

УДК 616.72-007.248: 618.46-085.451.22.014.41

Е.Д. Луценко\*, М.В. Останков, Н.А. Бондарович, А.Н. Гольцев

## Влияние применения криоконсервированной суспензии клеток плаценты на показатели периферической крови и костного мозга животных с адьювантным артритом

UDC 616.72-007.248: 618.46-085.451.22.014.41

### E.D. Lutsenko\*, M.V. Ostankov, N.A. Bondarovich, A.N. Goltsev Influence of Application of Cryopreserved Placental Cell Suspension on Indices of Peripheral Blood and Bone Marrow of Animals with Adjuvant Arthritis

**Реферат:** На модели адьювантного артрита у мышей линии СВА/Н исследованы гематологические показатели, определен уровень циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) и количество стволовых кроветворных клеток (CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>, CD117<sup>+</sup>) в костном мозге (КМ) до и после применения нативной и криоконсервированной в различных режимах суспензии клеток плаценты (СКП). СКП криоконсервировали с 10% диметилсульфоксида или 10% пропандиосахароля. Максимальное терапевтическое действие оказывало введение нативной СКП (14-е сутки) и суспензии, криоконсервированной с пропандиосахаролем (28-е сутки). Введение любой из суспензий корригировало скорость оседания эритроцитов, ЦИК, количество ядродержащих клеток в КМ, но эффект проявлялся в различные сроки. Применение криоконсервированных суспензий способствовало восстановлению индекса пролиферативной активности стволовых кроветворных клеток. В зависимости от условий криоконсервирования СКП изменялись свойства вводимой суспензии, что влияло на сроки восстановления количества CD117<sup>+</sup>-клеток.

**Ключевые слова:** артрит, криоконсервирование, плацента, стволовые кроветворные клетки.

**Реферат:** На моделі ад'ювантного артриту у мишей лінії СВА/Н досліджено гематологічні показники, визначено рівень циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) та кількість стовбурових кроветворних клітин (CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>, CD117<sup>+</sup>) у кістковому мозку (КМ) до і після застосування нативної та криоконсервованої за різними режимами суспензії клітин плаценти (СКП). СКП криоконсервовували з 10% диметилсульфоксида або 10% пропандіосахаролі. Максимальна терапевтична дія спостерігалась після введення нативної СКП (14-а доба) і суспензії, криоконсервованої з пропандіосахаролі (28-а доба). Введення будь-якої суспензії коригувало швидкість осідання еритроцитів, ЦІК, кількість ядромісних клітин у КМ, але ефект проявлявся в різні терміни. Застосування криоконсервованих суспензій сприяло відновленню індексу проліферативної активності стовбурових кроветворних клітин. Залежно від умов криоконсервування СКП змінювалися властивості введеної суспензії, що впливало на термін відновлення кількості CD117<sup>+</sup>-клітин.

**Ключові слова:** артрит, криоконсервування, плацента, стовбурові кроветворні клітини.

**Abstract:** In the model of adjuvant-induced arthritis in CBA/H mice there were investigated the hematological indices, circulating immune complexes (CIC) in peripheral blood, a number of hematopoietic stem cells: CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> and CD117<sup>+</sup> in bone marrow (BM) before and after applying either fresh or cryopreserved with various regimens placental cell suspension (PCS). PCS was cryopreserved with either 10% dimethyl sulfoxide or 10% propane diol saccharol. The maximum therapeutic effect was found after the introduction of fresh PCS (day 14) and suspension, cryopreserved with propane diol saccharol (day 28). The introduction of any of PCS positively affected the erythrocyte sedimentation rate (ESR), CIC, nucleated cells in bone marrow, but the effect was manifested at different terms. The application of cryopreserved suspensions contributed to the restoration of proliferative activity of hematopoietic stem cells. Depending on the cryopreservation regimen of the PCS, the properties of the injected suspension changed which affected the recovery time of the number of CD117<sup>+</sup>-cells.

**Key words:** arthritis, cryopreservation, placenta, hematopoietic stem cells.

Всестороння оцінка стану організму при аутоімунних захворюваннях, в том числі і при ревматоїдному артриті (РА), виявила виражені порушення в функціонуванні кроветворної системи. У пацієнтів з цією патологією об'явлено зниження кількості кроветворних предшественників, посилені апоптоз CD34<sup>+</sup>-клеток

Autoimmune diseases, including rheumatoid arthritis (RA), are accompanied with the significant impairments in the function of hematopoietic system. Patients suffering from this pathology usually have a decreased number of hematopoietic progenitors, enhanced apoptosis of CD34<sup>+</sup> cells in bone marrow (BM), changes in the clonogenic

Відділ кріопатофізіології та імунології, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Department of Cryopathophysiology and Immunology, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

\*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;  
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52  
електронна пошта: lenalutsenko809@gmail.com

\*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine 61016;  
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952  
e-mail: lenalutsenko809@gmail.com

Надійшла 06.02.2018

Прийнята до друку 18.02.2019

Received February, 06, 2018

Accepted February, 18, 2019

© 2019 E.D. Lutsenko et al. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**Основные обозначения**

АА	адьювантный артрит
АИЗ	аутоиммунные заболевания
ДМСО	диметилсульфоксид
ГПЧ	гомогенат плаценты человека
ЗФФР	забуференный фосфатами физиологический раствор
ИА	индекс артрита
ИДО	индоламин-2,3-диоксигеназа
ИЛ	интерлейкин
ИПА	индекс пролиферативной активности
КД	клетки, криоконсервированные под защитой 10%-го раствора диметилсульфоксида
КМ	костный мозг
КОЕ-ГМ	гранулоцитарно-макрофагальные колониеобразующие единицы
КОЕс	колониеобразующие единицы в селезенке
КП	клетки, криоконсервированные под защитой 10%-го раствора пропандиосахароля
нСКП	нативная суспензия клеток плаценты
ПДС	пропандиосахароль
ПСК	полипотентная стволовая клетка
РА	ревматоидный артрит
СКК	стволовая кроветворная клетка
СКП	суспензия клеток плаценты
СОЭ	скорость оседания эритроцитов
ССО	суммарная степень отклонения
ЦИК	циркулирующие иммунные комплексы

**Abbreviation used in the text**

AA	adjuvant arthritis
AID	autoimmune diseases
DMSO	dimethyl sulfoxide
HPH	human placenta homogenate
PBS	phosphate buffered saline
AI	arthritis Index
IDO	indolamine-2,3-dioxygenase
IL	interleukin
IPA	the index of proliferative activity
CD	cells cryopreserved under 10% dimethyl sulfoxide solution protection
BM	bone marrow
CFU-GM	granulocyte macrophage colony forming units
CFUs	colony-forming units in spleen
CP	cells cryopreserved under 10% solution of propandiosaccharol protection
fPCS	fresh suspension of placental cells
PDS	propandiosaccharol
PSC	polypotent stem cell
RA	rheumatoid arthritis
SCC	hematopoietic stem cell
PCS	placental cell suspension
ESR	erythrocyte sedimentation rate
TDD	total deviation degree
CIC	circulating immune complexes

в костном мозге (КМ), изменение клоногенного потенциала стволовых клеток и функций стромального микроокружения [18]. Поэтому показатели состояния периферической крови и КМ являются важными не только диагностическими и прогностическими критериями течения ревматоидного артрита (РА), но и эффективности его лечения.

Благодаря способности клеток плаценты продуцировать факторы с гемопоэтической ростовой и иммуносупрессорной активностью в виде стволовых факторов, трансформирующего ростового фактора  $\beta$  (ТРФ  $\beta$ ) и интерлейкина-10 (ИЛ) [21], данный орган может использоваться для создания продуктов, корригирующих гемопоэз и обладающим противовоспалительным действием [4]. Применение этих клеток в терапевтических целях предусматривает их предварительное криоконсервирование. Эффективность данного лечения обусловлена, с одной стороны, различиями популяционного состава клеток после криоконсервирования при разных режимах охлаждения, а с другой – множеством критериев оценки, среди которых обязательным является состояние кроветворной и иммунной систем.

Важным аспектом в терапии аутоиммунных заболеваний (АИЗ) считается иммуносупрессия, поэтому наличие иммуносупрессивных свойств в криоконсервированном материале плаценты – главный критерий его успешного использования. Существуют данные об участии в этом процессе

potential of stem cells and the functions of stromal microenvironment [2]. Indices of peripheral blood and BM are therefore important not only for diagnostic and prognostic criteria of the course of rheumatoid arthritis (RA), but also as a reflection of treatment effectiveness.

As the cells of placenta produce the factors with hematopoietic growth and immune suppressive activity, *e. g.* the stem-cell factor, transforming growth factor  $\beta$  (TGF  $\beta$ ) and interleukin-10 (IL) [9], the placenta can be used to develop the products that correct hematopoiesis and those with anti-inflammatory effect [6]. The use of these cells for therapeutic purposes usually involves their preliminary cryopreservation. Thus the effectiveness of the treatment is associated, on the one hand, with the differences in the population composition of the cells after cryopreservation under different cooling regimens, and on another, with a variety of assessment criteria, among which the condition of hematopoietic and immune systems is mandatory.

An important aspect in treatment of autoimmune diseases (AID) is immune suppression, therefore the presence of immunosuppressive properties in the cryopreserved placental product is the main criterion for its successful use. There is an evidence that this process involves the enzyme indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO), the expression of which was found in fresh and cryopreserved suspension of placental cells [5]. Nevertheless,

фермента индолеамин-2,3-диоксигеназы (ИДО), экспрессия гена которого была выявлена в нативной и криоконсервированной суспензии клеток плаценты [19]. Вместе с тем известно, что препараты, обладающие выраженными иммуносупрессивными свойствами, оказывают негативное влияние на гемопоэз, поэтому целью работы была оценка влияния суспензии клеток плаценты, криоконсервированной в различных режимах охлаждения, на состояние гематологических показателей в экспериментальной модели ревматоидного артрита – адьювантном артрите.

### Материалы и методы

В работе были использованы мыши линии СВА/Н массой 18–20 г 8–10-месячного возраста. Эксперименты проводили в соответствии с Законом Украины «О защите животных от жестокого обращения» (№ 3447-IV от 21.02.2006 г.) при соблюдении требований Комитета по биоэтике Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (г. Харьков), согласованных с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

Адьювантный артрит (АА) у мышей линии СВА/Н индуцировали субплантарным введением полного адьюванта Фрейнда [11] в дозе 0,05 мл с 1,5 мг/мл инактивированной *Mycobacterium tuberculosis*. Развитие АА оценивали по индексу артрита (ИА) – отношению длины окружности сустава опытной лапы (в сантиметрах) к показателю контрольного сустава у этого животного.

Суспензию клеток плаценты (СКП) получали из хориального участка зрелой плаценты мышей на 18–19 сутки гестации по методу В.И. Грищенко и соавт. [6]. Криоконсервирование СКП осуществляли в криопробирках («Nunc», Дания). В СКП, содержащую  $5 \times 10^6$  клеток в 0,5 мл забуференного фосфатами физиологического раствора, вводили медленно по каплям 0,5 мл 20%-го раствора криопротектора диметилсульфоксида (ДМСО) – (суспензия КД) или пропандиосахароля (ПДС) (суспензия КП), что соответствовало 10%-й концентрации криопротекторов. Суспензию замораживали на программном замораживателе УОП-1 (ОП Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины) по двухэтапному способу охлаждения: первый этап – охлаждение со скоростью 1 град/мин до  $-40^{\circ}\text{C}$ , второй этап – погружение в жидкий азот. Пробирки с клеточной суспензией отогревали на водяной бане ( $42^{\circ}\text{C}$ ) при непрерывном встряхивании в течение 1–2 мин.

the medical products with pronounced immunosuppressive properties are known to have a negative effect on hematopoiesis, therefore the research aim was to evaluate the effect of a suspension of placental cells cryopreserved with various cooling modes, on the state of hematological parameters in experimental model of RA, the adjuvant arthritis.

### Materials and methods

The research was performed in 8–10 month-old CBA/H mice weighing 18–20g. The experiments were carried out in accordance with the Law of Ukraine ‘On the Protection of Animals Against Cruelty’ (№ 3447-IV of February 21<sup>st</sup>, 2006) meeting the requirements of the Committee in Bioethics of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine (Kharkiv), and agreed with the statements of European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

Adjuvant arthritis (AA) in CBA/H mice was induced by subplantar administration of Freund’s complete adjuvant [16] with 0.05 ml dose comprising 1.5 mg/ml inactivated *Mycobacterium tuberculosis*. The AA development was assessed by the arthritis index (AI), *i. e.* the ratio of the joint circumference of affected paw (in centimeters) to the index of the control joint of this animal.

Placental cell suspension (PCS) was obtained from the chorial region of the mature mouse placenta on 18–19 days of gestation according to the method of V.I. Grishchenko *et al.* [8]. The PCS was cryopreserved in cryovials (Nunc, Denmark). The PCS contained  $5 \times 10^6$  cells in 0.5 ml of phosphate buffered saline, and was slowly dropwise supplemented with 0.5 ml of a 20% solution of dimethyl sulfoxide (DMSO) cryoprotectant (herein after CD suspension) or propan-diosaccharol (PDS) (CP suspension), and final concentration of cryoprotectants was 10%. The suspension was frozen with the UOP-1 programmable freezer (Experimental Unit of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine) using a two-stage cooling method: the first stage was cooling at a rate of 1 deg/min down to  $-40^{\circ}\text{C}$ , the second stage was an immersion into liquid nitrogen. The tubes with cell suspension were warmed in a water bath ( $42^{\circ}\text{C}$ ) with continuous shaking for 1–2 minutes.

On day 7 after the pathology induction, 0.2 ml of a suspension of either fresh or cryopreserved



На 7-е сутки после индукции патологии в хвостовую вену мышей вводили 0,2 мл суспензии нативных или криоконсервированных клеток плаценты в дозе  $1 \times 10^6$  клеток на мышь.

Экспериментальные животные с АА были разделены на группы (по 5–7 особей в каждой): АА – индукция АА; АА + нСКП – введение нативной СКП (нСКП) на фоне АА; АА + КД – введение СКП, криоконсервированной с ДМСО (КД); АА + КП – введение СКП, криоконсервированной с ПДС (КП); контроль – введение интактным животным забуференного фосфатами физиологического раствора.

На 14, 21, 28-е сутки развития АА в периферической крови декапитированных животных определяли абсолютное содержание лейкоцитов, эритроцитов, концентрацию гемоглобина, процентное содержание лимфоцитов, гранулоцитов, моноцитов, эозинофилов на гематологическом анализаторе «Abacus» («Diatron», Австрия) согласно протоколу фирмы-производителя.

Скорость оседания эритроцитов (СОЭ) оценивали в аппарате Панченкова [10].

Циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК) определяли спектрофотометрически (длина волны 280 нм) методом преципитации с 3%-м и 4%-м растворами полиэтиленгликоля с м. м. 6 000 [15] и выражали в виде коэффициента размера ЦИК, рассчитанного как отношение концентрации белка в иммунных комплексах ( $C_4/C_3$ ).

Для интегральной оценки терапевтической эффективности применения СКП на 14 и 28-е сутки развития патологии использовали следующую формулу [5]:

$$ССО = \sum : 100,$$

где ССО – суммарная степень отклонения;  $\sum$  – сумма значений отклонений от контроля по всем показателям (чем ближе ССО к 0, тем выше эффективность лечения).

Костный мозг (КМ) вымывали из бедренных костей экспериментальных животных средой 199 («ПанЭко», Россия), содержащей 3% эмбриональной телячьей сыворотки и 2% цитрата натрия [2], и подсчитывали количество ядросодержащих клеток в камере Горяева [8].

На 14 и 28-е сутки после индукции АА в КМ животных определяли количество клеток с фенотипическими признаками стволовых кроветворных клеток (СКК) –  $CD34^+CD38^-$ ,  $CD117^+$  с помощью моноклональных антител: CD34-PE, CD38-FITC, CD117-FITC («BD Pharmingen», США). Для выявления неспецифического окрашивания использовали изотипические контроли FITC Rat

placenta cells in a dose of  $1 \times 10^6$  cells per mouse was injected into the tail vein of mice.

Experimental animals with AA were divided into groups (5–7 individuals each): AA – AA induction; AA + fPCS – introduction of fresh PCS (fPCS) on the background of AA; AA + CD – introduction of PCS, cryopreserved with DMSO (CD); AA + CP – introduction of the PCS, cryopreserved with PDS (CP); control – introduction of phosphate buffered saline to intact animals.

The absolute content of leukocytes, erythrocytes, hemoglobin concentration, percentage of lymphocytes, granulocytes, monocytes, eosinophils with hematology analyzer Abacus (Diatron, Austria) according to the manufacturing company protocol were determined in peripheral blood of decapitated animals on days 14, 21, 28 of AA development.

The erythrocyte sedimentation rate (ESR) was evaluated by the Panchenkov's device [15].

Content of circulating immune complexes (CIC) was assessed spectrophotometrically at 280 nm by the precipitation method with 3% and 4% solution of polyethylene glycol with m.m. 6,000 [22] and expressed as the ratio of the CIC size, calculated as the ratio of protein concentrations in immune complexes ( $C_4/C_3$ ).

For an integral assessment of therapeutic efficiency of using the PCS to days 14 and 28 of the pathology development, the following formula was used [7]:

$$TDD = \sum : 100,$$

where TDD is total deviation degree;  $\sum$  – sum of deviations from the control for all the indices (the closer the TDD to 0, the higher the treatment efficiency).

The femoral bone marrow (BM) was washed with medium 199 (PanEco, Russia) containing 3% fetal bovine serum and 2% sodium citrate [3], and the number of nucleated cells was counted in Goryaev's chamber [12].

To days 14 and 28 after AA induction in the BM of animals, the number of cells with phenotypic signs of hematopoietic stem cells (HSCs) was determined –  $CD34^+CD38^-$ ,  $CD117^+$  using monoclonal antibodies: CD34-PE, CD38-FITC, CD117-FITC (BD Pharmingen, USA). FITC Rat (Wistar) IgG2b,  $\kappa$ ; PE Rat IgG2a,  $\kappa$  (BD Pharmingen, USA) isotypic controls were used to detect non-specific staining according to the manufacturer protocol. The indices were evaluated with FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, United States).

The proliferative activity index (PAI) was calculated as the ratio of percentage of less differentia-



(Wistar) IgG2b,  $\kappa$ ; PE Rat IgG2a,  $\kappa$  («BD Pharmingen», США) в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Показатели оценивали на проточном цитофлуориметре «FACSCalibur» («BD Biosciences», США).

Индекс пролиферативной активности (ИПА) вычисляли как отношение процентного содержания менее дифференцированных СКК к более дифференцированным клеткам стволового компартмента, т. е.  $\% CD34^+CD38^- / \% CD117^+$  [2].

Для статистического анализа использовали программы «Excel» («Microsoft», США), «Statistica 8.0» («Statsoft», США) [14]. Нормальность распределения проверяли с помощью критериев Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка, равенство дисперсий оценивали по критерию Левена. В зависимости от характера распределения данных в выборках множественные сравнения проводили одномерным (однофакторным) дисперсионным анализом для независимых групп с последующим сравнением значений между группами критерием Тьюки [7] или ранговым анализом вариаций по Краскелу-Уоллису программой «ANOVA» («StatSoft», США). Результаты определения показателей периферической крови представляли как среднее значение (Mean) и среднее квадратичное отклонение (SD). Количество ядро-содержащих клеток,  $CD34^+CD38^-$ ,  $CD117^+$  представляли как медиану (Me) и квартили (25 и 75-й процентиля). Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Развитие отека сустава после введения полног адьюванта Фрейнда является одним из основных клинических проявлений развития АА. Максимальных значений отек достигал к 14-м суткам и сохранялся в течение всего времени наблюдения (табл. 1).

В динамике развития патологии у животных с АА установлены незначительные колебания количества лейкоцитов (табл. 1). Вместе с тем выраженные изменения количества гранулоцитов и лимфоцитов у животных этой группы отмечались в течение всего срока наблюдения (рисунок). Установлено, что при редких осложнениях РА (синдроме Фелти) наблюдаемая нейтропения может быть обусловлена гибелью нейтрофилов, нагруженных антителами или иммунными комплексами и фагоцитозом [22, 23].

Динамика ЦИК имела также волновой характер: значимое увеличение количества комплексов отмечено на 14–21-е сутки, уменьшение – на 28-е сутки, что, вероятно, связано с интенсивностью оседания их в тканях. Падение уровня

тед HSCs to more differentiated stem cells, *i. e.*  $\% CD34^+CD38^- / \% CD117^+$  [3].

For statistical analysis, the Excel software (Microsoft, USA), Statistica 8.0 (Statsoft, USA) were used [21]. The Kolmogorov-Smirnov normality and Shapiro-Wilk tests were used to assess the normality of the distribution, the equality of variances was evaluated by the Levene's test. Depending on the nature of the data distribution in the samples, multiple comparisons were carried out with one-dimensional (one-factor) analysis of variance for independent groups, followed by comparison of the values between groups by Tukey's criterion [9] or ranking analysis of Kruskal-Wallis one-way analysis of variance (ANOVA) (StatSoft, USA). The results of the determination of peripheral blood parameters were presented as Means and standard deviation (SD). The number of nucleated cells,  $CD34^+CD38^-$ ,  $CD117^+$  was presented as median (Me) and quartiles (25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentiles). Differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$ .

### Results and discussion

The development of joint edema after introduction of Freund's complete adjuvant is one of the main clinical manifestations of the AA development. On day 14 the edema reached maximum volume and persisted throughout the entire observation period (Table 1).

The pathology development in animals with AA was accompanied with insignificant alterations in the number of leukocytes (Table 1). At the same time, the pronounced changes in the number of granulocytes and lymphocytes in this group of animals were observed during the entire observation period (Figure).

It has been established earlier that in rare complications of RA (Felty's syndrome), the observed similar neutropenia may result from death of neutrophils loaded with antibodies or immune complexes and phagocytosis [14, 19].

The CIC dynamics also had a wave pattern: a significant increase in the number of complexes was noted to days 14–21, a decrease was found to day 28, which was probably due to the intensity of their sedimentation in tissues. A drop in the CIC level usually indicates the attenuation of pathological process, a decrease in the rate of their formation and increase in the rate of elimination [15]. At the same time, the presence of clinical signs of pathology during these periods and the CIC decrease below the control values indicated the development of more complex mechanisms, for example, observed with

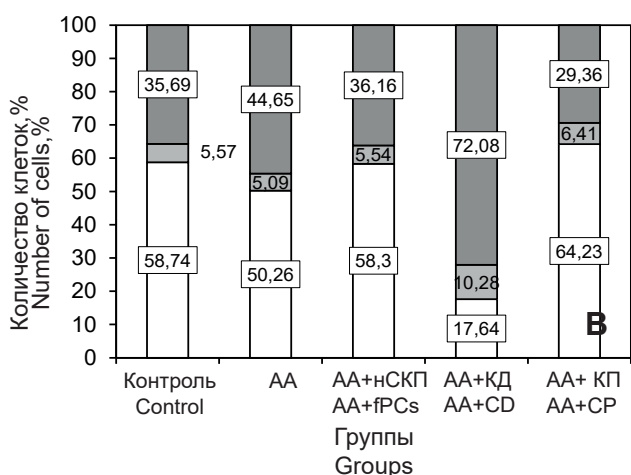
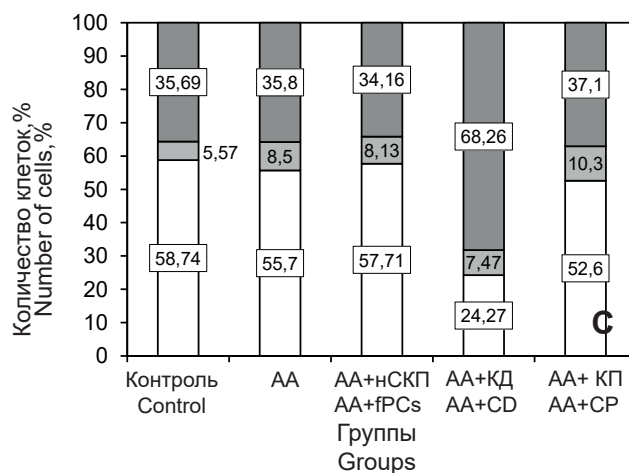
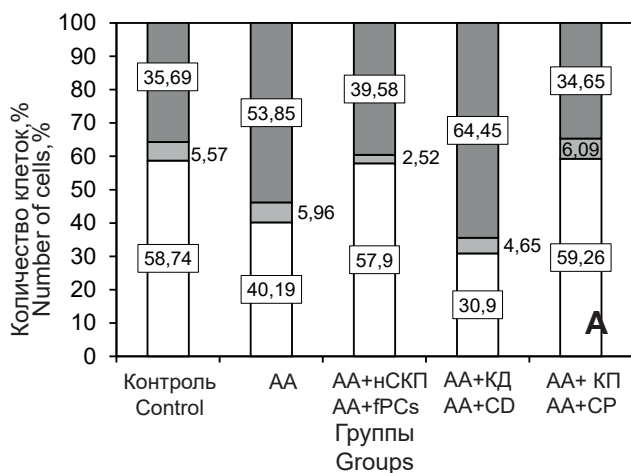


**Таблица 1.** Индекс артрита и показатели периферической крови животных с АА до и после введения СКП ( $m \pm SD$ ) ( $n = 30$ )  
**Table 1.** Arthritis and peripheral blood indices for animals with AA prior to and after PCS introduction ( $m \pm SD$ ) ( $n = 30$ )

Сроки наблюдения, сутки Observation terms, days	Показатель Index	Контроль Control	АА AA	АА + нСКП AA + fPCS	АА + КД AA + CD	АА + КП AA + CP
14	Индекс артрита Arthritis Index	1	1,6 ± 0,2 <sup>#</sup>	1,17 ± 0,2*	1,4 ± 0,1 <sup>^</sup>	1,3 ± 0,1*
	Эритроциты × 10 <sup>12</sup> /л Erythrocytes × 10 <sup>12</sup> /l	10,45 ± 1,5	9,47 ± 0,1	8,5 ± 0,6	8,85 ± 0,8	6,34 ± 0,7* <sup>^</sup>
	Лейкоциты × 10 <sup>9</sup> /л Leukocytes × 10 <sup>12</sup> /l	6,07 ± 1,8	5,24 ± 0,5	5,24 ± 0,6	8,59 ± 0,9* <sup>^</sup>	4,21 ± 0,5*
	Гемоглобин, г/л Hemoglobin, g/l	82,23 ± 4,4	109,07 ± 10,2 <sup>#</sup>	122,88 ± 15,1*	90,28 ± 7,3* <sup>^</sup>	67,94 ± 5,8* <sup>^</sup> &
	СОЭ, мм/ч ESR mm/h	1,17 ± 0,6	2 ± 0,2 <sup>#</sup>	1 ± 0,1*	1 ± 0,1*	1,5 ± 0,1 <sup>^</sup> &
	ЦИК CIC	1,18 ± 0,1	1,37 ± 0,3 <sup>#</sup>	0,54 ± 0,3*	4,52 ± 0,6* <sup>^</sup>	2,22 ± 0,3* <sup>^</sup> &
21	Индекс артрита Arthritis Index	–	1,5 ± 0,2 <sup>#</sup>	1,38 ± 0,1	1,35 ± 0,1*	1,45 ± 0,1
	Эритроциты × 10 <sup>12</sup> /л Erythrocytes × 10 <sup>12</sup> /l	–	9,25 ± 0,4	9,39 ± 0,4	9,1 ± 0,1	9,34 ± 0,5
	Лейкоциты × 10 <sup>9</sup> /л Leukocytes × 10 <sup>12</sup> /l	–	7,23 ± 0,8	7,23 ± 0,9	5,89 ± 0,6*	2,64 ± 0,3* <sup>^</sup> &
	Гемоглобин, г/л Hemoglobin, g/l	–	122,93 ± 9,9 <sup>#</sup>	113,64 ± 10,1*	96,73 ± 7,3* <sup>^</sup>	113,54 ± 10,4* <sup>^</sup> &
	СОЭ, мм/ч ESR mm/h	–	1 ± 0,1	1 ± 0,1	1,5 ± 0,2* <sup>^</sup>	2,3 ± 0,2* <sup>^</sup> &
	ЦИК CIC	–	1,78 ± 0,5 <sup>#</sup>	0,88 ± 0,2*	1,21 ± 0,1* <sup>^</sup>	1,16 ± 0,1* <sup>^</sup>
28	Индекс артрита Arthritis Index	–	1,52 ± 0,3 <sup>#</sup>	1,4 ± 0,4	1,28 ± 0,2* <sup>^</sup>	1,2 ± 0,3* <sup>^</sup>
	Эритроциты × 10 <sup>12</sup> /л Erythrocytes × 10 <sup>12</sup> /l	–	8,49 ± 0,6	9,0 ± 0,4	9,28 ± 0,5	10,28 ± 0,3*
	Лейкоциты × 10 <sup>9</sup> /л Leukocytes × 10 <sup>12</sup> /l	–	6,24 ± 0,1	6,24 ± 1,1	3,19 ± 0,4* <sup>^</sup>	6,59 ± 1,2*
	Гемоглобин, г/л Hemoglobin, g/l	–	114,5 ± 10,1 <sup>#</sup>	110,8 ± 11,3	103,18 ± 14,1*	99,83 ± 10,2*
	СОЭ, мм/ч ESR mm/h	–	3 ± 0,3 <sup>#</sup>	2 ± 0,2*	2 ± 0,2*	1,3 ± 0,3* <sup>^</sup> &
	ЦИК CIC	–	0,64 ± 0,1 <sup>#</sup>	1,23 ± 0,1*	1,21 ± 0,3*	1,13 ± 0,3*

**Примечание:** различия значимы по сравнению с контролем (#); группой АА (\*); группой АА + нСКП (^); между группами АА + КД и АА + КП (&),  $p < 0,05$ .

**Note:** differences are statistically significant if compared with the control (#) group AA (\*); group AA + fPCS (^); between groups AA + CD and AA + CP (&),  $p < 0.05$ .



Показатели периферической крови мышей с АА до и после введения СКП в разные сроки наблюдения. 14-е сутки (А), 21-е сутки (В), 28-е сутки (С); □ – лимфоциты, ■ – моноциты, ■ – эозинофилы, ■ – гранулоциты. Различия значимы по сравнению с контролем (#); группой АА (\*); группой АА + нСКП (^); группой АА + КД (&);  $p < 0,05$ ,  $n = 30$ .

Indices of peripheral blood of mice with AA prior to and after PCS within various observation terms. A – day 14, B – day 21, C – day 28; □ – lymphocytes, ■ – monocytes, eosinophils, ■ – granulocytes. Differences are statistically significant versus control (#); group AA (\*); group AA + fPCS(^); group AA + CD (&);  $p < 0,05$ ,  $n = 30$ .

ЦИК обычно свидетельствует о затухании патологического процесса, снижении скорости их образования и повышении скорости элиминации [10]. Вместе с тем наличие клинических признаков патологии в эти сроки и уменьшение показателя ЦИК ниже контрольных значений свидетельствовали о более сложных развивающихся механизмах, наблюдаемых, например, при недостатке отдельных компонентов системы комплемента.

Развитие воспаления у животных с АА подтвердилось повышением показателя СОЭ в 1,7 раза на 14-е сутки и в 3 раза на 28-е сутки.

Интерес представляет существенное повышение содержания гемоглобина у животных с патологией в течение всего времени наблюдения (в 1,3 раза на 14-е; 1,5 раза – на 21-е; 1,4 раза на 28-е сутки). Известно, что наиболее частым внесуставным проявлением РА является анемия, в большинстве случаев нормохромная, иногда гипохромная, очень редко гиперхромная [1]. Причины высокого содержания гемоглобина могут быть разными, в частности, это может быть следствием компенсаторной реакции организма на уменьшение количества эритроцитов.

Длительные и значительные изменения показателей периферической крови обусловили

a lack of certain components of the complement system.

The development of inflammation in animals with AA was confirmed by an ESR increased index in 1.7 times on day 14 and in 3 times on day 28.

Of interest is a significant rise in hemoglobin content in the animals with pathology during the entire observation period (1.3 times on day 14; 1.5 times on day 21 and 1.4 times on 28<sup>th</sup> day). It is known that the most frequent extraarticular manifestation of RA is anemia, in most cases it is normochromic, sometimes hypochromic, very rarely hyperchromic [25]. The reasons for a high content of hemoglobin may be different, in particular, this may be due to a compensatory response of the body to reduce the number of red blood cells.

Continuous and significant changes in peripheral blood indices determined the need to assess the impairments in BM of the animals with AA. It is known that in 68.7% patients with RA have a decreased number of BM cells, as well as of CD34<sup>+</sup>-cells; hematopoietic progenitors, *i. e.* burst-forming erythroid units and granulocyte-macrophage colony-forming units (CFU-GM); reduced apoptotic index of myeloid progenitors if compared with the control; there is also a slight plasmocytosis and some 'irritation' of the leukocyte population [25]. L.A. Thoren *et al.* [23] described

необходимость определения нарушений в КМ у животных с АА. Известно, что у пациентов с РА в 68,7% случаев уменьшается количество клеток в КМ, количество CD34<sup>+</sup>-клеток; кроветворных предшественников – бурстобразующих эритроидных единиц и гранулоцитарно-макрофагальных колониеобразующих единиц (КОЕ-ГМ); снижается апоптотический индекс миелоидных предшественников по сравнению с контролем; наблюдается небольшой плазмцитоз и некоторое «раздражение» лейкоцитарного ростка [1]. L.A. Thorèn и соавт. [25] описали дефект клоногенного потенциала CD34<sup>+</sup>-клеток КМ пациентов с РА. Кроме того, авторы установили снижение содержания этих клеток при краткосрочном и долгосрочном культивировании. Информации о клетках с иммунофенотипом CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>, представляющих собой малочисленную покоящуюся субпопуляцию СКК [20], длительно поддерживающих клоногенный потенциал при долгосрочном культивировании при РА, практически отсутствует. Недостаточно охарактеризованы при данной патологии клетки, экспрессирующие трансмембранный рецептор CD117/c-Kit, при дефиците которого снижается количество стволовых клеток, способных к длительному самоподдержанию [25].

В динамике развития АА установлено, что на 14-е сутки на фоне снижения в 1,2 раза по сравнению с контролем количества клеток в КМ (табл. 2), количество CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-клеток не изменялось, количество CD117<sup>+</sup>-клеток повышалось в 1,3 раза. На 28-е сутки величина субпопуляций кроветворных предшественников увеличивалась в 3,8 и 3,6 раза соответственно, тогда как содержание клеток в КМ уменьшалось в 1,6 раза по сравнению с контролем. Очевидно, что изменение числа стволовых клеток гемопоэтического ряда не зависит только от количества ядерных клеток в органе. Это согласуется с полученными нами ранее результатами, свидетельствующими о перераспределении субпопуляционного состава кроветворных предшественников разной степени дифференцировки (колониеобразующих единиц в селезенке (КОЕс), КОЕ-ГМ) в КМ при развитии АА в сторону повышения содержания более потенциальных предшественников (КОЕс14) [2].

Вероятно, недостаток в КМ дифференцированных кроветворных предшественников активирует процесс пролиферации потенциальных клеток стволового компартмента. Такое перераспределение кроветворных предшественников при АА может быть следствием развивающегося в организме воспалительного процесса. В физиологическом

the impaired clonogenic potential of CD34<sup>+</sup>-cells of BM of the patients with RA. In addition, the authors found a decrease in the content of these cells during short-term and long-term culturing. There is a scanty information on cells with CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> immunophenotype, representing a small quiescent subpopulation of HSCs [10], having a long maintained clonogenic potential during long-term culture in RA. There is also a lack of information about the cells expressing the transmembrane receptor CD117/c-Kit, which deficit entails the reduction of the number of stem cells capable of long-term self-maintenance [23].

In development of AA was associated with the following changes: on background of a 1.2 time decrease in the number of cells in BM versus the control BM (Table 2) which was found on day 14, the number of CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-cells did not change, and the one of CD117<sup>+</sup>-cells was increased 1.3 times. On day 28 the mentioned hematopoietic progenitor subpopulations increased 3.8 times and 3.6 times, respectively, while the cell content in BM decreased 1.6 times if compared with the control. It is obvious that the change in the number of stem cells of the hematopoietic lineage does not depend only on the number of nucleated cells in the organ. This is consistent with our previous results, indicating a redistribution of the subpopulation composition of hematopoietic precursors of different differentiation (colony forming units in spleen (CFU), CFU-GM) in the BM with the development of AA towards increasing the content of the more potent progenitors (CFUs) [3].

Probably, the lack of differentiated hematopoietic progenitors in BM activates the proliferation of the potent cells of the stem cell pool. Such a redistribution of hematopoietic precursors during AA development may be a consequence of the inflammatory process developing in the body. In normal physiological conditions, more than 90% of the BM HSCs resides in the G<sub>0</sub> phase, expressing the receptors (*Tie-1*, IGF1R), allowing the cells to respond to regulatory signals. At the same time, the transcription factors *Fos* and *GATA-2* are highly expressed, contributing to the rapid activation of HSCs in response to the changes in microenvironment [26].

Several stress factors induce in HSCs the development of cascade of events starting from the entry of cells into a short-term phase of 'super depression' and activation of antiproliferative genes *Tob-1*, *p-21*, *Btg-3* in them, as well as an increase in the expansion of TIMP3 and serine proteases, suppressing the cell migration. This is facilitated by the activation of genes induced by interfer-



**Таблица 2.** Количество ядросодержащих клеток, CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>, CD117<sup>+</sup>, ИПА в КМ при АА до и после введения СКП

**Table 2.** Number of nucleated cells CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>, CD117<sup>+</sup>, PAI in BM at AA prior to and after introduction of PCS

Сроки наблюдения, сутки Observation terms, days	Показатель Index	Контроль (n = 5) Control (n = 5)	АА (n = 5)	АА + нСКП (n = 4) АА + fPCS (n = 4)	АА + КД (n = 4) АА + CD (n = 4)	АА + КП (n = 4) АА + CP (n = 4)
14	Ядросодержащие клетки в КМ/бедро × 10 <sup>6</sup> Nucleated cells in BM/thigh × 10 <sup>6</sup>	7,4 (7,2–7,5)	6,0 <sup>#</sup> (4,8–7,7)	6,3 (5,8–6,8)	10,1* <sup>^</sup> (8,8–11,5)	7,0 <sup>&amp;</sup> (5,8–8,3)
	CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>-</sup>	0,01 (0,01–0,02)	0,01 (0,01–0,02)	0,01 (0,01–0,02)	0,06* <sup>^</sup> (0,01–0,12)	0,05 <sup>^&amp;</sup> (0,03–0,09)
	CD117 <sup>+</sup>	2,5 (1,91–8,39)	3,1 <sup>#</sup> (3,08–3,19)	3,6* (2,01–5,39)	2,8 <sup>^</sup> (1,48–4,22)	4,5* <sup>^&amp;</sup> (1,48–4,22)
	ИПА PAI	0,0024 (0,0022–0,0026)	0,0032 <sup>#</sup> (0,0031–0,0033)	0,0027 (0,0025–0,0028)	0,0218* <sup>^</sup> (0,0216–0,0219)	0,0114* <sup>^&amp;</sup> (0,0112–0,0116)
28	Ядросодержащие клетки в КМ/бедро × 10 <sup>6</sup> Nucleated cells in BM/thigh × 10 <sup>6</sup>	–	4,5 <sup>#</sup> (4,0–6,0)	12,1* (9,8–14,3)	6,3* <sup>^</sup> (5,9–6,8)	11,5* <sup>^&amp;</sup> (11,0–11,9)
	CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>-</sup>	–	0,023 <sup>#</sup>	0,015* (0,01–0,04)	0,01* (0,01–0,02)	0,01 <sup>&amp;</sup> (0–0,04)
	CD117 <sup>+</sup>	–	9,0 <sup>#</sup> (3,08–9,1)	8,7 (5,61–11,7)	8,4 (8,0–9,12)	4,3* <sup>^&amp;</sup> (1,14–5,9)
	ИПА PAI	–	0,003 <sup>#</sup> (0,002–0,003)	0,0017* (0,0015–0,0019)	0,0012* <sup>^</sup> (0,0010–0,0014)	0,0023* <sup>^&amp;</sup> (0,0021–0,0024)

**Примечание:** различия значимы по сравнению с контролем (<sup>#</sup>); группой АА (<sup>\*</sup>); группой АА + нСКП (<sup>^</sup>); между группами АА + КД и АА + КП (<sup>&</sup>),  $p < 0,05$ .

**Note:** differences are statistically significant versus control (<sup>#</sup>); group AA (<sup>\*</sup>); group AA + fPCS (<sup>^</sup>); between groups AA + CD and AA+CP (<sup>&</sup>),  $p < 0.05$ .

состоянии более 90% СКК КМ пребывает в G<sub>0</sub>-фазе, экспрессируя рецепторы (*Tie-1*, IGF1R), позволяющие клеткам отвечать на регуляторные сигналы. Одновременно в высокой степени экспрессируются транскрипционные факторы Fos и GATA-2, способствующие быстрой активации СКК в ответ на изменения в микроокружении [26]. Некоторые стрессорные факторы индуцируют в СКК развитие каскадных сменяющихся событий, начинающихся с вхождения клеток в кратковременную фазу «суперпокоя» и активации в них антипролиферативных генов *Tob-1*, *p-21*, *Btg-3*, а также повышение экспансии TIMP3 и серин-протеиназ, подавляющих клеточную миграцию. Этому способствует и активация генов, индуцированных интерфероном-γ (ИФН-γ), что подтверждает ответ СКК на провоспалительные сигналы, и последующая индукция генов ранней и поздней фаз пролиферации [26]. Следовательно, стабильное состояние СКК может су-

ron-γ (IFN-γ), which confirms the response of HSCs to pro-inflammatory signals, and the subsequent induction of the genes of early and late phases of proliferation [26].

Consequently, the stable state of HSCs can significantly change with the development of AID, when hematopoietic compartment is under the negative influence of imbalance of pro-inflammatory and inflammatory cytokines (tumor necrosis factor-α (TNF-α), IFN-α, IL-1, IL-2, IL-6, IL-12) and anti-inflammatory cascade (IL-4, IL-10, TNF-β) [3]. Here the effect of re-profiling of the hemopoiesis system of pro- and anti-inflammatory mediators is obvious. IL-6 may be involved into this process, and its concentration is increased in the patients with RA. It stimulates the differentiation of polypotent HSCs, including CFUs-14, IL-8, and controls the formation, chemotaxis and activation of neutrophils, being the main cell substrate in AA. One of the reasons for the impairment of

ществено изменяться при развитии АИЗ, когда гемопоэтический компартмент находится под негативным влиянием дисбаланса цитокинов провоспалительного и воспалительного паттернов (фактора некроза опухоли- $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ), ИФН- $\gamma$ , ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-12) и противовоспалительного каскада (ИЛ-4, ИЛ-10, ТРФ- $\beta$ ) [2]. В этом случае очевиден факт влияния перепрофилирования системы гемопоэза про- и противовоспалительными медиаторами. В данный процесс может быть вовлечен ИЛ-6, уровень концентрации которого повышается у пациентов с РА. Он стимулирует дифференцировку полипотентных СКК, в том числе КОЕс-14, ИЛ-8, и контролирует формирование, хемотаксис и активацию нейтрофилов – основного клеточного субстрата при АА. Одной из причин нарушения функции СКК при РА является избыточная продукция стромальными клетками КМ цитокина ФНО- $\alpha$ , который через собственный рецептор может ингибировать кроветворение [24]. Повышенный уровень этого цитокина, коррелирующий с развитием клинических признаков патологии, был отмечен и в экспериментальной модели – у животных с АА [3].

Оценка развития отека показала, что терапевтический эффект любой из исследованных суспензий наблюдался в разные сроки и в различной степени (см. табл. 1). Наиболее выраженный эффект был установлен после введения суспензии нСКП (14-е сутки) и КП (28-е сутки). У животных группы АА + КП индекс отека снижался раньше (14-е сутки), чем в группе АА + КД (28-е сутки).

Анализ периферической крови животных, которым вводили суспензию, показал положительную динамику восстановления показателей в случае использования нСКП или КП (см. рисунок). На 28-е сутки у экспериментальных группах животных, которым вводили нСКП или КП, количество гранулоцитов и лимфоцитов соответствовало контрольным значениям, что свидетельствовало об активации лимфоцитарного и гранулоцитарного ростков кроветворения, возможно, на уровне общего предшественника. В периферической крови животных группы АА + КД в течение всего времени наблюдения соотношение форменных элементов крови не восстанавливалось, существенно увеличивалось количество гранулоцитов и снижалось количество лимфоцитов по сравнению с контрольным показателем, что может свидетельствовать об угнетении лимфоидного ростка.

Существенное различие в содержании форменных элементов крови после введения суспен-

HSC function in RA is the overproduction by the stromal BM cells of cytokine TNF- $\alpha$ , which through its own receptor can inhibit the blood formation [20]. An elevated level of this cytokine, correlating with the development of clinical signs of pathology, was also noted in an experimental model in the animals with AA [4].

Evaluation of edema development showed that a therapeutic effect of any of the suspensions studied was observed at different times and was variously expressed (Table 1). The most pronounced effect was established after the introduction of the fPCS suspension (day 14) and CP (day 28). In animals of the AA + CP group, the edema index decreased earlier (day 14) than in the AA + CD group (day 28).

Analysis of the peripheral blood of animals that were injected with suspensions showed a positive trend in the recovery of indicators in the case of using fPCS or CP (see Figure). On day 28 after administering the suspensions in the groups of animals, injected with fPCS or CP, the number of granulocytes and lymphocytes corresponded to the control values, which indicated the activation of lymphocytic and granulocytic hemopoiesis lineages, possibly at the level of a common precursor. In peripheral blood of the AA + CD group animals, the ratio of the formed elements was not restored during the entire observation period, the number of granulocytes was increased significantly and the one of lymphocytes was decreased as compared with the control, which may indicate suppression of the lymphoid lineage.

A significant difference in the content of blood cells after administration of a CD or CP suspension, noted through the whole periods of observation, may be an evidence of different functional potential of the administered suspensions. Previously, it has been shown that the conditions of PCS cryopreservation affect the redistribution of cell populations in it and determine the functional properties of administered cells in respect of the level of cytokines in the serum of animals with AA [4]. It was found that the CP suspension, in contrast to the CD one, contained much more Kashchenko and Hofbauer cells producing the immunosuppressive mediators IDO, TRF $\beta$  [13]. Perhaps this is due to the earlier manifestation of a positive effect and preservation of the level of TRF $\beta$  in blood of the animals with the introduced CP, in contrast to the those with CD. This factor concentration is known to correlate with the functional characteristics of leukocytes: an increase in the number of leuko-

зии КД или КП, отмеченное во все сроки наблюдения, может быть подтверждением разного функционального потенциала вводимых суспензий. Ранее было показано, что условия криоконсервирования СКП влияют на перераспределение в ней клеточных популяций и определяют функциональные свойства вводимых клеток в отношении уровня цитокинов в сыворотке крови животных с АА [3]. Было установлено, что в суспензии КП, в отличие от суспензии КД, содержится значительно больше клеток Кащенко и Хофбауэра, продуцирующих иммуносупрессорные медиаторы ИДО, ТРФβ [9]. Возможно, этим обусловлено более раннее проявление положительного эффекта и сохранение уровня ТРФβ в крови у животных с введением КП, в отличие от введения КД. Известно, что концентрация этого фактора коррелирует с функциональными характеристиками лейкоцитов: увеличением числа лейкоцитов в периферической крови, адгезивной способностью нейтрофилов, количеством Bcl-2<sup>+</sup>- и CD95<sup>+</sup>-клеток [12]. Иными словами, корригирующий эффект вводимого материала КП при АА может быть подтверждением гипотезы о том, что условия криоконсервирования определяют функциональные характеристики вводимых клеток. В предыдущих наших работах было доказано, что изменяя параметры криоконсервирования, в частности используя разные криопротекторы (полиэтиленоксид-400 или ДМСО), можно ингибировать функцию акцессорно-регуляторных элементов в КМ, тем самым снизить иммунореактивность миелотрансплантата в реакции «трансплантат против хозяина» [2]. Нами было также подтверждено, что экспрессии гена *ido* в клетках плаценты, криоконсервированных под защитой ПДС, была выше, чем в клетках, криоконсервированных с ДМСО, что может в определенной мере объяснить различия в иммунорегуляторном потенциале этих суспензий [19].

Вместе с тем транскрипционные процессы, определяющие функцию деконсервированных клеток, в настоящее время остаются малоизученными. По результатам исследований белоксинтезирующего аппарата в бактериальных клетках *Escherichia coli* [16] было установлено, что после криоконсервирования происходят выраженное ингибирование процессов синтеза основных белков и индукция синтеза стресс-белков, основным из которых была молекула с м. м. 24 кДа. Наиболее криолабильной в формировании основных белков оказалась фаза транскрипции, тогда как фаза трансляции не изменялась. Стресс-белки, которые синтезировались после

cytes in peripheral blood, adhesive ability of neutrophils, the number of Bcl-2<sup>+</sup>- and CD95<sup>+</sup>-cells [17]. In other words, the existence of corrective effect of the introduced material of CP in AA development can support the hypothesis that the cryopreservation conditions determine the functional characteristics of the cells injected. In our previous studies, we have proven that when changing the parameters of cryopreservation, in particular using different cryoprotectants (polyethylene oxide-400 or DMSO), it was possible to inhibit the function of accessory-regulatory elements in BM, thereby reducing an immune reactivity of myelograft in the graft-versus-host disease [3]. We also confirmed that the expression of the *ido* gene in placental cells cryopreserved under PDS protection was higher than in those cryopreserved with DMSO, which may to some extent explain the differences in the immunoregulatory potential of these suspensions [5].

At the same time, the transcriptional processes, determining the function of thawed cells are currently poorly understood. According to the results of investigations of protein-synthesizing apparatus in bacterial cells of *Escherichia coli*, it was established [24] that a pronounced inhibition of the synthesis of basic proteins and the induction of synthesis of stress proteins was found after cryopreservation, and main this was 24 kDa molecule. The transcription phase was the most cryolabile during the formation of the major proteins, while the translation phase did not change. Stress proteins, synthesized after cryopreservation were non-related to heat shock proteins, and the genes encoding their synthesis were different [24]. The study of the effect of exposure temperature, concentration of DMSO cryoprotectant on the expression level of stemness genes in fetal liver stem cells (*nanog*, *oct4*, *sox2*) showed a decrease in their expression at higher concentrations of cryoprotectant. Incubation with a cooled cryoprotectant had a smaller impact on this parameter [1]. In a whole, a brief analysis of the published earlier data and our own results suggests that cryopreservation (under certain conditions of implementation) is a factor which controls the state of various cell types, including their immune regulatory potential.

Evaluating the effectiveness of using fresh or any of the cryopreserved PCS on the CIC level, we noted that the recovery of the CIC coefficient occurred on day 28 after the pathology induction. These data are consistent with the previously presented results confirming the corrective action of

криоконсервирования, были неродственны белкам теплового шока, а гены, кодирующие их синтез, разные [16]. Изучение влияния температуры экспозиции, концентраций криопротектора ДМСО на уровень экспрессии stemness-генов в стволовых клетках фетальной печени (*nanog*, *oct4*, *sox2*) показало снижение уровня их экспрессии при более высоких концентрациях криопротектора. Экспозиция с охлажденным криопротектором оказывала меньшее влияние на данный параметр [17]. В целом представленный краткий анализ данных литературы и собственных результатов позволяют предположить, что криоконсервирование (при определенных условиях реализации) является фактором управления состоянием различного вида клеток, включая их иммунорегуляторный потенциал.

Оценивая эффективность применения нативной или любой из криоконсервированных СКП на показатели уровня ЦИК, мы отметили, что восстановление коэффициента ЦИК происходило на 28-е сутки после индукции патологии. Эти данные согласуются с представленными ранее результатами, подтверждающими корректирующее действие продуктов фетоплацентрного комплекса, в частности, криоконсервированной кордовой крови («Криоцелл-Гемокорд» ГП «Межведомственный научный центр криобиологии и криомедицины НАН, АМН и МОЗ Украины») в отношении уровня ЦИК [13].

Результаты изучения механизма действия вводимой СКП на исследуемые параметры КМ животных с АА показали, что после введения нСКП на фоне снижения отека (14-е сутки) они не отличались от таковых у животных с патологией. На 14-е сутки уменьшение степени воспаления и, как следствие, отека не было обусловлено изменением состояния кроветворных предшественников под действием нСКП. Снижение отека у животных группы АА + КП в этот же срок наблюдалось при повышении количества ядросодержащих клеток в КМ в 1,2 раза, CD117<sup>+</sup>-клеток – 1,7 раза, ИПА – в 4,8 раза по сравнению с животными группы АА (табл. 2). Эти изменения свидетельствуют об уменьшении выраженности воспалительного процесса и объясняют механизм действия применяемой суспензии КП.

На 28-е сутки выраженность отека суставов снижалась у животных с введением КД и КП. Отмечено повышение количества ядросодержащих клеток в КМ (в 1,7 и 1,9 раза соответственно), снижение количества CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-клеток (в 2,5 и 1,3 раза соответственно), ИПА (в 2,3 и 1,2 раза соответственно) по сравнению с показателями

the fetoplacental complex products, in particular, the cryopreserved cord blood (CryoCell-Hemocord by SE Interdepartmental Scientific Center for Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences, Academy of Medical Sciences and the Ministry of Health of Ukraine) regarding the CIC level [18].

The studying of the mechanism of action of injected CPS on the investigated parameters of BM in the animals with AA showed that after the introduction of fPCS against the background of decreasing edema (day 14), they did not differ from those in the animals with pathology. On the 14<sup>th</sup> day, a decrease in the inflammation degree and, as a result, a reduction of edema was not due to a change in the state of hematopoietic progenitors under the influence of fPCS. A decrease in edema in the animals of the AA + CP group at the same time was observed along with a rise in the number of nucleated cells in BM by 1.2 times, CD117<sup>+</sup>-cells by 1.7 times, IPA by 4.8 times in comparison with the animals of AA group (Table 2). These changes indicate a reduced severity of inflammation and explain the mechanism of action of the applied CP suspension.

On day 28<sup>th</sup> the severity of joint edema decreased in animals with the introduction of CD and CP. An increase in the number of nucleated cells in BM (1.7 and 1.9 times, respectively), a decrease in the number of CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-cells (2.5 and 1.3 times, respectively), IPA (2.3 and 1.2 times, respectively) compared to those of the animals with AA were observed. However, after the introduction of CP, in contrast to the CD introduction, the number of CD117<sup>+</sup>-cells decreased by 2.1 times compared with that in the animals with AA. The various therapeutic effects of the CD and CP introduction may be due to differences in the regulation of the serum TNF $\alpha$  level in these animals, which has an inhibitory effect on the HSCs state [4].

It has been previously shown that human placenta homogenate (HPH) contains the regulators of functional status of committed hematopoietic precursors of different level of maturity (CFUs8, CFUs12) [6]. The manifested activity of HPH in relation to CFU12, which are a close to polypotent HSCs (PHSCs), indicates the presence in placenta of hematopoietic regulation factors, similar to the stem-cell factor (the Steel factor), which stimulates the proliferation and differentiation of PHSCs. This factor is produced by stromal, epithelial, and endothelial structures of rodent placenta. The authors also found that the stimulation of colony formation by BM after the introduction of cryopreserved HPH was less pronounced, which was likely due



животных с АА. Вместе с тем после введения КП, в отличие от введения КД, количество CD117<sup>+</sup>-клеток уменьшалось в 2,1 раза по сравнению с таковым у животных с АА. Разный терапевтический эффект от введения суспензии КД и КП может быть обусловлен различиями в регуляции сывороточного уровня ФНО $\alpha$  у этих животных, оказывающего ингибирующее влияние на состояние СКК [3].

Ранее, было показано, что в гомогенате плаценты человека (ГПЧ) присутствуют регуляторы функционального статуса коммитированных кроветворных предшественников разной степени зрелости (КОЕс8, КОЕс12) [4]. Проявление активности ГПЧ в отношении КОЕс12, являющихся близкой формой полипотентных СКК (ПСКК), свидетельствует о наличии в плаценте факторов регуляции кроветворения, подобных стволовоклеточному фактору (фактору Стила), который стимулирует пролиферацию и дифференцировку ПСКК. Этот фактор продуцируется стромальными, эпителиальными и эндотелиальными структурами, присутствующими и в плаценте грызунов. Авторы также установили, что стимуляция колониеобразования КМ после введения криоконсервированного ГПЧ была менее выражена, что, вероятно, обусловлено снижением лимфогематотропной активности ГПЧ после криоконсервирования. Представленные в данной работе результаты показывают, что после введения СКП также изменяется содержание кроветворных предшественников. Однако в результате применения КД и КП повышается модулирующая активность в отношении кроветворных предшественников CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>, CD117<sup>+</sup>, в отличие от введения нСКП. Можно предположить, что отмеченные различия регуляторного действия являются результатом проявления активности различного спектра субстанций в ГПЧ и СКП либо разной криоустойчивости факторов, регулирующих КОЕс и кроветворные предшественники в КМ (CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>, CD117<sup>+</sup>).

Оценка терапевтической эффективности вводимого материала СКП по ССО показала (таблица 3), что у животных, которым вводили нСКП, данный показатель в течение всего времени наблюдений был ниже, чем в группе животных с АА, что свидетельствовало об эффективности применения и комплексном действии вводимой суспензии. У животных после введения суспензии КП ССО на 28-е сутки была в 2,3 раза ниже, чем в группе с АА и в 1,6 раза меньше, чем после введения суспензии нСКП или КД, что свидетельствовало

to a reduced lymphohematotropic HPH activity after cryopreservation. The results presented in this paper show that after the introduction of PCS, the content of hematopoietic precursors also changes. However, as a result of the use of CD and CP, the modulating activity with respect to the hematopoietic precursors of CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>, CD117<sup>+</sup> increases, in contrast to the introduction of fPCS. The revealed differences in regulatory action can be assumed to be the result of manifestation of activity of different spectrum of substances in HPH and PCS or various cryostability of the factors regulating CFU and hematopoietic precursors in BM (CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>, CD117<sup>+</sup>).

**Таблица 3.** Суммарная степень отклонения показателей при адьювантном артрите до и после введения суспензии клеток плаценты

**Table 3.** Total deviation degree of indices at adjuvant arthritis prior to and after introduction of placental cell suspension

Группы Groups	Срок наблюдения, сутки Observation terms, days	
	14	28
АА AA	4,64	9,66
АА + нСКП AA + fPCS	3,12	6,90
АА + КД AA + CD	23,94	7,01
АА + КП AA + CP	15,1	4,27

Assessment of therapeutic efficiency of the injected PCS by TDD showed that in the animals, injected with fPCS, this index was lower during the entire observation period versus the group of the animals with AA, which demonstrated the efficiency of using the combined effect of the suspension. The animals with administration of the CP suspension had the MTR index on 28<sup>th</sup> day 2.3 times lower than in the group with AA and 1.6 times less than in case of administration of suspension of fPCS or CD, which indicated a higher efficiency of the CP use if compared to fPCS and CD.

Thus, the data obtained indicate a high regulatory potential of the cryopreserved PCS in restoration of hemopoietic and immune systems during AID. In this regard, it is promising to determine the mechanisms of interaction of the introduced suspension with cellular or molecular substrates in recipients and the peculiarities



о более высокой эффективности применения КП по сравнению с нСКП и КД.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о высоком регуляторном потенциале криоконсервированной СКП в восстановлении гемопоэтической и иммунокомпетентной сферы при АИЗ. В связи с этим является перспективным определение механизмов взаимодействия вводимой суспензии с клеточными или молекулярными субстратами у реципиентов и особенностей действия криоконсервирования на модификацию этих свойств.

### Выводы

1. Нативная и криоконсервированная СКП, независимо от условий криоконсервирования, проявляли на 14-е сутки развития АА корректирующее действие в отношении уровня гемоглобина, ЦИК, количества гранулоцитов, на 21-е сутки – уровня гемоглобина, на 28-е сутки – количества гранулоцитов, ЦИК, ядродержащих и CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-клеток в КМ.

2. Разный механизм терапевтического действия нативных и криоконсервированных клеток проявлялся в отношении уровня гемоглобина и ЦИК (14-е сутки), СОЭ (21-е сутки).

3. Снижение степени отека суставов у животных с введением криоконсервированного материала (КД или КП) на 28-е сутки может быть связано с коррекцией пролиферативной активности клеток в КМ – снижением содержания CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> и ИПА.

4. Режим криоконсервирования влияет на функциональные свойства СКП при введении животным с АА в отношении отека суставов СОЭ, содержания CD117<sup>+</sup>-клеток в КМ, количества ядродержащих клеток, ИПА, времени наступления терапевтического эффекта.

### Литература

1. Ватутин НТ, Смирнова АС, Калинкина НВ, Шевелев АН. Анемия у больных ревматоидным артритом: особенности патогенеза, диагностики и лечения. Русский медицинский журнал [Интернет]. 2013 [цитировано 10.01.2018]; (21): 1069. Доступно с: [https://www.rmj.ru/articles/zabolevaniya\\_kostno\\_myshechnoy\\_sistemy/Anemiya\\_u\\_bolnyh\\_revmatoidnym\\_artritom\\_osobennosti\\_patogeneza\\_dagnostiki\\_i\\_lecheniya/](https://www.rmj.ru/articles/zabolevaniya_kostno_myshechnoy_sistemy/Anemiya_u_bolnyh_revmatoidnym_artritom_osobennosti_patogeneza_dagnostiki_i_lecheniya/)
2. Гольцев АН, Гаевская ЮА, Дубрава ТГ. Влияние криоконсервирования на функциональный статус стволовых клеточных и мезенхимальных клеток костного мозга животных с аутоиммунной патологией. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2016; 26 (1): 63–72.
3. Гольцев АН, Луценко ЕД, Останков МВ, Бондарович НА. Оценка цитокинового профиля при адьювантном артрите

of the effect of cryopreservation on modification of these properties.

### Conclusions

1. To day 14 of AA development, fresh and cryopreserved PCS, regardless of the cryopreservation conditions, showed a correcting effect on hemoglobin level, CIC, granulocyte count, hemoglobin count, on the 21<sup>st</sup> day they changed granulocyte count, and on 28<sup>th</sup> day they affected CIC, nucleated and CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-cells in BM.

2. A different mechanism of therapeutic effect of fresh and cryopreserved cells was manifested in respect of the level of hemoglobin and CIC (day 14), ESR (day 21).

3. The decrease in the degree of the joints edema in the animals with introduced cryopreserved material (either CD or CP) observed on day 28 may be associated with the correction of cell proliferative activity in BM, *i. e.* a decrease in CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> and IPA.

4. Cryopreservation mode affected functional properties of PCS when introducing it to the animals with AA in respect of edema of joints, ESR, content of CD117<sup>+</sup>-cells in BM, number of nucleated cells, IPA, onset time of therapeutic effect.

### References

1. Borysov P, Dimitrov A, Ostankov M, Goltsev A. The effect of cryopreservation on the expression of nanog, oct4, sox2 genes in hematopoietic and mesenchymal stem cells of murine fetal liver. In: Abstracts book of 52<sup>nd</sup> annual meeting of the society for cryobiology CRYO 2015; 2015 July 26–29, Ostrava, Czech Republic. Ostrava; 2015. p. 44.
2. Colmegna I, Weyand CM Haematopoietic stem and progenitor cells in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2011; 50 (2): 252–60.
3. Goltsev AN, Gayevskaya YuA, Dubrava TG, Ostankova LV. Effect of cryopreservation on functional status of bone marrow hematopoietic and mesenchymal stem cells in animals with autoimmune pathology. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2016; 26(1): 63–72.
4. Goltsev AN, Lutsenko ED, Ostankov MV, Bondarovich NA. [Estimation of cytokine profile in adjuvant arthritis model after cryopreserved placenta cells application]. *Pathologia*. 2011; 8(2): 99–101. Russian.
5. Goltsev AN, Lutsenko ED, Ostankov MV, Dimitrov AYU. Cryopreservation conditions determine the expression level of indolamine 2,3-dioxygenase gene in placental cells. In: Innovation of low temperature preservation and biobanking. Book of abstract SLTB 2013; 2013 Oct. 6-9, Hannover, Germany. Hannover; 2013. p.65.
6. Goltsev AN, Ostankova LV, Lutsenko ED, et al. Response of the lymphohemopoietic system of the organism on the injection of the products of the fetoplacental complex. *Problems of Cryobiology*. 2000; (2): 15–30.

- после применения криоконсервированных клеток плаценты. Патология. 2011; 8 (2): 99–101.
4. Гольцев АН, Останкова ЛВ, Луценко ЕД, и др. Ответ лимфогеомопоэтической системы организма на введение продуктов фетоплацентарного комплекса. Проблемы криобиологии. 2000; (2): 15–30.
  5. Гольцев АМ, Останкова ЛВ, Луценко ОД, винахідники; Інститут проблем криобіології і кріомедицини НАН України, патентовласник. Спосіб порівняльної оцінки ефективності лікування. Патент України № 2004031694 15.12.2004.
  6. Грищенко ВІ, Морозова ТФ, Воротилін ОМ та ін. Приготування та зберігання криоконсервованої суспензії плаценти для клінічного використання: методичні рекомендації. Харків; 1997. 14 с.
  7. Гржибовский АМ. Анализ трех и более независимых групп количественных данных. Экология человека. 2008; (3): 50–8.
  8. Левшиц ВМ, Сидельникова ВМ. Медицинские лабораторные анализы: справочник. Москва: ТРИАДА-Х; 2000. 312 с.
  9. Луценко ЕД. Популяционный состав и функциональный потенциал клеток плаценты, криоконсервированной в различных режимах. Світ медицини та біології. 2009; (3): 105–9.
  10. Меньшиков ВВ, Делеторская ИН, Золотницкая РП. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник. Москва: Медицина; 1987. 368 с.
  11. Міщенко ОЯ, Котвицька АА. Фармакологічна ефективність емульсії анальбену на моделі ад'ювантного артриту у щурів. Вісник фармації. 2001; 27 (3): 124–5.
  12. Моисеева ОМ, Лясникова ЕА, Семенова ЕГ, и др. Трансформирующий фактор бета и маркеры активации лейкоцитов при гипертонической болезни. Артериальная гипертензия. 2003; (1): 14–6.
  13. Овчинникова ОВ, Бондаренко ИА, Лазуренко ВВ, и др. Использование криоконсервированной пуповинной крови в лечении железодефицитной анемии беременных. Проблемы криобиологии. 2008; 18 (3): 361–3.
  14. Румянцев ПО, Румянцева УВ, Саенко ВА. Статистические методы анализа в клинической практике Часть I. Одномерный статистический анализ. Проблемы эндокринологии. 2009; 55 (5): 48–55.
  15. Стручков ПВ, Константинова НА, Лаврентьев ВВ, Чучалин АГ. Скрининг-тест для оценки патогенных свойств циркулирующих иммунных комплексов. Лабораторное дело. 1985; (7): 410–2.
  16. Цуцаева АА. Проблемы глубокого холодого анабиоза и криоиммунология. Проблемы криобиологии. 1997; (1–2): 23–6.
  17. Borysov P, Dimitrov A, Ostankov M, Goltsev A. The effect of cryopreservation on the expression of nanog, oct4, sox2 genes in hematopoietic and mesenchymal stem cells of murine fetal liver. In: Abstracts book of 52<sup>nd</sup> annual meeting of the society for cryobiology CRYO 2015; 2015 Jul 26–29, Ostrava, Czech Republic. Ostrava; 2015. p. 44.
  18. Colmegna I, Weyand CM. Haematopoietic stem and progenitor cells in rheumatoid arthritis. Rheumatology (Oxford). 2011; 50(2): 252–60.
  19. Goltsev AN, Lutsenko ED, Ostankov MV, Dimitrov AYU. Cryopreservation conditions determine the expression level of indolamine 2,3-dioxygenase gene in placental cells. In: Innovation of low temperature preservation and biobanking. Book of abstract SLTB 2013; 2013 Oct. 6–9, Hannover, Germany. Hannover; 2013. p. 65.
  20. Hao QL, Shah AJ, Thiemann FT, et al. A Functional Comparison of CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> Cells in Cord Blood and Bone Marrow. Blood. 1995; 86(10): 3745–53.
  21. He J, Zhang Y, Jiang XX. Isolation and characterization of human placenta derived adherent cells and their hematopoietic growth factor expression. Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi. 2003; 24(12): 652–4.
  22. Mahéva M, Audia S, De Lastours V, et al. Neutropenia in Felty's syndrome successfully treated with hydroxychloroquine. 7. Goltsev AN, Ostankova LV, Lutsenko OD, et al., inventors. Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of NAS of Ukraine, assignee. [A method of comparative assessment of the effectiveness of treatment]. Ukraine patent 2004031694 2004 Dec 15. Ukrainian.
  8. Grishchenko VI, Morozova TF, Vorotilin OM, et al. [Preparation and storage of cryopreserved placental suspension for clinical use: methodical recommendations]. Kharkiv; 1997. 14 p. Ukrainian.
  9. Grijbovsky AM. [Analysis of three and more independent groups of quantitative data]. Human Ecology. 2008; (3): 50–58. Russian.
  10. Hao QL, Shah AJ, Thiemann FT, Smogorzewska EM, Crooks GM. A functional comparison of CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> cells in cord blood and bone marrow. Blood. 1995; 86 (10): 3745–53.
  11. He J, Zhang Y, Jiang XX, et al. Isolation and characterization of human placenta derived adherent cells and their hematopoietic growth factor expression. Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi. 2003; 24 (2): 652–4.
  12. Levshyts VM, Sydelnykova VM. [Medical laboratory tests. Directory]. Moscow: TRYADA.-Kh; 2000. 312 p. Russian.
  13. Lutsenko ED. [Populational content and functional potential of placenta cells cryopreserved by various modes]. World of Medicine and Biology. 2009; (3): 105–9. Russian.
  14. Mahéva M, Audia S, De Lastours V, et al. Neutropenia in Felty's syndrome successfully treated with hydroxychloroquine. Haematologica [Internet]. 2007 Jul 1 [cited 2017 Jul 1]; 92 e78. Available from: <http://www.haematologica.org/content/92/7>.
  15. Menshikov VV, Deletorskay IH, Zolotnitskay RP. Laboratory methods of research in clinic: the Directory. Moscow: Meditsina; 1987. 368 p. Russian.
  16. Mischenko OY, Kotvitska AA. [Pharmacological efficacy of the analbic emulsion on the model of adjuvant arthritis in rats]. News of Pharmacy. 2001; (3): 124–5. Ukrainian.
  17. Moiseyeva OM, Lyasnikova YeA, Semenova EG, et al. [Transforming factor-b1 and markers of leukocytic activation in hypertensive disease]. Arterial Hypertensia. 2003; 9 (1): 14–6. Russian.
  18. Ovchinnikova OV, Bondarenko IA, Lazurenko VV, et al. Application of cryopreserved cord blood in treatment of hypoferric anemia of pregnant. Problems of Cryobiology. 2008; 18 (3): 361–3.
  19. Owlia MB, Newman K, Mojtaba Akhtari M. Felty's Syndrome, Insights and Updates. Open Rheumatol J. 2014; (8): 129–36.
  20. Riether C, Schürch CM, Ochsenbein AF. Regulation of hematopoietic and leukemic stem cells by the immune system. Cell Death Differ. 2015; (22): 187–98.
  21. Rummyantsev PO, Saenko VA, Rummyantseva UV. [Statistical methods for the analyses in clinical practice. Part 1. Univariate statistical analysis]. Problems of Endocrinology. 2009; (5): 48–55. Russian.
  22. Struchkov PV, Konstantynova NA, Lavrentev VV, Chuchalyn AH. [Screening test for the evaluation of pathogenic properties of circulating immune complexes]. Lab. Delo. 1985; (7): 410–2. Russian.
  23. Thorén LA, Liuba K, Bryder D, Nygren JM. Kit regulates maintenance of quiescent hematopoietic stem cells. J Immunol. 2008; 180 (4): 2045–53.
  24. Tsutsayeva AA. [Profound cold anabiosis and immunology]. Problems of Cryobiology. 1997; (1–2): 23–5.
  25. Vatutin NT, Smirnova AS, Kalinkina NV, Shevelok AN. [Anemia in Patients with Rheumatoid Arthritis: features of pathogenesis, diagnostics and treatments]. Russian Medical Journal [Internet]. 2013 03 Sept [cited 10.01.2018]; (21): 1069. Available from: [https://www.rmj.ru/articles/zabo\\_levaniya\\_kostno\\_myshechnoy\\_sistemy/Anemiya\\_u\\_bolnyh\\_revmatoidnym\\_artritom\\_osobennosti\\_patogeneza\\_dagnostiki\\_i\\_lecheniya/](https://www.rmj.ru/articles/zabo_levaniya_kostno_myshechnoy_sistemy/Anemiya_u_bolnyh_revmatoidnym_artritom_osobennosti_patogeneza_dagnostiki_i_lecheniya/) Russian.

- Haematologica [Internet]. 2007 Jul 1 [cited 2017 Jul 1]; 92: e78. Available from: <http://www.haematologica.org/content/92/7>.
23. Owlia MB, Newman K, Mojtaba Akhtari M. Felty's Syndrome, Insights and Updates. *The Open Rheumatology Journal*. 2014; 8: 129–36.
24. Riether C, Schürch CM, Ochsenbein AF. Regulation of hematopoietic and leukemic stem cells by the immune system. *Cell Death and Differentiation*. 2015; 22: 187–98.
25. Thorén LA, Liuba K, Bryder D, et al. Kit regulates maintenance of quiescent hematopoietic stem cells. *The Journal of Immunology*. 2008; 180(4): 2045–53.
26. Venezia TA, Merchant AA, Ramos CA, et al. Molecular signatures of proliferation and quiescence in hematopoietic stem cells. *PLoS Biol* [Internet]. 2004 Oct [cited 10.01.2018]; 2(10): e301. Available from: <https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.0020301>