

## Внутривенное введение эмбриональных нервных клеток крысам с хроническим отравлением алкоголем

А.Ю. ПЕТРЕНКО<sup>1</sup>, Г. А. КОВАЛЁВ<sup>2</sup>, В. И. ГРИШЕНКО<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

<sup>2</sup>Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина

## Intravenous Injection of Embryonic Neural Cells to Rats with Chronic Alcohol Poisoning

A.YU.PETRENKO<sup>1</sup>, G.A. KOVALEV<sup>2</sup>, V.I. GRISCHENKO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

<sup>2</sup>V.N. Karazin Kharkov National University

Изучали проблему коррекции последствий хронического отравления алкоголем. Выявлена эффективность внутривенного введения эмбриональных нервных клеток (ЭНК) для коррекции последствий хронического отравления алкоголем, даже на фоне продолжающегося приёма алкоголя в малых дозах. Показано, что внутривенное введение криоконсервированных ЭНК человека крысам не оказывает негативного влияния на интактных животных. На модели хронического отравления алкоголем показано, что введение ЭНК приводит к улучшению общего состояния организма и функционального состояния печени: уменьшает протромбиновое время, продолжительность гексеналового сна, повышает содержание альбумина в плазме крови.

**Ключевые слова:** эмбриональные нервные клетки, криоконсервирование, трансплантация, внутривенное введение, хроническое отравление алкоголем, модель, самки крыс, печень.

Вивчали проблему корекції наслідків хронічного отруєння алкоголем. Виявлена ефективність внутрішньовенного введення ембріональних нервових клітин (ЕНК) для корекції наслідків хронічного отруєння алкоголем, навіть при продовженні прийому алкоголю у малих дозах. Показано, що внутрішньовенне введення криоконсервованих ЕНК людини не впливає негативно на інтактних тварин. На моделі хронічного отруєння алкоголем показано, що введення ЕНК поліпшує загальний стан організму і функціональний стан печінки: зменшує протромбіновий час, тривалість гексеналового сну, збільшує вміст альбуміну в плазмі крові.

**Ключові слова:** ембріональні нервові клітини, криоконсервування, трансплантація, внутрішньовенне введення, хронічне отруєння алкоголем, модель, самки шурів, печінка.

The problem of correcting the consequences of chronic alcoholic poisoning was studied. The efficiency of intravenous injection of embryonic neural cells (ENCs) to correct the consequences of chronic alcoholic poisoning even at the background of continued alcohol intake in small doses was found out. An intravenous introduction of cryopreserved human ENCs to rats was shown as causing no negative effect on intact animals. In the model of chronic alcohol poisoning the ENCs injection was demonstrated to result in the improvement of an organism's general state and functional state of liver: it decreased the prothrombin time, hexenal sleep and increased albumin content in blood plasm.

**Key-words:** embryonic neural cells, cryopreservation, transplantation, intravenous injection, chronic alcohol poisoning, model, rat females, liver.

За последние десятилетия потребление алкоголя значительно возросло во многих регионах мира [3]. В связи с этим проблема коррекции последствий хронического отравления алкоголем является важной и злободневной. Особое беспокойство вызывает потребление алкоголя женщинами [5], что продиктовано не только социальной стороной этого явления, которая традиционно выносится на первый план, но и сугубо медицинской. По сравнению с мужчинами, женщины более восприимчивы к алкоголю, и алкогольное поражение органов развивается у них быстрее и протекает тяжелее [9]. Мишенью для алкоголя является печень, но алкоголь и продукты его метаболизма поражают также нервную, иммунную, пищева-

For recent decades the alcohol consumption has been significantly increased in many world regions [3]. In this connection the problems of correcting the consequences of chronic alcohol poisoning is important and of current interest. A wide involvement of women in alcohol consumption provides a special concern [5], imposed by not only traditionally highlighted social side of this phenomenon, but by particularly medical one as well. If comparing with men, women are more alcohol susceptible and an alcohol damaging of organs develops in them more rapidly and proceeds more severe [9]. The liver is a target for alcohol, but alcohol and its metabolic products damage the nervous, immune, digestive and other systems as well, i.e. have a system effect [2]. It is of common knowledge that the first

**Адрес для корреспонденции:** Петренко А.Ю., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Перяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 772-01-35, факс: +38 (057) 772-00-84, e-mail: pay@kharkov.ua

**Address for correspondence:** Petrenko A.Yu., Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 772 0135, fax: +380 57 772 0084, e-mail: pay@kharkov.ua

рительную и другие системы, то есть обладают системным действием [2]. Общеизвестно, что первым и обязательным этапом эффективной коррекции последствий хронического отравления алкоголем является полный отказ от употребления спиртного, но это условие далеко не всегда выполняется. Таким образом, часть пациентов отказываются от лечения или же коррекционные мероприятия оказываются неэффективными. Для лечения таких пациентов необходима разработка новых терапевтических подходов с использованием эмбриональных тканей, эффективность применения которых уже доказана при лечении многих заболеваний [6]. Учитывая токсическое воздействие алкоголя на нервную систему, объектом введения нами были выбраны ЭНК, тропные по отношению к нервной системе и не обладающие направленным гепатотропным воздействием. Для введения ЭНК используются различные методы: введение ЭНК в мозговые структуры, эндолумбальное и ретролюмбальное введение. Все эти методы сложны и требуют хирургического опыта, что является одним из сдерживающих факторов в клиническом применении ЭНК. На этом фоне своей простотой и доступностью отличается внутривенный метод введения, который мог бы значительно расширить сферу применения ЭНК в клинической практике. Однако этот метод практически не исследован. Разработка данного направления требует проведения опытов на животных с использованием экспериментальных моделей хронического отравления алкоголем.

Цель нашей работы – выяснение безопасности внутривенного введения криоконсервированных ЭНК человека самкам крыс и оценка их действия на модели хронического отравления алкоголем.

### **Материалы и методы**

Исследования выполняли на 3-месячных самках белых беспородных крыс. Эксперименты проводили в соответствии с “Общими принципами экспериментов на животных”, одобренными I Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, Украина, 2001) и согласованными с положениями “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей” (Страсбург, Франция, 1985). Хроническое отравление алкоголем производили в соответствии с разработанной моделью, позволяющей довести потребление алкоголя до 14-18 г/кг массы тела без использования жидких диет или насильственного введения. Модель включала три этапа.

*Первый этап* – отбор животных, склонных к алкоголизации, на основании отборочного теста.

and mandatory step for efficient correction of consequences of chronic alcohol poisoning is a complete refusal from alcohol consumption, but this condition is always far from being accomplished accomplishment. Thus, some patients refuse to be treated or the correcting measures occurred to be inefficient. For treatment of such patients it is necessary to elaborate new therapeutic approaches with using embryonic tissues, whose application efficiency has been already proved when treating many diseases [6]. Taking into account the alcohol toxic effect on nervous system, the ENC's, being tropic in respect of nervous system and having no directed hepatotropic effect, were selected as the injection object. Methods for ENC's injection are as follows: ENC's introduction into brain structures, endolumbar and retrolumbar introduction. All these methods are complicated and require surgical experience, that is one of the deterrents in ENC's clinical application. At this background an intravenous method differs by its simplicity and availability, that might significantly extend the field of ENC's application in clinical practice. However, this method has not been practically investigated. The development of this direction requires the performance of experiments in animals with usage of experimental models of chronic alcohol poisoning.

Our work was aimed to reveal the safety of intravenous injection of cryopreserved human ENC's to rat females and evaluation of their effect in the model of chronic alcohol poisoning.

### **Materials and methods**

The investigations were carried-out in 3 months' white breedless rat females. The experiments were conducted according to the General Principles of Experiments in Animals, approved by the 1<sup>st</sup> National Congress on Bioethics (Kiev, Ukraine, 2001) and agreed with the statements of European Convention on Vertebrate Protection, Used for Experimental and other Scientific Aims (Strasbourg, France, 1985). Chronic alcohol poisoning was performed according to the elaborated model, enabled bringing alcohol consumption up to 14-18 g/kg of body weight with no use of liquid diets or forced introduction. The model comprised three steps.

*The first step* included the selection of animals, liable to alcoholisation, based on a selective test. The selective test procedure was as follows:

- a day before test performance the animals were deprived of food with a free access to water;
- animals, placed into individual cages, obtained by 1 ml of 40% ethanol solution on standard pieces of white bread;
- as a selective criterion we assumed the amount of eaten bread for 1 hr: the animals which ate less than a half of a piece were rejected.

Процедура отборочного теста состояла в следующем:

-за сутки до проведения теста животные лишались пищи со свободным доступом к воде;

-животные, помещенные в индивидуальные клетки, получали по 1 мл 40%-го раствора этанола на стандартных кусочках белого хлеба;

-критерием отбора являлось количество съеденного хлеба в течение часа: животные, съедавшие менее половины кусочка, выбраковывались.

*Второй этап* – привыкание животных к алкоголю, длительность 2 недели. Первую неделю они находились на обычной диете, но вместо воды получали 5% -й раствор этанола, вторую – этот раствор заменяли 15% -м раствором этанола.

*Третий этап* – интенсивная алкоголизация, длительность 11 недель. Вместо обычной диеты животные получали 96%-й раствор этанола на стандартных кусочках белого хлеба, 2 раза в неделю – побеги овса. Взвешивали животных один раз в неделю.

После окончания интенсивной алкоголизации животные были переведены на малую дозу алкоголя (вместо воды в поилках находился 15%-й раствор этанола) и обычную диету.

Все животные были разделены на экспериментальную и контрольную группы. Животным экспериментальной группы внутривенно вводили криоконсервированные ЭНК в дозе  $10^7$  клеток/100 г массы тела, контрольной – среду криоконсервирования (СКК) в эквивалентном объеме. ЭНК получали из головного мозга эмбрионов человека 9-12 недель гестации неферментативным методом, криоконсервировали под защитой 5%-го ДМСО по трёхэтапной программе замораживания, включающей охлаждение до  $-40^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ ; от  $-40$  до  $-80^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  и погружение в жидкий азот. Пробы отогревали на водяной бане при  $40^{\circ}\text{C}$  непосредственно перед внутривенным введением.

Тестовыми параметрами были выбраны показатели как общего состояния организма (динамика изменения массы тела, состояние шерсти, смертность), так и функционального состояния печени (продолжительность гексеналового сна, протромбиновое время, содержание альбумина в плазме крови). Для оценки состояния шерсти применялась пятиуровневая шкала, в соответствии с которой выделялись следующие категории:

-первая – блестящая, лоснящаяся шерсть, волосы не выпадают, не ломаются;

-вторая – шерсть тусклая, без выпадения и ломкости волос;

-третья – шерсть тусклая, ломкая, умеренно выраженное выпадение волос;

-четвёртая – шерсть тусклая, ломкая, выраженное выпадение волос;

*The second step* comprised the animals' addiction to alcohol of 2 weeks duration. During first week the animals were fed on a usual diet, but received 5% ethanol solution instead of water, within the second week this solution was replaced by 15% ethanol solution.

*The third step* included an intensive alcoholisation with 11 weeks duration. Instead of ordinary diet the animals received 96% ethanol solution on the standard white bread pieces, and oats sprouts twice a week. Animals were weighed once a week.

After finishing intensive alcoholisation the animals were changed over a low alcohol dose (with 15% ethanol solution in drinking-bottles instead of water) and an ordinary diet.

All animals were divided into experimental and control groups. To the animals of experimental group the cryopreserved ENC's in the dose of  $10^7$  cells/100 g of body weight were intravenously injected, for the control group the cryopreservation medium (CPM) in an equivalent volume was introduced. ENC's were derived from human embryo brain of 19-12 gestation weeks by a non-enzymatic method, cryopreserved under 5% DMSO protection by three-step freezing program, including cooling down to  $-40^{\circ}\text{C}$  with  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$  rate; from  $-40$  down to  $-80^{\circ}\text{C}$  with  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$  rate and immersion into liquid nitrogen. The samples were thawed on water bath at  $40^{\circ}\text{C}$  directly before intravenous injection.

As test parameters we selected the indices of both general state of an organism (dynamics of change in body weight, hair state, death rate) and functional state of liver (hexenal sleep duration, prothrombin time, albumin content in blood plasm). Five-level scale was applied for hair state estimation, according to which the following categories were emphasised:

- first: bright, shiny hair, no loss and fragility in hairs;

- second: dim hair, without loss and fragility in hairs;

- third: dim, fragile hair, moderately manifested hairs loss;

- fourth: dim, fragile hair, manifested hairs loss;

- fifth: dim, fragile hair, with manifested hairs loss and alopecia areata (single and multiple foci).

All measurements were performed thrice: at the first stage it was done before alcoholisation (intact animals), at the second one: after finishing an intensive alcoholisation (prior to intravenous introduction of cryopreserved ENC's) and at the third: a week after intravenous injection of cryopreserved ENC's or CPM.

## Results and discussion

In order to find out whether an intravenous injection of cryopreserved ENC's in the chosen doses causes a negative effect, an additional investigation in animals of the same sex and age was carried-out. The ENC's introduction was performed from  $10^7$  to  $5 \times 10^7$  cells/100 g of body weight. The dose of introduced cells was

-пятая – шерсть тусклая, ломкая, наблюдается выраженное выпадение волос, присутствует гнездная алопеция (одиночные или множественные очаги).

Все измерения производились трижды: на первом этапе – до алкоголизации (интактные животные), на втором – по окончании интенсивной алкоголизации – перед внутривенным введением криоконсервированных ЭНК и на третьем – спустя неделю после внутривенного введения криоконсервированных ЭНК или СКК.

### Результаты и обсуждение

Для того чтобы выяснить, не оказывает ли негативного влияния внутривенное введение криоконсервированных ЭНК в выбранной нами дозе, были дополнительно исследованы животные того же пола и возраста. Введение ЭНК осуществляли от  $10^7$  до  $5 \times 10^7$  клеток/100 г массы тела. Доза вводимых клеток увеличивалась с интервалом в 10 млн клеток, объём вводимой при этом суспензии колебался от 200 до 1000 мкл. Процедуру внутривенного введения ЭНК все животные перенесли хорошо. Наблюдение за животными осуществлялось на протяжении 12 недель. За весь указанный период гибели животных, поведенческих нарушений, отклонений в наборе массы тела и состоянии шерсти не наблюдалось. В ответ на внутривенное введение ЭНК не отмечалось тромбообразования или иных нарушений реологических свойств крови. Таким образом, результаты предварительной серии экспериментов свидетельствуют об отсутствии негативного влияния внутривенного введения криоконсервированных ЭНК.

Внутривенное введение криоконсервированных ЭНК человека на модели хронического отравления алкоголем у самок крыс приводило к улучшению как общего состояния организма, так и функционального состояния печени.

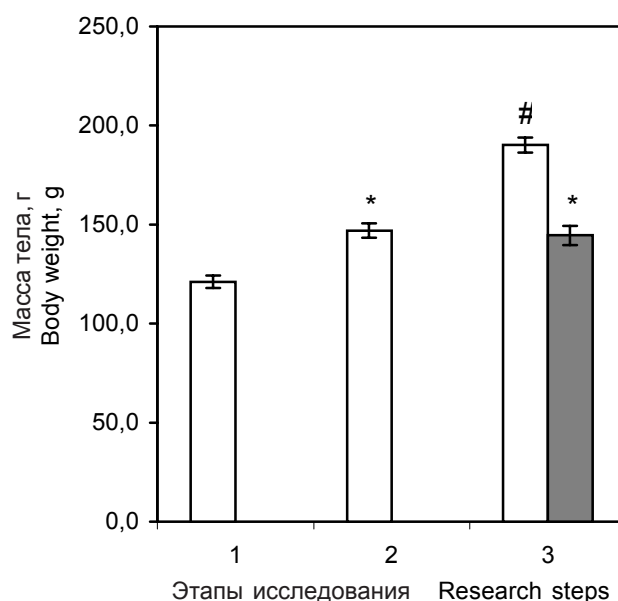
Масса тела животных перед началом алкоголизации составляла  $121,1 \pm 3,2$  г ( $n=19$ , рис. 1), после развития модели –  $146,8 \pm 3,7$  г ( $n=19$ ), а спустя неделю после внутривенного введения ЭНК –  $190,0 \pm 3,8$  г ( $n=9$ ). В это же время масса тела контрольных животных ( $n=10$ ), которым вместо ЭНК вводили СКК, составляла  $144,4 \pm 4,9$  г ( $P>0,05$ ). Таким образом, по сравнению с контролем внутривенное введение ЭНК приводило к увеличению массы тела животных в 1,3 раза.

Состояние шерсти у животных оценивалось однократно, через неделю после внутривенного введения криоконсервированных ЭНК (рис. 2). К первой категории (шерсть без признаков патологии) была отнесена большая часть животных в опыте 6 из 9 и ни одно из 10 животных в контроле; ко второй (шерсть тусклая, без выпадения и ломкости волос) – 2 из 9 животных в опыте и 1 из 10 животных в контроле; к третьей категории (шерсть

increased with 10 million cells interval, at the same time the volume of introduced suspension varied from 200 to 1000  $\mu$ l. The procedure of intravenous ENC's injection was well endured by all animals. They were observed within 12 weeks. No death, behaviour disorders, deviations in body weight gain and hair state were observed within all mentioned period. In response to an intravenous ENC's injection no thrombogenesis or other disorders in blood rheologic properties were noted. Thus, the results of preliminary experiments testify to the absence of any negative effect of cryopreserved ENC's intravenous introduction.

An intravenous injection of cryopreserved human ENC's in the model of chronic alcohol poisoning in rat females resulted in the improvement of both general state of an organism and liver functional state as well.

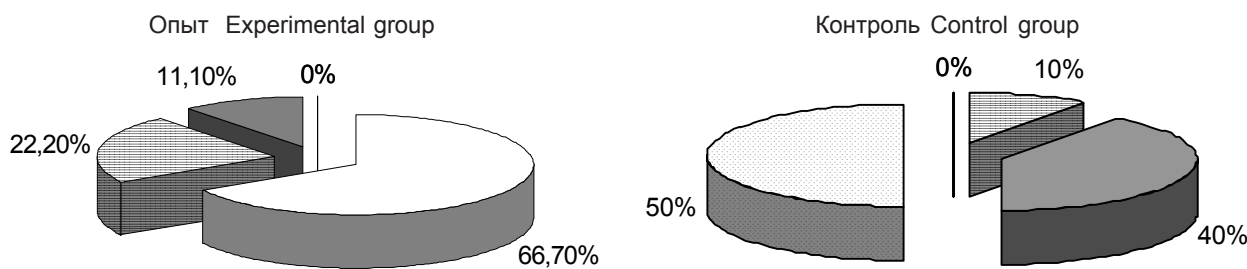
The body weight of animals before alcoholisation beginning made  $121.1 \pm 3.2$  g ( $n=19$ , Fig. 1) after model development it was  $146.8 \pm 3.7$  g ( $n=19$ ), but a week after intravenous ENC's injection it was  $190.0 \pm 3.8$  g ( $n=9$ ). At the same time the body weight of control animals ( $n=10$ ), to those CPM was introduced instead of ENC's, made  $144.4 \pm 4.9$  g ( $P>0.05$ ). Thus, in comparison with the control an intravenous ENC's injection resulted in 1.3 time increase in animals' body weight.



**Рис. 1.** Изменение массы тела животных: 1 – интактных; 2 – после развития модели хронического отравления алкоголем; 3 – через неделю после внутривенного введения криоконсервированных ЭНК (опыт – □) или СКК (контроль – ■); достоверные отличия относительно групп: \* – интактной, # – контрольной.

**Fig. 1.** Change in animals' body weight: 1 – intact; 2 – after model development of chronic alcohol poisoning; 3 – a week after intravenous injection of cryopreserved ENC's (experimental group – □) or CPM (control – ■); statistically significant differences in respect of groups: \* – intact, # – control.





**Рис. 2.** Распределение животных по категориям состояния шерсти. □ – I; ▤ – II; ▥ – III; ▦ – IV; ■ – V.  
**Fig. 2.** Animals distribution by categories of hair state. □ – I; ▤ – II; ▥ – III; ▦ – IV; ■ – V.

тусклая, ломкая, умеренно выраженное выпадение волос) – 1 из 9 животных в опыте и 4 из 10 животных в контроле; к четвертой категории (шерсть тусклая, ломкая, выраженное выпадение волос) – ни одно из 9 животных в опыте и 5 из 10 животных в контроле; к пятой (шерсть тусклая, ломкая, наблюдается выраженное выпадение волос, присутствует гнездовая алопеция) не было отнесено ни одно из животных в обеих группах. Таким образом, состояние шерсти животных экспериментальной группы было значительно лучшим.

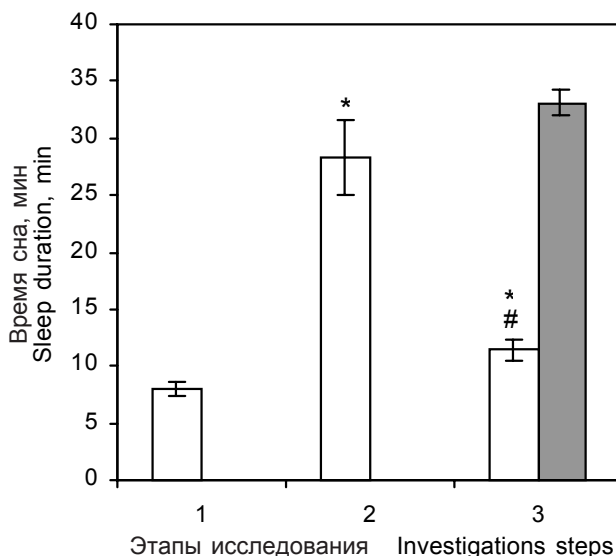
Средняя продолжительность гексеналового сна животных перед началом алкоголизации составляла  $8,0 \pm 0,5$  мин, после развития модели –  $28,3 \pm 2,2$  мин ( $n=19$ , рис. 3), продолжительность гексеналового сна в опыте ( $n=9$ ) –  $11,4 \pm 0,9$  мин, в контроле ( $n=10$ ) –  $33,1 \pm 1,1$  мин ( $P>0,05$ ). Таким образом, после внутривенного введения ЭНК продолжительность гексеналового сна уменьшалась в 2,5 раза, у животных в контроле она достоверно не изменялась.

Протромбиновое время у интактных животных составляло  $25,2 \pm 0,4$  с, после развития модели –  $51,2 \pm 1,7$  с ( $n=19$ , рис. 4), у экспериментальных животных ( $n=9$ ) –  $27,7 \pm 1,5$  с, у животных контрольной группы ( $n=10$ ) –  $44,3 \pm 1,7$  с ( $P>0,05$ ). После внутривенного введения ЭНК протромбиновое время в опыте уменьшалось в 1,9 раза, в контроле – в 1,2 раза.

Содержание альбумина в плазме крови животных ( $n=19$ , рис. 5) до алкоголизации составляло  $2,82 \pm 0,1$  г/дл, после развития модели –  $0,98 \pm 0,1$  г/дл. Через неделю после внутривенного введения ЭНК содержание альбумина в плазме крови животных составляло  $1,87 \pm 0,1$  г/дл ( $n=9$ ), в контрольной группе ( $n=10$ ) –  $1,25 \pm 0,1$  г/дл ( $P>0,05$ ). Содержание альбумина в плазме крови животных экспериментальной группы увеличилось в 1,9, контрольной – в 1,3 раза.

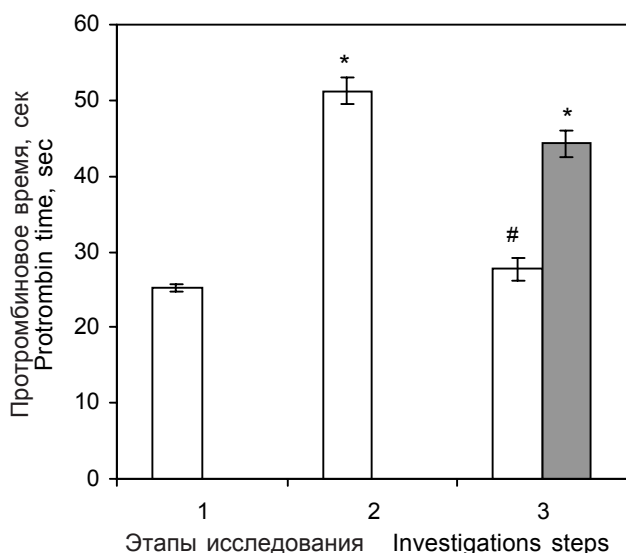
Следует отметить, что в отличие от контроля в экспериментальной группе не отмечалось гибели животных.

Hair state in animals was estimated once, a week after cryopreserved ENC's intravenous introduction (Fig. 2). To the first category (hair without pathological signs) we referred the majority of animals in 6 and 9 experiments and none from 10 animals in the control; 2 animals from 9 in the experiment and 1 from 10 in the control were referred to the second one (dim hair, without hairs loss and fragility); to the third one (dim, fragile hair, moderately manifested hairs loss) there were done 1 from 9 animals in the experiment and 4 from 10 animals in the control; none of 9 animals in the experiment and 5 of 10 animals in the control were referred to the fourth category (dim, fragile hair,



**Рис. 3.** Изменение продолжительности гексеналового сна животных: 1 – интактных; 2 – после развития модели хронического отравления алкоголем; 3 – через неделю после внутривенного введения криоконсервированных ЭНК (опыт – □) или СКК (контроль – ■); достоверные отличия относительно групп: \* – интактной, # – контрольной.

**Fig. 3.** Change of hexenal sleep duration of animals: 1 – intact; 2 – after model development of chronic alcohol poisoning; 3 – a week after intravenous injection of cryopreserved ENC's (experimental group – □) or CPM (control – ■); statistically significant differences in respect of groups: \* – intact, # – control.



**Рис. 4.** Изменение протромбинового времени у животных: 1 – интактных; 2 – после развития модели хронического отравления алкоголем; 3 – через неделю после внутривенного введения криоконсервированных ЭНК (опыт – □) или СКК (контроль – ■); достоверные отличия относительно групп: \* – интактной, # – контрольной.

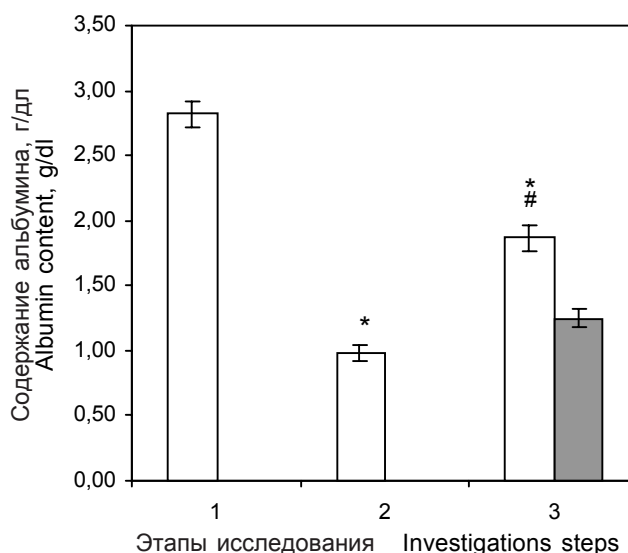
**Fig. 4.** Change of prothrombin time in animals: 1 – intact; 2 – after model development of chronic alcohol poisoning; 3 – a week after intravenous injection of cryopreserved ENCs (experimental group – □) or CPM (control – ■); statistically significant differences in respect of groups: \* – intact, # – control.

Таким образом, внутривенное введение криоконсервированных ЭНК интактным животным не оказывает вредного воздействия, улучшает показатели общего состояния организма и функционального состояния печени на модели хронического отравления алкоголем самок крыс.

Более выраженный прирост массы тела, отсутствие смертности и лучшее состояние шерсти у животных экспериментальной группы может свидетельствовать об улучшении работы органов пищеварительной системы, о повышении эффективности метаболических процессов.

Значительное уменьшение продолжительности гексеналового сна у животных после внутривенного введения криоконсервированных ЭНК свидетельствует о восстановлении скорости метаболизма гексенала, которая может служить показателем детоксикационной функции печени.

Уменьшение протромбинового времени и более высокое содержание альбумина в плазме крови животных экспериментальной группы приводит к более активному синтезу альбумина и специфических белков, синтезируемых в печени. Имеются в виду такие белки, как фибриноген, протромбин и другие специфические белковые продукты, участвующие в процессе свёртывания крови.



**Рис. 5.** Изменение содержания альбумина в плазме крови животных: 1 – интактных; 2 – после развития модели хронического отравления алкоголем; 3 – через неделю после внутривенного введения криоконсервированных ЭНК (опыт – □) или СКК (контроль – ■); достоверные отличия относительно групп: \* – интактной, # – контрольной.

**Fig. 5.** Change of of albumin content in blood plasm of animals: 1 – intact; 2 – after model development of chronic alcohol poisoning; 3 – a week after intravenous injection of cryopreserved ENCs (experimental group – □) or CPM (control – ■); statistically significant differences in respect of groups: \* – intact, # – control.

manifested hairs loss), the fifth group (dim, fragile hair, a manifested hairs loss with alopecia areata) comprised no animals in both groups. Thus, the hair state of the animals of experimental group's was considerably better.

An average duration of hexenal sleep of animals before alcoholisation beginning made  $8.0 \pm 0.5$  min, after model development it was  $28.3 \pm 2.2$  min ( $n=19$ , Fig. 3), hexenal sleep duration in the experiment ( $n=9$ ) was  $11.4 \pm 0.9$  min, and  $33.1 \pm 1.1$  min in the control ( $n=10$ ) ( $P>0.05$ ). Thus, after ENCs introduction the hexenal sleep duration reduced in 2.5 times, and did not statistically and significantly change in the control animals.

Prothrombin time in intact animals made  $25.2 \pm 0.4$  sec, after the model development it made  $51.2 \pm 1.7$  sec ( $n=19$ , Fig. 4), in the experimental animals ( $n=9$ ) it made  $27.7 \pm 1.5$  sec, and  $44.3 \pm 1.7$  sec ( $P>0.05$ ) in those of the control group ( $n=10$ ). After intravenous ENCs introduction a prothrombin time decreased in 1.9 times in the experiment and in 1.2 times in the control.

Albumin content in blood plasm of animals ( $n=19$ , Fig. 5) before alcoholisation made  $2.82 \pm 0.1$  g/dl, and  $0.98 \pm 0.1$  g/dl after model development. A week after intravenous ENCs injection the albumin content in blood plasm of animals made  $1.87 \pm 0.1$  g/dl ( $n=9$ ), and it was

Механизм воздействия ЭНК изучен недостаточно и, как правило, связывается с высоким содержанием в эмбриональных клетках биологически активных веществ [1]. Последние, вероятно, могут оказывать как специфическое воздействие на орган, тропностью к которому они обладают, так и неспецифическое стимулирующее воздействие на другие органы и системы, улучшая тем самым общее состояние организма и создавая благоприятный фон для протекания процессов саногенеза.

Другим объяснением эффекта от введения ЭНК может быть репаративное и стимулирующее влияние на ЦНС, что может приводить к оптимизации нейрогуморальной регуляции других органов и систем организма, в первую очередь иммунной (протекание алкогольного гепатита) и пищеварительной систем (уменьшение проницаемости кишечной стенки для эндотоксинов и, следовательно, токсического воздействия на печень). Лечебное воздействие ЭНК может быть опосредовано как нейротрофическими факторами, являющимися полифункциональными белково-пептидными регуляторами, способствующими активации других систем (например, иммунной и эндокринной), деятельность которых теснейшим образом связана с ЦНС [4,7], так и непосредственным “замещающим” эффектом, когда ЭНК встраиваются взамен погибших клеток мозга и берут на себя их функции. В пользу такой трактовки свидетельствуют работы, доказывающие проницаемость гематоэнцефалического барьера для биологически активных веществ, а также клеток, способных мигрировать через эндотелий в мозг [7,8]. Так, в недавних исследованиях Чу К и др. [7] было показано, что внутривенно введенные крысам ЭНК человека способны проникать через гематоэнцефалический барьер и дифференцироваться в различные типы нервных клеток.

Следует отметить, что эти результаты получены на фоне продолжающегося приёма алкоголя в малых дозах, то есть без полной абстиненции. Таким образом, внутривенное введение ЭНК может быть использовано для разработки новых методов лечения хронического отравления алкоголем, даже на фоне продолжающегося приёма алкоголя в малых дозах.

## Выводы

Внутривенное введение криоконсервированных ЭНК человека интактным крысам не оказывает негативного влияния на поведение, реологические свойства крови, массу тела и состояние шерсти. На модели хронического отравления алкоголем показано, что внутривенное введение ЭНК оказывает положительное влияние на общее

$1.25 \pm 0.1$  g/dl ( $P > 0.05$ ) in the control group ( $n=10$ ). The albumin content in blood plasma of experimental group's animals increased in 1.9 and in 1.3 times in the control group.

Of note is that in contrast to the control no animal death was observed in the experimental group.

Thus, an intravenous injection of cryopreserved ENC's to intact animals does not cause a damaging effect, improves indices of general state of an organism and liver functional state in the model of chronic alcohol poisoning in rat females.

More manifested body weight increase, absence of death and better body hair state in the experimental group's animals can testify to the improvement of digestive system activity, about increase in metabolic processes efficiency.

Considerable reduction of hexenal sleep duration in animals after intravenous injection of cryopreserved ENC's testifies to the recovery of hexenal metabolism rate, which can be the index of liver detoxification function.

Prothrombin time reduction and higher albumin content in blood plasma of experimental group's animals suggest more active synthesis of albumin and specific proteins, synthesised in liver. It means such proteins as fibrinogen, prothrombin and other specific protein products, participating in coagulation process.

The effect mechanism of ENC's is poorly studied and, as a rule, is related to a high content of biologically active substances in embryonic cells [1]. The latter can probably cause both specific effect on the organ, which they have tropicity to, and a non-specific stimulating effect on other organs and systems, thereby improving the general state of an organism and creating a favourable background for sanogenesis processes course.

Another explanation for the effect of ENC's introduction can be a reparative and stimulating effect on CNS, than can result in the optimisation of neurohumoral regulation in other organs and systems of an organism, firstly of immune (alcohol hepatitis proceeding) and digestive systems (decrease in intestinal wall permeability for endotoxins and, consequently, toxic effect on liver). Therapeutic effect on ENC's can be mediated by both neurotrophic factors, being polyfunctional protein-peptide regulators, contributing to other system activation (for example, immune and endocrine ones), which activity is tightly related to CNS [4, 7] and a direct “substituting” effect, where ENC's are built instead of dead brain cells and take their functions. The works, proving the blood brain barrier permeability for biologically active substances, and cells, capable to migrate through endothelium into brain testify in favour of such interpretation [7, 8]. Thus, the recent investigations of Chu K et al. [7] demonstrated that the intravenously introduced human ENC's to rats were

состояние организма: увеличивает прирост массы тела, улучшает состояние шерсти; улучшает функциональное состояние печени, что проявляется в уменьшении протромбинового времени и продолжительности гексеналового сна, повышении содержания альбумина в плазме крови. Применение ЭНК может явиться основой для разработки новых методов лечения хронического отравления алкоголем.

### Литература

1. *Акимова И.М., Гурчин Ф.А., Королёва Н.Ю. и др.* Клиническое применение трансплантации эмбриональных зачатков мозга при заболевании эпилепсией // Рос биомед. журнал.– 2001.– Т. 2.– С. 41-46.
2. *Бабак О. Я.* Алкоголь - пристрастие, уносящее здоровье // Мед. газета.– 2002.– №3.– С. 2.
3. *Калинин А.В.* Вопросы патогенеза, клиники и лечения алкогольной болезни печени // Клинические перспективы в гастроэнтерологии, гепатологии.– 2001.– №4.– С. 8-14.
4. *Клюшник Т.П.* Нейротрофические факторы как возможное эффективное звено при терапии с использованием фетальных клеток и тканей // Трансплантация фетальных тканей и клеток человека.– М., 1996.– С. 103.
5. *Кошкина Е.А.* К вопросу о профилактике алкоголизма среди женщин. Социология и практические аспекты. Вып. II.– М., 1990.– С.158.
6. *Кулаков В.И., Сухих Г.Т., Молнар Е.М.* Трансплантация фетальных тканей человека: анализ состояния проблемы и перспективы развития // Трансплантация фетальных тканей и клеток человека.– М., 1996.– С. 251.
7. *Chu K., Kim M., Jeong S.W. et al.* Human neural stem cells can migrate, differentiate, and integrate after intravenous transplantation in adult rats with transient forebrain ischemia // *Neurosci Lett.*– 2003.– Vol. 343, N2.– P. 129-133.
8. *Krivit W., Sung J.H., Shaping E.G., Lockman L.A.* Microglia: the effector cell for reconstitution of the central nervous system following bone marrow transplantation for lysosomal and peroxisomal storage diseases // *Cell Transplant.*– 1995.– Vol. 4, №4.– P. 385-392.
9. *Nanji A., Jokelainen K., Fotouhinia M. et al.* Increased severity of alcoholic liver injury in female rats: role of oxidative stress, endotoxin, and chemokines // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*– 2002.– Vol.281.– P. G1348–G1356.

Поступила 07.07.2004

capable to penetrate through a blood brain barrier and be differentiated into various types of neural cells.

It should be noted that these results were obtained at the background of continued alcohol intake in small doses, *i.e.* without complete abstinence. Thus, an intravenous ENC's injection can be used for development of new methods for chronic alcohol poisoning treatment even at the background of continued alcohol intake in small doses.

### Conclusions

Intravenous injection of cryopreserved human ENC's to intact rats does not cause a negative effect on the behaviour, rheologic blood properties, body weight and hair state. On the model of chronic poisoning with alcohol there was shown that intravenous ENC's introduction affects positively general state of an organism: increases the body weight growth, improves hair state; improves liver functional state, that manifests in a reduction of prothrombin time and hexenal sleep duration, albumin increase in blood plasm. ENC's application can be the base for new methods development in chronic alcohol poisoning treatment.

### References

1. *Akimova I.M., Gurchin F.A., Koroleva N.Yu. et al.* Clinical application of embryonic brain germ transplantation at epilepsy // *Ros. biomed. zhurnal.*– 2001.– Vol. 2.– P. 41-46.
2. *Babak O.Ya.* Alcohol is destroying health addiction // *Med.gazeta.*– 2002.– N3.– P. 2.
3. *Kalinin A.V.* Questions of pathogenesis, clinical picture and treatment of liver alcohol disease // *Klinicheskie perspektivy v gastroenterologii, gepatologii.*– 2001.– N4.– P. 8-14.
4. *Klyushnik T.P.* Neurotrophic factors as possible efficient link at therapy with usage of fetal cells and tissues // *Transplantation of human fetal tissues and cells.*– Moscow, 1996.– P.103.
5. *Koshkina E.A.* To the question of alcoholism prevention in women. Sociology and practical aspects. Issue II.– Moscow, 1990.– P. 158.
6. *Kulakov V.I., Sukhikh G.T., Molnar E.M.* Transplantation of human fetal tissues: problem state analysis and perspectives of development// *Transplantation of human fetal tissues and cells.*– Moscow, 1996.– P.251.
7. *Chu K., Kim M., Jeong S.W. et al.* Human neural stem cells can migrate, differentiate, and integrate after intravenous transplantation in adult rats with transient forebrain ischemia // *Neurosci Lett.*– 2003.– Vol. 343, N2.– P. 129-133.
8. *Krivit W., Sung J.H., Shaping E.G., Lockman L.A.* Microglia: the effector cell for reconstitution of the central nervous system following bone marrow transplantation for lysosomal and peroxisomal storage diseases // *Cell Transplant.*– 1995.– Vol. 4, №4.– P. 385-392.
9. *Nanji A., Jokelainen K., Fotouhinia M. et al.* Increased severity of alcoholic liver injury in female rats: role of oxidative stress, endotoxin, and chemokines // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*– 2002.– Vol.281.– P. G1348–G1356.

Accepted in 07.07.2004