках в сайтах воспаления, что, в общем, способствует прогрессированию заболевания. Субплантарное введение ПАФ вызвало у мышей опытных групп появление местной воспалительной реакции, которая клинически проявлялась в виде эритематозности и отека опытного сустава, что характеризуется как развитие экспериментального АА (Bendele, 2001). Величину отека характеризует рассчитанный по указанному выше принципу ИА. Этот показатель у интактных животных принят за единицу. Как свидетельствуют представленные на рис. 1 данные, по мере развития АА (с 1 по 28 сутки наблюдения), ИА имел волнообразный характер. Первый пик отека у нелеченных животных был отмечен на 6 сутки после инициации патологии (ИА –  $1,6 \pm 0,1$ ;  $P < 0,05$ ), что совпадало с острым периодом течения АА (стадия доклинических проявлений заболевания). Второй, более выраженный пик отека, был зафиксирован на 12 сутки развития патологии (ИА –  $1,65 \pm 0,1$ ;  $P < 0,05$ ), что согласуется с данными других авторов, наблюдающими подобную стадийность в динамике развития АА (Венгеровский и др., 1979). После 12 суток в группе мышей с АА наблюдалось постепенное снижение ИА, но и на 28 сутки этот показатель оставался на достоверно более высоких значениях, чем контрольные (ИА –  $1 \pm 0,07$ ;  $P < 0,05$ ). Согласно данным литературы (Саратиков и др., 1983), отек региональных суставов в период 4–9 сутки является следствием интраартикулярных изменений синовиума с последующим развитием грануляционной ткани. Период с 10 по 20 сутки АА соответствует наиболее интенсивному разрастанию соединительной ткани (Венгеровский и др., 1979), что может обуславливать более выраженный отек суставов в данные промежутки времени и характеризуется как фаза начала клинических проявлений заболевания.

Лечение КФП оказывало неоднозначный эффект на исследуемый показатель. Введение нКФП на 7 сутки АА сопровождалось аггравацией ИА уже через два дня после введения, не снижая показатель у животных с АА вплоть до 28 суток наблюдения. Надо отметить, что достоверное снижение ИА у мышей с АА было отмечено после введения кКФП как на 7, так и 14 сутки развития патологии. Данный факт может быть результатом селективного воздействия физико-химических

факторов криоконсервирования на определенные субпопуляции КФП и, соответственно, спектр продуцируемых ими регуляторных медиаторов.



**Рис. 1. Индекс артрита у мышей с АА до и после введения нативных и криоконсервированных КФП; стрелками указаны сроки введения КФП**

*Примечания: различия достоверны (при  $p < 0,05$ ): \* по сравнению с группой животных с АА.*

Известно, что РА сопровождается деструкцией соединительной ткани, в состав основного вещества которой входят гликопротеины. Их уровень определяют различными реакциями, основанными на показателях содержания сиаловой кислоты и серомукоида. Показатели СРБ, серомукоидов и сиаловых кислот в крови быстро и многократно увеличиваются при развитии воспалительных процессов различной природы и локализации (Мазуров, 2005). В условиях развития РА отмечается высокая корреляция степени изменения этих субстанций с клинической манифестацией заболевания и стадией его развития (Vittecq et al., 2003). Так, повышение СРБ отмечается в активной фазе болезни у 77% больных. Синтез СРБ происходит в печени и регулируется провоспалительными цитокинами, в первую очередь ИЛ-6, а также ИЛ-1 и ФНО, которые играют важную роль в патогенезе РА. Постоянно повышенный уровень СРБ четко коррелирует с деструкцией соединительной ткани суставов, указывая на неблагоприятное течение РА (Насонова и др., 1997).

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что на всех исследуемых стадиях АА отмечалось достоверное увеличение СРБ, количества сиаловых кислот и серомукоидов по сравнению с контролем (табл. 1, рис. 2). Так, к 7 суткам развития патологии наблюдалось увеличение количества сиаловых кислот и серомукоидов в сыворотке крови примерно на 20–25 %, повышаясь вдвое к 14 суткам АА. Динамика изменения исследуемых показателей у животных с АА после проведенного лечения КФП зависела от вида используемых клеток и времени их введения. Надо отметить, что введение нативных или криоконсервированных КФП на 7 сутки приводило к нормализации исследуемых показателей, с практически полной их компенсацией к 28 суткам, что коррелировало с уменьшением ИА у животных с АА. Аналогичный эффект при введении обоих видов КФП на 14 сутки развития патологии был отмечен в отношении содержания сиаловых кислот и серомукоидов, но не СРБ. Однако в данном случае обращает на себя внимание менее выраженная модулирующая активность криоконсервированного материала при введении на 14 сутки АА (рис. 2 (Б, Г)). Данный факт может быть обусловлен как стадией развития иммуновоспалительной реакции, которая а priori на 7 или 14 сутки развития АА имеет существенные отличия, так и особенностями проявления криоконсервированными КФП иммуномодулирующей активности.

Таблиця 1.

## СРБ в сыворотке крови животных с АА до и после лечения КФП

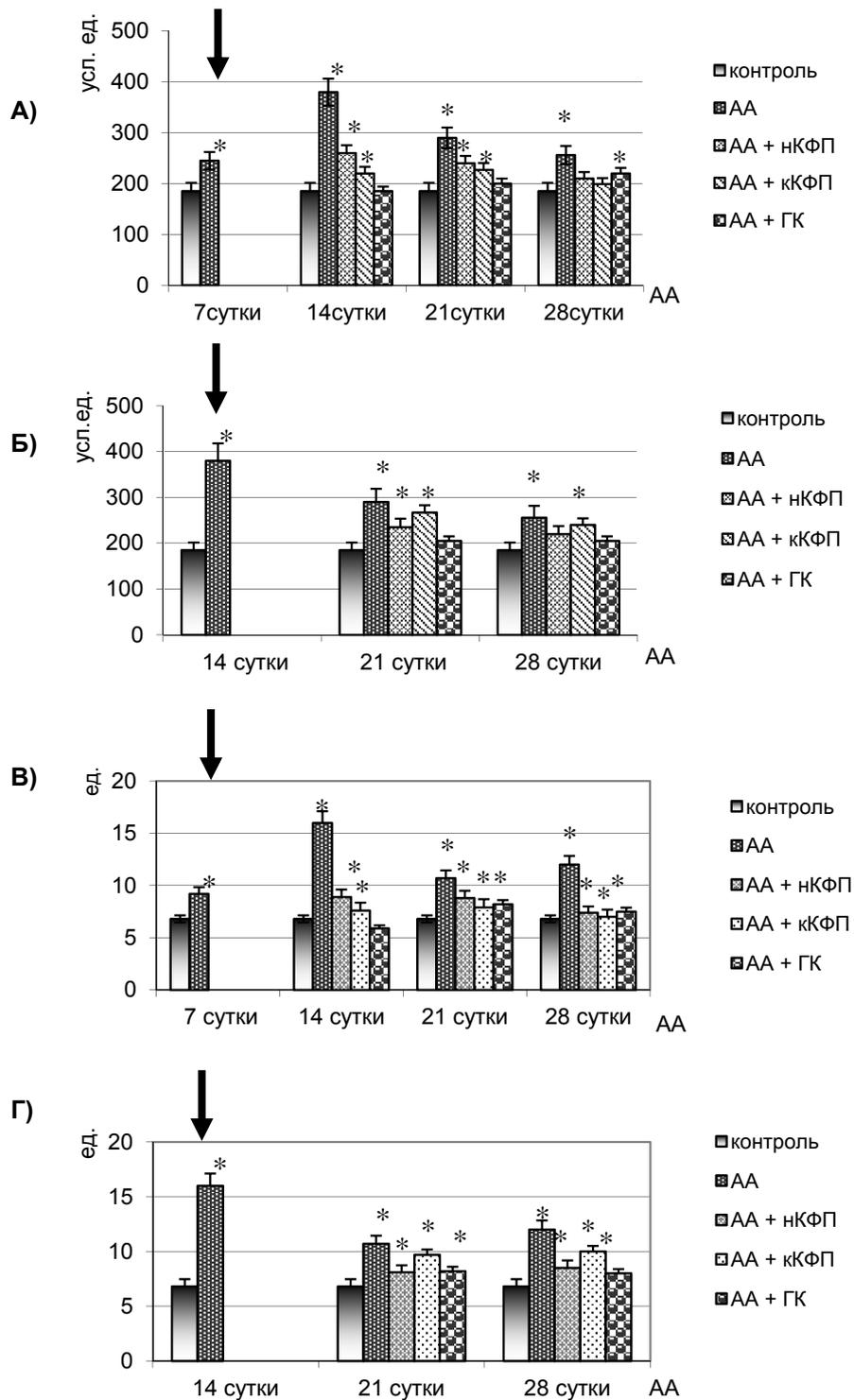
|             | До лечения КФП | После лечения (ГК) | После лечения (кКФП) | После лечения (нКФП) |
|-------------|----------------|--------------------|----------------------|----------------------|
| АА 7 сутки  | (±)            |                    |                      |                      |
| АА 14 сутки | (+)            | (---)              | (±)                  | (±)                  |
| АА 21 сутки | (+)            | (---)              | (---)                | (---)                |
| АА 28 сутки | (+)            | (---)              | (---)                | (---)                |

|             | До лечения КФП | После лечения (ГК) | После лечения (кКФП) | После лечения (нКФП) |
|-------------|----------------|--------------------|----------------------|----------------------|
| АА 14 сутки | (+)            |                    |                      |                      |
| АА 21 сутки | (+)            | (---)              | (±)                  | (±)                  |
| АА 28 сутки | (+)            | (---)              | (±)                  | (---)                |

Примечания: (+) – положительный результат, (±) – слабо положительный результат, (---) – отрицательный результат; стрелками указаны сроки введения КФП.

Таким образом, результаты данного исследования свидетельствуют о том, что динамическое развитие иммуновоспалительной реакции при АА является каскадным процессом, на каждом этапе которого меняются многие параметры состояния иммунокомпетентной сферы организма. В связи с этим успех подобного рода терапии определяется многими условиями. Наиболее выраженный корригирующий эффект был зафиксирован после введения КФП на 7 сутки развития АА. Видимо, проявление разной степени активности КФП может определяться фазой развития иммуновоспалительной реакции, которая на 7 сутки может иметь более благоприятный профиль для проведения подобного рода терапии. Это в полной мере соответствует представлению о значимости исходного состояния ИС организма в проявлении «восприимчивости» к любому типу иммунокорригирующих препаратов (Утешев и др., 1995). Более того, при одном и том же исходном состоянии ИС в момент применения препарата клеточной терапии, а именно КФП, определяющим фактором корригирующего эффекта уже является их структурно-функциональное состояние. Такая феноменология может свидетельствовать о модификации под действием физико-химических факторов кріоконсервирования рецепторного репертуара КФП, ответственного за реализацию их коммуникационных взаимодействий с микроокружением реципиента и, как следствие, восприятие регуляторных сигналов (Goltsev et al., 2006). Наконец, мембранные структуры могут быть составным компонентом антигенных эпитопов и после кріоконсервирования менять иммуногенные характеристики клеток. Другими словами, есть все предпосылки считать, что отмеченные изменения корригирующего эффекта кКФП обусловлены трансформацией их структурно-функциональных характеристик, обуславливая особенности реализации этими клетками «лиганд-рецепторных» взаимодействий. В роли составляющих компонентов этого взаимодействия выступают как организм реципиента, так и клетки вводимого кріоконсервированного препарата в виде КФП.

Полученные результаты являются экспериментальным обоснованием возможности использования КФП как препаратов лечения РА с обязательной необходимостью выбора определенных схем их применения в клинической практике.



**Рис. 2.** Количество силовых кислот (А), (Б) и серомукоидов (В), (Г) в сыворотке крови животных до и после лечения; стрелками указаны сроки введения КФП

Примечания: различия достоверны (при  $p < 0,05$ ): – \* по сравнению с контрольной группой животных.

## Список литературы

- Бельский Ю.П., Данилец М.Г., Бельская Н.В. Роль оксида азота в иммуносупрессорной и противоопухолевой активностях клеток эмбриональной печени // Бюллетень СО РАМН. – 2005. – №2. – С. 75–78. /Bel'skiy Yu.P., Danilets M.G., Bel'skaya N.V. Rol' oksida azota v immunosupressornoy i protivopukholevoy aktivnostyakh kletok embrional'noy pecheni // Byulleten' SO RAMN. – 2005. – №2. – S. 75–78./
- Венгеровский А.И., Саратиков А.С., Тихонова Н.М. Влияние бутадиона на морфогистохимические изменения в суставах при адьювантном полиартрите // Фармакология и токсикология. – 1979. – Т.17, №3. – С. 269–274. /Vengerovskiy A.I., Saratikov A.S., Tikhonova N.M. Vliyaniye butadiona na morfogistokhimicheskiye izmeneniya v sustavakh pri ad'yuvantnom poliartrite // Farmakologiya i toksikologiya. – 1979. – T.17, №3. – S. 269–274./
- Гольцев А.Н., Дубрава Т.Г., Луценко Е.Д. и др. Поиск альтернативных криоконсервированию путей модификации иммунореактивности алломиелотрансплантата. Часть 1 // Пробл. криобиологии. – 1996. – №4. – С. 3–16. /Gol'tsev A.N., Dubrava T.G., Lutsenko Ye.D. i dr. Poisk al'ternativnykh kriokonservirovaniyu putey modifikatsii immunoreaktivnosti allomiyelotransplantata. Chast' 1 // Probl. kriobiologii. – 1996. – №4. – S. 3–16./
- Гольцев А.Н., Дубрава Т.Г., Луценко Е.Д. и др. Проявление иммуномодулирующей активности клеток фетальной печени в условиях развития реакции «трансплантат против хозяина» // Иммунология та алергологія. – 2010. – №1. – С.144. /Gol'tsev A.N., Dubrava T.G., Lutsenko Ye.D. i dr. Proyavleniye immunomoduliruyushchey aktivnosti kletok fetal'noy pecheni v usloviyakh razvitiya reaktsii «transplantat protiv khozyaina» // Immunologiya ta alergologiya. – 2010. – №1. – S.144./
- Гольцев А.М., Бабенко Н.М., Останкова Л.В., Луценко О.Д. Застосування криоконсервованих продуктів ембріофетоплацентарного комплексу як коректорів аутоімунних захворювань на моделі експериментального алергійного енцефаломієліту (ЕАЕ) // Трансплантологія. – 2003. – Т.4, №1. – С. 207–209. /Gol'tsev A.M., Babenko N.M., Ostankova L.V., Lutsenko O.D. Zastosuvannya kriokonservovanykh produktiv embriofetoplatsentarnogo kompleksu yak korektoriv autoimmunnykh zakhvoryuvan' na modeli eksperymental'nogo alergiyynogo entsefalomiyelitu (EAE) // Transplantologiya. – 2003. – T.4, №1. – S. 207–209./
- Гольцев А.Н. Возможные причины развития аутоиммунной патологии и поиск путей ее лечения // Пробл. мед. науки та освіти. – 2000. – №1. – С. 22–37. /Gol'tsev A.N. Vozmozhnyye prichiny razvitiya autoimmunnoy patologii i poisk putey yeyo lecheniya // Probl. med. nauki ta osvity. – 2000. – №1. – S. 22–37./
- Гольцев А.Н., Дубрава Т.Г., Гаевская Ю.А. и др. Криобиологические технологии как компонент оптимизированных методов лечения аутоиммунных заболеваний // Клінічна імунологія. Алергологія. Інфектологія. – 2009. – №1–2 (20–21). – С. 46–51. /Gol'tsev A.N., Dubrava T.G., Gayevskaya Yu.A. i dr. Kriobiologicheskyye tekhnologii kak komponent optimizirovannykh metodov lecheniya autoimmunnykh zabolevaniy // Klinichna imunologiya. Alergologiya. Infektologiya. – 2009. – №1–2 (20–21). – S. 46–51./
- Гольцев А.Н., Попова К.Н., Сироус М.А. Криоконсервирование – фактор оптимизации терапевтического эффекта продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса (ПЭФПК): часть 2. Коррекция состояния лимфогемопоезического комплекса экспериментальных животных с АИГА клетками фетальной печени // Пробл. криобиол. – 2006. – Т.16, №4. – С. 396–407. /Gol'tsev A.N., Popova K.N., Sirous M.A. Kriokonservirovaniye – faktor optimizatsii terapevticheskogo efekta produktov embriofetoplatsentarnogo kompleksa (PEFPK): chast' 2. Korrektsiya sostoyaniya limfogemopoeticheskogo kompleksa eksperimental'nykh zhivotnykh s AIGA kletkami fetal'noy pecheni // Probl. kriobiol. – 2006. – T.16, №4. – S. 396–407./
- 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. криобиол. – 2009. – Т.19, №2. – С. 143–153 /Gol'tsev A.N., Dubrava T.G., Ostankova L.V. i dr. Osobennosti vliyaniya kriokonservirovaniya na funktsional'nyy potentsial stvolovykh krovetvornykh kletok fetal'noy pecheni raznykh srokov gestatsii // Probl. kriobiol. – 2009. – T.19, №2. – S. 143–153./
- Грищенко В.И., Гольцев А.Н. Трансплантация продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса. От понимания механизма действия к повышению эффективности применения // Пробл. криобиол. – 2002. – №1. – С. 54–84 /Grishchenko V.I., Gol'tsev A.N. Transplantatsiya produktov embriofetoplatsentarnogo kompleksa. Ot ponimaniya mekhanizma deystviya k povysheniyu effektivnosti primeneniya // Probl. kriobiol. – 2002. – №1. – S. 54–84./
- Давлетова Ч.И., Китаев М.И., Мирахмедова А.Х., Джайлобаев К.А. Цитотоксический эффект лимфоцитов крови и синовиальной жидкости у больных ревматоидным артритом // Иммунопатология и клиническая иммунология. – 2002. – №5. – С. 279–282. /Davletova Ch.I., Kitayev M.I., Mirakhmedova A.Kh., Dzhaylobayev K.A. Tsitotoksicheskiy effekt limfotsitov krovi i sinovial'noy zhidkosti u bol'nykh revmatoidnym artritom // Immunopatologiya i klinicheskaya immunologiya. – 2002. – №5. – S. 279–282./
- Камышников С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. – 2000. – Т.2. – С. 64–66. /Kamyshnikov S. Spravochnik po kliniko-biokhimicheskoy laboratornoy diagnostike. – 2000. – T.2. – S. 64–66./
- Коваленко В.М., Шуба Н.М., Проценко Г.О. Актуальні питання діагностики та лікування ревматичних хвороб за підсумками роботи III Національного конгресу ревматологів України // Укр. ревматол. журнал. – 2002. – №1. – С. 3–12. /Kovalenko V.M., Shuba N.M., Protsenko G.O. Aktual'ni pytannya diagnostyky ta likuvannya

- revmatychnykh khvorob za pidsumkamy roboty III Natsional'nogo kongresu revmatologiv Ukraini // Ukr. revmatol. zhurnal. – 2002. – №1. – S. 3–12./
- Міщенко О.Я., Котвіцька А.А. Фармакологічна ефективність емульсії анальбену на моделі ад'ювантного артриту у щурів // Вісник фармації. – 2001. – №3. – С. 124–125. /Mishchenko O.Ya., Kotvits'ka A.A. Farmakologichna efektyvnist' emul'sii anal'benu na modeli ad'yuvantnogo artrytu u shchuriv // Visnyk farmatsii. – 2001. – №3. – S. 124–125./
- Мазуров В.И. Клиническая ревматология: руководство для врачей. – Санкт-Петербург: Фолиант, 2005. – 520с. /Mazurov V.I. Klinicheskaya revmatologiya: rukovodstvo dlya vrachev. – Sankt-Peterburg: Foliyant, 2005. – 520s./
- Мацевитая И.В., Останков М.В. Применение клеток фетальной печени как один из возможных путей модификации иммунореактивности криоконсервированного алломиелотрансплантата // Проблемы криобиологии. – 2008. – Т.18. – С. 68–72. /Matsevitaya I.V., Ostankov M.V. Primeneniye kletok fetal'noy pecheni kak odin iz vozmozhnykh putey modifikatsii immunoreaktivnosti kriokonservirovannogo allomiyelotransplantata // Problemy kriobiologii. – 2008. – T.18. – S. 68–72./
- Насонова Е.Л., Чичасова Н.В., Баранов А.А. Клиническое значение С-реактивного белка при ревматоидном артрите // Клинич. медицина. – 1997. – №7. – С. 26–30. /Nasonova Ye.L., Chichasova N.V., Baranov A.A. Klinicheskoye znachenije C-reaktivnogo belka pri revmatoidnom artrite // Klinich. meditsina. – 1997. – №7. – S. 26–30./
- Петренко Ю.А., Горохова Н.А., Петренко А.Ю. Влияние высокомолекулярных соединений на жизнеспособность и функциональную активность клеток эмбриональной печени человека до и после криоконсервирования // Пробл. криобиол. – 2005. – Т.15, №3. – С. 375–379. /Petrenko Yu.A., Gorokhova N.A., Petrenko A.Yu. Vliyaniye vysokomolekulyarnykh soyedineniy na zhiznesposobnost' i funktsional'nyuy aktivnost' kletok embrional'noy pecheni cheloveka do i posle kriokonservirovaniya // Probl. kriobiol. – 2005. – T.15, №3. – S. 375–379./
- Саратиков А.С., Венгеровский А.И., Прищепт Т.П. Адьювантная болезнь (морфология, патогенез, экспериментальная терапия). – Томск: Изд-во Томск. ун-та, 1983. – 101с. /Saratikov A.S., Vengerovskiy A.I., Prishchep T.P. Ad'yuvantnaya bolezn' (morfologiya, patogenez, eksperimental'naya terapiya). – Tomsk: Izd-vo Tomsk. un-ta, 1983. – 101s./
- Сироус М.А., Гольцев К.А., Рассоха И.В. Влияние факторов криоконсервирования на иммуногенные свойства эритроцитов // Холод в биологии и медицине: ежегодн. конф. молодых ученых. Тез. докл. – Харьков, 2009. – С.14. /Sirous M.A., Goltsev K.A., Rassokha I.V. Vliyaniye faktorov kriokonservirovaniya na immunogennyye svoystva eritrotsitov // Kholod v biologii i meditsine: ezhegodn. konf. molodykh uchenykh. Tez. dokl. – Khar'kov, 2009. – S.14./
- Сироус М.А., Гольцев К.А., Луценко Е.Д. и др. Криоконсервирование как фактор оптимизации терапевтического потенциала клеток фетальной печени при лечении АИГА // Пробл. криобиол. – 2008. – Т.18, №2. – С.189. /Sirous M.A., Goltsev K.A., Lutsenko Ye.D. i dr. Kriokonservirovaniye kak faktor optimizatsii terapevticheskogo potentsiala kletok fetal'noy pecheni pri lechenii AIGA // Probl. kriobiol. – 2008. – T.18, №2. – S.189./
- Токарева Л.В., Сизякина Л.П. Оценка эффективности различных комбинаций противоревматических препаратов в комплексном лечении ревматоидного артрита // Мед. иммунология. – 2002. – Т.4, №2. – С.214. /Tokareva L.V., Sizyakina L.P. Otsenka effektivnosti razlichnykh kombinatsiy protivorevmaticheskikh preparatov v kompleksnom lechenii revmatoidnogo artrita // Med. immunologiya. – 2002. – T.4, №2. – S. 214./
- Утешев Б.С., Сергеев А.С., Коростелов С.А. Анализ современных направлений в создании иммуностропных средств // Экспер. и клин. фармакология. – 1995. – Т.58, №3. – С. 3–7. /Uteshev B.S., Sergeyev A.S., Korostelov S.A. Analiz sovremennykh napravleniy v sozdanii immunotropnykh sredstv // Eksp. i klin. farmakologiya. – 1995. – T.58, №3. – S. 3–7./
- Черешнев В.А., Хайтов Р.М., Сидорович И.Г., Родионов С.Ю. Влияние  $\alpha$ -фетопротеина человека на иммунореактивность при трансплантации тканей в эксперименте // Иммунология. – 2003. – №6. – С. 330–332. /Chereshnev V.A., Khaitov R.M., Sidorovich I.G., Rodionov S.Yu. Vliyaniye  $\alpha$ -fetoproteina cheloveka na immunoreaktivnost' pri transplantatsii tkaney v eksperimente // Immunologiya. – 2003. – №6. – S. 330–332./
- Ямпольская Е.Е., Гольцев А.Н. Модуляция состояния моноцитарно-фагоцитарной системы у животных с аутоиммунной патологией клетками фетальной печени // Патология. – 2011. – Т.8, №2. – С. 105–107. /Yampol'skaya Ye.Ye., Goltsev A.N. Modulyatsiya sostoyaniya monotsitarno-fagotsitarnoy sistemy u zhyvotnykh s autoimmunnoy patologiyey kletkami fetal'noy pecheni // Patologiya. – 2011. – T.8, №2. – S. 105–107./
- Ямпольская Е.Е., Гольцев А.Н., Гурина Т.М. Изменение функционального потенциала клеток фетальной печени в зависимости от режима криоконсервирования // Світ медицини та біології. – 2007. – №1. – С. 89–93. /Yampol'skaya Ye.Ye., Goltsev A.N., Gurina T.M. Izmeneniye funktsional'nogo potentsiala kletok fetal'noy pecheni v zavisimosti ot rezhima kriokonservirovaniya // Svit medytsyny ta biologii. – 2007. – №1. – S. 89–93./
- Arnaud F.G., Meryman H.T. WBC reduction in cryopreserved RBC units // Transfusion. – 2003. – Vol.43, №4. – P. 517–525.
- Bathon J.M., Martin R.W., Fleischmann R.M. et al. Comparison of etanercept and methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis // The New England Journal of Medicine. – 2000. – Vol.343, №22. – P. 1586–1593.

- Bendele A.M. Animal models of rheumatoid arthritis // J. Musc. Neuron. Interact. – 2001. – Vol.1, №4. – P. 377–385.
- Friedman R.B., Young D.S. Effects of disease on clinical laboratory tests. 3-th ed. – Washington: AACCC Press, 1997. – 1068p.
- Goltsev A.N., Babenko N.N., Dubrava T.G., Shatneva O.M. Modification of bone marrow hemopoietic cells after cryopreservation // International Journal of refrigeration. – 2006. – №3. – P. 358–367.
- 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, №1. – P. 29–38.
- Harris E.D. Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy // New. Engl. J. Med. – 1990. – Vol.322. – P. 1277–1289.
- Keethesan N., Whiteman C., Malczewski A. et al. Effect of cryopreservation on the immunogenicity of umbilical cord blood cells // Transfusion and Apheresis Science. – 2004. – Vol.30. – P. 47–54.
- Le Blank K. Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells // Cytoterapy. – 2003. – Vol.5, №6. – P. 485–489.
- Marques A., Müller S. Mouse models of autoimmune diseases // Current Drug Discovery Technologies. – 2000. – №6. – P. 262–269.
- Mellor A.L., Chandler P., Kook L.G. et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase, immunosuppression and pregnancy // Journal of Reproductive Immunology. – 2002. – Vol.57. – P. 143–150.
- Riccardi C., Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry // Nature Protocols. – 2006. – №1. – P. 1458–1461.
- Silverman E.D., Isacovics B., Petsche D., Laxer R.M. Synovial fluid cells in juvenile arthritis: evidence of selective T cell migration to inflamed tissue // Clin. Exp. Immunol. – 1993. – Vol.91. – P. 90–95.
- Stopka T., Zivny J. H., Stopkova P. et al. Human hematopoietic progenitors express erythropoietin // Blood. – 1998. – №91. – P. 3766–3772.
- Ushiyama T., Chano T., Inoue K., Matsusue Y. Cytokine production in the infrapatellar fat pad: another source of cytokines in knee synovial fluids // Ann. Rheum. Dis. – 2003. – Vol.62, №2. – P. 108–113.
- Venkataraman M. Effect of cryopreservation on immune responses. VIII. Enhanced secretion of interferon-gamma by frozen human peripheral blood mononuclear cells // Cryobiology. – 1995. – Vol.32. – P. 528–534.
- Vittecoq O., Pouplin S., Krzanowska K. et al. Rheumatoid factor is the strongest predictor of radiological progression of rheumatoid arthritis in a three year prospective study in community-recruited patients // Rheumatology. – 2003. – Vol.42. – P. 939–946.

---

**Представлено: Г.Ф.Жегунов / Presented by: G.F.Zhegunov**

**Рецензент: В.В.Мартиненко / Reviewer: V.V.Martynenko**

*Подано до редакції / Received: 13.02.2012*