

КОРРЕКЦИЯ НАРУШЕНИЙ СИСТЕМЫ КРОВЕТВОРЕНИЯ, ВЫЗВАННЫХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ГИПОТИРЕОЗОМ, КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫМИ ПРЕПАРАТАМИ КОРДОВОЙ КРОВИ

О. В. Кудокоцева, И. И. Ломакин, В. Ю. Пурешева

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков

Резюме. Снижение уровня гормонов щитовидной железы, проявляющееся в результате гипотиреоза, приводит к стойкой патологии системы кроветворения — развитию анемии и лейкопении. В этой связи целью настоящей работы было экспериментальное исследование влияния криоконсервированного препарата кордовой крови человека (ККч) как трансфузионного материала для коррекции анемии и лейкопении, вызванных недостаточностью гормонов щитовидной железы. В работе использованы клеточные и бесклеточные препараты ККч, что дает возможность определить роль отдельных компонентов кордовой крови (клеток и цитокинов плазмы) в процессах восстановления кроветворения у экспериментальных животных с мерказолиловой моделью гипотиреоза и стимуляции их собственной гормонопродуцирующей функции щитовидной железы, угнетенной мерказолилом. Можно заключить, что лечебный эффект терапии препаратами кордовой крови складывается из различных воздействий, основным из которых все же следует признать участие кроветворных клеток в репарации поврежденной ткани реципиента.

Ключевые слова: кроветворение, тиреоидные гормоны, гипотиреоз, кордовая кровь.

КОРЕКЦІЯ ПОРУШЕНЬ СИСТЕМИ КРОВОТВОРЕННЯ, ВИКЛИКАНИХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ ГІПОТИРЕОЗОМ, КРІОКОНСЕРВОВАНИМИ ПРЕПАРАТАМИ КОРДОВОЇ КРОВІ

О. В. Кудокоцева, І. І. Ломакін, В. Ю. Пурешева

Резюме. Зниження рівня гормонів щитовидної залози, що виявляється в результаті гіпотиреозу, призводить до стійкої патології системи кровотворення — розвитку анемії та лейкопенії. У зв'язку з цим метою цієї роботи було експериментальне дослідження впливу криоконсервованого препарату кордової крові людини (ККЛ) як трансфузійного матеріалу для корекції анемії і лейкопенії, викликаних недостатністю гормонів щитовидної залози. У роботі використані клітинні і безклітинні препарати ККЛ, що дає можливість визначити роль окремих компонентів кордової крові (клітин та цитокинів плазми) в процесах відновлення кровотворення у експериментальних тварин з мерказоліловою моделлю гіпотиреозу і стимуляції їх власної гормонопродукуючої функції щитовидної залози, пригніченої мерказолілом. Можна зробити висновок, що лікувальний ефект терапії препаратами кордової крові складається з різних впливів, основним з яких все ж слід визнати участь кроветворних клітин в репарації пошкодженої тканини реципієнта.

Ключові слова: кровотворення, тиреоїдні гормони, гіпотиреоз, кордова кров.

CORRECTION OF HEMATOSIS SYSTEM DISORDERS INDUCED BY EXPERIMENTAL HYPOTHYROIDISM AND CRYOPRESERVED CORD BLOOD PREPARATIONS

O. V. Kudokotseva, I. I. Lomakin, V. Yu. Purysheva

Summary. Decrease of thyroid hormones level manifesting due to hypothyroidism leads to sustained pathology of hematosis system, development of anemia and leukopenia. Herewith the research aim was an experimental investigation of effect of cryopreserved human cord blood (HCB) preparation as transfusion material for correction of anemia and leukopenia caused by insufficiency of thyroid hormones. We used cell and cell-free HCB preparations, this enables to determine the effect of certain cord blood components (cells and plasma cytokines) on hematosis regeneration in experimental animals with mercasolil model of hypothyroidism and stimulation by their thyroid hormone-producing function suppressed by mercasolil. One may conclude that the treatment effect of therapy with cord blood preparations consists in different influences, involvement of hematosis cells into reparation of recipient's damaged tissue should be considered as the main one.

Keywords: hematosis, thyroid hormones, hypothyroidism, cord blood.

Адрес для переписки:

Кудокоцева Ольга Валентиновна

кандидат биологических наук

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины
61015, Харьков, ул. Переяславская, 23

Хорошо известно, что аллогенные и аутологичные трансплантации гемопоэтических стволовых

клеток (ГСК) кордовой крови (КК) являются общепринятым методом лечения значительного ко-

личества онкологических и незлокачественных заболеваний системы крови [1, 2]. Трансплантации ГСК КК показаны также при иммуно- и гемодепрессивных состояниях различного генеза. Кордовая кровь нашла свое применение и в неонатологии в качестве альтернативы донорским трансфузиям [3]. Таким образом, клеточные препараты, полученные из кордовой крови человека (ККч), представляют собой новый класс современных иммуномодуляторов, действующих на все звенья клеточного и гуморального иммунитета и в настоящее время широко используются при различных патологических состояниях, сопровождающихся нарушениями системы иммунитета и кроветворения.

Задokumentировано, что значительное количество населения Украины в настоящее время страдает гипотиреозом [4]. Рост частоты заболеваний, связанных с нарушением функции щитовидной железы, обусловлен неблагоприятным состоянием окружающей среды, важнейшими факторами которого являются последствия аварии на ЧАЭС, а в недалеком будущем — и последствия аварии на самой крупной в мире АЭС в Японии в марте 2011 г., химические загрязнения, а также наличием эндемических районов по йоддефициту. Для гипотиреоза характерно развитие анемии и лейкопении [5, 6], что связано с недостатком гормонов, играющих свою роль в образовании клеточных элементов крови.

В этой связи целью настоящей работы являлось исследование в эксперименте влияния ксенотипного по происхождению препарата кордовой крови (человек-крыса) как трансфузионного материала для коррекции анемий и лейкопений, вызванных недостаточностью гормонов щитовидной железы.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования выполнены на 80-ти беспородных белых самках крыс 4-месячного возраста массой тела 140–160 г. Работа с экспериментальными животными проводилась в соответствии с положением Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, Франция, 1985).

В контрольную группу входили интактные животные и животные, которым вводились клеточные и бесклеточные (б/к) препараты ККч. В динамике проведения эксперимента и в период наблюдения ни одно из исследуемых животных не погибло.

Гипотиреоз в эксперименте моделировали пероральным введением фармакопейного тиреостатика мерказолила (мерказолиловый гипотиреоз) (МГ) [7]. Препарат вводили ежедневно при принудительном безальтернативном питье водного раствора из расчета на одно животное 50 мг/кг массы тела в сутки в течение 4-х месяцев. Полноту достижения гипотиреоза контролировали измерением концентрации трийодтиронина и тироксина в сыворотке крови.

В качестве препарата кордовой крови использовали криоконсервированную взвесь ядросодержащих клеток (ЯСК) ККч [8].

Сбор кордовой крови производили после получения информированного согласия у беременной, которая проходила тщательный дородовой скрининг на наличие противопоказаний к донорству КК.

Выделение фракции ядросодержащих клеток (ЯСК) из кордовой крови проводили методом седиментации эритроцитов в градиенте аптечного препарата Полиглюкин. В качестве криопротектора использовали ДМСО в конечной концентрации 5,0 %. Криоконсервирование ЯСК ККч проводили по разработанной и запатентованной в ИПКиК НАН Украины методике [8].

Исследования ЯСК (CD45+) КК, в том числе и гемопоэтических (CD34+), до и после криоконсервирования были проведены на проточном цитометре FACS Calibur фирмы Becton Dickinson (США) по международному ISHAGE протоколу. Жизнеспособность ЯСК до и после криоконсервирования оценивали с использованием 7AAD (BD) [8].

Бесклеточный препарат ККч получали при дополнительном центрифугировании клеточного, вышеуказанного, препарата при 3000 об/мин в течение 15–20 минут. Получаемый в результате центрифугирования супернатант не содержал ЯСК и ГСК КК и представлял собой бесклеточный препарат, используемый в наших экспериментах в качестве контроля.

Все препараты ККч вводились экспериментальным животным в хвостовую вену на 13-е сутки проведения эксперимента. Использовали рекомендованную для успешной трансплантации дозу жизнеспособных после размораживания ГСК (CD34+), равную (1,7–2,3)Ч105/кг массы тела реципиента [1, 2].

Определение уровня гормонов проводили иммуноферментным методом с помощью тест-наборов для определения тиреоидных гормонов (общая и свободная фракция тироксина и трийодтиронин) ООО «Дослідно-виробничий інститут біотехнології», Украина. Исследования гормональных уровней тироксина и трийодтиронина проводились в 1, 3, 7 и 14-е сутки после введения препаратов.

Подсчет ядерных клеток в гепаринизированной крови проводили общепринятым методом в камере Горяева. Лейкоцитарную формулу подсчитывали в окрашенных мазках крови по Романовскому-Гимзе, используя готовый раствор.

Статистическая обработка полученных цифровых результатов проводилась с помощью программы «StatGraphics-2.1». Достоверность различий между группами оценивали с использованием теста Manna-Whitney.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Широко используемой экспериментальной моделью гипотиреоза является фармакологическая мерказолиловая модель. Мерказолил (1-ме-

тил-2-меркаптоимідазол) інгібує активність тиропероксидази щитовидної залози і блокує окислення йодистих солей до активного йода, а також гальмує синтез моноїодтирозина і дийодтирозина і, відповідно, перетворення дийодтирозина в тироксин. При введенні в організм експериментальних тварин мерказолила (за розрахунку 50 мг/кг маси тіла в сутки впродовж 2-х місяців) розвивається прогресуючий процес, який до кінця восьмої тижня характеризується стійким ураженням щитовидної залози. Зменшена продукція гормонів в щитовидній залозі проявляється суттєвим зменшенням рівня тиреоїдних гормонів в плазмі периферическої крові мишей. Під впливом мерказолила у самок мишей відбувалося достовірне зменшення рівня Т4_{вс} в крові на 72 % ($p < 0,001$) і Т4_{св} — на 55 %, рівня Т3_{вс} — на 37 % порівняно з відповідними показателями у тварин контрольної групи. Рівень Т3_{св} достовірно перевищував такий у контрольних мишей.

Розвиваючись в експерименті МГ приводило до розвитку анемії і лейкопенії у підопитних тварин. В динаміці дослідження периферическої крові експериментальних тварин відзначається достовірне зменшення (до 55 %) кількості еритроцитів при мерказолилової моделі гіпотиреозу (табл. 1). На протязі всього терміну спостереження відзначається прогресуюче зменшення кількості лейкоцитів, коли рівень зниження досягає 60 % порівняно з інтактними тваринами. Зменшення кількості нейтрофілів прогресує до закінчення другого місяця спостереження — досягає 60 %. Рівень лімфоцитів при експериментальному гіпотиреозі достовірно не змінюється відносно контролю. Показателі кількості еозинофілів незмінні на протязі всього експерименту.

леним йода, може відбуватися утворення йодпротеїнів, тироксину і трийодтироніну, а активність антимікробних систем (процесів фагоцитозу) лейкоцитів напряму пов'язана з процесами йодування. Показано [9], що тільки до 20 % трийодтироніну крові людини має тиреоїдне походження, решта кількість гормону в крові утворюється шляхом йодування тироксину в трийодтиронін.

Таким чином, зменшення об'єму клітинних елементів в периферическій крові в процесі розвитку гіпотиреозу вліч за собою зменшення імунної активності і потенціювання прогресуючого зниження рівня тиреоїдних гормонів.

Введення препаратів ККч зменшувало вираженість проявів анемії і лейкопенії при мерказолилово-гіпотиреозі (табл. 1). У інтактній групі тварин при введенні ККч недостовірне збільшення кількості еритроцитів виявлялося на 2-й день з наступним поверненням до початкових значень на 7–14-й дні. Відзначена також тенденція збільшення рівня лейкоцитів до 20 % з поверненням до початкового рівня на 14-й день спостереження (табл. 1).

Збільшення кількості еритроцитів в групі експериментальних гіпотиреозу після введення препарату ККч прогресувало, досягаючи кінця 14-го дня достовірно високих значень, а відзначене збільшення кількості лейкоцитів утримувалося на 2–7-й дні спостереження і відповідувало початковому рівню в контрольній групі (табл. 1).

Таким чином, введення препаратів ККч сприяло регресу розвинутих при експериментальному гіпотиреозі порушень в формі наростаючої анемії і лейкопенії. Дані зміни можна пов'язати з високим рівнем еритропоїтину в плазмі ККч — основного факто-

Таблиця 1
Динаміка зміни кількості формених елементів крові мишей при МГ і введенні препарату ККч (М ± m)

Клітини крові	Термін спостереження	Досліджуєма група		
		Контроль	МГ	МГ + ККч
Еритроцити ($\times 10^{12}/л$)	Початок	8,5 ± 0,2	5,2 ± 0,5*	5,2 ± 0,5*
	2 дні	9,1 ± 0,3	4,5 ± 0,5*	6,5 ± 0,5*
	7 дні	8,7 ± 0,4	4,7 ± 0,2*	6,7 ± 0,2*
	14 дні	8,2 ± 0,6	5,1 ± 0,3*	7,1 ± 0,3*
Лейкоцити ($\times 10^9/л$)	Початок	12,4 ± 0,2	6,4 ± 0,6*	6,4 ± 0,6*
	2 дні	14,8 ± 1,1	6,4 ± 0,5*	8,1 ± 0,2*
	7 дні	14,0 ± 1,5	6,0 ± 1,0*	8,5 ± 0,2*
	14 дні	12,8 ± 1,1	5,8 ± 0,7*	7,5 ± 0,2*

Примітки: n = 5, * — $p < 0,05$ порівняно з показателем контролю.

Представлені в роботі дані відносно кількості лейкоцитів і нейтрофілів можуть відображати стан антимікробної системи організму експериментальних тварин. Відомо [9], що в нейтрофілах, паралельно з накоп-

ра, підтримуючого базальний рівень формации червоної крові, який діє через специфічні рецептори, розташовані на поверхні клітин. В такому випадку, як трансфузійний матеріал для корекції систе-

мы кроветворения достаточно было бы применять бесклеточные препараты ККч, а именно — плазму или сыворотку кордовой крови. Ответить на этот вопрос нам помогут проведенные нами эксперименты по влиянию трансфузии клеточных и бесклеточных препаратов ККч на уровень тиреоидных гормонов в плазме периферической крови экспериментальных животных как основной причины развития анемии и лейкопении при их недостаточности вследствие гипотиреоза.

Из таблицы 2 видно, что при введении клеточного препарата ККч крысам контрольных групп отмечалась тенденция к увеличению количества тиреоидных гормонов в периферической крови. Хотя высокой степени достоверности при анализе данных не получено, крайние показатели уровней гормонов явно подчеркивали эту тенденцию (81,0 нМоль/л — для Т4общ.; 19,0 нМоль/л — для Т4своб.; 4,2 нМоль/л — для Т3общ. и 15,9 нМоль/л — для Т3своб.).

К 14 суткам наблюдения эта тенденция угасала, что, возможно, отражало общую направленность эндокринной системы к состоянию гормональной эйтонии. Изменения в содержании гормонов в периферической крови при введении препарата ККч крысам с экспериментальным гипотиреозом носили ту же направленность: отмечали увеличение количества всех фракций тиреоидина и трийодтиронина к 3-м суткам, сохранение на этих уровнях на 7-е и на 14-е сутки после введения препарата ККч (табл. 2). Отмеченное более значительное статистически достоверное и более устойчивое по времени повышение уровня гормонов может быть связано со стимуляцией собственной гормонопродуцирующей функции щитовидной железы.

Введение бесклеточного препарата ККч, не содержащего ГСК, практически не отразилось на содержании всех фракций Т4 и Т3 в контрольной

группе животных, отмечалась лишь некоторая тенденция к увеличению свободной фракции трийодтиронина на 3-и и 7-е сутки. В группе с экспериментальным гипотиреозом отмечалось достоверное увеличение Т4общ., Т4своб., Т3общ., и статистически недостоверное увеличение Т3своб. (табл. 2).

В работе показано, что введение препаратов ККч при МГ способствует возрастанию уровня гормонов при угнетенной мерказолилом функции щитовидной железы. Сравнивая величины возрастания тиреоидных гормонов можно отметить, что клеточный препарат вызывает более чем в 2 раза, по сравнению с бесклеточным препаратом, увеличение тиреоидных гормонов в периферической крови экспериментальных животных. При этом эффект от применения клеточного препарата сохранялся на протяжении 14-ти суток наблюдения в отличие от более кратковременного эффекта от бесклеточного препарата.

Несмотря на то, что плазма КК представляет собой уникальную биологически активную субстанцию, содержащую более 60 специфических плацентарных белков, которые играют роль цитокинов, интерлейкинов, ферментов, адаптогенов, факторов роста, иммунорегуляторных агентов и т.д. [10], можно заключить, что лечебный эффект терапии препаратами кордовой крови складывается из различных воздействий, основным из которых все же следует признать участие кроветворных клеток в репарации поврежденной ткани реципиента. Репарация ткани представляет собой сложный процесс, одной из составляющих которого является стимуляция пролиферативной активности собственных клеток реципиент, в нашем случае это может быть как стимуляция гормонопродуцирующей функции щитовидной железы экспериментальных животных, так и стимуляция собственных гемопоэтических стволовых клеток.

Таблица 2

Концентрация тиреоидных гормонов в плазме крови крыс при введении крысам с МГ клеточного (ККч) и бесклеточного (б/к) препарата кордовой крови ($M \pm m$) нМоль/л)

Гормон	Исследуемая группа	Срок наблюдения			
		Начало эксперимента	3 сутки	7 сутки	14 сутки
Т4общ.	Контроль	68,2 ± 6,4	72,6 ± 8,4	72,2 ± 6,4	71,0 ± 5,4
	МГ+ККч	18,7 ± 3,9*	26,2 ± 2,0*	28,7 ± 3,7*	22,4 ± 4,2*
	МГ+ б/к	18,7 ± 3,9*	24,2 ± 2,5*	24,7 ± 1,7*	19,4 ± 2,2*
Т4своб.	Контроль	14,8 ± 2,2	16,8 ± 2,0	15,7 ± 3,2	16,5 ± 2,5
	МГ+ККч	3,8 ± 0,2*	7,2 ± 0,4?	6,7 ± 1,7*	4,8 ± 0,2*
	МГ+б/к	3,8 ± 0,2*	6,2 ± 0,6?	4,7 ± 1,5*	4,2 ± 0,2*
Т3общ.	Контроль	3,4 ± 0,8	3,7 ± 0,5	4,0 ± 0,5	3,5 ± 0,5
	МГ+ККч	1,6 ± 0,3*	2,28 ± 0,2*	2,1 ± 0,3?	2,6 ± 0,8
	МГ+б/к	1,6 ± 0,3*	1,8 ± 0,5*	1,7 ± 0,3*	1,7 ± 0,6*
Т3своб.	Контроль	12,2 ± 1,8	14,5 ± 0,7	14,7 ± 1,2	13,8 ± 1,4
	МГ+ККч	18,6 ± 2,7*	21,7 ± 0,5*	22,2 ± 1,6*	20,5 ± 2,5*
	МГ+б/к	18,6 ± 2,7*	19,7 ± 0,5*	20,0 ± 1,5*	19,5 ± 1,3*

Примечания: n = 5, * — p < 0,05 по сравнению с показателем контроля.

Таким образом, комплексные препараты кордовой крови, включающие в себя суспензию всех ЯСК, в том числе и ГСК, взвешенных в богатой биологически-активными веществами плазме, могут влиять на все системы и звенья организма, способствуя нормализации их работы.

Исходя из многочисленных литературных данных и собственных экспериментальных наблюдений можно сделать вывод о перспективности дальнейшего экспериментального исследования и возможности клинического применения препаратов кордовой крови.

ЛИТЕРАТУРА

1. Биологические основы и перспективы терапии стволовыми клетками [Текст] / Е. Б. Владимирская, О. А. Майорова, С. А. Румянцев [и др.]. – М.: Медпрактика, 2005. – 391 с.
2. Румянцев, А. Г. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток у детей. Руководство для врачей [Текст] / А. Г. Румянцев, А. А. Масчан. – М.: Медицинское информационное агентство «МИА», 2003. – 910 с.
3. Федорова, Т. А. Использование пуповинной крови как альтернатива донорским трансфузиям в неонатологии [Текст] / Т. Федорова, М. Аппалуп // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2006. – № 1 (3). – С. 39–41.
4. Assessment of the Iodine Deficiency Disorders and monitoring their elimination: a guide for programme managers [Text] / 3rd ed. – Geneva: WHO/Euro/NUT, 2007. – P. 1–98.
5. Ткаченко, В. И. Гипотиреоз: патогенетические основы клинических проявлений [Текст] / В. И. Ткаченко // Семейная медицина. – 2008. – № 1. – С. 15–19.
6. Boelaert, K. Thyroid hormone in health and disease [Text] / K. Boelaert, J. Franklyn // J. of Endocrin. – 2005. – Vol. 187, N 1. – P. 1–15.
7. Доклінічне вивчення тиреостатичних та тиреоїдстимулюючих засобів [Текст] / О. С. Ром-Богуславська [та ін.] // Доклінічні дослідження лікарських засобів: Метод. Рекомендації. – Київ, 2001. – С. 409–420.
8. Кордовая кровь — альтернативный источник стволовых клеток для регенеративной медицины: новые подходы к проблеме криоконсервирования [Текст] / Л. А. Бабийчук [и др.] // Буковинський медичний вісник. – 2009. – № 4. – С. 23–26.
9. Sapin, R. Thyroxine (T4) and triiodothyronine (T3) determinations: techniques and value in the assessment of thyroid function [Text] / R. Sapin, J. L. Schlienger // Ann. Biol. Clin. (Paris). – 2003. – Vol. 61. – N 4. – P. 411–420.
10. Мошко, Ю.О. Кріоконсервування сироватки кордової крові, визначення її біологічної активності та клінічної ефективності в терапії хронічних сальпінгофоритів [Текст]: Автореф. дис. ... канд. мед. наук / Ю. Мошко. – Харків, 2003. – 20 с.