

УДК 615.277.3:616.155.194

О.В. Кудокотцева*, И.Ф. Коваленко, И.И. Ломакин, Г.А. Бабийчук

Коррекция анемии, развивающейся в результате токсического действия 5-фторурацила, криоконсервированными препаратами кордовой крови

UDC 615.277.3:616.155.194

O.V. Kudokotseva*, I.F. Kovalenko, I.I. Lomakin, G.A. Babijchuk

Correction of Anemia Resulting From 5-Fluorouracil Toxic Effect Using Cryopreserved Preparations of Cord Blood

Реферат: Применение большинства химиотерапевтических препаратов приводит к развитию гипоплазии костно-мозгового кроветворения и выраженной анемии. На модели цитостатической гемодепрессии 5-фторурацилом (5-ФУ) у мышей изучено влияние криоконсервированных препаратов кордовой крови человека (ККЧ) (клеточного и бесклеточного) на восстановление эритроидных элементов периферической крови (ПК). Показано, что внутривенное введение криоконсервированных ядросодержащих клеток (кЯСК) ККЧ способствовало ускорению восстановления абсолютного количества эритроцитов в более ранние сроки, чем в группах сравнения (5-ФУ и 5-ФУ + бесклеточный супернатант ККЧ). Установлено, что к 9-м суткам после введения кЯСК ККЧ полностью восстанавливается количество эритроцитов ПК мышей с сохранением их внешнего контура.

Ключевые слова: кордовая кровь, химиотерапия, анемия, эритроциты, индекс сферичности, гемолиз.

Реферат: Застосування більшості хіміотерапевтичних препаратів призводить до розвитку гіпоплазії кістково-мозкового кровотворення і вираженої анемії. На моделі цитостатичної гемодепресії 5-фторурацилом (5-ФУ) у мишей вивчено вплив криоконсервованих препаратів кордової крові людини (ККЛ) (клітинного та безклітинного) на відновлення еритроїдних елементів периферичної крові (ПК). Показано, що внутрішньовенне введення криоконсервованих ядровмісних клітин (кЯВК) ККЛ сприяло прискоренню відновлення абсолютної кількості еритроцитів у більш ранні терміни, ніж у групах порівняння (5-ФУ і 5-ФУ+безклітинний супернатант ККЛ). Встановлено, що до 9-ї доби після введення кЯВК ККЛ повністю відновлюється кількість еритроцитів ПК мишей зі збереженням їх зовнішнього контуру.

Ключові слова: кордова кров, хіміотерапія, анемія, еритроцити, індекс сферичності, гемолиз.

Abstract: The use of the most chemotherapeutic drugs leads to the development of hypoplasia of bone marrow hematopoiesis and severe anemia. The effect of cryopreserved preparations of human cord blood (HCB) (cellular and acellular ones) on the recovery of erythroid elements in peripheral blood (PB) was studied in the model of cytostatic hemodepression with 5-fluorouracil (5-FU) in mice. An intravenous administration of cryopreserved nucleated cells (cNCs) of HCB was shown as contributed to an accelerated recovery of the absolute number of erythrocytes at the earlier terms than in the groups of comparison (5-FU and 5-FU + cell-free HCB supernatant). There was established, that to day 9 after administering HCB cNCs the erythrocyte number in murine PC was completely recovered and their outer contour was kept.

Key words: cord blood, chemotherapy, anemia, erythrocytes, sphericity index, hemolysis.

В настоящее время в Украине отмечается неуклонный рост численности онкологических заболеваний. Химиотерапия (ХТ) является неотъемлемой частью комплексного лечения онкологических заболеваний. Однако, наряду с положительным терапевтическим эффектом, абсолютное большинство химиотерапевтических средств оказывает побочное действие, часто приводящее к развитию гипоплазии костномозгового кроветворения и выраженной анемии [4, 5, 17, 20, 21].

Причинами многих патологий, включая и анемию, зачастую являются нарушения нормальной

Currently the occurrence of oncological diseases is steadily growing in Ukraine. Chemotherapy (CT) is an integral part of combined therapy for oncological diseases. However together with a positive therapeutic effect an absolute majority of chemotherapeutic agents possesses side effects, often resulting in developed hypoplasia of bone marrow hematopoiesis and pronounced anemia [1, 4, 5, 14, 23].

The causes for many pathologies including anemia, are frequently the disorders in normal vital activity of cells, modification of structure and properties of their biological membranes, being the first responding to

Отдел криофизиологии, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-30-84,
электронная почта: kudokokosha@gmail.com

Поступила 17.03.2014
Принята в печать 14.04.2014

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2014. – Т. 24, №4. – С. 312–321.
© 2014 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

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

*To whom correspondence should be addressed:
23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015;
tel.: +380 57 3737435, fax: +380 57 373 3084,
e-mail: kudokokosha@gmail.com

Received March, 17, 2014
Accepted April, 14, 2014

Probl. Cryobiol. Cryomed. 2014. 24(4): 312–321.
© 2014 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

жизнедеятельности клеток, модификация структуры и свойств их биологических мембран, которые первыми реагируют на внешние по отношению к клетке воздействия. Кроме того, биологическая активность большинства химических соединений, в том числе и противоопухолевых лекарственных препаратов, опосредуется через мембранные механизмы с помощью изменения проницаемости мембран, влияния на самообновление и активность связанных с ними ферментов [12, 21, 22].

Актуальность исследований биологических мембран обуславливается и тем, что основные их функции (компартиментализация, проницаемость, контактные взаимодействия, рецепция) являются регуляторными, что позволяет рассматривать мембрану как универсальную систему, обеспечивающую координированные изменения метаболизма клетки, органа и организма в целом [12, 22].

В этой связи интересным представляется исследование мембран эритроцитов – наиболее многочисленных форменных элементов крови, которые одними из первых включаются в ответную реакцию организма на различные воздействия и повреждения.

На современном этапе развития медицины приоритетными задачами практической онкологии являются поиск и разработка принципиально новых методических подходов, а также усовершенствование традиционных способов ХТ с целью повышения эффективности лечения злокачественных опухолей.

Согласно существующим представлениям в коррекции гемодепрессивных состояний различной этиологии важнейшую роль играют гемопоэтические стволовые кроветворные клетки (СКК) и ростовые факторы [5–8, 18].

Принимая во внимание вышеизложенное, представляет несомненный интерес изучение влияния клеточного препарата кордовой крови человека (ККЧ), в состав которого входят стволовые гемопоэтические кроветворные клетки и биологически активные вещества плазмы, на некоторые количественные и качественные характеристики эритроцитов крови при цитостатических воздействиях.

В этой связи целью данной работы было исследование влияния химиотерапии 5-фторурацилом (противоопухолевым препаратом широкого спектра действия) на количество эритроцитов в периферической крови мышей и структурно-функциональное состояние их мембран, а также возможности коррекции развивающейся анемии с использованием криоконсервированной суспензии кордовой крови.

external exposures to a cell. In addition the biological activity of most chemical compounds, including anti-tumour medicines is mediated through the membrane mechanisms by affecting the membrane permeability, their self-renewal and activity of associated to them enzymes [5, 13, 21].

The relevance of studying biological membranes is also stipulated by the fact that their main functions (compartmentalization, permeability, contact interactions, reception) are regulatory, that allows considering the membrane as an universal structure, providing coordinated changes in metabolism of cell, organ and whole body [13, 21].

Proceeding from this fact of interest was to study the erythrocyte membranes: the most numerous blood corpuscles, ones of the first involved into organism's response to different exposures and damages.

At an actual stage of medicine development the search and design of crucially new methodical approaches, as well as the mastering of CT standard ways aiming to increase the therapy efficiency for malignant tumors are the priority tasks in practical oncology.

According to current notions the hematopoietic stem cells (HSCs) and growth factors play a primary role in correcting hemodepressive states of different etiology [6, 7, 9, 20, 23].

All the above considered of actual interest is studying the effect of cell preparation of human cord blood (HCB), comprising hematopoietic stem cells and biologically active plasma substances on certain quantitative and qualitative characteristics of blood erythrocytes under cytostatic exposures.

Accordingly this research was aimed to study the chemotherapy effect with 5-fluorouracil (broad-spectrum antitumour drug) on a number of erythrocytes in murine peripheral blood, structural and functional state of their membranes, as well as the possibilities to correct developing anemia with administering cord blood cryopreserved suspension.

Materials and methods

The experiments were carried-out according to the General Principles of Experiments in Animals approved by the National Congress in Bioethics (Kyiv, 2013) and agreed to the statements of European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

Research was done within autumn-winter period in 60 breedless mice weighing 18–20 g, and composing 4 groups. Three experimental groups (E1, E2, E3) received 5-fluorouracil drug (5-FU; Ebewe Pharma, Austria) once intraperitoneally in maximum tolerated



Материалы и методы

Эксперименты проведены в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными V Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2013) и согласованными с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

Работу выполняли в осенне-зимний период на 60 беспородных мышах массой 18–20 г, которые составляли 4 группы. Трех опытным группам животных (O1, O2, O3) однократно внутривентриально вводили препарат 5-фторурацил (5-ФУ; «Ebewe-Pharma», Австрия) в максимально переносимой дозе 228 мг/кг. Затем мышам группы O2 через 3–4 ч после применения 5-ФУ вводили внутривенно 0,2 мл суспензии криоконсервированных ядросодержащих клеток (кЯСК) ККЧ (ГП «МНЦ КиК НАН, АМН и МОЗ Украины», г. Харьков) в дозе 5×10^8 жизнеспособных ЯСК/кг [1, 2, 5, 15, 18], а группе O3 – 0,2 мл бесклеточного супернатанта, который получали 15-минутным центрифугированием вышеуказанной суспензии кЯСК ККЧ при 170g. Четвертой контрольной группе вводили физиологический раствор в эквивалентном объеме (0,2 мл). Животных выводили из эксперимента на 2, 5, 9, 12 и 16-е сутки путем декапитации.

Абсолютное количество эритроцитов в периферической крови (ПК) определяли общепринятым методом в камере Горяева (объектив $\times 40$, окуляр $\times 7$). Отдельно определяли процент молодых форм эритроцитов (ретикулоцитов), поскольку увеличение числа ретикулоцитов и их выход в циркулирующую кровь отражает активный эритропоэз в костном мозге [8]. Унифицированным методом подсчета количества ретикулоцитов является их окраска бриллиантовым крезиловым синим непосредственно на стекле. Приготовленные указанным способом мазки микрофотографировали с помощью иммерсионного объектива. Подсчитывали не менее 1000 эритроцитов, среди которых выявляли клетки, содержащие зернисто-нитчатую субстанцию. Количество ретикулоцитов выражали в процентах.

Изменение внешнего контура эритроцитов – одна из ответных реакций системы крови на любое неблагоприятное воздействие на организм. Особенно показательным является сферический индекс эритроцитов, свидетельствующий о перестройке структуры и изменении физико-химических свойств эритроцитарной мембраны [12, 19]. Индекс сферичности, прямо пропорциональный поверхностно-объемному соотношению (S/V) и характеризующий форму эритроцитов, определяли методом малоуглового рассеяния света в суспензии эритроцитов (30%-й гематокрит) [13].

dose of 228 mg/kg. Then the mice of group E2 in 3–4 hrs after administering 5-FU were intravenously injected with 0.2 ml suspension of HCB cryopreserved nucleated cells (cNCs) (Interdepartmental Scientific Center of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Academy of Medical Sciences and Ministry of Health Care of Ukraine, Kharkov) in 5×10^8 dose of viable NCs/kg [1, 2, 18, 20, 23], and group E3 received 0.2 ml of cell-free supernatant, procured by 15-min centrifugation of aforementioned HCB cNCs suspension at 170g. The control group 4 was injected with saline in an equivalent volume (0.2 ml). Animals were decapitated to days 2, 5, 9, 12 and 16.

The absolute number of erythrocytes in peripheral blood (PB) was determined by the standard method in Goryaev chamber ($\times 40$ lens, $\times 7$ ocular). The percentage of young erythrocytes (reticulocytes) was determined separately, since an increased reticulocytes number and their release into circulating blood reflected an active erythropoiesis in bone marrow [9]. The unified method for counting reticulocytes is their staining with cresyl blue brilliant directly on glass. The prepared in such a way smears were microscopied with immersion lens. There were counted at least 1,000 erythrocytes, among which there were revealed the cells with granular-filamentous substance. Reticulocyte number was expressed as a percentage.

A change in erythrocyte outer contour is one of the blood system responses to any unfavorable exposure to an organism. A spherical index of erythrocytes, testifying to the rearrangement in the structure and changed physical and chemical properties of erythrocyte membrane is of extra significance [13, 15]. Sphericity index directly proportional to the surface-volume ratio (S/V) and characterizing the erythrocyte shape was determined by small-angle scattering method in erythrocyte suspension (30% hematocrit) [17].

To determine the distribution density of erythrocytes by sphericity index the experimental curves of osmotic fragility were plotted. For this purpose a cell of device to measure the light intensity scattered by erythrocyte suspension, containing 3 ml of sodium chloride solution with concentration from 0.15 to 0.05 M was supplemented with 3 μ l of erythromass [11]. According to the small-angle scattering and calibration curve data there was determined a part (in percentage) of cells not exposed to hemolysis in hypotonic solutions of non-penetrating substance. Erythrocyte distribution by sphericity index was determined by the dependency of osmotic fragility using physical and mathematical model of erythrocyte hypotonic hemolysis in solution of non-penetrating substance [12, 17, 20]. Erythrocyte predominant forms corresponded to the following intervals of sphericity index: (spherocytes + spherost-



Для определения плотности распределения эритроцитов по индексу сферичности получали экспериментальные кривые осмотической хрупкости. С этой целью в ячейку устройства для измерения интенсивности рассеянного суспензией эритроцитов света, содержащую 3 мл раствора хлорида натрия с концентрацией от 0,15 до 0,05 М, добавляли 3 мкл эритроцитовой массы [23]. По данным малоуглового рассеяния и калибровочного графика определяли долю (в процентах) клеток, не подверженных гемолизу, в гипотонических растворах непроницающего вещества. Распределение эритроцитов по индексу сферичности устанавливали по зависимости осмотической хрупкости, используя физико-математическую модель гипотонического гемолиза эритроцитов в растворе непроницающего вещества [11, 13, 23]. Преобладающие формы эритроцитов соответствовали следующим интервалам индекса сферичности: сфероциты (сфероциты + сферостоматоциты + стоматоциты III) – 1–1,3; стоматоциты (стоматоциты II и I + нормоциты) – 1,3–1,7; нормоциты (дискоциты) – 1,7–2,1 и уплощенные дискоциты – 2,1–3.

Статистическую обработку полученных результатов проводили по методу Стьюдента-Фишера с использованием программного обеспечения «Excel» («Microsoft», США).

Результаты и обсуждение

Результаты анализа литературных данных свидетельствуют о том, что применение фторпиримидинового антиметаболита 5-ФУ приводит к глубокому подавлению как гранулоцитопоэза, так и эритропоэза в костном мозге мышей [6–8].

Нами показано, что криоконсервированная клеточная суспензия ККЧ, содержащая в своем составе ЯСК, в том числе и стволовые кроветворные CD34⁺-клетки в аутологичной плазме [1, 2], оказывала выраженный стимулирующий эффект на процессы костномозгового кроветворения, угнетенного в результате проведения химиотерапии, что подтверждалось повышенным выходом в ПК молодых форм эритроцитов (табл. 1). Так, увеличение содержания ретикулоцитов у мышей при сочетанном введении 5-ФУ и кЯСК ККЧ (группа O2) отмечали с 5-х суток эксперимента, тогда как развитие ретикулоцитоза в ПК после применения 5-ФУ (группа O1) или 5-ФУ на фоне бесклеточного супернатанта ККЧ (группа O3) регистрировали с 12-х суток наблюдения. При этом количество

matocytes + stomatocytes III) – 1–1,3; stomatocytes (stomatocytes II and I + normocytes) – 1.3–1.7; 'normocytes' (discocytes) – 1.7–2.1 and 'flattened' discocytes – 2,1–3.

Findings were statistically processed with t-test method using Excel software (Microsoft, USA).

Results and discussion

The results of literature data analysis testify to a deep suppression of both granulocytopoiesis and erythropoiesis in murine bone marrow caused by applying 5-FU fluoropyrimidine antimetabolite [6, 7, 9].

Cryopreserved HCB cell suspension, comprised NCs, including CD34⁺ hematopoietic stem cells in autologous plasma [1, 2] was shown to cause a pronounced stimulating effect on bone marrow hematopoiesis processes, suppressed due to performed chemotherapy, that was confirmed by an increased release of young erythrocytes into PB (Table 1). Thus, an increased content of reticulocytes in mice during combined administration of 5-FU and HCB cNCs (group E2) was noted from day 5 of the experiment, whereas the reticulocytosis development in PB after applying 5-FU (group E1) or 5-FU against the background of HCB cell-free supernatant (group E3) was recorded from day 12 of observation. In this case a number of reticulocytes in murine PB starting from day 5 after administering HCB cellular preparation against the background of cytostatic (group E2) exceeded the same index in the animals received only cytostatic 5-FU or cell-free preparation (Table 1).

A rise of reticulocyte number and their release into circulating blood reflect an active erythropoiesis in bone marrow. Thus, the data presented demonstrate the

Таблица 1. Содержание ретикулоцитов в ПК мышей после введения 5-ФУ и криоконсервированных препаратов ККЧ, % (n = 3)

Table 1. Reticulocyte content in PB of mice after treatment with 5-FU and HCB cryopreserved preparations, % (n = 3)

Группа животных Animal group	Срок после проведения ХТ, суток Period after CT performance, days				
	2	5	9	12	16
Контроль Control	2,6 ± 0,4	2,6 ± 0,4	2,6 ± 0,4	2,6 ± 0,4	2,6 ± 0,4
Группа O1 Group E1	0,7 ± 0,3*	1,0 ± 0,2*	2,3 ± 0,4	3,9 ± 0,5*	3,6 ± 0,3*
Группа O2 Group E2	0,6 ± 0,2*	1,6 ± 0,3	3,8 ± 0,4*	4,6 ± 0,5*	4,2 ± 0,4*
Группа O3 Group E3	0,7 ± 0,2*	0,9 ± 0,2*	2,0 ± 0,3*	4,2 ± 0,2*	4,1 ± 0,3*

Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$).

Note: * – the differences are statistically significant if compared with the control, $p \leq 0.05$.

ретикулоцитов в ПК мышей с 5-х суток после введения клеточного препарата ККЧ на фоне цитостатика (группа О2) превосходило аналогичный показатель у животных, получавших только цитостатик 5-ФУ либо бесклеточный препарат (табл. 1).

Увеличение числа ретикулоцитов и их выход в циркулирующую кровь отражает активный эритропоэз в костном мозге. Таким образом, представленные данные свидетельствуют о способности криоконсервированной суспензии ЯСК ККЧ, в состав которой входят и СКК, стимулировать процессы костномозгового эритропоэза, подавленные цитостатиком 5-ФУ ряда фторпиримидиновых антиметаболитов.

Применение КЯСК ККЧ способствовало ускорению восстановления абсолютного количества эритроцитов ПК до контрольных значений уже на 9-е сутки эксперимента, тогда как у животных группы О1 этот показатель восстанавливался только к 16-м суткам наблюдения (табл. 2).

Бесклеточный супернатант криоконсервированного препарата кордовой крови, который фактически представляет собой плазму, по своей эффективности восстанавливать абсолютное количество эритроцитов в ПК животных группы О3 значительно уступает суспензии КЯСК ККЧ. Данный факт можно объяснить следующим: в состав КЯСК ККЧ, в отличие от бесклеточного препарата, входят СКК, которые, вероятно, и оказывают значимый эффект на процессы эритропоэза, ингибированные цитостатическим препаратом. Следует отметить, что у животных группы О3 количество эритроцитов в ПК восстанавливалось быстрее, чем в группе О1 ($(6,67 \pm 0,25) \times 10^9/\text{мл}$ и $(5,17 \pm 0,45) \times 10^9/\text{мл}$ соответственно на 12-е сутки после введения 5-ФУ). Это можно объяснить тем, что эритропоэтин, как гликопротеиновый гормон, содержащийся в достаточном количестве в плазме ККЧ [8, 14, 16, 18], контролирует процессы эритропоэза, однако его однократного введения явно недостаточно. Полученные результаты согласуются с данными литературы о малой эффективности цитокинов и ростовых факторов при их краткосрочном применении [9, 16].

В ходе лечения цитостатическими препаратами отмечены значительные нарушения морфофункционального состояния эритроцитов: уменьшение сухой массы эритроцитов, снижение в них концентрации сульфгидрильных групп и липопротеинов, увеличение числа трансформированных форм

Таблица 2. Количество эритроцитов в ПК мышей после введения 5-ФУ и криоконсервированных препаратов ККЧ, $\times 10^9/\text{мл}$ ($n = 3$)

Table 2. Erythrocyte number in PB of mice after treatment with 5-FU and HCB cryopreserved preparations, $\times 10^9/\text{ml}$ ($n = 3$)

Группа животных Animal group	Срок после проведения ХТ, суток Period after CT performance, days				
	2	5	9	12	16
Контроль Control	7,93 \pm 0,35	7,93 \pm 0,35	7,93 \pm 0,35	7,93 \pm 0,35	7,93 \pm 0,35
Группа О1 Group E1	4,80 \pm 0,11*	4,61 \pm 0,23*	4,37 \pm 0,28*	5,17 \pm 0,45*	6,45 \pm 0,31*
Группа О2 Group E2	4,76 \pm 0,31*	5,24 \pm 0,49*	7,17 \pm 0,40	8,00 \pm 0,10	8,27 \pm 0,41
Группа О3 Group E3	4,65 \pm 0,12*	4,40 \pm 0,22*	5,00 \pm 0,19*	6,67 \pm 0,25*	7,90 \pm 0,46

Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$).

Note: * – the differences are statistically significant if compared with the control, $p \leq 0.05$.

capability of cryopreserved suspension of HCB NCs, comprising HSCs as well, to stimulate bone marrow erythropoiesis processes, suppressed by 5-FU cytostatic agent of fluoropyrimidine antimetabolites series.

The application of HCB cNCs contributed to accelerated recovery of an absolute number of PB erythrocytes up to the control values even to day 9 of the experiment, whereas in group E1 animals this index recovered only to day 16 of observation (Table 2).

Cell-free supernatant of cryopreserved cord blood preparation, actually being the plasm, is significantly inferior to the HCB cNCs suspension by its efficiency to recover the absolute number of erythrocytes in PB of group E3 animals. This fact can be explained as follows: the HCB cNCs, unlike cell-free preparation comprise HSCs, which, probably significantly affect the erythropoiesis processes, inhibited by cytostatic drug. Of note is the fact, that in group E3 animals a number of erythrocytes in PB recovered more rapidly than in the group E1 ($(6.67 \pm 0.25) \times 10^9/\text{ml}$ and $(5.17 \pm 0.45) \times 10^9/\text{ml}$, respectively, by day 12 after 5-FU administration). This can be explained by the fact that erythropoietin as glycoprotein hormone, containing in a sufficient amount in HCB plasm [9, 16, 19, 20], controls the erythropoiesis processes, but its single injection is obviously insufficient. These findings are consistent with the literature data about low efficiency of cytokines and growth factors during their short-term application [8, 19].

During therapy with cytotoxic drugs there were observed significant disorders in morphofunctional state of erythrocytes: a decreased dry mass of erythrocytes, reduced concentration of sulfhydryl groups and lipoproteins inside the cells, an increased number of transformed cell shapes, cells with ultrastructural disorders,



Таблица 3. Количество эритроцитов с определенным индексом сферичности в ПК мышей группы О1 после введения 5-ФУ, % ($n = 3$)

Table 3. Content of erythrocyte with definite sphericity index in PB of mice of Group E1 after treatment with 5-FU, % ($n = 3$)

Индекс сферичности Sphericity index	Контроль Control	Срок после проведения ХТ, суток Period after CT performance, days		
		2	9	16
1-1,3	5,0±1,0	7,7 ±2,0	0,1 ±0,1*	10,1 ±1,2*
1,3-1,7	45,6 ±12,8	73,2 ±5,7*	69,6 ±3,9	50,3 ±9,4
1,7-2,1	38,3±8,7	18,3± 7,1*	26,4 ±4,0	32,7 ±10,0
2,1-3	11,1± 8,2	0,8± 0,7*	3,8 ±0,5*	7,0 ±1,9

Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$).

Note: * – the differences are statistically significant if compared with the control, $p \leq 0.05$.

клеток, клеток с нарушениями ультраструктуры, усиление способности эритроцитов к обратимой агрегации [10]. Изменения в составе и функционировании эритроцитарной мембраны, как известно, могут существенно влиять и на важную функцию эритроцитов – транспорт кислорода [12, 19]. Таким образом, исследование внешнего контура эритроцитов является одной из важных задач определения ответных реакций системы крови на любое неблагоприятное воздействие на организм, в частности на химиотерапию. Изменение внешнего контура эритроцитов имеет свои особенности, которые сводятся к трансформации основной популяции эритроцитов (дискоцитов) в сфероциты, эхиноциты и стоматоциты, причиной которой являются, в первую очередь, изменения в цитоскелете и плазмалемме эритроцитов [3].

Метод определения плотности распределения эритроцитов по индексу сферичности представляется более информативным по сравнению с определением количества эритроцитов в ПК, так как отражает нарушения соотношения между кроветворной и кроверазрушающей системами, критерием чего служит осмолярность среды, при которой наступает 50%-й гемолиз эритроцитов.

По результатам исследования функциональной активности эритроцитов ПК мышей (соотношение форм клеток, осмотической хрупкости и гемолиза) установлено, что уже на 2-е сутки после ХТ у животных групп О1 и О2 значительно изменяется, по сравнению с контролем, количество эритроцитов практически всех форм, значительно снижается количество нормоцитов (дискоцитов) (табл. 3, 4), что может быть связано с токсическим действием 5-ФУ.

enhancement of erythrocyte capability to reversible aggregation [10]. Changes in the composition and functioning of erythrocyte membrane are known as capable to significantly affect an important function of erythrocytes: oxygen transport [13, 15]. Thus, the studying of erythrocyte outer contour is one of the important tasks to determine the blood system responses on any adverse exposure, in particular chemotherapy. A change in outer contour of erythrocytes has its own peculiarities, reduced to transformation of erythrocyte main population (discocytes) into spherocytes, echinocytes and stomatocytes, caused first of all by the changes in erythrocyte cytoskeleton and plasma membrane [3].

The method for determining the erythrocyte density distribution by sphericity index is more informative than the detection of erythrocyte number in PB, since it reflects the disorders in the ratio between hematopoietic and hemoclastic systems, which criterion is the medium osmolarity, when 50% hemolysis of erythrocytes occurs.

According to the findings in functional activity of PB erythrocytes of mice (ratio of cell shapes, osmotic fragility and hemolysis) there was established the fact, that even to day 2 after CT in animals of groups E1 and E2 a number of erythrocytes of virtually all the shapes significantly changed, a number of ‘normocytes’ (discocytes) was significantly reduced as compared to the control (Tables 3 and 4), that might be due to a toxic effect of 5-FU.

Suggested mechanisms of toxic action of cytostatic drugs on erythrocytes have been reported in the papers [5, 13, 21], where there were studied certain structural and functional indices of erythrocyte membranes prior to and after incubation with cyclophosphan and cisplatin. Blood incubation with these cytostatic drugs was established to result in fragmentation of protein molecules with accumulation of toxic degradation products due to a decrease in albumin binding capacity, stipulated by the association of chemotherapeutic agents with centers of albumin molecule. Preferential binding of chemotherapeutic agents with erythrocyte membranes obviously occurs by incorporating into lipid bilayer area.

In group E2 animals (Table 4) a number of spherocytes with sphericity index 1–1,3 to day 2 of observation was significantly lower than the control, whereas in the group E1 we noted an increase in erythrocyte number of spheroid shape (spherocytes and spherostomatocytes) versus the control indices. Dynamics of change (16 observation days) in erythrocyte number



Предполагаемые механизмы токсического действия цитостатиков на эритроциты представлены в работах некоторых исследователей [12, 21, 22], которые изучали отдельные структурно-функциональные показатели мембран эритроцитов до и после инкубации с циклофосфаном и цисплатином. Было установлено, что инкубация крови с этими цитостатиками приводит к фрагментации белковых молекул с накоплением токсических продуктов деградации вследствие снижения связывающей способности альбумина, что обусловлено ассоциацией химиопрепаратов с центрами молекулы альбумина. Преимущественное связывание химиопрепаратов с мембранами эритроцитов происходит, очевидно, путем встраивания в область липидного бислоя.

В группе животных О2 (табл. 4) количество сфероцитов с индексом сферичности 1–1,3 на 2-е сутки наблюдения было значимо ниже контроля, тогда как в группе О1 отмечалось повышение количества эритроцитов сфероидной формы (сфероциты и сферостоматоциты) относительно контрольных показателей. Динамика изменения с 16-х суток наблюдения количества эритроцитов сфероидной формы в группе животных после применения 5-ФУ (см. табл. 3) характеризовалась тем, что данный показатель значимо снижался (по сравнению с контролем) на 9-е сутки и к концу наблюдения увеличивался достоверно. Количество стоматоцитов к этому сроку наблюдения приближалось к контрольному показателю ($50,3 \pm 9,4$ и $45,6 \pm 12,8$ соответственно). К 16-м суткам нормализовалось и количество эритроцитов с характерной для этих клеток дискоидной формой с индексом сферичности 1,7–2,1.

Динамика изменения количества эритроцитов с патологической формой у животных группы О2, которым на фоне химиопрепарата 5-ФУ вводили кЯСК ККЧ, была аналогична показателям группы О1, однако в группе О2 показатели эритроцитов нормализовались значительно раньше – на 9-е, а не на 16-е сутки наблюдения (см. табл. 3 и 4). Полученные данные согласуются с динамикой восстановления абсолютного количества эритроцитов в ПК (см. табл. 2).

На рисунке видно, что на 2-е сутки эксперимента 50%-й гемолиз суспензии эритроцитов наступает в обеих опытных группах при более высоких, чем в контроле, значениях тоничности среды (179 и 157 мОсмоль соответственно).

В группе О1 на 9-е сутки после применения 5-ФУ доля эритроцитов предгемолитических форм остается высокой, хотя тоничность среды, при которой наступает 50%-й гемолиз эритроцитов, снижается до 171 мОсмоль (см. табл. 3, рисунок А).

Таблица 4. Количество эритроцитов с определенным индексом сферичности в ПК мышей группы О2 после введения 5-ФУ и криоконсервированных препаратов ККЧ, % ($n = 3$)

Table 4. Number of erythrocytes with definite sphericity index in PB of mice of Group E2 after treatment with 5-FU and HCB cryopreserved preparations, % ($n = 3$)

Индекс сферичности Sphericity index	Контроль Control	Срок после проведения ХТ, суток Period after CT performance, days	
		2	9
1-1,3	$5,0 \pm 1,0$	$0,5 \pm 0,1^*$	$4,0 \pm 1,0$
1,3-1,7	$45,6 \pm 12,8$	$85,0 \pm 8,5^*$	$50,3 \pm 9,5$
1,7-2,1	$38,3 \pm 8,7$	$10,9 \pm 7,2^*$	$36,9 \pm 14,3$
2,1-3	$11,1 \pm 8,2$	$3,5 \pm 1,9^*$	$8,8 \pm 2,6$

Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$).

Note: * – the differences are statistically significant if compared with the control, $p \leq 0.05$.

of spheroid shape in the group of animals after administering 5-FU (see Table 3) was characterized by a significant decrease in this index (compared to the control) to day 9 and a statistically significant increase to the observation end. A number of stomatocytes to this observation term approached to the control index (50.3 ± 9.4 and 45.6 ± 12.8 respectively). To day 16 the number of erythrocytes with discoid shape, inherent to these cells with 1.7–2.1 sphericity index was normalized as well.

Dynamics of change in erythrocyte number with abnormal shape in group E2 animals, received HCB cNCs against the background of chemotherapy with 5-FU, was similar to the indices of group E1, but in the group E2 the erythrocyte indices were normalized much earlier: to day 9, but not 16 (Tables 3 and 4). These findings agree with recovery dynamics of the absolute number of erythrocytes in PB (Table 2).

Fig. 1 and 2 show that to day 2 of the experiment the 50% hemolysis of erythrocyte suspension occurs in both experimental groups at higher values of medium tonicity than in the control (179 and 157 mOsm, respectively).

In group E1 to day 9 after administering 5-FU a part of erythrocytes of pre-hemolytic shapes remains high, although the medium tonicity, where 50% erythrocyte hemolysis occurs, decreases down to 171 mOsm (Table 3, Fig. A). Only to day 16 the index of osmotic fragility of erythrocytes approaches to the control value of 165 mOsmol (Fig. A). To very this term a complete recovery of the absolute number of PB erythrocytes occurs in this animal group (see Table 2).



Только на 16-е сутки показатель осмотической хрупкости эритроцитов приближается к контрольному значению 165 мОсмоль (см. рисунок А). Именно к этому сроку происходит полное восстановление абсолютного количества эритроцитов ПК этой группы животных (см. табл. 2).

Уже на 9-е сутки после ХТ и введения КЯСК ККЧ суспензия эритроцитов мышей по своему составу сравнима с контрольной группой (табл. 4, рисунок В), а 50%-й гемолиз суспензии регистрируется в этот срок при близкой к контролю тоничности среды (159 мОсмоль). Приведенные выше результаты хорошо согласуются с данными, представленными в табл. 4, и полученными нами показателями количества эритроцитов в ПК (см. табл. 2).

Исходя из данных табл. 3, 4 и рисунка можно сделать вывод, что клеточный препарат ККЧ способствует более быстрому восстановлению целостности мембран красных клеток крови мышей после химиотерапии фторурацилом, что может иметь важное значение для реализации дальнейшего клинического эффекта противоопухолевой терапии.

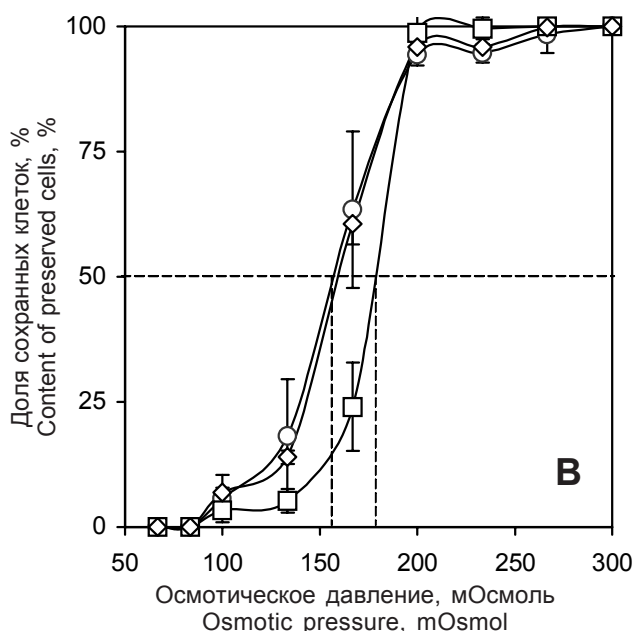
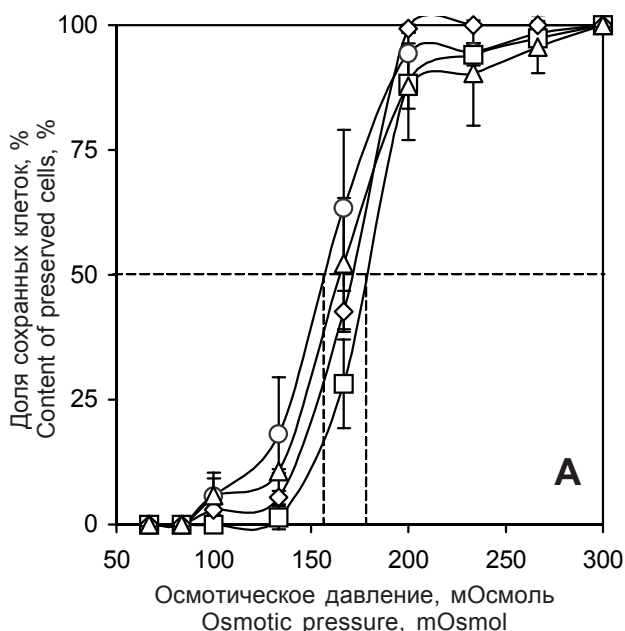
Учитывая, что мембрана эритроцита является универсальной регуляторной системой, которая обеспечивает координированные изменения метаболизма не только отдельно взятых клеток, но и всех систем жизнедеятельности [12], можно надеяться на получение иммунокорректирующего

Even to day 9 after chemotherapy and administering HCB cNCs the murine erythrocyte suspension was comparable by its composition with the control group (Table 4, Fig. B), and a 50% suspension hemolysis was recorded within this period under the medium tonicity being close to the control (159 mOsmol). The above results correlate well with the data presented in Table 4, and our data of erythrocyte number in PB (Table 2).

Proceeding from the data presented in Table 3, 4 and Figure it can be concluded that the HCB cell preparation contributes to more rapid recovery of erythrocyte membrane integrity in mice after chemotherapy with fluorouracil, that may be of great importance in implementing further clinical effect of antitumor therapy.

Taking into account the fact, that the erythrocyte membrane is an universal regulatory structure, providing coordinated metabolic changes of not only certain cells, but all the systems of vital activity [13], we can hope for obtaining an immunocorrective effect when applying HCB cell preparation on the whole organism as well.

Thus, this research demonstrated the expediency of administering the HCB cryopreserved nucleated cellular suspension in anemia, emerging after 5-fluorouracil application to recover the absolute number of peripheral blood erythrocytes and structural-functional state of their plasma membranes.



Динамика гемолиза эритроцитов ПК мышей группы O1 после введения 5-ФУ (А) и O2 после введения 5-ФУ и КЯСК ККЧ (В): ○ – контроль, △ – 2-е сутки, ◇ – 9-е сутки, □ – 16-е сутки.

Dynamics of PB erythrocyte hemolysis in mice of Group E1 after administering 5-FU (A) and in Group E2 after administering 5-FU and HCB cNCs (B): ○ – the control, △ – day 2, ◇ – day 9, □ – day 16.

эффекта от применения клеточного препарата ККЧ и на весь организм в целом.

Таким образом, исследование показало целесообразность применения криоконсервированной ядросодержащей клеточной суспензии ККЧ при формирующейся после применения 5-фторурацила анемии для восстановления абсолютного количества эритроцитов периферической крови и структурно-функционального состояния их плазматических мембран.

Выводы

1. Криоконсервированная суспензия ЯСК человека оказывает стимулирующий эффект на эритропоэз у мышей, восстанавливая абсолютное количество эритроцитов периферической крови и в более короткие сроки, купируя развитие анемии, возникающей в результате действия 5-фторурацила.

2. Криоконсервированная суспензия ЯСК ККЧ значительно снижает процент гемолизированных (вследствие токсического действия цитостатиков) эритроцитов периферической крови мышей, предотвращая изменение их внешнего контура.

Литература

1. Бабийчук Л.А., Кудокоцева О.В., Зубов П.М., Зубова О.Л. Новые подходы к криоконсервированию ядросодержащих клеток кордовой крови и оценка их жизнеспособности // Укр. химиотерапевт. журнал. – 2008. – №1–2. – С. 85–87.
2. Бабийчук Л.А., Кудокоцева О.В., Рязанцев В.В. и др. Современные подходы к количественному и качественному учету криоконсервированных стволовых клеток кордовой крови // Трансплантология. – 2008. – Т. 10, №1. – С. 119–121.
3. Бархина Т.Г., Никитина Г.М., Черных А.С. Экологическая морфология клеток периферической крови в норме и патологии // Успехи совр. естествознания. – 2006. – №1. – С. 35–36.
4. Беляев А., Бягненко С., Рухляда Н. Внутривентрикулярная химиотерапия злокачественных опухолей брюшной полости. – СПб.: Элби, 2007. – 254 с.
5. Владимирская Е.Б., Майорова О.А., Румянцев С.А., Румянцев А.Г. Биологические основы и перспективы терапии стволовыми клетками. – М.: Медпрактика, 2005. – 392 с.
6. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Жданов В.В. Влияние цитостатических препаратов на стволовые клетки костного мозга // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2005. – №1. – С. 20–24.
7. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Жданов В.В. Роль стволовых клеток в восстановлении кроветворения при цитостатических и лучевых миелосупрессиях // Бюл. сибир. медицины. – 2006. – №2. – С. 35–42.
8. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Скурихин Е.Г. и др. Усиление стимулирующего действия эритропоэтина на эритропоэз антисеротониновым препаратом при цитостатической миелосупрессии // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2009. – Т. 147, №7. – С. 56–59.
9. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Шерстобоев Е.Ю. Механизмы локальной регуляции кроветворения. – Томск: STT, 2000. – 148 с.

Conclusions

1. Cryopreserved suspension of HCB NCs causes a stimulating effect on erythropoiesis in mice, by recovering the absolute number of peripheral blood erythrocytes and by stopping the anemia progress occurred as a result of 5-fluorouracil effect in a shorter time.

2. Cryopreserved suspension of HCB NCs significantly reduces the percentage of hemolyzed (due to a toxic effect of cytostatic drugs) peripheral blood erythrocytes in mice, by preventing the changes in their outer contour.

References

1. Babijchuk L.A., Kudokotseva O.V., Ryazantsev V.V. et al. Modern approaches to quantitative and qualitative calculation of cryopreserved cord blood stem cells. *Transplantologiya* 2008; 10(1): 119–121.
2. Babijchuk L.A., Kudokotseva O.V., Zubov P.M., Zubov O.L. New approaches to cryopreservation of cord blood nucleated cells and assessing their viability. *Ukr Khimioterapevt J* 2008; (1–2): 85–87.
3. Barkhina T.G., Nikitina G.M., Chernykh A.S. Ecological morphology of peripheral blood cells in norm and pathology. *Uspekhi Sovr Estestvoznaniya* 2006; (1): 35–36.
4. Belyaev A., Bagnenko S., Rukhlyada N. Intraperitoneal chemotherapy of malignant tumors of abdominal cavity. *St. Petersburg: Elbi*; 2007.
5. Chu E., DeVita V.Jr. *Chemotherapy of malignancies*, editor. Moscow: Praktika; 2008.
6. Goldberg E.D., Dygai A.M., Zhdanov V.V. Effect of cytostatics on bone marrow stem cells. *Cell Technologies in Biology and Medicine* 2005; (1): 20–24.
7. Goldberg E.D., Dygai A.M., Zhdanov V.V. Role of stem cells in recovering hematopoiesis during cytostatic and radiation myelosuppression. *Bulletin of Siberian Medicine* 2006; (2): 35–42.
8. Goldberg E.D., Dygai A.M., Sherstoboyev E.Y. Mechanisms of local regulation of hematopoiesis. *Tomsk: STT*; 2000.
9. Goldberg E.D., Dygai A.M., Skurikhin E.G. et al. Strengthening of stimulating effect of erythropoietin on erythropoiesis with antiserotonin preparation in cytostatic myelodepression. *Bul Exp Biol Med* 2009; 147(7): 56–59.
10. Goldberg V.E., Novitsky V.V., Kolosova M.V. et al. Effect of anti-cancer therapy on structural and metabolic status and functional state of erythrocytes in patients with head and neck tumors. *Eksperimentalnaya i Klinicheskaya Farmakologiya* 2004; (5): 39–42.
11. Gordienko E.O., Gordienko O.I., Gordienko Yu.E. et al., inventors. Way to determine the density of distribution probability in erythrocytes by sphericity index. Patent of Ukraine 47910A, IPC7 G01N33/49. 2002 July 15.
12. Gordienko E.O., Gordienko O.I., Kovalenko I.F. et al. Physical-mathematical analysis and experimental determination of distribution integrity of human donor and umbilical blood erythrocytes by sphericity index. *Biofiz Visnyk* 2000; 1(6): 75–78.
13. Gorlo E.I. Structural and functional state of cell membranes of blood and lymph in cancer patients with various chemotherapeutic effects [dissertation]. *Rostov-on-Don*; 2000.
14. Hmelevskaya E.S. Role of monoamines in the regulation of hematopoietic precursors of various classes under cytostatic myelosuppression [dissertation]. *Tomsk*; 2011.



10. Гольдберг В.Е., Новицкий В.В., Колосова М.В. и др. Влияние противоопухолевой терапии на структурно-метаболический статус и функциональное состояние эритроцитов у больных с опухолями головы и шеи // Эксперим. и клин. фармакология. – 2004. – №5. – С. 39–42.
11. Гордієнко Є.О., Гордієнко О.І., Коваленко І.Ф. та ін. Фізико-математичний аналіз та експериментальне визначення щільності розподілу еритроцитів донорської і пуповинної крові людини за індексом сферичності // Біофіз. вісник. – 2000. – Вип. 1 (6). – С. 75–78.
12. Горло Е. И. Структурно-функциональное состояние мембран клеток крови и лимфы у онкологических больных при различных химиотерапевтических воздействиях: Автореф. дис. ...канд. биол. наук. – Ростов-на-Дону, 2000. – 25 с.
13. Коваленко С.Є., Алексеева Л.І., Кулешова Л.Г. та ін. Возможные механизмы антигемолитической дії хлорпромазину // Проблемы криобиологии. – 2006. – Т.16, №2. – С. 137–142.
14. Коноводова Е.Н. Эритропоэтин у плода и новорожденного // Акушерство и гинекология. – 2004. – №1. – С. 13–16.
15. Матяш М.Т. Особенности и механизмы действия гемостимулирующего действия препаратов разных фармакологических групп в условиях противоопухолевой полихимиотерапии: Автореф. дис. ...канд. фарм. наук. – Томск, 2008. – 22 с.
16. Павлов А.Д., Морцакова Е.Ф. Регуляция эритропоэза: Физиологические и клинические аспекты. – М.: Медицина, 1987. – 272 с.
17. Противоопухолевая химиотерапия. Руководство / Под ред. Т. Скила. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 627 с.
18. Румянцев А.Г., Масчан А.А. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток у детей. – М.: МИА, 2003. – 910 с.
19. Хадарцев А.А., Кидалов В.Н., Якушина Г.Н. и др. Ранняя реакция эритроцитов на экстремальные воздействия – образование условно-полиморфных стом и изменение их флуоресценции // Вестник новых мед. технологий. – 2002. – №3. – С. 19–21.
20. Хмелевская Е.С. Роль моноаминов в регуляции кроветворных предшественников различных классов в условиях цитостатической миелосупрессии: Автореф. дис. ...канд. мед. наук. – Томск, 2011. – 26 с.
21. Химиотерапия злокачественных новообразований / Под ред. Э. Чу, В. Де Вита мл. – М.: Практика, 2008. – 460 с.
22. Шалашная Е.В., Горошинская И.А., Неродо Г.А. и др. Исследование влияния химиопрепаратов на уровень эндогенной интоксикации, интенсивность свободнорадикального окисления и мембранный аппарат клеток крови больных с рецидивами рака шейки матки в опытах *in vitro* // Сибир. онколог. журнал. – 2008. – №2 (26). – С. 50–54.
23. Пат. №47910А, Україна, МПК7 G01 N 33/49. Спосіб визначення щільності ймовірності розподілу еритроцитів за індексом сферичності / Є.О. Гордієнко, О.І. Гордієнко, Ю.Є. Гордієнко та ін.; заявник та патентовласник Інститут проблем криобіології та кріомедицини НАН України. Заявл. 26.10.2001; опубл. 15.07.02, Бюл. №7.
15. Khadartsev A.A., Kidalov V.N., Yakushina G.N. et al. Early response of erythrocytes to extreme exposures: formation of conditionally polymorphic stomas and change in their fluorescence. Journ New Med Techn 2002; (3): 19–21.
16. Konovodova E.N. Erythropoietin in the fetus and newborn. Obstetrics and Gynecology 2004; 1: 13–16.
17. Kovalenko S.E., Alekseyeva L.I., Kuleshova L.G. et al. Possible mechanisms of chlorpromazine antihemolytic effect. Problems of Cryobiology 2006; 16(2): 137–142.
18. Matyash M.T. Features and action mechanisms of hemostimulating effect of preparations of different pharmacological groups in terms of anti-tumor chemotherapy [dissertation]. Tomsk; 2008.
19. Pavlov A.D., Morschakova E.F. Regulation of erythropoiesis: Physiological and clinical aspects. Moscow: Meditsina; 1987.
20. Rumyantsev A.G., Maschan A.A. Hematopoietic stem cell transplantation in children. Moscow: MIA; 2003.
21. Shalashnaya E.V., Goroshinskaya I.A., Nerodo G.A. et al. Study of chemotherapeutic agents effect on level of endogenous intoxication, intensity of free radical oxidation and membrane apparatus of blood cells in patients with recurrent cervical cancer in experiments *in vitro*. Siberian J Oncol 2008; 2(26): 50–54.
22. Skil T., editor. Anticancer chemotherapy. Moscow: GEOTAR Media; 2011.
23. Vladimirskaia E.B., Mayorova O.A., Rumyantseva S.A., Rumyantsev A.G. Biological grounds and prospects of stem cell therapy. Moscow: Medpraktika; 2005.

