

ПОКАЗНИКИ КРОВІ ТВАРИН З ХРОНІЧНИМ ЗАПАЛЕННЯМ ЯЄЧНИКІВ ТА ВВЕДЕННЯМ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАНУ (м. Харків)

Робота виконана в рамках НДР «Оптимізація репродуктивної функції тварин і людини за допомогою кріоконсервованих клітинних препаратів та фізико-хімічних факторів», № держ. реєстрації 0111U001197.

Вступ. Жіноче безпліддя запального ґенезу залишається однією з актуальних проблем сучасної гінекології [4]. Слід зазначити, що хронічне запалення яєчників (ХЗЯ) у великій мірі зумовлено наявністю первинного імунodefіциту, який сприяє переходу гострого запального процесу в хронічну стадію. У той же час тривалий запальний процес призводить до зниження імунологічної реактивності організму. На ефекторному рівні хронізація запалення, насамперед, пов'язана з недостатністю системи крові, що розвивається при персистенції флогогена [6]. Дослідження гематологічних маркерів запалення є одним з ключових моментів при вивченні протікання запальних процесів і їх корекції.

Ефективність лікування ХЗЯ як правило не висока, у зв'язку з чим інтенсивно проводяться дослідження альтернативних методів лікування. Аналіз літератури вказує на доцільність проведення досліджень, в яких вивчається оптимізація гормональної та репродуктивної дисфункцій за допомогою препаратів, до складу яких входять як біологічно активні сполуки, так і стовбурові клітини. Так, наприклад, кріоекстракти плаценти використовуються як стимулятори гормональної і репродуктивної функцій в організмі [3], а мультипотентним мезенхімальним стромальним клітинам (ММСК) властива імуномодулююча дія [10]. Застосування сучасних технологій культивування та кріоконсервування дозволяє використовувати стовбурові клітин в сучасній терапії гінекологічних захворювань.

Метою роботи було дослідження динаміки показників запалення у крові тварин з хронічним запаленням яєчників за умов внутрішньовенного введення культивованих та кріоконсервованих мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин кісткового мозку.

Об'єкт і методи дослідження. В роботі використовували ММСК кісткового мозку мишей ($n=5$), які отримували зі стегнових кісток методом, що забезпечує адгезію стромальної фракції до культурального пластику з подальшим видаленням фракції клітин, що не адгезували. У роботі були використані

стандартні умови культивування при 37°C в атмосфері 5% CO₂.

Кріоконсервування культур ММСК здійснювали під захистом 10% діметилсульфоксиду («РАА», Австрія) з додаванням 20% ембріональної сироватки великої рогатої худоби на середовищі IMDM («РАА»). Отриману суспензію вміщували по 1 мл у кріопробірки («Nunc», США), охолоджували зі швидкістю 1°C/хв до -80°C з подальшим зануренням у рідкий азот [1]. Відігрівали зразки на водяній бані при 37°C та відмивали від кріозахисного середовища шляхом центрифугування.

В якості експериментальних тварин були використані 60 безпорідних статевозрілих білих мишей-самок з масою тіла 18-20 г. ХЗЯ моделювали шляхом одноразового внутрішньочеревинного введення поблизу знаходження яєчників інактивованої вакцини *Staphylococcus aureus* штам 209 у дозі 50×10^6 мікробних тіл [2]. На 22 добу з моменту введення інактивованої вакцини тваринам проводили введення у бокову хвостову вену: контрольна група ($n=15$) – фізіологічний розчин (0,2 мл); дослідна група 1 ($n=15$) – культивовані ММСК (КММСК) кісткового мозку; дослідна група 2 ($n=15$) – кріоконсервовані ММСК (КрММСК) кісткового мозку. Об'єм введеної рідини у всіх дослідних групах складав 0,2 мл на тварину, який містив $0,5 \times 10^5$ клітин. Також була сформована група інтактних тварин ($n=15$) аналогічної маси та віку без будь-яких втручань.

На 5, 10 і 20 добу з моменту введення ММСК визначали загальну кількість лейкоцитів периферійної крові [7], швидкість осідання еритроцитів (ШОЕ) та робили мазок крові для визначення лейкоцитарної формули [5]. Крім того визначали вміст загального білка у сироватці крові (СпайнЛаб, Україна) та С-реактивного білка (ЗАО «ЄКОлаб», Росія). Усі маніпуляції з тваринами здійснювали відповідно до вимог [8].

Утримання тварин та експерименти проводилися відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

При статистичній обробці результатів використовували однофакторний дисперсійний аналіз і

Клітинний склад крові мишей з ХЗЯ та терапією ММСК (M ± m, n = 5)

Група тварин	Строк спостереження	Загальна кількість лейкоцитів	Показники складу крові, %			
			Нейтрофіли	Еозинофіли	Моноцити	Лімфоцити
Контроль	10 доба	17,3±2,45 [#]	26,4±7,1	1,2±0,8 [#]	15,6±4,9 [#]	56,8±9,6
	20 доба	17,75±3,73 [#]	19,7±6,9	1,8±0,4	16,9±6,8 [#]	61,6±11,3
КММСК	10 доба	7,65±2,59 [*]	21,7±8,3	2,7±0,5	15,2±5,5 [#]	60,4±12,3
	20 доба	7,5±3,25 [*]	31,4±9,1	2,4±0,5	6,8±3,2 [*]	59,4±11,5
КрММСК	10 доба	6,35±1,98 [*]	30,3±5,9	3,8±1,5	16,5±6,9 [#]	49,4±12,9
	20 доба	6,2±1,67 [*]	35,8±5,9	2,0±1,0	5,1±2,0 [*]	57,1±14,3
Інтакт		6,9±3,29	30,2±5,9	30,2±5,9	2,4±1,2	64,2±9,7

Примітка: * – різниця статистично значуща з групою контролю (P≤0,05; n=5); # – різниця статистично значуща з інтактними тваринами (P≤0,05; n=5).

t-критерій Стьюдента з використанням програми Statistica 8.

Результати досліджень та їх обговорення. Результати попередніх наших досліджень [9] свідчили, що на 20 добу у тварин з терапією КрММСК на фоні згасання запальних проявів відбувалась активізація репаративного процесу з тенденцією до нормалізації морфологічних параметрів оваріальної тканини.

При вивченні лейкоцитарної реакції периферійної крові було встановлено (табл.), що введення як культивованих, так і кріоконсервованих ММСК знижує загальну кількість лейкоцитів до показників інтактних тварин на 10 добу терапії, що, мабуть, пов'язано з імуномодулюючим впливом на процеси запалення та гемопоез. У контрольній групі тварин з введенням фізіологічного розчину на всіх термінах спостереження зберігався незначний лейкоцитоз, що свідчило про персистенцію запальних процесів.

Застосування препаратів ММСК в терапії ХЗЯ супроводжувалося тенденцією до нормалізації лейкоцитарної формули крові впродовж 20 діб (табл.). За співвідношенням лейкоцитів всіх видів в крові піддослідних тварин простежувалася однакова закономірність: при запаленні на тлі застосування клітинних препаратів достовірно знижувалася кількість моноцитів периферійної крові, а відносна кількість нейтрофілів при цьому збільшувалася у порівнянні з контролем на 20 добу.

При визначенні лейкоцитарних індексів виявилось, що на протязі всього строку експерименту величина лімфоцитарного індексу (співвідношення лімфоцитів до нейтрофілів) на тлі клітинної терапії мала тенденцію до зниження стосовно контролю. На 20 добу терапії КММСК і КрММСК цей індекс був вірогідно нижче, ніж у контролі на 40 і 49% відповідно. Індекс Кребса (ІК – співвідношення нейтрофілів до лімфоцитів) поступово зростав і до кінця експерименту досягав значень інтактних тварин. У контрольній групі спостерігалася зменшення ІК в 1,5 разів відносно інтакту, що мабуть пов'язано зі зниженням активності фагоцитарних реакцій. Індеси співвідношення нейтрофілів до моноцитів (ІСНМ) та

лімфоцитів до моноцитів (ІСЛМ) за умов терапії мали позитивну динаміку відновлення, хоча до кінця дослідження і не досягали відповідних показників інтактних тварин.

Слід зазначити, що дані індекси у контрольних тварин протягом всього терміну спостереження залишалися зниженими. Таким чином, введення як культивованих, так і кріоконсервованих ММСК сприяло нормалізації співвідношення афекторної і ефекторної ланок імунологічного процесу.

Одночасно були досліджені показники активності запального процесу в сироватці крові, а саме вмісту загального білка та реакції на СРБ. У контрольній групі тварин вміст загального білка був вірогідно вище на досліджених строках на 10, 25 та 14% стосовно інтактних тварин. У тварин з терапією спостерігали нормалізацію вмісту загального білка починаючи з 5 доби і до завершення спостереження (рис. 1).

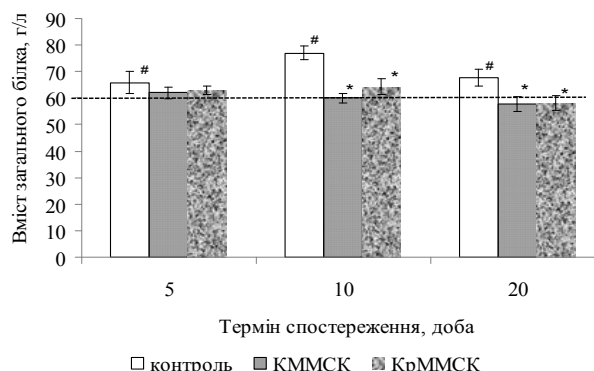


Рис. 1. Динаміка вмісту загального білка в сироватці крові мишей з ХЗЯ та терапією ММСК (* – різниця статистично значуща з групою контролю (P≤0,05; n=5); # – різниця статистично значуща з інтактними тваринами (P≤0,05; n=5); пунктирна лінія – показник інтактних тварин).

Дослідження по виявленню С-реактивного білка в сироватці крові свідчили, що у всіх тварин з клітинною терапією вже на 10 добу реакція на СРБ ставала негативною із збереженням ефекту до завершення експерименту. В групі контрольних тварин на тлі незначної гіперпротеїнемії реакція на СРБ протягом спостереження залишалася слабкопозитивною.

Аналогічна тенденція спостерігалася і при аналізі результатів вимірювання ШОЕ після введення клітинних препаратів (рис. 2). Було встановлено, що на протязі всього строку дослідження у тварин з терапією не відзначалося вірогідних змін ШОЕ. В групі контролю досліджений показник вірогідно перевищував відповідні значення у інтактних тварин і тварин з терапією (в 2,3 та 1,8 рази відповідно на 20 добу).

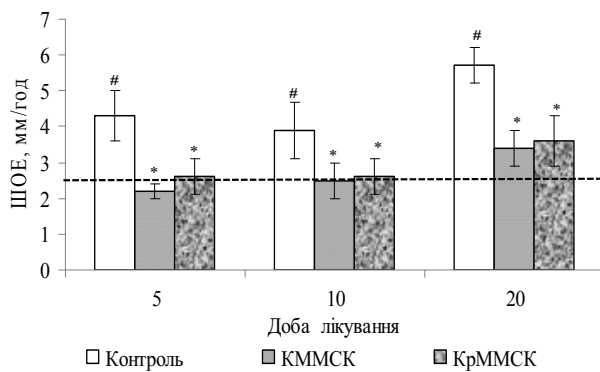


Рис. 2. ШОЕ в динаміці у мишей з ХЗЯ та терапією ММСК (* – різниця статистично значуща з групою контролю ($P \leq 0,05$; $n = 5$); # – різниця статистично значуща з інтактними тваринами ($P \leq 0,05$; $n = 5$); пунктирна лінія – показник інтактних тварин).

За сукупністю проаналізованих маркерів запалення в крові експериментальних тварин можна стверджувати про наявність позитивної тенденції в перебігу ХЗЯ після введення клітинних препаратів – КММСК і КрММСК кісткового мозку, – без вірогідної різниці між ними. Корегуючий вплив генералізованого введення ММСК кісткового мозку на протікання

запального процесу в яєчниках ймовірно пов'язаний з імуномодулюючими властивостями досліджених препаратів.

Незважаючи на те, що первинний інтерес до ММСК пов'язаний з потенційною здатністю до регенерації тканин, відкриття їх імуномодулюючих властивостей дозволяє розширити напрямки клінічного застосування. При активації сигналами запального мікрооточення, ММСК здатні комплексно впливати на клітини імунної системи за допомогою контактних і гуморальних механізмів, приводячи до зниження клітинної реактивності та стимуляції лейкоцитів [10].

Отримані результати імуномодулюючого впливу культивованих та криоконсервованих ММСК на перебіг відновлення показників крові тварин з хронічним запаленням яєчників дозволяє зробити висновок про можливість їх застосування в комплексній терапії гінекологічних захворювань.

Висновки. Генералізоване введення як культивованих, так і криоконсервованих мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин кісткового мозку тваринам з хронічним запаленням яєчників чинить модулюючу дію на перебіг запалення.

Перспективи подальших досліджень. Важливим питанням, яке потребує детального вивчення, є вплив терапії ММСК на фертильність тварин з ХЗЯ.

Література

1. Волкова Н. О. Дослідження морфофункціональних характеристик криоконсервованих культур клітин стромального походження / Н. О. Волкова // Проблеми криобиології. – 2012. – Т. 22, № 2. – С. 118-125.
2. Волкова Н. О. Моделювання хронічного запалення яєчників / Н. О. Волкова, М. С. Юхта, Т. О. Юрчук [и др.] // Патологія. – 2014. – № 1. – С. 100-104.
3. Грищенко Н. Г. Влияние криоэкстракта плаценты на течение хронического воспаления яичников у мышей / Н. Г. Грищенко, Н. А. Клименко, Н. И. Горголь [и др.] // Медицина сьогодні і завтра. – 2010. – № 2-3. – С. 47-48.
4. Дубоссарская З. М. Хронические воспалительные процессы внутренних женских половых органов / З. М. Дубоссарская, А. И. Миляновский, В. Г. Коляденко – К. : Здоровье, 2003. – С. 115-118.
5. Западнюк И. П. Лабораторные животные : разведение, содержание, использование в эксперименте / И. П. Западнюк, В. И. Западнюк, Е. А. Захария. – К. : «Вища школа», 1983. – 305 с.
6. Клименко Н. А. Костномозговое кроветворение и лейкоцитарная реакция периферической крови при хроническом воспалении на фоне локального удаления тканевых базофилов / Н. А. Клименко, М. В. Лупырь // Буковинський медичний вісник. – 2008. – Т. 12, № 3. – С. 81-86.
7. Лабораторные методы исследования в клинике : Справочник / Под ред. В. В. Меньшикова. – М. : Медицина, 1987. – 368 с.
8. Directive 2010/63/eu of the European parliament and of the council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes // Journal of the European Union. – 2010. – L 276/33.
9. Volkova N. A. Multipotent mesenchymal stromal cells of bone marrow in therapy of chronic inflammation of the murine ovaries / N. A. Volkova, M. S. Yukhta, T. A. Yurchuk [et al.] // Biotechnologia Acta. – 2014. – Т. 7, № 5. – С. 35-42.
10. Weina L. Effect of mesenchymal stem cell transplantation on immunological injury of the ovary in mice / L. Weina, X. Qixuan, Q. Junwen [et al.] // J. South Med. Univ. – 2011. – Vol. 31, № 5. – P. 825-829.

УДК 618. 11-002. 2-085:611. 018. 46

ПОКАЗНИКИ КРОВІ ТВАРИН З ХРОНІЧНИМ ЗАПАЛЕННЯМ ЯЄЧНИКІВ ТА ВВЕДЕННЯМ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ

Волкова Н. О., Юхта М. С., Юрчук Т. О., Ревенко О. Б., Степанюк Л. В.

Резюме. Встановлено, що як культивовані, так і криоконсервовані мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини кісткового мозку за умов генералізованого введення чинять модулюючу дію на перебіг запалення, що характеризується відновленням загальної кількості лейкоцитів, формули крові, реакції на С-реактивний білок, вмісту загального білка та швидкості осідання еритроцитів у крові тварин з хронічним запаленням яєчників.

Ключові слова: мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини кісткового мозку, культивування, криоконсервування, хронічне запалення яєчників.

УДК 618. 11-002. 2-085:611. 018. 46

ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ ЖИВОТНЫХ С ХРОНИЧЕСКИМ ВОСПАЛЕНИЕМ ЯИЧНИКОВ И ВВЕДЕНИЕМ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА

Волкова Н. А., Юхта М. С., Юрчук Т. А., Ревенко О. Б., Степанюк Л. В.

Резюме. Установлено, что как культивированные, так и криоконсервированные мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки костного мозга в условиях генерализованного введения оказывают модулирующее действие на течение воспаления, которое характеризуется восстановлением общего количества лейкоцитов, формулы крови, реакции на С-реактивный белок, содержания общего белка и скорости оседания эритроцитов в крови животных с хроническим воспалением яичников.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки костного мозга, культивирование, криоконсервирование, хроническое воспаление яичников.

UDC 618. 11-002. 2-085: 611. 018. 46

Haematological Parameters of Animals with Chronic Inflammation of the Ovaries and Bone Marrow Multipotent Mesenchymal Stromal Cells Administration

Volkova N. O., Yukhta M. S., Yurchuk T. O., Revenko O. B., Stepanjuk L. V.

Abstract. Female infertility of inflammatory genesis remains one of the most urgent problems of modern gynecology. In this case an alternative method to optimize the hormonal and reproductive dysfunctions is the use of medicines contained biologically active compounds or stem cells.

The aim of the study was to determine the haematological parameters in the animals with chronic inflammation of the ovaries after generalized administration of cultured and cryopreserved bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells (CMMSCs and CrMMSCs respectively).

Materials and methods. All manipulations with animals were carried out according to "European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes" (Strasbourg, 1986).

MMSCs were isolated from resected femur of mice (n=5) and cultured under standard conditions (37°C, 5% CO₂, 95% humidity) according to the method providing an adhesion of stromal fraction to the culture plastic with following removal of the non-adhered cells.

MMSCs' suspension was cryopreserved in cryovials under protection of 10% DMSO and 20% fetal bovine serum on the base of nutritive medium with rate 1 deg/min to -80°C and following plunging in liquid nitrogen. Samples were stored in a low temperature bank for 3 months and then were thawed on water bath (40°C) with following removal of cryoprotectant by centrifugation.

Chronic inflammation of the ovaries was modeled by a single intraperitoneal administration of inactivated vaccine of *Staphylococcus aureus* strain 209 in the dose 50×10⁶ microbial bodies. At the 21st day the mice of the control group (n=5) were intravenously administrated by saline solution (0.2 mL), and the animals of experimental groups 1 (n=5) and 2 (n=5) were treated with 0.5×10⁶ CMMSCs and CrMMSCs respectively. Nontreated animals (n=5) served as intact control. Evaluation of the MMSCs' therapy efficiency was performed using haematological (leukocyte number of peripheral blood, leukogram, erythrocyte sedimentation rate) and biochemical (serum protein content, response to C-reactive protein) methods at the 5th, 10th and 20th days after cell administration.

Results. It was found that in the control group of animals with saline administration on all terms of observation slight leukocytosis remained indicating the persistence of inflammation. The total serum protein content in this group of animals remained significantly higher too with respect to intact mice (on 10, 25 and 14% at the 5th, 10th and 20th days respectively). Together with hyperproteinemia existence a response to C-reactive protein remained weakly positive during all observation in case of the saline administration. The same applied to the erythrocyte sedimentation rate: in the control group it was significantly higher than the values in intact animals and animals with therapy (2.3 and 1.8 times respectively at the 20th day).

At the same time CMMSCs and CrMMSCs in generalized administration had a modulating effect on the course of inflammation which was characterized by decrease of the total leukocyte number and normalization of leukogram, total protein level, C-reactive protein and erythrocyte sedimentation rate to the 20th day of observation. It should be noted that the significant difference of studied parameters between cultured and cryopreserved MMSCs was not found.

Jointly analyzing of inflammation markers in the blood of experimental animals it can be argued about the presence of a positive trend in the course of inflammation after CMMSCs and CrMMSCs administration. Correction effect of generalized MMSC administration on the chronic inflammation of the ovaries probably associated with immunomodulatory properties of investigated objects.

Keywords: bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells, culturing, cryopreservation, chronic inflammation of the ovaries.

Рецензент – проф. Шепітько В. І.

Стаття надійшла 02. 03. 2015 р.