

УДК 612.649.011.87:615.014.41:615.921.5.018.1-092.4

О.Ю.Кожина\*, М.В.Останков, Л.В. Останкова, Н.А. Бондарович, А.Н. Гольцев

## Влияние криоконсервированной кордовой крови на активность альвеолярных макрофагов в экспериментальной модели гриппа

UDC 612.649.011.87:615.014.41:615.921.5.018.1-092.4

O.Yu. Kozhina\*, M.V. Ostankov, L.V. Ostankova, N.A. Bondarovich, A.N. Goltsev

## Effect of Cryopreserved Cord Blood on Activity of Alveolar Macrophages in Experimental Model of Influenza

**Реферат:** Исследовано формирование резистентности к вирусу гриппа А у мышей после введения криоконсервированного лейкоконцентрата кордовой крови человека (кЛККЧ) или его компонентов (плазма, ядродержащие клетки). Методом бронхоальвеолярного лаважа был получен смыв со слизистой оболочки дыхательных путей экспериментальных животных в условиях развития гриппа. Проведен сравнительный анализ клеточного состава смыва дыхательных путей и функциональной активности альвеолярных макрофагов легких мышей на 7- и 14-е сутки после инфицирования вирусом гриппа. Инфицирование проводили через 6 месяцев после интраназального введения кЛККЧ или его компонентов. Установлено, что кЛККЧ в большей степени, чем его компоненты, корригировал функциональную активность альвеолярных макрофагов, повышая их фагоцитарную активность и предотвращая развитие иммунодефицита у животных с индукцией вирусной патологии.

**Ключевые слова:** альвеолярные макрофаги, криоконсервированная кордовая кровь, профилактика гриппа.

**Реферат:** Досліджено формування резистентності до вірусу грипу А у мишей після введення криоконсервованого лейкоконцентрату кордової крові людини (кЛККЛ) або його компонентів (плазми, ядерних клітин). Методом бронхоальвеолярного лаважу отримано змив зі слизової оболонки дихальних шляхів експериментальних тварин в умовах розвитку грипу. Проведено порівняльний аналіз клітинного складу змиву дихальних шляхів і функціональної активності альвеолярних макрофагів легень мишей на 7- та 14-ту добу після інфікування вірусом грипу. Інфікування проводили через 6 місяців після інтраназального введення кЛККЛ або його компонентів. Встановлено, що використання кЛККЛ більшою мірою, ніж його компонентів, модифікувало функціональну активність альвеолярних макрофагів, підвищуючи їх фагоцитарну активність та запобігаючи розвитку імунодефіциту у тварин з індукцією вірусної патології.

**Ключові слова:** альвеолярні макрофаги, криоконсервована кордова кров, профілактика грипу.

**Abstract:** Formation of resistance to influenza virus of type A in mice following introduction of cryopreserved human cord blood leucosconcentrate (cHCBL) or its components (plasma, nucleated cells). Bronchoalveolar lavage was obtained from mucous membrane of respiratory tract in experimental animals during influenza development. Analysis of cell composition of bronchoalveolar lavage as well as functional activity of alveolar macrophages in lungs of animals in 7 and 14 days following influenza virus introduction. The infection was performed in 6 month after preventive intranasal introduction of cHCBL or its components. It was found that cHCBL in more extent than its components corrected the functional activity of alveolar macrophages increasing their phagocytic activity and preventing the immune deficiency development in animals with inducted viral pathology.

**Key words:** alveolar macrophages, cryopreserved cord blood, influenza preventive maintenance.

Проблема поиска эффективных средств для профилактики и лечения вирусных инфекций, вызывающих патологию респираторного тракта, остается актуальной в связи с высокими показателями заболеваемости [4, 12]. Несмотря на интенсивный скрининг лекарственных препаратов против гриппа, проводимый во всем мире, применение противовирусных средств ограничено из-за формирования к ним резистентности у вирусов. Перспективным направлением в профилактике гриппа является разра-

The task of searching for effective preparations to prevent and treat viral infections of respiratory tract has remained an actual one due to high indices of morbidity [4, 12]. In spite of intensive screening of medical products against influenza performed all over the world, application of antiviral preparations is limited due to resistance formed in viruses. Perspective direction in influenza prophylaxis is the development of preparations enabling to increase the activity of an organism own defence systems.

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

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

\*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:  
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015;  
тел.: (+38 057) 373-31-87, факс: (+38 057) 373-30-84,  
электронная почта: dr\_yalo@mail.ru

\* To whom correspondence should be addressed:  
23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015;  
tel.: +380 57 373 3007, fax: +380 57 373 3084,  
e-mail: dr\_yalo@mail.ru

Поступила 19.02.2013  
Принята в печать 19.09.2013

Received February, 19, 2013  
Accepted September, 19, 2013

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2013. – Т. 23, №3. – С. 247–259.  
© 2013 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

Problems of Cryobiology and Cryomedicine. – 2013. – Vol. 23, Nr. 3. – P. 247–259.  
© 2013 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

ботка средств, способных повышать активность собственных защитных сил организма.

Известно, что альвеолярные макрофаги, входящие в состав моноцитарно-фагоцитарной системы (МФС) организма, выступают в первой линии эффекторных механизмов иммунологического гомеостаза и являются основными факторами неспецифической защиты [10, 18]. Обладая исключительной реактивностью и высокой мобилизационной готовностью, они принимают непосредственное участие в регуляции иммунного ответа в лёгких как в нормальных физиологических условиях, так и при различных патологических процессах, в частности при инфицировании респираторными вирусами. Альвеолярные макрофаги способны опосредованно модулировать ответные реакции других иммунокомпетентных клеток через высвобождение медиаторов [7]. Так, активированные альвеолярные макрофаги продуцируют свободные радикалы, цитокины, хемокины и другие медиаторы воспаления, которые запускают реакции организма для осуществления врожденного и адаптивного иммунного ответа на внедрение патогенов [10, 11]. Ни одно из проявлений приобретенного иммунитета не реализуется в полном объеме без участия клеток МФС [7, 10, 15]. Так и активированные альвеолярные макрофаги благодаря своей фагоцитарной и секреторной активности играют главную роль в инициации и развитии воспалительного процесса в лёгких.

Ранее было показано, что интраназальное введение криоконсервированного лейкоконцентрата кордовой крови человека (кЛККЧ) способствовало повышению фагоцитарной активности перитонеальных фагоцитов у мышей, инфицированных вирусом гриппа [6]. Поскольку клетки МФС являются гетерогенной популяцией, которая включает как циркулирующие, так и резидентные фагоциты, то в настоящей работе было оценено влияние кЛККЧ и его отдельных компонентов на функциональное состояние альвеолярных макрофагов мышей.

Исследования показали, что клетки наиболее эффективно проявляют свои свойства в естественных для них условиях, т. е. в среде с определённым химическим составом [7, 20]. Принимая во внимание тот факт, что кЛККЧ представляет собой суспензию ядросодержащих клеток в аутологичной плазме, то логично предположить, что максимальный защитный потенциал будет иметь цельный кЛККЧ по сравнению с отдельными компонентами.

В связи с вышеизложенным целью данного исследования была сравнительная оценка функционального состояния альвеолярных макрофагов у мышей, инфицированных вирусом гриппа А/Виктория через 6 месяцев после превентивного введения кЛККЧ или его компонентов.

Alveolar macrophages being the part of organism monocyte-phagocyte system (MPS) are known to be activated in the first line of affecting mechanisms in immune homeostasis and are the basic factors of non-specific defense [11]. Possessing an exceptional reactivity and high mobilization readiness they directly participate in regulation of immune response of lungs both in normal physiological conditions and different pathological processes, in particular during infection with respiratory viruses. Alveolar macrophages are able to indirectly modulate the responses of other immunocompetent cells by release of mediators [7]. For example, activated alveolar macrophages produce free radicals, cytokines, chemokines and other inflammation mediators triggering the reactions of organism to implement congenital and adaptive immune response to the introduction of pathogens [10, 11]. No manifestation is entirely implemented without MPS cells [7, 10, 15]. Activated alveolar macrophages due to their phagocytic and secretory activity play an essential role in initiation and development of inflammatory process in lungs as well.

Previously we have found that intranasal introduction of cryopreserved human cord blood leukoconcentrate (cHCBL) contributed to the increase of phagocytic activity in peritoneal phagocytes of mice infected with influenza virus [6]. The MPS cells are heterogeneous population which includes circulating as well as resident phagocytes, thereby in this research we have assessed the effect of cHCBL and its individual components on functional state of murine alveolar macrophages.

The investigations showed that the cells most effectively manifested the properties in their natural environment, *i. e.* in the medium with certain chemical and composition [7, 20]. Considering the fact that cHCBL is a suspension of nucleated cells in autologous plasma we may suggest that the whole cHCBL will have maximum protective potential if compared to its separate components.

In this regard the research aim was to comparatively assess the functional state of alveolar macrophages of mice infected with A/Victoria influenza virus in 6 months after preventive introduction of cHCBL and its components.

### Materials and methods

The experiments were performed in 2 (at the start of experiment) and 8 month-old (at the end of the experiment) Balb/C mice of 18–20g weight in compliance with the General Principles of Experiments in Animals approved by the 3<sup>rd</sup> National Congress on Bioethics (Kiev, 2007) and agreed with the regulations of European Convention on Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).



## Материалы и методы

Эксперименты проведены на мышах линии Balb/C 2- (в начале эксперимента) и 8-месячного (в конце эксперимента) возраста с массой 18–20 г в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными III Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2007) и согласованными с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

Кордовую кровь получали от здоровых рожеиц после подписания ими добровольного информированного согласия. Лейкоконцентрат кордовой крови человека готовили путём пассивной седиментации эритроцитов в градиенте плотности высокомолекулярного декстрана (полиглюкин, «Юриа-фарм», Украина). Криоконсервировали ЛККЧ в аутологичной плазме по двухэтапной программе на программном замораживателе УОП-6 производства СКТЬ с ОП ИПКиК НАН Украины по ранее разработанному методу [17]. Образцы размораживали на водяной бане при температуре 40...41°C [3]. Плазму получали из кЛККЧ после его размораживания и центрифугирования при 380g в течение 15 мин при 20°C. Ядросодержащие клетки (ЯСК) выделяли из кЛККЧ двукратным центрифугированием при 170g в течение 10 мин при 20°C, отмывали стерильным рингер-фосфатным буферным раствором (РФБ) и перед введением животному ресуспендировали в 2,0 мл РФБ. Стерильность кЛККЧ оценивали согласно методическим рекомендациям [16].

Мыши были разделены на 7 групп. Животным опытных групп 1–6 в возрасте 2-х месяцев интраназально вводили: 1 – кЛККЧ 0,05мл ( $(6 \pm 2) \times 10^5$  клеток/мышь) однократно ( $n = 21$ ); 2 – плазму кЛККЧ 0,05мл однократно ( $n = 21$ ); 3 – ЯСК кЛККЧ 0,05мл ( $(6 \pm 2) \times 10^5$  клеток/мышь) однократно ( $n = 21$ ); 4 – вирус гриппа А/Виктория в дозе  $LD_{25/10}$  ( $n = 21$ ); 5 – интерферон («Лаферобион», «ОАО Киевмедпрепарат», Украина) 14 МЕ 5 раз в день в течение 3 дней ( $n = 21$ ); 6 – физиологический раствор 0,05мл (0,9% NaCl, «Юриа-фарм», Украина) однократно ( $n = 21$ ). Группу 7 составили интактные мыши ( $n = 7$ ).

Через 6 месяцев после введения указанных субстратов 14 животных (из 21) опытных групп интраназально заражали вирусом гриппа А/Виктория в дозе  $LD_{100/10}$ . Неинфицированные мыши этих групп составили контроль ( $n = 7$  в каждой группе).

Вирус гриппа (штамм А/Виктория/7/75 (H3N2)) был предоставлен НИИ гриппа РАМН (Санкт-Петербург, Россия), прошёл 6 пассажей на белых

Cord blood was derived from healthy obstetric patients after their voluntary informed consent. Human cord blood leukoconcentrate was prepared by passive sedimentation of erythrocytes in density gradient of high molecular weight dextran (Polyglucin, Yuria-Pharm, Ukraine). HCBL was cryopreserved in autologous plasma by two-step program in programmable freezer UOP-6 (Special Designing and Technical Bureau with Experimental Unit of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine) using previously developed method [18]. The samples were thawed in water bath at 40–41°C [3]. Plasma was obtained from cHCBL after its thawing and centrifuging at 380g for 15 min at 20°C. Nucleated cells (NC) were isolated from cHCBL by two-fold centrifugation at 170g during 10 min at 20°C, washed with sterile Krebs-Ringer's solution (KRS) and resuspended prior to introduction into animal in 2.0 ml of KRS. Sterility of cHCBL was assessed according to the methodical recommendations [17].

The mice were divided into 7 groups. The animals of experimental groups 1–6 of 2 months old were intranasally administered with: 1) 0.05 ml cHCBL ( $(6 \pm 2) \times 10^5$  cells/mice) one-fold ( $n = 21$ ); 2) 0.05 ml cHCBL plasma one-fold; 3) cHCBL NC of 0.05 ml ( $(6 \pm 2) \times 10^5$  cells/mice) one-fold ( $n = 21$ ); 4) A/Victoria influenza virus of  $LD_{25/10}$  ( $n = 21$ ); 5) 14 IU of Interferon (Laferobion, Arterium, Ukraine) 5 times a day during 3 days ( $n = 21$ ); 6) 0.05 ml of physiological saline (0.9% NaCl, Yuria-Pharm, Ukraine) one-fold ( $n = 21$ ). Group 7 comprised the intact mice ( $n = 7$ ).

Six months later the administration of the mentioned substrates 14 animals (among 21) of each experimental groups were intranasally infected with influenza virus A/Victoria of  $LD_{100/10}$ . Non-infected mice of these groups made the control ( $n = 7$ ).

Influenza virus (A/Victoria strain (H3N2), procured from the Scientific Research Institute of Influenza of the Russian Academy of Medical Sciences, St. Petersburg, Russia) was exposed to 6 passages in white mice and 2 passages in avian embryos. Titer of hemagglutinins of infected allantoic fluid was 1:512, infectious titer made  $10^4 LD_{50/10}$ .

The material for assessment was procured from mice of groups 1–6 6 months later the administration of the mentioned substrates and in 7 and 14 days after infection with influenza virus. To obtain the alveolar macrophages the mice after cutting of inferior *vena cava* and exsanguination were thrice subjected to bronchoalveolar lavage (BAL) by 1.0 ml sterile KRS at 37°C using endotracheal catheter [19]. The obtained cell suspension was centrifuged at 170g for 5 min at 21–22°C. Supernatant was removed, the sedimented



мышьях и 2 пассажа на куриных эмбрионах. Титр гемагглютининов инфицированной аллантаической жидкости соответствовал 1:512, инфекционный титр –  $10^4$  LD<sub>50</sub>/10.

Забор исследуемого материала у мышей групп 1–6 проводили через 6 месяцев после введения указанных субстратов и на 7- и 14-е сутки после инфицирования вирусом гриппа. Для получения альвеолярных макрофагов мышам после перерезания нижней полой вены и обескровливания троекратно проводили бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ) по 1,0 мл стерильным РФБ при 37°C с помощью интратрахеального катетера [19]. Полученную клеточную суспензию центрифугировали при 170g в течение 5 мин при температуре 21...22°C. Надосадочную жидкость удаляли, осевшие клетки ресуспендировали в 2,0 мл среды Хенкса («ИПВЭ им. М.П. Чумакова РАМН, Россия»). Концентрацию клеток подсчитывали в камере Горяева [8] и доводили до  $1 \times 10^6$  кл./мл. Цитологический состав и фагоцитарную активность клеток БАЛ определяли в мазках, окрашенных азур II-эозином по Романовскому [8] с использованием светового микроскопа ЛОМО (ок. 10, об. 40, 90).

Фагоцитарную активность определяли по методу М.Г. Александрова и соавт. [1]: оценивали фагоцитарный индекс (ФИ), фагоцитарное число (ФЧ), абсолютный показатель фагоцитарной активности (АПФА) альвеолярных макрофагов.

Экспрессию молекул CD11b (Mac-1) определяли на клетках БАЛ методом проточной цитофлуориметрии («FACS Calibur», «BD», США) с использованием моноклональных антител FITC anti-mouse CD11b с изотипом Rat IgG2b («BD», США) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Статистический учёт данных, полученных после цитофлуориметрического анализа, осуществляли с помощью программы WinMDI 2.8 (стандартный пакет).

Статистическую обработку полученных результатов проводили по методу Стьюдента с учетом коэффициента Фишера. Различия между выборками считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ . Данные представлены в виде среднего  $\pm$  стандартной ошибки среднего.

### Результаты и обсуждение

По результатам цитологического анализа БАЛ можно определить степень выраженности воспалительной реакции в бронхолегочной системе, охарактеризовать направленность происходящих процессов, спрогнозировать исход заболевания [13]. При исследовании морфологического состава БАЛ у неинфицированных мышей групп 1–6 не выявлено

cells were resuspended in 2.0 ml Hank's solution (Institute of Polymyelitis and Viral Encephalitis, Russia). Cell concentration was calculated in Goryaev's chamber [9] and the suspension was diluted to get  $1 \times 10^6$  cells/ml. Cytological composition and phagocytic activity of BAL cells were determined in the smears stained with azure II-eosin according Romanowsky [9] using light microscope LOMO (magnification 400 and 900).

Phagocytic activity was determined according method of Aleksandrov *et al.* [1]: phagocytic index (PI), phagocytic number (PN), and absolute index of phagocytic activity (AIPA) of alveolar macrophages were assessed.

Expression of CD11b (Mac-1) molecules was assessed in BAL cells using flow cytometry (FACS Calibur, BD, USA), and monoclonal antibodies FITC anti-mouse CD11b with Rat IgG2b isotype (BD, USA) according to the manufacturer recommendations. The data obtained after flow cytometry analysis were statistically processed with WinMDI 2.8 software (standard package).

The obtained data were statistically processed by Student-Fisher test. Differences were considered as significant at  $p < 0.05$ . The data are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean.

### Results and discussion

Cytological analysis of BAL allows to assess the intensity of inflammatory response in bronchopulmonary system, characterize the targeting of the processes, and predict the disease outcome [13]. In our study the morphological composition of BAL in non-infected mice of the groups 1–6 had no significant differences if compared to the intact control (Fig. 1). The derived lavages mainly contained alveolar macrophages (65–71%), lymphocytes (10–13.5%), and small number of neutrophils, eosinophils, basophils (0–1%) and epithelial cells.

To the 7<sup>th</sup> day after infection with influenza virus a significant redistribution in cell composition of BAL was observed in mice of the studied groups (Fig. 2). For example, in mice of group 1 the number of alveolar macrophages and basophils was twice increased ( $p < 0.05$ ), and the number of lymphocytes and epithelial cells was 10 and 2.5 times decreased, respectively, testifying to the development of inflammation in lungs as a response to introduction of influenza virus A.

The number of basophilic granulocytes in BAL in infected mice of the second group was 6 times higher than of the intact control ( $p < 0.05$ ). Concentration of lymphocytes was 4 times decreased. The number of neutrophils and epithelial cells remained at the level of group control. The obtained data attested more ex-



статистически значимых отличий по сравнению с интактным контролем (рис. 1). В полученных смывах преобладали альвеолярные макрофаги (65–71%) и лимфоциты (10–13,5%), в небольшом количестве определялись нейтрофилы, эозинофилы, базофилы (0–1%) и эпителиальные клетки.

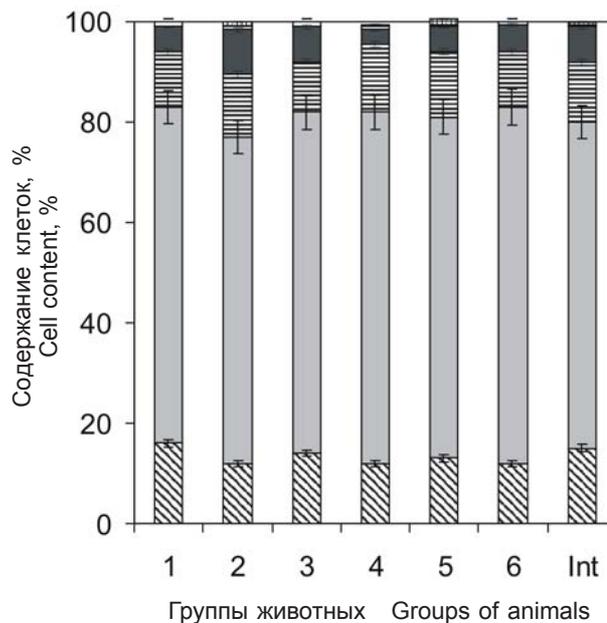
На 7-е сутки после инфицирования вирусом гриппа у мышей исследуемых групп наблюдали значимое перераспределение в клеточном составе БАЛ (рис. 2). Так, у мышей группы 1 в 2 раза увеличилось количество альвеолярных макрофагов и базофилов ( $p < 0,05$ ), а количество лимфоцитов и эпителиальных клеток снизилось в 10 и 2,5 раза соответственно, что свидетельствовало о развитии воспалительного процесса в лёгких в ответ на внедрение вируса гриппа А/Виктория.

У инфицированных мышей группы 2 количество базофильных гранулоцитов в БАЛ было в 6 раз выше значений интактного контроля ( $p < 0,05$ ). Концентрация лимфоцитов снизилась в 4 раза. На уровне показателей контрольных животных группы оставалось количество нейтрофилов и эпителиальных клеток. Полученные данные свидетельствуют о более выраженном воспалительном процессе в лёгких мышей данной группы по сравнению с животными группы 1 на 7-е сутки после инфицирования.

У инфицированных мышей группы 3 увеличилось количество базофилов, эозинофилов и эпителиальных клеток в 10, 4 и 1,4 раза соответственно по сравнению с интактным контролем ( $p < 0,05$ ), что подтвердило факт развития острого воспаления с элементами аллергической реакции. При этом концентрация альвеолярных макрофагов оставалась на уровне контроля группы, что может свидетельствовать о задержке миграции клеток МФС в очаг воспаления.

В группе 4 отмечали незначимое увеличение в БАЛ инфицированных животных количества альвеолярных макрофагов в 1,2 раза при снижении в 1,7 раза лимфоидных и в 2 раза эпителиальных клеток относительно показателей интактного контроля (рис. 2). Содержание зрелых гранулоцитов достоверно не отличалось от показателей контроля группы. Полученные данные также свидетельствовали о развитии воспалительной реакции в лёгких мышей к 7-м суткам после инфицирования гриппом.

У инфицированных мышей групп 5 и 6 на 7-е сутки развития гриппа отмечалось повышение содержания нейтрофильных, эозинофильных, базофильных гранулоцитов, а также дегенеративно измененных эпителиальных клеток, при этом количество альвеолярных макрофагов было в 1,2 ра-



**Рис. 1.** Клеточный состав БАЛ у мышей через 6 месяцев после введения КЛККЧ и его компонентов: ▨ – эпителиальные клетки; □ – альвеолярные макрофаги; □ – лимфоциты; ■ – нейтрофилы; □ – эозинофилы; □ – базофилы; Int – интактные животные.

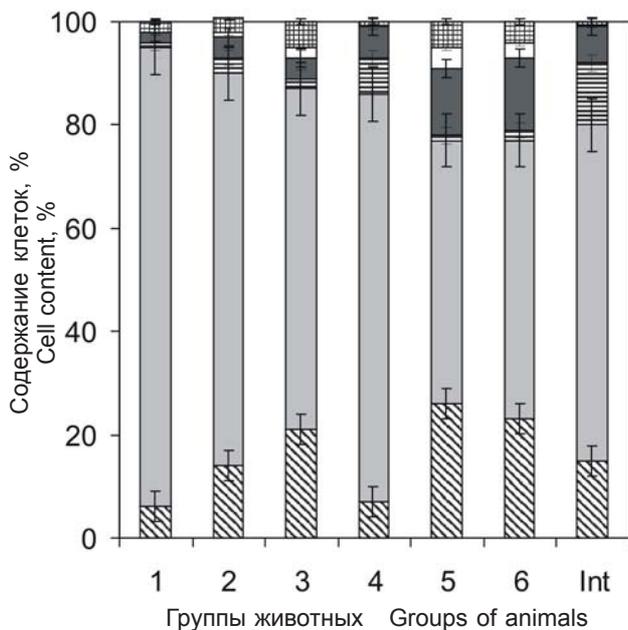
**Fig. 1.** Cell composition of BAL in the mice 6 months after cHCBL and its components introduction: ▨ – epithelial cells; □ – alveolar macrophages; □ – lymphocytes; ■ – neutrophils; □ – eosinophils; □ – basophils; Int – intact animals.

pressed inflammatory process in lungs of mice of this group comparing with the animals of the 1<sup>st</sup> group to the 7<sup>th</sup> day after infection.

Infected mice of the group 3 had 10; 4 and 1.4 times increased number of basophils, eosinophils and epithelial cells, respectively, compared to the intact control ( $p < 0.05$ ) indicating the development of acute inflammation with elements of hypersensitivity reaction. It should be noted that concentration of alveolar macrophages remained at the control level probably indicating the delay of MPS cells migration into focus of inflammation.

In group 4 we noted insignificant (1.2 times) increase in BAL of alveolar macrophages number and 1.7 times decrease of lymphoid cells and 2 times decrease of epithelial ones with respect to the indices of the intact control (Fig. 2). The content of mature granulocytes differed insignificantly from the group control indices. The findings also testified to the development of inflammation reaction in lungs of the mice to the 7<sup>th</sup> day after infection with influenza virus.

In mice of the experimental groups 5 and 6 to the 7<sup>th</sup> day of influenza development we noted the rise in the content of neutrophil, eosinophil, basophil granulocytes as well as degeneratively changed epithelial



**Рис. 2.** Клеточный состав БАЛ у мышей на 7-е сутки после инфицирования вирусом гриппа А: ▨ – эпителиальные клетки; ■ – альвеолярные макрофаги; □ – лимфоциты; ■ – нейтрофилы; □ – эозинофилы; □ – базофилы; Int – интактные животные.

**Fig. 2.** Cell composition of BAL in the mice to the 7<sup>th</sup> day after infection with influenza virus A: ▨ – epithelial cells; ■ – alveolar macrophages; □ – lymphocytes; ■ – neutrophils; □ – eosinophils; □ – basophils; Int – intact animals.

за ниже показателей контроля группы. Такая картина, вероятнее всего, свидетельствовала о активном течении патологических процессов у мышей данных групп, формировании аллергической настроенности организма, создании предпосылок для развития отёка лёгких [4]. Полученные результаты подтверждаются данными работы В.И. Совалкина и соавт., в которой показано, что при выраженном воспалении число нейтрофильных лейкоцитов в БАЛ резко увеличивается, а значительное снижение содержания альвеолярных макрофагов, вероятно, свидетельствует об истощении макрофагального звена иммунитета [14].

При исследовании клеточного состава БАЛ у инфицированных животных всех групп на 14-е сутки после инфицирования тенденцию к репарации ткани лёгких отмечали только у мышей группы 1, у которых сохранялось повышенное содержание (в 1,2 раза) альвеолярных макрофагов при сниженном в 1,5 раза количестве лимфоцитов, в 3,5 раза нейтрофилов и 1,8 раза эпителиальных клеток относительно показателей интактного контроля (рис. 3). В этот период у инфицированных мышей групп 2 и 3 в БАЛ оставалось повышенным в 2 раза количество нейтрофилов и 1,2–2 раза эпителиальных

cells, moreover the number of alveolar macrophages was 1.2 times lower than the control values. This probably indicated to a significant activity of alteration processes in mice of these groups, formation of organism's allergy disposition, providing the conditions for development of pulmonary edema [4]. Our findings are confirmed by the data of the paper of Sovalkin *et al.*, showing that at severe inflammation the number of neutrophilic leukocytes in BAL is dramatically increased, and significant reduction in content of alveolar macrophages presumably indicates to the exhaustion of immunity macrophagal link [14].

Analyzing the cell composition of BAL in infected animals of all the groups to the 14<sup>th</sup> day after infection we observed the tendency to lung tissue reparation only in the mice of group 1, in which an increased content (1.2 times) of alveolar macrophages was preserved, and decreased number of lymphocytes (1.5 times), neutrophils (3.5 times), and epithelial cells (1.8 times) in respect to the indices of intact control was found (Fig. 3). In this period, the infected mice of groups 2 and 3 exhibited the number of neutrophils as 2 times increased and number of epithelial cells as 1.2–2 times increased comparing to the group control, and the macrophages content was 1.2–1.4 times lower comparing to the group control ( $p < 0.05$ ). This attested the proceeding inflammation induced by causative agent of influenza and remnants of the cells infected with virus. In infected mice of group 4 the indices of BAL differed insignificantly from the group control, but a relative lymphocytosis was preserved if compared to the intact group. This fact was probably associated with the attenuation of inflammation and started recovery. All the animals of groups 5 and 6 to the 10<sup>th</sup> day died so no data of BAL cell composition on the 14<sup>th</sup> day after infection could be presented. It was found previously that the main cause of death of the mice infected with lethal dose of A/Victoria influenza virus is the development of hemorrhagic edema-pneumonia [2].

One of the characteristics of alveolar macrophage functional activity is known to be their ability to phagocytosis. Namely the rate of their reaction and intensity of response to antigen affects the outcome and duration of inflammation [11].

The data obtained from the study of the alveolar macrophage phagocytic activity in mice prior to and after infection with influenza virus A are presented in Table. It was found that prior to virus infection in mice of group 1 the PI was increased in 1.2, PN in 1.5 and AIPA in 1.3 times if compared with the intact animals. In control mice of group 2 only PN was significantly increased (in 1.4 times). In non-infected mice of the groups 3–6 the indices of phagocytic activity were not

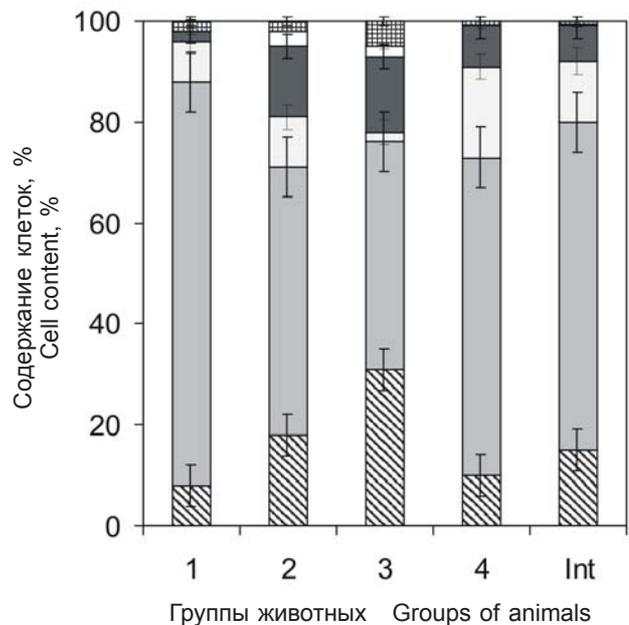


клеток при сниженном в 1,2–1,4 раза содержании макрофагов ( $p < 0,05$ ), что свидетельствовало о продолжающемся воспалительном процессе, вызванном возбудителем гриппа и продуктами распада инфицированных вирусом клеток. У инфицированных мышей группы 4 показатели БАЛ значимо не отличались от контроля группы, однако сохранялся незначительный лимфоцитоз по сравнению с интактной группой. Данный факт, вероятно, связан с затуханием воспалительного процесса и формированием состояния реконвалесценции (рис. 3). Все инфицированные животные групп 5 и 6 к 10-м суткам погибли, поэтому данные о клеточном составе БАЛ на 14-е сутки после инфицирования не представлены. Ранее было показано, что основной причиной гибели мышей, инфицированных летальной дозой вируса гриппа А, является развитие геморрагического отёка-пневмонии [2].

Известно, что одной из характеристик функциональной активности альвеолярных макрофагов является их способность к фагоцитозу. Именно от скорости их реагирования и интенсивности ответа на антиген зависит исход и продолжительность воспалительной реакции [11].

Данные, полученные при исследовании фагоцитарной активности альвеолярных макрофагов у мышей до и после инфицирования вирусом гриппа А, представлены в таблице и на рис.4. Так, до инфицирования вирусом у мышей группы 1 отмечали повышение ФИ в 1,2, ФЧ в 1,5 и АПФА в 1,3 раза по сравнению с интактным контролем. У контрольных мышей группы 2 значимо повышалось (в 1,4 раза) только ФЧ. У неинфицированных мышей групп 3–6 показатели фагоцитарной активности статистически значимо не отличались от уровня интактного контроля. Следовательно, альвеолярные макрофаги у мышей групп 1 и 2 до инфицирования вирусом гриппа А были функционально более активными, чем в группах 3–6. Полученные данные свидетельствуют о том, что именно нефракционированный кЛККЧ и его плазма в большей степени, чем ЯСК кЛККЧ, оказывают стимулирующее действие на фагоцитарную активность альвеолярных макрофагов.

У животных группы 1 на 7-е сутки после инфицирования фагоцитарная активность альвеолярных макрофагов была выше по сравнению с интактным контролем и неинфицированными мышами этой группы. Фагоцитарный индекс увеличился в 1,3, а фагоцитарное число – в 2 раза относительно показателей интактного контроля ( $p < 0,05$ ). В группах 2, 3 и 4 повышение фагоцитарной активности альвеолярных макрофагов на 7-е сутки после инфицирования было менее выражено по сравнению



**Рис. 3.** Клеточный состав БАЛ у мышей на 14-е сутки после инфицирования вирусом гриппа А/Виктория: ▨ – эпителиальные клетки; ■ – альвеолярные макрофаги; □ – лимфоциты; ■ – нейтрофилы; □ – эозинофилы; ▨ – базофилы; Int – интактные животные.

**Fig. 3.** Cell composition of BAL in mice to the 14<sup>th</sup> day after infection with influenza virus A/Victoria: ▨ – epithelial cells; ■ – alveolar macrophages; □ – lymphocytes; ■ – neutrophils; □ – eosinophils, ▨ – basophils; Int – intact animals.

significantly differed from the control. Therefore, the alveolar macrophages in mice of groups 1 and 2 prior to infection with influenza virus A were more active than the cells in groups 3–6. The obtained data testify to the fact that namely unfractionated cHCBL and its plasma stimulate the phagocytic activity of alveolar macrophages in greater extent if compared to NC of cHCBL.

In the animals of the group 1 the phagocytic activity of alveolar macrophages in 7 day after infection was higher if compared with intact animals and non-infected mice of this group. Phagocytic index was increased in 1.3, and phagocytic number enhanced in 2 times comparing to the intact control indices ( $p < 0.05$ ). In the groups 2, 3 and 4 the increasing of phagocytic activity of alveolar macrophages to the 7<sup>th</sup> day after infection was less expressed if compared with the indices of the group 1. In infected animals of groups 5 and 6 at the same observation period the PN was 1.5 times higher comparing to intact mice, PI and AIPA were not significantly differed from the intact control, that was associated with the decreasing of alveolar macrophages number in BAL.

To the 14<sup>th</sup> day of influenza development in the mice of the group 1 all the indices of phagocytic activity

с показателями группы 1. У инфицированных животных групп 5 и 6 в этот же период наблюдения ФЧ было в 1,5 раза выше, чем у интактных мышей, ФИ и АПФА достоверно не отличались от интактного контроля, что связано с уменьшением количества альвеолярных макрофагов в БАЛ.

На 14-е сутки развития гриппа у мышей группы 1 все показатели фагоцитарной активности макрофагов значимо ( $p < 0,05$ ) превышали контрольные значения. Подобного рода изменения могут свидетельствовать об активации процессов репарации, поскольку клетки МФС принимают участие не только в элиминации патогенов из организма, но и в удалении продуктов распада клеток, погибших в результате вирусной экспансии. В группах 2 и 3 в этот срок наблюдения ФЧ и ФИ инфицированных животных превышали показатели контрольных ( $p < 0,05$ ), однако суммарный показатель фагоцитарной активности альвеолярных макрофагов достоверно не отличался от показателей интактных животных, что может быть обусловлено снижением содержания макрофагов в БАЛ. У инфицированных мышей группы 4 в этот период сохранялось повышение ФИ, а ФЧ и АПФА соответствовали показателям группы 7.

В данной работе определяли концентрацию клеток, содержащих рецептор CD11b (Mac-1, CR3), который, помимо рецепторной функции, выполняет роль молекулы межклеточной адгезии [9]. Он принимает непосредственное участие в процессе миграции клетки, клеточно-опосредованной цитотоксичности, фагоцитозе частиц, опсонизированных iC3b, хемотаксисе и активации клеток. Рецептор CD11b опосредует взаимодействия бронхоальвеолярных клеток друг с другом, количество которых на мембране альвеолярных макрофагов может варьировать при разных патологических процессах [10]. Запуск Fc-опосредованной цитотоксичности возможен только после активации рецепторов адгезии CD11b, которые являются

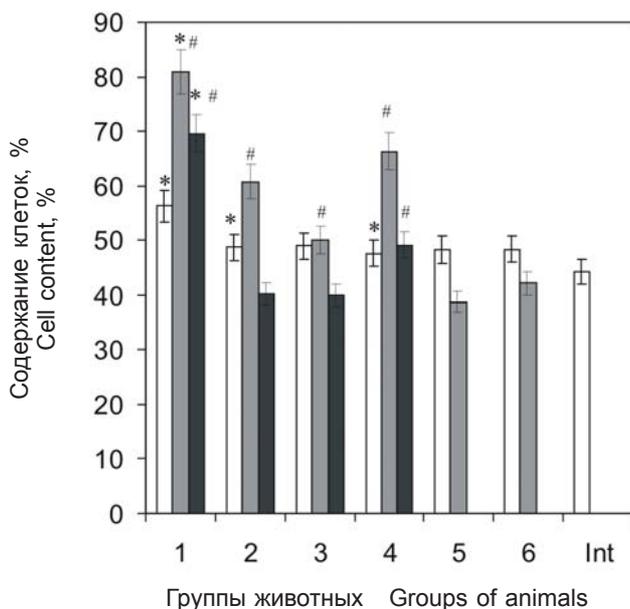
Показатели фагоцитарной активности альвеолярных макрофагов у мышей до и после инфицирования вирусом гриппа,  $M \pm m$   
Indices of phagocytic activity of alveolar macrophages in mice prior to and after infection with influenza virus,  $M \pm m$

Группы животных Groups of animals	Показатели Indices	Неинфицированные мыши (контроль) Non-infected mice (control)	Инфицированные мыши Infected mice	
			7-е сутки 7 <sup>th</sup> day	14-е сутки 14 <sup>th</sup> day
1	ФИ, % PI, %	84,1 ± 5,4*	91,0 ± 5,5**	87,3 ± 5,5*
	ФЧ, абс.ед. PN, abs. units	5,1 ± 0,3*	7,3 ± 0,4**	6,7 ± 0,4*
	АМ, ×10 <sup>6</sup> кл/мл AM, ×10 <sup>6</sup> cells/ml	0,66 ± 0,04	0,9 ± 0,05**	0,82 ± 0,05*
2	ФИ, % PI, %	75,2 ± 4,5	80,1 ± 4,8*	75,8 ± 4,6
	ФЧ, абс.ед. PN, abs. units	4,8 ± 0,3*	5,4 ± 0,3*	5,6 ± 0,34*
	АМ, ×10 <sup>6</sup> кл/мл AM, ×10 <sup>6</sup> cells/ml	0,65 ± 0,04	0,76 ± 0,05**	0,52 ± 0,03*
3	ФИ, % PI, %	72,1 ± 4,3	75,7 ± 4,5	88,7 ± 5,3*
	ФЧ, абс.ед. PN, abs. units	3,9 ± 0,3	5,1 ± 0,3*	5,2 ± 0,3*
	АМ, ×10 <sup>6</sup> кл/мл AM, ×10 <sup>6</sup> cells/ml	0,66 ± 0,04	0,67 ± 0,04#	0,45 ± 0,03*
4	ФИ, % PI, %	68,3 ± 4,1	84,2 ± 5,0	77,8 ± 4,6*
	ФЧ, абс.ед. PN, abs. units	3,6 ± 0,2	4,6 ± 0,3*	4,2 ± 0,3
	АМ, ×10 <sup>6</sup> кл/мл AM, ×10 <sup>6</sup> cells/ml	0,71 ± 0,04	0,81 ± 0,05**	0,62 ± 0,037
5	ФИ, % PI, %	71,1 ± 4,2	75,9 ± 4,5	-
	ФЧ, абс.ед. PN, abs. units	3,2 ± 0,2	5,0 ± 0,3*	-
	АМ, ×10 <sup>6</sup> кл/мл AM, ×10 <sup>6</sup> cells/ml	0,68 ± 0,048	0,5 ± 0,03*	-
6	ФИ, % PI, %	73,8 ± 4,4	78,1 ± 4,7	-
	ФЧ, абс.ед. PN, abs. units	3,5 ± 0,2	4,8 ± 0,3*	-
	АМ, ×10 <sup>6</sup> кл/мл AM, ×10 <sup>6</sup> cells/ml	0,71 ± 0,05	0,54 ± 0,03	-
7 Интактные животные Intact animals	ФИ, % PI, %	68,1 ± 4,0	-	-
	ФЧ, абс.ед. PN, abs. units	3,4 ± 0,2	-	-
	АМ, ×10 <sup>6</sup> кл/мл AM, ×10 <sup>6</sup> cells/ml	0,65 ± 0,04	-	-

**Примечания:** АМ – абсолютное число альвеолярных макрофагов в БАЛ мышей; различия значимы по сравнению с: \* – интактным контролем (группа 7); # – группой 6 на 7-е сутки после инфицирования вирусом гриппа А/Виктория ( $p \leq 0,05$ ).

**Note:** AM – number of alveolar macrophages in BAL of mice; the differences are significant if compared with: \* – intact control (group 7); # – group 6 to the 7<sup>th</sup> day after infection ( $p \leq 0.05$ ).





**Рис. 4.** Абсолютный показатель фагоцитарной активности альвеолярных макрофагов у мышей до и после инфицирования вирусом гриппа А/Виктория: □ – до инфицирования; ■ – на 7-е сутки после инфицирования; ■ – на 14-е сутки после инфицирования. Различия значимы по сравнению с: \* – интактным контролем (группа 7); # – группой 6 на 7-е сутки после инфицирования ( $p < 0,05$ ).

**Fig. 4.** Absolute index of phagocytic activity of alveolar macrophages in mice prior to and after infection with influenza virus A/Victoria: □ – prior to infection; ■ – to the 7<sup>th</sup> day after infection; ■ – to the 14<sup>th</sup> day after infection. The differences are significant if compared with: \* – intact control (group 7); # – group 6 to the 7<sup>th</sup> day after infection ( $p < 0.05$ ).

одновременно и рецепторами адгезии комплемента, связывающего С3-компонент комплемента [9].

Содержание CD11b<sup>+</sup>-клеток в БАЛ у контрольных мышей групп 1–6 до инфицирования вирусом значительно не отличается от данного показателя интактного контроля (рис. 5). Средняя интенсивность флуоресценции (СИФ) в контроле группы 1 на 65% была выше значений интактного контроля (рис. 6). Такое повышение СИФ можно объяснить увеличением числа рецепторов на клетках БАЛ, что позволило клеткам животных этих групп эффективнее реагировать на патоген при инфицировании животных.

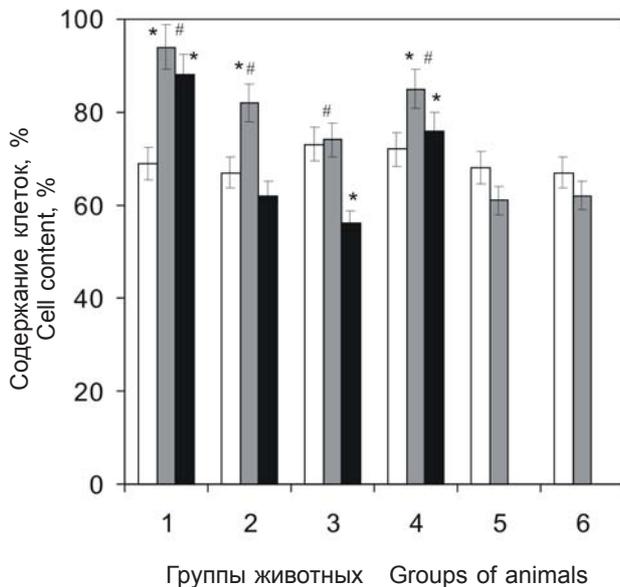
Так, при исследовании содержания CD11b<sup>+</sup>-клеток и СИФ на 7-е сутки после инфицирования летальной дозой вируса гриппа у мышей групп 1–4 в БАЛ наблюдали увеличение концентрации этих клеток по сравнению с интактным контролем (рис. 5, 6). Это может быть связано с повышенной напряженностью фагоцитарной активности в процессе формирования иммунного ответа. У инфицированных мышей групп 5 и 6 на 7-е сутки количество CD11b<sup>+</sup>-клеток в БАЛ было ниже, а СИФ выше, чем в интактном контроле, что может быть связано с гибелью фагоцитов и компенсаторным увеличением количества рецепторов адгезии на альвеолярных макрофагах при формировании иммунной защиты.

На 14-е сутки после инфицирования гриппом у мышей группы 1 количество CD11b<sup>+</sup>-клеток и СИФ в БАЛ превышали показатели интактного контроля. В группе 2 содержание CD11b<sup>+</sup>-клеток в БАЛ инфицированных животных было таким, как и до инфицирования, а СИФ в 2 раза была выше интактного контроля. Количество CD11b<sup>+</sup>-клеток у инфи-

of macrophages were significantly higher ( $p < 0.05$ ) than the control values. These changes may testify to activation of reparation processes, since the cells of MPS contribute not only to elimination of pathogens in an organism, but to removal of cell remnants, left after their death due to viral expansion. In the groups 2 and 3 the indices of PN and PI in infected animals in this observation period exceeded the group control indices ( $p < 0.05$ ), however, the total index of phagocytic activity of alveolar macrophages was not significantly differed from the indices of the intact animals, that may be stipulated by reduced content of macrophages in the BAL. In the infected mice of the group 4 an increased PI was preserved in this period, but PN and AIPA were the same as in the group 7.

Performing this research we established concentration of the cells, containing CD11b receptor (Mac-1, CR3), which along with receptor function fulfilled the role of molecule of cell-cell adhesion [9]. It is directly involved to cell migration, cell-mediated cytotoxicity, phagocytosis of iC3b opsonized particles, chemotaxis and cell activation. CD11b receptor mediates interaction of bronchoalveolar cells, the receptors number on the membrane of alveolar macrophages may vary at different pathologies [10]. Initiation of Fc-mediated cytotoxicity is possible only after activation of CD11b adhesion receptors, which also are the complement receptors, binding C3 component of the complement [9].

The content of CD11b<sup>+</sup> cells in BAL in control mice of the groups 1–6 prior to infection did not significantly differ from this index of the intact control (Fig. 5). Mean fluorescent intensity (MFI) in the group 1 control was by 65% higher than intact control values (Fig. 6). This increasing of MFI may be explained by the increa-



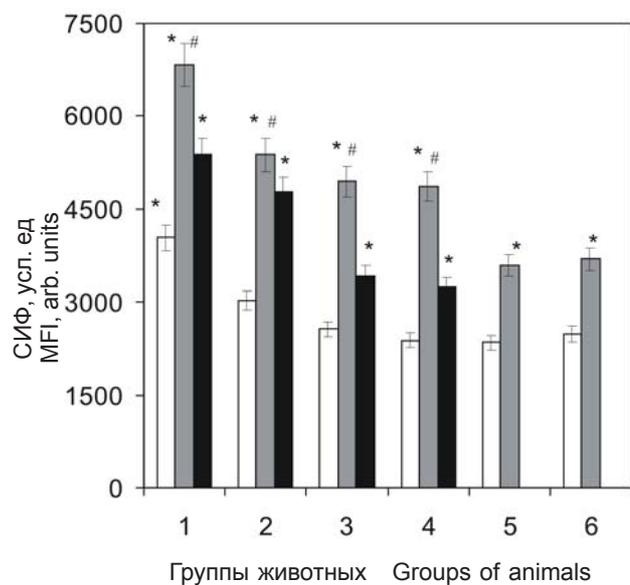
**Рис. 5.** Количество CD11b<sup>+</sup>-клеток в БАЛ у мышей до и после инфицирования вирусом гриппа А/Виктория: □ – до инфицирования; ▒ – на 7-е сутки после инфицирования; ■ – на 14-е сутки после инфицирования. Различия значимы по сравнению с: \* – интактным контролем (группа 7); # – группой 6 на 7-е сутки после инфицирования ( $p < 0,05$ ).

**Fig. 5.** Number of CD11b<sup>+</sup>-cells in BAL of mice prior to and after infection with influenza virus A/Victoria: □ – prior to infection; ▒ – to the 7<sup>th</sup> day after infection; ■ – to the 14<sup>th</sup> day after infection. The differences are significant if compared with: \* – intact control (group 7); # – group 6 to the 7<sup>th</sup> day after infection ( $p < 0.05$ ).

цированных мышей группы 3 было ниже, а СИФ выше, чем в интактном контроле, в группе 4 количество CD11b<sup>+</sup>-клеток у инфицированных животных совпадало с показателем контрольных, а СИФ превышала значения интактного контроля (рис. 5, 6).

Таким образом, у инфицированных мышей групп 5 и 6 отмечены развитие выраженного воспалительного процесса в дыхательных путях и формирование вторичного иммунодефицита за счёт снижения активности альвеолярных макрофагов (см. рис. 4). У животных групп 1–3, которые получали кЛККЧ или его компоненты за 6 месяцев до инфицирования, деструктивные изменения в респираторном тракте были менее выражены, а активность альвеолярных макрофагов, относящихся к факторам неспецифической защиты, не отличалась от интактного контроля. Наибольший защитный потенциал был отмечен у животных, превентивно получавших нефракционированный кЛККЧ до инфицирования вирусом гриппа.

В работе Tumitany A.R. *et al.* указано, что у мышей Balb/c, используемых в эксперименте, пре-



**Рис. 6.** Средняя интенсивность флуоресценции CD11b<sup>+</sup>-клеток в БАЛ мышей до и после инфицирования вирусом гриппа А/Виктория: □ – до инфицирования; ▒ – на 7-е сутки после инфицирования; ■ – на 14-е сутки после инфицирования. Различия достоверны по сравнению с: \* – интактным контролем (группа 7); # – группой 6 на 7-е сутки после инфицирования ( $p < 0,05$ ).

**Fig. 6.** Mean fluorescent intensity of CD11b<sup>+</sup> cells in BAL of mice prior to and after infection with influenza virus A/Victoria: □ – prior to infection; ▒ – to the 7<sup>th</sup> day after infection; ■ – to the 14<sup>th</sup> day after infection. The differences are significant if compared with: \* – intact control (group 7); # – group 6 to the 7<sup>th</sup> day after infection ( $p < 0.05$ ).

sed number of receptors in BAL cells, that could enable the cells from animals of these groups to reveal pathogen more rapidly and effectively after infection introduction.

In particular, assessment of the content of CD11b<sup>+</sup> cells and MFI to the 7<sup>th</sup> day after infection introduction with lethal dose of influenza virus in BAL of mice of the groups 1–4 in revealed the increased concentration of these cells if compared with the intact control (Fig. 5, 6). This may be associated with higher phagocytic activity during immune response formation. In the infected mice of the groups 5 and 6 to the 7<sup>th</sup> day the number of CD11b<sup>+</sup> cells in BAL was lower, but MFI was higher than in the intact control that may be associated with death of phagocytes and compensatory increase of adhesion receptors number in alveolar macrophages during immune response.

To the 14<sup>th</sup> day after influenza virus infection introduction in mice of the group 1 a number of CD11b<sup>+</sup> cells and MFI in BAL exceeded the indices of intact control. In the group 2 the content of CD11b<sup>+</sup> cells in BAL was the same as prior to infection, but MFI was 2 times higher than the one of the intact control.



обладают макрофаги с фенотипом M2 [22], которые в естественных для них условиях обладают более высокой миграционной активностью по сравнению с клетками фенотипа M1, ответственными за развитие воспалительного процесса за счёт прямого цитотоксического действия и продукции провоспалительных цитокинов и хемокинов [21]. Макрофаги с фенотипом M2 преимущественно отвечают за фагоцитирование фрагментов погибших клеток, что определяет их центральную роль в процессах ремоделирования и восстановления повреждённых тканей [19, 22]. На основании полученных нами данных установлено, что на 14-е сутки после инфицирования у мышей группы 1, которым вводили нефракционированный кЛККЧ, в большей степени, чем в группах мышей, получавших отдельно плазму или ядродержащие клетки кЛККЧ, отмечалась активация макрофагов, функционально предназначенных для регулирования воспалительного ответа и восстановления иммунного гомеостаза.

Снижение экспрессии CD11b на клетках БАЛ, принимающих участие в иммунном ответе, коррелирует с интенсивностью воспалительного процесса в лёгких [6], наиболее выраженном у инфицированных мышей групп 5 и 6. Повышение степени экспрессии CD11b у инфицированных животных, которым предварительно были введены кЛККЧ или его компоненты, имеет прямую зависимость с повышением фагоцитарной активности альвеолярных макрофагов.

Известно, что на первых этапах внедрения патогена ведущую роль играют неспецифические факторы иммунологической защиты [11, 15]. Поэтому перспективным направлением в медицине является разработка средств, не только создающих иммунологический барьер на слизистых оболочках после интраназального введения, но и повышающих активность альвеолярных макрофагов, ответственных за формирование местной воспалительной реакции в дыхательных путях. На основании полученных данных можно заключить, что превентивно введенный нефракционированный кЛККЧ в большей степени, чем его отдельные компоненты, влияет на выраженность воспалительной реакции, модулирует фагоцитарную активность альвеолярных макрофагов, повышая экспрессию рецепторов адгезии на них, обеспечивает формирование адекватного иммунного ответа на патоген. Превентивное введение кЛККЧ препятствовало развитию вторичного иммунодефицита у экспериментальных животных за счёт регулирования активности факторов неспецифической защиты (альвеолярных макрофагов).

The number of CD11b<sup>+</sup> cells in mice of the group 3 was lower and MFI was higher than in the intact control, in the group 4 a number of CD11b<sup>+</sup> cells in infected mice coincided with that in the control animals, and MFI exceeded the intact values (Fig. 5, 6).

Thus, the mice of the groups 5 and 6 exhibited a significant inflammatory process in respiratory passages and formed secondary immunodeficiency due to reduction of alveolar macrophage activity (Fig. 4). In the animals of the groups 1–3, which were treated with cHCBL or its components 6 months prior to infection, the destructive changes in respiratory tract were less expressed and activity of alveolar macrophages, as a factor of non-specific protection did not differ from the intact control. The highest protective potential was revealed in the animals, which were treated with unfractionated cHCBL prior to infection with influenza virus.

Tumitany *et al.* showed that experimental Balb/c mice, had the prevailed content of macrophages with M2 phenotype [22], which under natural conditions had higher migration activity if compared with the cells of M1 phenotype, responsible for development of inflammatory process due to a direct cytotoxic action and production of anti-inflammatory cytokines and chemokines [21]. Macrophages with M2 phenotype are responsible mainly for elimination of fragments of died cells, that determine their central role in remodelling and regeneration of injured tissues [19, 22]. Our results showed that by the 14<sup>th</sup> day after infection in the mice of the group 1 treated with unfractionated cHCBL there was revealed activation of macrophages which were functionally targeted for the control of inflammatory response and immune balance restoration and this was in a greater extent than in the groups of mice, treated with solely plasma or nucleated cells of cHCBL.

Reduction of CD11b expression in BAL cells, taking part in immune response correlated with intensity of inflammation in lungs which was the most expressed in the infected mice of the groups 5 and 6. The increasing of CD11b expression in infected animals pretreated with cHCBL or its components depended directly on the increasing of phagocytic activity of alveolar macrophages.

It is known that early stages of pathogen introduction are characterised with activity of non-specific factors of immunological defense [11, 15]. Therefore the development of the medicines, which provide not only an immune barrier in mucous membranes after intranasal administration, but also increase the activity of alveolar macrophages responsible for the formation of local inflammatory response in respiratory passages is

## Выводы

1. Превентивное интраназальное введение кЛККЧ или его компонентов модифицирует функциональную активность альвеолярных макрофагов.

2. Применение нефракционированного кЛККЧ в большей степени, чем его компонентов, повышает функциональную активность альвеолярных макрофагов в условиях развития вирусной инфекции.

## Литература

1. Александров М.Г., Кудрявицкий А.И., Румянцева Е.Г. и др. Метод вычисления абсолютных показателей фагоцитоза // *Лабораторное дело*. – 1988. – №9. – С. 30–32.
2. Гольцев А.Н., Волина В.В., Онасенко Е.С. и др. Инфицирование животных вирусом гриппа после предварительного введения препарата «Криоцелл-гемокорд». Сообщение III. Изучение морфофункционального состояния лёгких мышей // *Проблемы криобиологии*. – 2010. – Т. 20, №3. – С. 318–326.
3. Гольцев А.Н., Калинин Т.А. Пуповинная кордовая кровь человека как источник гемопозитических клеток для клинического применения. Часть 3. Криоконсервирование // *Проблемы криобиологии*. – 1999. – №1. – С. 45–56.
4. Грипп: этиология, профилактика и лечение: Сб. статей и тезисов. – СПб, 2011. – 72с.
5. Игонин А.А., Кукес В.Г., Сурнакова Н.Е. Иммуномодулирующий эффект антибактериальных препаратов у больных внебольничной пневмонией (ВП) // *Клин. микробиология и антимикробная химиотерапия*. – 2002. – Т. 4, Прил. 1. – С. 24–25.
6. Кожина О.Ю., Порожан Е.А. Роль моноцитарно-фагоцитарной системы в формировании противовирусной резистентности после введения компонентов криоконсервированного лейкоконцентрата кордовой крови // *Проблемы криобиологии*. – 2012. – Т. 22, №2. – С. 215.
7. Лямина С.В., Веденикин Т.Ю., Круглов С.В. и др. Особенности фагоцитарной и миграционной активности альвеолярных макрофагов M1 и M2 фенотипов // *Фундаментальные исследования*. – 2011. – № 11. – С. 536–539.
8. Меньшиков В.В., Делекторская Л.Н., Золотницкая Р.П. и др. Лабораторные методы исследования: Справочник / Под ред. В.В. Меньшикова – М.: Медицина, 1987. – 368 с.
9. Нестерова И. В., Колесникова Н. В., Клещенко Е. И. и др. Варианты трансформации фенотипа нейтрофильных гранулоцитов CD64<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> у новорожденных с различными инфекционно-воспалительными заболеваниями // *Цитокины и воспаление*. – 2011. – Т.10, № 4. – С. 61–65.
10. Плехова Н. Г., Сомова Л. М. Роль моноцитов/макрофагов в патогенезе вирусных инфекций // *Тихоокеанский мед. журнал*. – 2010. – №3. – С. 5–9.
11. Попов Н. Н., Романова Е. А. Молекулярные и клеточные механизмы противовирусного иммунитета // *Вісник ХНУ*. – 2002. – № 546. – С. 69–73.
12. Протасова С.Ф., Леонтьева Л.И., Козлова Н.М. Новые препараты на основе интерферонов против вирусов гриппа, включая А (H5N1) // *Цитокины и воспаление*. – 2007. – Т. 6, №3. – С. 20–26.
13. Самсонова М. В. Диагностические возможности бронхоальвеолярного лаважа // *Атмосфера. Пульмонология и аллергология*. – 2006. – №4. – С. 8–12.
14. Совалкин В.И., Алтынова Е. И., Нестерова К.И., Ломброзо А.В. Роль изучения факторов местного иммунитета

of great importance. Basing on the obtained results we may conclude that preventively introduced unfractionated cHCBL affects the intensity of inflammatory response, modulates phagocytic activity of alveolar macrophages by increasing the expression of their adhesion receptors, provides the formation of adequate immune response to pathogen in a greater extent than its individual components. Preventive introduction of cHCBL inhibited development of secondary immunodeficiency in experimental animals due to the triggering of non-specific protection factors (alveolar macrophages).

## Conclusions

1. Preventive intranasal introduction of cHCBL or its components modifies functional activity of alveolar macrophages.

2. Application of unfractionated cHCBL increases functional activity of alveolar macrophages during development of viral infection in a greater extent than its individual components.

## References

1. Aleksandrov M.G., Kudryavitskiy A.I., Rumyantseva E.G. et al. Calculation method of absolute indices of phagocytosis // *Laboratornoe Delo*. – 1988. – N9. – P. 30–32.
2. Goltsev A.N., Volina V.V., Onasenko E.S. et al. Infection of animals with the influenza virus after a preliminary administration of preparation "Cryo-cell-Haemocord". Report III. Study of morphofunctional state of mice lungs // *Problems of Cryobiology*. – 2010. – Vol. 20, N3. – P. 318–326.
3. Goltsev A.N., Kalinichenko T.A. Umbilical human cord blood as a source of hemopoietic cells for clinical application. Part III. Cryopreservation // *Problems of Cryobiology*. – 1999. – N1. – P. 45–46.
4. Influenza: etiology, prevention, treatment: Papers and abstracts. – St. Petersburg, 2011. – 72 p.
5. Igonin A.A., Kukes V.G., Surnakova N.E. Immunomodulating effect of antibacterial preparations in patients with community-acquired pneumonia (CAP) // *Klin. Mikrobiologiya i Antimikrobnaya Khimioterapiya*. – 2002. – Vol.4 (Suppl.1). – P. 24–25.
6. Kozhyna O.Yu., Porozhan E.A. Role of monocyte-phagocytic system in formation of antiviral resistance after introduction of cryopreserved cord blood leukoconcentrate components // *Problems of Cryobiology*. – 2012. – Vol. 22, N2. – P. 215.
7. Lyamina S.V., Vedenikin T.Yu., Kruglov S.V. et al. Peculiarities of phagocytic and migrational activity of alveolar macrophages of M1 and M2 phenotypes // *Fundamentalnye Issledovaniya*. – 2011. – N11. – P. 536–539.
8. Men'shikov V.V., Delektorskaya L.N., Zolotnitskaya R.P. et al. Laboratory research methods: Manual / Ed. by V.V. Men'shikov. Moscow: Meditsina, 1987. – 368 p.
9. Nesterova I.V., Kolesnikova N.V., Kleschenko E.I. et al. Transformation of neutrophil granulocytes phenotype to CD64<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> in newborns with different infectious inflammatory diseases // *Tsytokiny i Vospalenie*. – 2011. – Vol. 10, N4. – P. 61–65.
10. Plekhova N.G., Somova L.M. Role of monocytes/macrophages in pathogenesis of viral infections // *Tikhookeanskiy Med. Zhurnal*. – 2010. – N3. – P.5–9.
11. Popov N.N., Romanova E.A. Molecular and cell mechanisms of antiviral immunity // *Visnyk KhNU*. – 2002. – N546. – P. 69–73.



- при патологии дыхательных путей // *Фундамент. исследования*. – 2011. – № 10. – С. 151–154.
15. Учитель И.Я. Макрофаги в иммунитете. – М.: Медицина, 1978. – 124с.
  16. Цуцаева А. А., Грищенко В. И., Кудокоцева О. В., Прокопчук О.С. Заготовка, криоконсервирование и клиническое применение гемопоэтических клеток кордовой крови человека: Метод. рекомендации. – Харьков, 2000. – 20 с.
  17. Патент №31847А, МПК5 А01N1/02. Україна. Спосіб криоконсервування кровотворних клітин кордової крові / А.О. Цуцаєва, В.І. Грищенко, О.В. Кудокоцева та ін. Заявл. 05.11.1998; опубл. 15.12.2000, Бюл. №7.
  18. Crapo D., Harmsen A.G., Sharman M.P., Musson R.A. Pulmonary immunobiology and inflammation in pulmonary diseases // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2000. – Vol. 162, №5. – P. 1983–1986.
  19. Lasbury M. E., Durant P. J., Lee S. H. Numbers of alveolar macrophages are increased during *Pneumocystis pneumonia* in mice // *J. Eukariot. Microbiol.* – 2003. – Vol. 50 (Suppl.). – P. 637–638.
  20. Martinez F. O., Sica A., Mantovani A. et al. Macrophage activation and polarization // *Front. Biosci.* – 2008. – Vol. 13. – P. 453–461.
  21. Stangel M., Joly E., Scolding N. J., Compston D.A.S. Normal polyclonal immunoglobulins ('IVIg') inhibit microglial phagocytosis in vitro // *J. Neuroimmunol.* – 2000. – Vol. 106, №1. – P. 137–144.
  22. Tumitan A. R., Monnazzi L. G., Ghiraldi F. R. et al. Pattern of macrophage activation in yersinia-resistant and yersinia-susceptible strains of mice // *Microbiol. Immunol.* – 2007. – Vol. 51, №10. – P. 1021–1028.
  12. Protasova S.F., Leont'eva L.I., Kozlova N.M. New preparations based on interferons against influenza virus, including A (H5N1) // *Tsitokiny i Vospalenie.* – 2007. – Vol.6, N3. – P. 20–26.
  13. Samsonova M.V. Diagnostic features of bronchoalveolar lavage // *Atmosfera. Pulmonologiya i Allergologiya.* – 2006. – N4. – P. 8–12.
  14. Sovalkin V.I., Altynova E.I., Nesterova K.I., Lombrozo A.V. Role of investigation of tissue immunity factors at respiratory tract pathology // *Fundament. Issledovaniya.* – 2011. – N10. – P. 151–154.
  15. Uchitel' I.Ya. Macrophages in immunity. – Moscow: Meditsina, 1978. – 124 p.
  16. Tsutsayeva A.O., Grischenko V.I., Kudokotseva O.V., Prokopyuk O.S. Procurement, cryopreservation and clinical application of hemopoietic cells of human cord blood: Methodical Recommendations. – Kharkiv, 2000. – 20 p.
  17. Патент N31847A Україна, IPC A01N1/02. Method of cryopreservation of hemopoietic cells of cord blood / A.O. Tsutsayeva, V.I. Grischenko, O.V. Kudokotseva et al. Appl. 05.11.1998. Publ. 15.12.2000. Bul. N7.
  18. Crapo D., Harmsen A.G., Sharman M.P., Musson R.A. Pulmonary immunobiology and inflammation in pulmonary diseases // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2000. – Vol. 162, N5. – P. 1983–1986.
  19. Lasbury M. E., Durant P. J., Lee S. H. Numbers of alveolar macrophages are increased during *Pneumocystis pneumonia* in mice // *J. Eukariot. Microbiol.* – 2003. – Vol. 50 (Suppl.). – P. 637–638.
  20. Martinez F. O., Sica A., Mantovani A. et al. Macrophage activation and polarization // *Front. Biosci.* – 2008. – Vol. 13. – P. 453–461.
  21. Stangel M., Joly E., Scolding N. J., Compston D.A.S. Normal polyclonal immunoglobulins ('IVIg') inhibit microglial phagocytosis in vitro // *J. Neuroimmunol.* – 2000. – Vol. 106, N1. – P. 137–144.
  22. Tumitan A. R., Monnazzi L. G., Ghiraldi F. R. et al. Pattern of macrophage activation in yersinia-resistant and yersinia-susceptible strains of mice // *Microbiol. Immunol.* – 2007. – Vol. 51, N10. – P. 1021–1028.

