УДК 591.111 : 599.323.4 – 089.843.47 : 576.3] – 084.1

© Д. Ю. Кустов, О. А. Слюсарев, О. А. Ракша-Слюсарева, І. В. Кокіна, Ю. Г. Друпп

ЗМІНИ ЛЕЙКОЦИТАРНОЇ ФОРМУЛИ КРОВІ У ЩУРІВ З МОДЕЛЛЮ ОВАРІАЛЬНОЇ НЕДОСТАТНОСТІ ТА ПІСЛЯ ЇЇ КОРЕКЦІЇ ТРАНСПЛАНТАЦІЄЮ ЕМБРІОНАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН

Донецький національний медичний університет ім. М. Горького
83003, м. Донецьк, пр. Ілліча, 16; e-mail: physiolog@mail.ru

Кустов Д. Ю., Слюсарев О. А., Ракша-Слюсарева О. А., Кокіна І. В., Друпп Ю. Г. **Зміни лейкоцитарної формули крові у щурів з моделлю оваріальної недостатності та після її корекції трансплантацією ембріональних стовбурових клітин.** – Стаття присвячена вивченню лейкоцитарної формули крові у щурів зі змодельованою гонадною недостатністю до та після її корекції шляхом введення ембріональних стовбурових клітин кордової крові. Після видалення яєчників відбувалось зниження загального вмісту лейкоцитів у крові за рахунок зменшення кількості циркулюючих лімфоцитів і природних кілерів. При цьому підвищувався рівень еозинофілів і моноцитів. Трансплантація стовбурових клітин відновлювала початковий рівень усіх досліджених показників лейкоцитарної формули крові, крім природних кілерів, вміст яких не відрізнявся від такого оваріектомованих самиць.

Ключові слова: трансплантація стовбурових клітин, гонадна недостатність, лейкоцитарна формула.

Вступ

Останнім часом особливу увагу дослідників привертає вивчення можливості застосування стовбурових клітин у лікуванні цілої низки важких захворювань, більшість яких формується й ускладнюється в екологічно несприятливих умовах. У зв'язку зі здібністю стовбурових клітин до диференціювання спектр патології, за якої вони можуть бути використаними, є дуже великим. До них належать захворювання нервової, імунної, ендокринної систем, гіпертонічна хвороба тощо.

Із недавніх пір активно ведуться дослідження застосування клітин ксеногенного походження при трансплантації. Спочатку ксеногенний матеріал застосовували в експериментальних дослідженнях для вивчення імунних реакцій організму. Із розвитком технологій використання стовбурових клітин і розширенням уявлень про імунну систему його почали використовувати і в терапевтичних цілях [1]. У той же час механізми впливу ембріональних стовбурових клітин (ЕСК) на різні органи і системи цілісного організму вивчено недостатньо. Залишається багато питань щодо пластичного потенціалу цих клітин, їх дії на імунітет.

У зв'язку з цим нам здавалось цікавим вивчити вплив трансплантації ЕСК кордової крові на показники лейкоцитарної формули гонадектомованих самиць білих щурів.

Матеріал і методи дослідження

Дослідження проводились на базі лабораторії "Клінічної і прикладної нейрофізіології" ДонНМУ. Досліди проводили на 40 самицях білих щурів, масою від 220 до 300 г.

Формування посткастраційного синдрому спостерігали через 4-5 днів після гонадектомії і підтверджували за допомогою визначення рівня статевих гормонів у крові. Надалі гонадектомованих щурів розділяли на 2 групи: контрольну та експериментальну, щурам якої вводили ЕСК. Трансплантацію ЕСК здійснювали внутрішньовенним введенням культури, отриманої з кордової крові.

Мазок крові забарвлювали азур-еозином за методом Романовського-Гимза. Кількість і морфологічні властивості лейкоцитів визначали під світловим мікроскопом у камері Горяєва. Лейкоцитарна формула підраховувалась за загальноприйнятою методикою [2].

Результати та обговорення

Як помітно з рис. 1, загальна кількість циркулюючих у крові лейкоцитів вірогідно знижувалась у тварин з видаленими яєчниками. Так, якщо в інтактних особин вона складала (10,44±0,82) Г/л, то після оваріектомії значення цього показника знизилось до (8,06±0,55) Г/л. Трансплантація ЕСК привела до відновлення рівня лейкоцитів у крові ((11,28±0,70) Г/л).

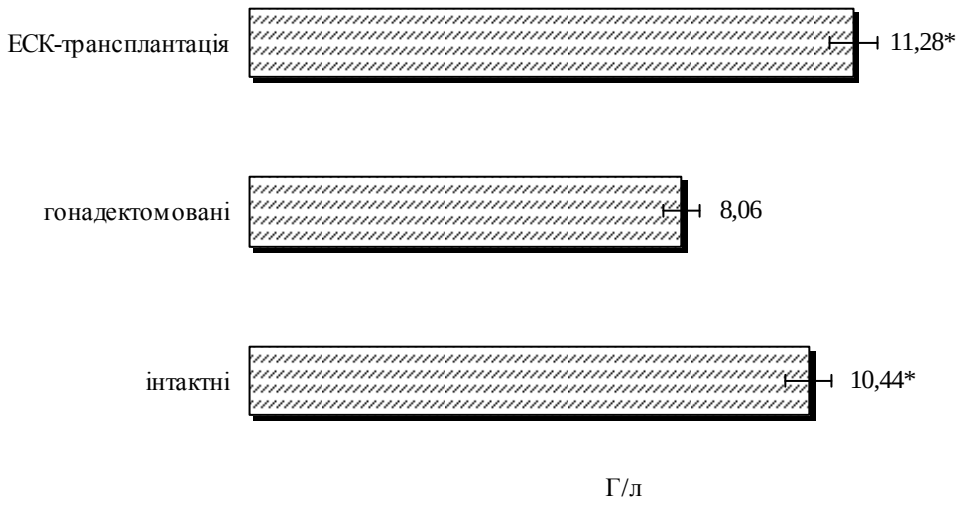

Рис. 1. Загальна кількість лейкоцитів у периферичній крові щурів з моделлю оваріальної недостатності до та після трансплантації ЕСК.

Примітка. * – p≤0,05 при порівнянні з оваріектомованими щурами.

Аналізуючи показники лейкоцитарної формули, що відповідають за неспецифічний імунитет, ми не побачили вірогідних змін між усіма трьома групами в рівні нейтрофілоцитів (рис. 2). Навпаки, кількість циркулюючих еозинофілів істотно підвищувалась у щурів після видалення яєчників (з (0,32±0,08) Г/л в інтактних самиць до (0,45±0,12) Г/л). Введення ЕСК нормалізувало значення цього показника ((0,29±0,06) Г/л).

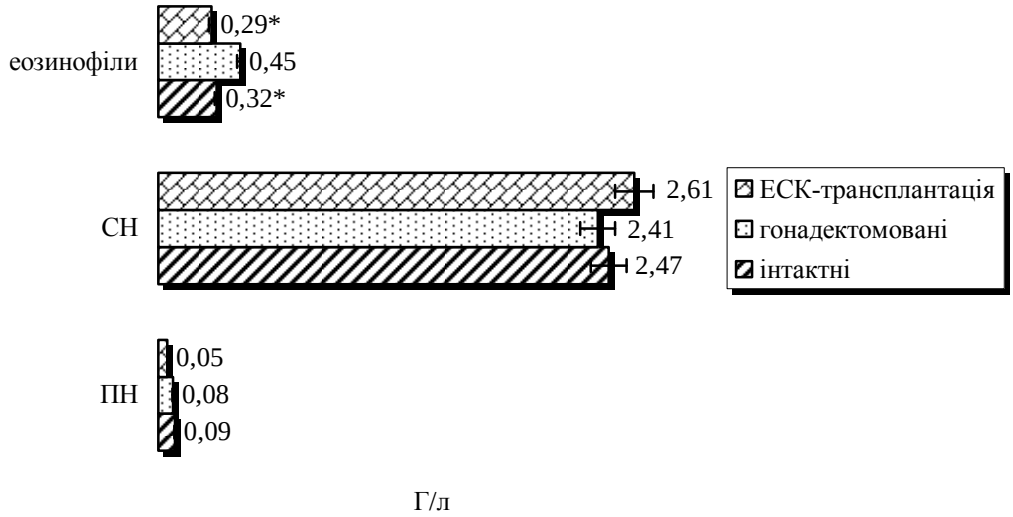

Рис. 2. Зміни кількості циркулюючих у крові паличкоядерних (ПН), сегментоядерних (СН) нейтрофілоцитів і еозинофілів у щурів після оваріектомії та подальшої трансплантації ЕСК.

Примітка. * – p≤0,05 при порівнянні з оваріектомованими щурами.

На рис. 3 наведено дані щодо елементів лейкоцитарної формули, які відповідають за формування специфічної імунної відповіді. Оваріектомія призводила до вірогідного зниження рівня циркулюючих у крові лімфоцитів. Якщо в інтактних тварин значення цього показника склало (7,49±0,32) Г/л, то в гонадектомованих воно дорівнювало (4,83±0,19) Г/л. Трансплантація ЕСК, культивованих із кордової крові, відновлювало початковий рівень

лімфоцитів у крові ((7,70±0,61) Г/л). Рівень моноцитів також дещо підвищувався в гонадектомованих особин (з (0,13±0,02) Г/л у нормі до (0,17±0,08) Г/л), але це підвищення не було вірогідним. Після введення ЕСК нами спостерігалось зниження кількості циркулюючих у крові моноцитів до (0,10±0,04) Г/л, що було вірогідно нижчим, ніж у самиць із видаленими яєчниками.

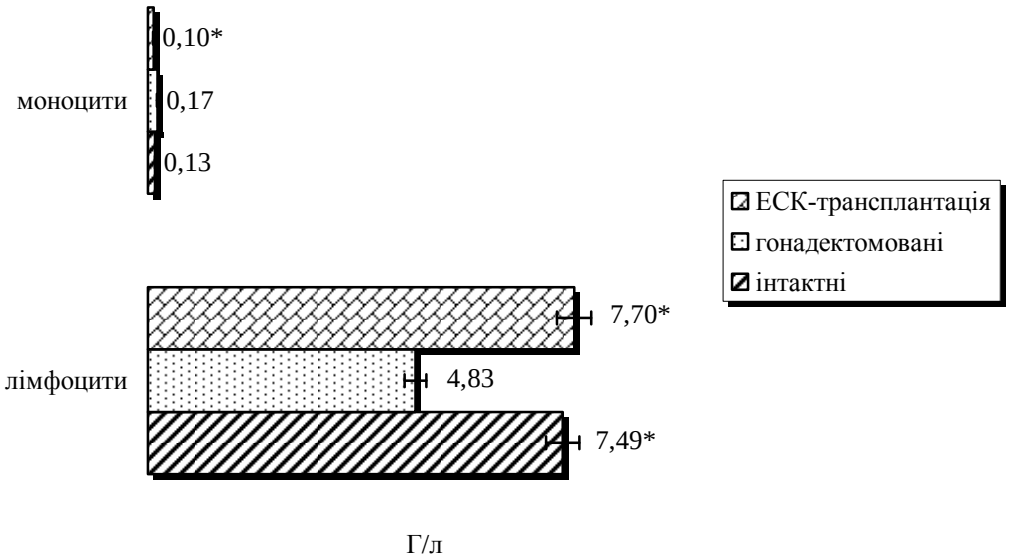

Рис. 3. Зміни кількості лімфоцитів і моноцитів у крові щурів зі змодельованою гонадною недостатністю та після її корекції введенням ЕСК.

Примітка. * – $p \leq 0,05$ при порівнянні з оваріектомованими щурами.

Кількість природних кілерів (ПК) після оваріектомії істотно знижувалась із (0,04±0,01) Г/л до (0,013±0,006) Г/л. Трансплантація ЕСК дещо підвищувала значення цього показника ((0,02±0,005) Г/л), проте воно було вірогідно нижчим за норму (рис. 4).

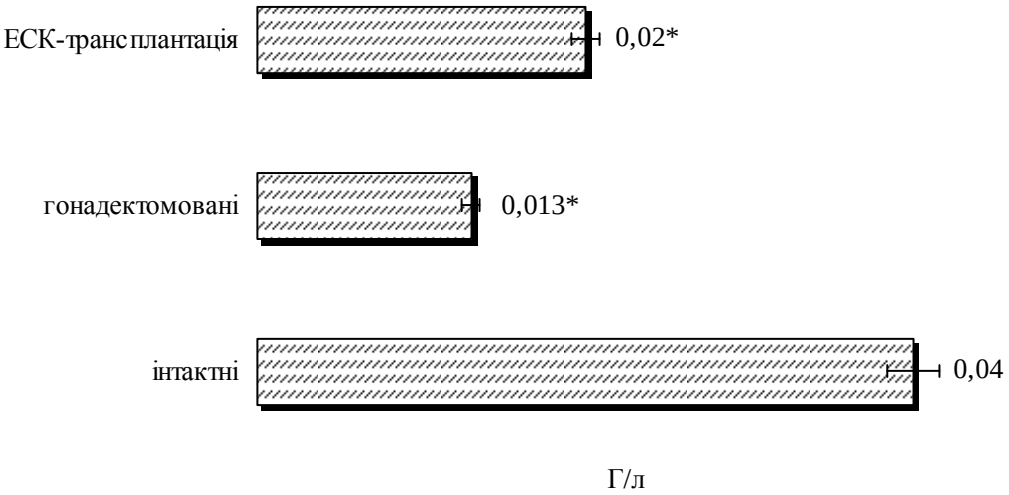

Рис. 4. Кількість природних кілерів (ПК) у периферичній крові щурів із моделлю оваріальної недостатності до та після трансплантації ЕСК.

Примітка. * – $p \leq 0,05$ при порівнянні з інтактними щурами.

Таким чином, у наших дослідженнях лейкоцитарної формули щурів після двобічної оваріектомії було виявлено зниження загальної кількості лейкоцитів у крові, в основному за рахунок лімфоцитів, при підвищенні рівня еозинофілів і моноцитів. У цьому випадку ми спостерігаємо прояв різноспрямованості впливу статевих стероїдів на імунну систему.

Прийнято вважати, що статеві гормони надають імуносупресорного ефекту [3]. Проте останні дослідження говорять про неоднозначність і багатоплановість впливу статевих стероїдів на різні ланки імунної системи і залежність спрямованості імунної відповіді від концентрації естрогенів або прогестерону [4-6]. У цьому також убачається існування тісних багатополюсних взаємин між нервовою, імунною та ендокринною системами.

Як відомо, після оваріектомії відбувається підвищення рівня сенсибілізації імунокомпетентних клітин організму [7], зокрема – і до власних тканин [8], що якраз може бути причиною збільшення кількості еозинофілів і моноцитів, тоді як лімфоцитарна ланка імунітету за недостатності модулюючого впливу статевих гормонів перебуває в пригніченому стані. Наші дані також узгоджуються з припущенням про супресорну роль статевих гормонів у виробленні моноцитами і макрофагами ІЛ-6 [9].

Трансплантація ЕСК у цілому приводила до відновлення початкового рівня показників лейкоцитарної формули. Виняток становили лише природні кілери, кількість яких суттєво не змінювалась у порівнянні з гонадектомованими щурами.

Висновки

1. Моделювання гонаддефіцитного стану шляхом двобічної оваріектомії приводило до різноспрямованих змін у лейкоцитарній формулі крові. Спостерігалось зниження рівня лімфоцитів і природних кілерів на фоні підвищення рівня еозинофілів і моноцитів.

2. Трансплантація стовбурових клітин кордової крові відновлювала фізіологічну норму лейкоцитарної формули. Виняток становили лише природні кілери, рівень яких не відрізнявся від такого в гонадектомованих щурів.

Список літератури

1. *Шевчук В. А.* Стволовые клетки и иммунологическая толерантность при клеточной трансплантации / В. А. Шевчук // Трансплантология. – 2005. – Т. 2. – С. 34–39.

2. *Руководство* к практическим занятиям по клинической лабораторной диагностике / Под ред. М. А. Базарновой, В. Т. Морозовой. – К.: Вища шк., 1988. – 318 с.

3. *Ройт А.* Иммунология / А. Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл. – М.: Мир, 2000. – 582 с.

4. *Татарчук Т. Ф.* Половые стероидные гормоны и иммунная система / Т. Ф. Татарчук, В. П. Чернышов, А. О. Исламова // Здоровье женщины. – 2003. – № 1 (3). – С. 33–37.

5. *Immune* disorders in women with premature ovarian failure in initial period / [V. P. Chernyshov, T. V. Radysh, I. V. Gura et al.] // Am. J. of Reprod. Immunology. – 2001. – № 46. – P. 220–225.

6. *Горбунова О. Л.* Роль хорионического гонадотропина и половых стероидных гормонов в модуляции вторичного иммунного ответа, реакции гиперчувствительности замедленного типа и фагоцитарной активности лейкоцитов / О. Л. Горбунова, С. В. Ширшев, Б. А. Бахметьев // Цитокины и воспаление. – 2007. – Т. 6, № 4. – С. 33–37.

7. *Чиркин В. В.* Вторичные иммунодефициты / В. В. Чиркин, В. Ф. Семенков, В. И. Карандашов. – М: Медицина, 1999. – 245 с.

8. *Влияние* разрушения супрахиазматических ядер гипоталамуса на состояние системы иммунитета / [Е. А. Ракша-Слюсарева, А. А. Слюсарев, В. Н. Казаков, П. Я. Кравцов, Д. Ю. Кустов и др.] // Тез. докл. II Российской конф. "Нейроиммунопатология". – М., 2002. – С. 62.

9. *17 beta-estradiol* inhibits interleukin-6 production by bone marrow-derived stromal cells and osteoblasts in vitro: a potential mechanism for the antiosteoporotic effect of estrogens / [G. Girasole, R. L. Jilka, G. Passeri, S. Boswell, G. Boder, D. C. Williams et al.] // J. Clin. Invest. – 1992. – № 89. – P. 883–891.

Кустов Д. Ю., Слюсарев А. А., Ракша-Слюсарева А. А., Кокина И. В., Друпп Ю. Г. **Изменения лейкоцитарной формулы крови у крыс с моделью овариальной недостаточности и после ее коррекции трансплантацией эмбриональных стволовых клеток.** – Статья посвящена изучению лейкоцитарной формулы крови у крыс с моделью гонадной недостаточности до и после её коррекции введением эмбриональных стволовых клеток кордовой крови. После удаления яичников происходило снижение общего содержания лейкоцитов в крови за счет уменьшения количества циркулирующих лимфоцитов и естественных киллеров. При этом повышался уровень эозинофилов и моноцитов. Трансплантация стволовых клеток восстанавливала исходный уровень всех исследованных показателей лейкоцитарной формулы крови, кроме естественных киллеров, содержание которых не отличалось от такового овариэктомированных самок.

Ключевые слова: трансплантация стволовых клеток, гонадная недостаточность, лейкоцитарная формула.

Kustov D. Yu., Slusarev O. A., Raksha-Slusareva O. A., Kokina I. V., Drupp Yu. G. **Leukocytic formula changes in rat model of ovarian deficiency and after its correction by embryonic stem cell transplantation.** – The article describes leukocytic formula changes in rat model of gonadal deficiency prior to and after its correction by cord-blood embryonic stem cell (ESC) transplantation. The general white blood cell count decreased after ovariectomy due to circulating lymphocyte and natural killer count diminishment. At the same time, eosinophil and monocyte count increased. Stem cell transplantation restored the initial levels of all the studied leukocytic formula parameters except natural killers count which stayed equal to the same of ovariectomised female rats.

Key words: stem cell transplantation, gonadal deficiency, leukocytic formula.