

## ВПЛИВ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ ГЕМОПОЕТИЧНИХ КЛІТИН КОРДОВОЇ КРОВІ НА ПОКАЗНИКИ ІМУНІТЕТУ ОРГАНІЗМУ СОБАК

*Гонтаренко А.О., Стегній Б.Т., Келеберда М.І., Кузнєцов Є.П.*

*Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків, Україна, e-mail: ar.temiy@mail.ru*

*В експерименті вивчено вплив трансплантації гемопоетичних клітин кордової крові на показники імунітету собак. Трансплантацію проводили клінічно здоровим тваринам і тваринам із індукованим станом імуносупресії на фоні тривалого застосування глюкокортикоїду дексаметазон. Результати досліджень доводять здатність клітин кордової крові впливати на показники гуморального і клітинного імунітету. Встановлено, що після трансплантації у тварин з імуносупресією відновлювалась кількість популяцій Т- і В- лімфоцитів та підвищувався рівень імуноглобулінів у крові, відмічено збільшення фагоцитарної активності макрофагів.*

**Ключові слова:** гемопоетичні клітини, імунітет, кордова кров, собаки, кровотворення

Існує багато захворювань, які призводять до тяжких розладів з боку системи імунітету та гемопоезу, та викликають порушення обміну речовин, що негативно впливає на організм у цілому та призводить до тяжких ускладнень захворювання. Часто у таких випадках під час терапії захворювань як інфекційної, так і неінфекційної етіології загальноприйняті схеми лікування не здатні ефективно впливати на відновлення порушень з боку системи імуногемопоезу. Зважаючи на це, сучасна ветеринарна медицина потребує нових альтернативних рішень у лікуванні важких імуносупресивних станів організму та патологій системи кровотворення. В останні роки значний науковий інтерес прикуто до розробки методів лікування на основі клітинно-тканинної терапії. Дослідження в цій галузі свідчать про високий потенціал використання біологічних структур фетоплацентарного комплексу [1]. Унікальність такого виду терапії полягає в тому, що введені в організм фрагменти фетальних тканин і клітини виконують замісну функцію, а також вони самостійно здатні синтезувати велику кількість біологічно активних речовин, що призводить до загальної стимуляції обмінних процесів і позитивно впливає на організм у цілому [2]. Важливим об'єктом досліджень в області клітинної біології, експериментальної і клінічної медицини сьогодні є стовбурові клітини (СК). Сучасною наукою доведено здатність стовбурових клітин до самовідновлення та диференціації в інші типи клітин організму, що дає широкі можливості їх використання при лікуванні різного генезу захворювань [7]. Основними джерелами для отримання СК вважаються жирова тканина та кістковий мозок дорослого організму або такі структури фетоплацентарного комплексу, як кров та ембріональна печінка. СК отримані із структур фетоплацентарного комплексу мають певні переваги перед аналогічними клітинами отриманими від дорослого організму [12]. З віком у дорослому організмі кількість стовбурових клітин значно зменшується, це обумовлено тим, що здатність клітин ділитися обмежена, тому потенціал ділення стовбурових клітин отриманих з ембріональних структур значно вищий ніж у аналогічних клітин отриманих від дорослого організму [3, 4, 5]. Також фетальні клітини мають слабо експресовані комплекси головних антигенів гістосумісності, що суттєво знижує імовірність їх відторгнення організмом після трансплантації [8, 5]. Чисельні матеріали сучасних досліджень розкривають перспективи використання кордової крові (КК) як джерела гемопоетичних стовбурових клітин, також плазма КК у своєму складі містить широкий комплекс біологічно активних речовин: гормонів, інтерферонів, факторів росту, гемопоетинів, ферментів, вітамінів і мікроелементів [6, 11]. Сучасні дослідження доводять позитивний вплив клітин КК як на різні органи, системи і клітинні культури, так і на організм у цілому. Суть застосування трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин КК напряму пов'язана з відновленням порушень системи імуногемопоезу. Вивчення особливостей впливу гемопоетичних клітин КК на організм тварин дає можливість створення нових ефективних методів лікування у сучасній ветеринарній медицині.

**Мета роботи** – дослідити вплив трансплантації гемопоетичних клітин кордової крові на показники імунітету собак.

**Матеріали та методи.** Кордову кров отримували з плаценти та пуповини плоду після проведення кесаревого розтину сук на останніх строках вагітності. Кров відбирали закритим шляхом за допомогою стерильного шприца з додаванням антикоагулянту. Зібрану КК розділяли на лейкоцитарну та еритроцитарну фракції методом седиментації з використанням розчину поліглюкін. Отриману лейкоцитарну фракцію кріоконсервували з використанням кріопротекторів ДМСО або ПЕО-1500 за допомогою контрольованого заморожування та зберігали у рідкому азоті за температури  $-196^{\circ}\text{C}$ . Розморожування кріоконсервованих клітин КК собаки проводили на водяній бані за температури  $(37-41)^{\circ}\text{C}$ , до повного переходу зразків у рідку фазу.

Дослід проводили на собаках 5–6 місячного віку. Усі собаки попередньо проходили період карантину впродовж 15 діб з метою виявлення наявності можливих захворювань. За 10 діб перед початком дослідження собакам проводили обробку від екто- та ендопаразитів. На момент початку дослідження всі тварини були клінічно здоровими. Було сформовано 4 групи тварин: 1-а – клінічно здорові собаки, яким вводили кріоконсервований лейкоконцентрат КК собак у дозі  $1 \times 10^6/\text{kg}$  маси тіла в/в, потім досліджували кров за показниками системи імунітету на 3, 7, 14 та 21 добу; 2-а – інтактні тварини яким не застосовували клітини КК собак (контрольна група); 3-я – тварини, яким було спровоковано стан імуносупресії, 4-а – тварини, яким було спровоковано стан імуносупресії та введено клітини КК. Розвиток імуносупресивного стану індукували шляхом введення тваринам 3-ї та 4-ї дослідних груп препарату «Дексаметазон» в/м у дозі  $1 \text{ mg/kg}$  маси тіла впродовж 30 діб з поступовим зниженням дози починаючи з 22 доби. Тваринам 4-ї дослідної групи, на 21 добу після введення «Дексаметазону», одноразово вводили клітини КК собак у дозі  $1 \times 10^6/\text{kg}$  маси

## Розділ 5. Імунологія

тіла в/в, після цього відбір проб крові проводили на 3, 7, 14 та 21 добу у тварин 3-ої та 4-ої групи. Кров досліджували за наступними показниками: загальна кількість лейкоцитів, Т-лімфоцитів (CD2, CD3), Т-хелперів (CD-4), Т-супресорів (CD-8), В-лімфоцитів (CD-19, CD-22), кількість імуноглобулінів, а також встановлювали фагоцитарний індекс та фагоцитарне число макрофагів.

**Результати досліджень.** У першій серії дослідів кріоконсервовані клітини КК вводили клінічно здоровим тваринам (тварини 1-ої групи, n=5). Встановлено, що максимальне збільшення загальної кількості лейкоцитів до  $11,7 \pm 0,12$  тис/мкл спостерігалось на 14 добу дослідю. До введення середні показники становили  $8,6 \pm 0,55$  тис/мкл. Максимальне збільшення абсолютної кількості імунокомпетентних клітин у периферійній крові спостерігалось на 14 та 21 добу. Так, рівень Т- і В-лімфоцитів на 14 добу збільшився в середньому на 31,7 % та 25,6 % відповідно, на 21 добу ці показники суттєво не змінювались та залишались приблизно на тому ж рівні. Також відмічалось збільшення показників фагоцитарного індексу та фагоцитарного числа на 7,6 % та 15,2 %, відповідно. Такі дані свідчать, що трансплантація клітин КК впливає на підвищення рівня Т- і В-лімфоцитів та приводить до збільшення загальної кількості лейкоцитів в організмі тварин. Відмічалось, що загальна кількість лейкоцитів у периферійній крові тварин збільшувалася після трансплантації клітин КК поступово та досягла максимального значення на 14 добу після введення клітин КК. Також слід зазначити, що цей показник залишався в межах фізіологічної норми. Тому можна зробити висновок, що алогенна трансплантація гемопоетичних клітин КК не викликала у клінічно здорових тварин різкого збільшення загальної кількості лейкоцитів, що свідчить про відсутність гострої алергічної реакції при застосуванні даного біологічного матеріалу. Також трансплантація клітин КК здатна підвищувати показники фагоцитарної активності лейкоцитів у крові.

Наступним етапом було дослідження здатності гемопоетичних клітин КК впливати на показники імунітету у собак із індукованим станом імуносупресії. Результати досліджень представлені в таблиці № 1.

**Таблиця 1** – Вплив кріоконсервованих клітин КК на показники імунної системи собак за умови експериментального імуносупресивного стану (n = 5).

| Показники                                | Показник до застосування дексаметазону | 21 доба застосування дексаметазону до введення клітин КК | Тварини дослідної групи № 3        |           |            |            | Тварини дослідної групи № 4    |           |            |            |
|--|--|--|------------------------------------|-----------|------------|------------|--------------------------------|-----------|------------|------------|
|  |  |  | тварини яким не вводили клітини КК |           |            |            | тварин яким вводили клітини КК |           |            |            |
|  |  |  | на 3 добу                          | на 7 добу | на 14 добу | на 21 добу | на 3 добу                      | на 7 добу | на 14 добу | на 21 добу |
| Лейкоцити                                | 8,9*                                   | 6,1  | 6,2                                | 6,8       | 8,2*       | 8,3*       | 11,3*                          | 10,9*     | 10,4*      | 9,9*       |
| Абс. число мононуклеарів                 | 3550*                                  | 1900   | 1800                               | 1950      | 2350*      | 3050*      | 4650*                          | 4450*     | 4150*      | 3600*      |
| Абс. число поліморфно-ядерні. Лейкоцитів | 5350                                   | 5500   | 5800                               | 5850      | 5600       | 5450       | 6900*                          | 6350*     | 5650       | 5250       |
| Т-лімфоцити абс. число                   | 1897*                                  | 1048   | 1032                               | 1225      | 1423*      | 1591*      | 2754*                          | 2686*     | 2145*      | 1950*      |
| Т – хелпери абс. число                   | 1138*                                  | 648  | 705                                | 775*      | 884*       | 1007*      | 1805*                          | 1650*     | 1428*      | 1170*      |
| Т – супресори абс. число                 | 517*                                   | 342  | 334                                | 356       | 412*       | 483*       | 760*                           | 741*      | 696*       | 660*       |
| В – лімфоцити абс. число                 | 728*                                   | 306  | 364                                | 392       | 431*       | 588*       | 776*                           | 855*      | 863*       | 798*       |
| Імуноглобуліни мг/мл -G                  | 9,2*                                   | 6,2  | 6,3                                | 6,9       | 7,5*       | 8,3*       | 13,7                           | 15,2*     | 14,8*      | 14,1*      |
| -A                                       | 1,53*                                  | 0,93   | 0,9                                | 1,1       | 1,2        | 1,3        | 2,3*                           | 2,4*      | 2,1*       | 2,2*       |
| -M                                       | 1,29                                   | 0,7  | 0,91                               | 0,98      | 1,1        | 1,0        | 1,4*                           | 1,3*      | 1,5*       | 1,4*       |
| Фагоцитарний індекс                      | 69,3*                                  | 49,3   | 53,4*                              | 55,6*     | 61,1*      | 63,2*      | 73,2*                          | 76,7*     | 72,4*      | 73,1*      |
| Фагоцитарне число                        | 6,2*                                   | 3,1  | 2,9                                | 3,6       | 4,0*       | 3,7*       | 6,8*                           | 7,2*      | 6,9*       | 7,3*       |

Примітка: тваринам обох груп застосовували дексаметазон в імуносупресивних дозах, на 21 добу тваринам 4-ої групи вводили клітини КК, після цього у тварин 3-ої та 4-ої групи відбирали проби крові на 3, 7, 14 та 21 добу;  
\* - Достовірні відмінності даних ( $p < 0,05$ ) у порів'янні з показниками на 21 добу застосування дексаметазону, до введення клітин КК

За результатами досліджень встановлено, що після тривалого застосування препарату «Дексаметазон» у тварин 3-ї та 4-ої дослідної груп знижувалась загальна кількість лейкоцитів у середньому на 32 %, абсолютне число мононуклеарних клітин на 46,5 %. Абсолютне число поліморфноядерних клітин підвищилось на 3,2 % (характерно при застосуванні кортикостероїдних препаратів). У середньому абсолютне число Т-лімфоцитів знизилось на 44 %, абсолютне число Т-хелперів на 43 %, Т-супресорів

на 33 %, абсолютне число В-лімфоцитів знизилось в середньому на 57 %. Після трансплантації гемопоетичних клітин КК собак у тварин 4-ої дослідної групи вже на 3 добу спостерігали стрімке підвищення показників імунітету. Загальна кількість лейкоцитів збільшилась на 85 % відносно показників на момент індукованої імуносупресії організму та на 26,9 % була вищою відносно кількості лейкоцитів до початку застосування дексаметазону. На 7 та 14 добу рівень лейкоцитів у тварин 4-ої групи суттєво не змінювався, на 21 добу він зменшився, але в середньому на 13 % був вищим порівняно з показниками до початку застосування дексаметазону. Також у тварин 4-ої групи абсолютне число мононуклеарних клітин уже на 3 добу після застосування клітин кордової крові в середньому збільшилося на 144 %, абсолютне число поліморфноядерних лейкоцитів на 25%, рівень Т-лімфоцитів збільшився на 162 %, Т-супресорів – на 122%, Т-хелперів – на 178 %, рівень В-лімфоцитів збільшився на 153 % відносно показників на момент виникнення імуносупресивного стану. Далі на 7 та 14 добу не спостерігалось різких змін за цими показниками. Кількість популяцій імунокомпетентних клітин на 21 добу поступово знизилась та була східна з показниками до застосування дексаметазону. Такі показники як фагоцитарний індекс та фагоцитарне число у тварин 4-ої групи максимально збільшувалися на 10 % та 16 % відповідно. Також у тварин 4-ої дослідної групи після трансплантації клітин КК підвищувався рівень імуноглобулінів, у той час як у тварин 3-ої групи на 21 добу він залишався нижчим порівняно з показниками до застосування дексаметазону. У 3-й групі на 3 та 7 добу показники імунітету тварин, що свідчили про наявність стану імуносупресії, залишались близькими до рівня, що відмічався на момент виникнення стану імуносупресії. На 21 добу показники поступово підвищувались, але залишались нижчими порівняно з показниками крові клінічно здорових тварин (до застосування дексаметазону).

**Висновки.** Оцінка показників системи імунітету організму собак свідчить про здатність кріоконсервованих клітин КК впливати на ланки гуморального та клітинного імунітету. Встановлено, що у клінічно здорових тварин після трансплантації клітин КК підвищувалось число лейкоцитів у крові, але у межах фізіологічної норми. Збільшилась кількість популяції Т- і В-лімфоцитів, а також збільшився фагоцитарний індекс і фагоцитарне число. У групі тварин, яким було введено кріоконсервовані клітини КК після індукованого стану імуносупресії, уже на 3 добу спостерігали значне підвищення показників загальної кількості лейкоцитів, відмічали відновлення популяції Т- і В-лімфоцитів та рівня імуноглобулінів, спостерігали підвищення функціонального потенціалу клітин моноцитарно-фагоцитарної системи.

Таким чином отримані дані дають підґрунтя для широкого застосування трансплантації гемопоетичних клітин КК у клінічній ветеринарії для корекції порушень системи імуногемопоезу.

#### Список літератури

1. Грищенко, В. И. Трансплантация продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса. От понимания механизма действия к повышению эффективности применения [Текст] / В. И. Грищенко, А. Н. Гольцев // Пробл. криобиологии. — 2002. — № 1. — С. 54–84.
2. Грищенко, В. И. Концепция клеточной терапии [Текст] / В. И. Грищенко, Б. П. Сандомирский // Пробл. криобиологии. — 2000. — № 1. — С. 3–6.
3. Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults [Text] / H. E. Broxmeyer [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. — 1992. — Vol. 89, № 9. — P. 4109–4113.
4. Kollman, C. Assessment of optimal size and composition of US National Registry of hematopoietic stem cell donors [Text] / C. Kollman [et al.] // Transplantation. — 2004. — Vol. 78, № 1. — P.89–95.
5. Broxmeyer, H. E. Cord blood hematopoietic stem cell transplantation [Electronic resurse] / H. E. Broxmeyer // StemBook. — Cambridge, MA : The Stem Cell Research Community, May 26, 2010. — 14 pp. — Mode to access : URL : <http://www.stembook.org/node/693>. — Title from the screen.
6. Абдулкадыров, К. Заготовка плацентарной крови. Особенности её клеточного состава и гемопоэтического потенциала [Текст] / К. Абдулкадыров, Н. Романенко // Трансфузиология. — 2003. — Т. 4, № 1. — С. 15–33.
7. Биологические основы и перспективы терапии стволовыми клетками [Текст] / Е. Б. Владимирская, О. А. Майорова, С. А. Румянцев, А. Г. Румянцева. — М. : Медпрактика, 2005. — 391 с.
8. Gluckman, E. Sources of haemopoietic stem cells for allogeneic transplantation [Text] / E. Gluckman // Blood and Marrow Transplantation (The EBMT Handbook) / J. Apperley, E. Gluckman, A. Gratwohe (Eds.). — Paris : ESH-EBMT, 1998. — P. 88–96.
9. Кухарчук, А. Л. Эмбриональные плюрипотентные прогениторные клетки, иммунологическая толерантность, аутоиммунные заболевания и старение организма [Текст] / А. Л. Кухарчук, В. В. Радченко, В. М. Сирман // Трансплантология. — 2003. — № 4. — С. 225–228.
10. Gluckman, E. Current status of umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation [Text] / E. Gluckman // Exp. Hematol. — 2000. — Vol. 28, № 11. — P. 1197–1205.
11. Low molecular weight plasma antioxidants and lipid peroxidation in maternal and cord blood [Text] // M. Kiely, P. A. Morrissey, P. F. Cogan, P. J. Kearney // Eur. J. Clin. Nutr. — 1999. — Vol. 53, № 11. — P. 861–864.
12. A functional comparison of CD 34+ CD 38- cells in cord blood and bone marrow [Text] / Q. L. Hao [et al.] // Blood. — 1995. — Vol. 86, № 10. — P. 3745–3753.

#### THE EFFECT OF TRANSPLANTATION OF HEMATOPOIETIC CORD BLOOD CELLS ON DOGS' IMMUNITY

**Gontarenko A.O., Stegnyy B.T., Keleberda N.I., Kuznecov E.P.**

*National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv, Ukraine*

*The article presents data showing the efficacy of hematopoietic cells of cord blood. During the experiment was studied how the transplantation of cells in the cord blood influences dogs' immunity and hematopoiesis. For transplantation cryopreserved leukocyte fraction of dogs' cord blood was used. DMSO and polyethylene oxide (m.m. 1500) were used as cryoprotector. The cord blood cells were transplanted to clinically healthy animals, in order to study immunomodulating properties, as well as to explore possible post-transplant reactions from the recipient's body. During this experiment, there were no allergic reactions identified, and the result of the studies demonstrates the ability of cord blood cells affect immunity. Transplantation contributed to the gradual increase of the immunocompetent cells amount in the blood of the recipient animal. The level*

of these indicators maintained on the 21st day after transplantation. In the other experiment, there is data showing the ability of the cord blood cells to restore impaired immunity and hematopoiesis. Animals that undergone transplantation were clinically healthy with induced immunosuppression after the prolonged use of glucocorticoid dexamethasone. After transplantation performed to immunosuppressed animals, positive changes in the indices of immunity and hematopoiesis were observed on the 3d day. As a result, after the application amount of populations of T- and B-lymphocytes has restored and the level of immunoglobulin in the blood has increased, also has been observed an increase in phagocytic activity of macrophages. The obtained data were compared to those immunosuppressed animals, which were not treated with cord blood cells. In this group of animals on the 3d and 7th day, the total number of leukocytes as well as the level of T- and B-lymphocytes remained low, on the 21th day these parameters were gradually restoring, but were still lower than before the application of dexamethasone.

**Keywords:** hematopoietic cells, immunity, cord blood, dog, hematopoiesis.

УДК 619:615.37:611.013.8:612.07:636.7

## ВИВЧЕННЯ ДІЇ БІОПРЕПАРАТУ НА ОСНОВІ ЕКСТРАКТУ ПЛАЦЕНТИ НА СИСТЕМУ ІМУНІТЕТУ СОБАК ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ІМУНОДЕФІЦИТНОГО СТАНУ

**Стегній М.Ю., Малакєєв А.С., Воек С.І., Коновалов А.В., Десятніков Л.О.**

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»,  
м. Харків, Україна, e-mail: stegniy@vet.kharkov.ua

В останні роки намітилася тенденція до створення та використання препаратів, виготовлених із природної сировини. Їх переваги в тому, що вони мають високу біологічну активність і нешкідливі для організму. Широке розповсюдження отримали препарати, виготовлені на основі тканин фетоплацентарного комплексу. Оптимальним варіантом для отримання ефективних лікарських засобів є використання плаценти, яка має яскраво виражені імуномодулюючі властивості, стимулює функціональну активність організму, позитивно впливає на регуляторні функції центральної та вегетативної нервової системи, гормональну і секреторну діяльність. Завдяки своєму унікальному складу (містить гормони, поліпептиди, мікроелементи, вітаміни, ферменти та білки), екстракт плаценти проявляє виражену загально тонізуючу і трофічну дію, сприяючи детоксикації, нормалізує кислотно-лужний баланс, біохімічні показники і формулу крові, знімає наслідки стрес-реакції. Саме тому розробка лікарських засобів із плацентарної тканини відноситься до особливо пріоритетних напрямків біотехнології та ветеринарної медицини.

**Ключові слова:** Біопрепарат екстракт плаценти свині, імунітет, собак, неспецифічна резистентність, імунодефіцитний стан.

На підставі аналізу даних щодо біологічних препаратів на основі плаценти тварин ми прийшли до висновку, про необхідність розробки препарату на основі екстракту плаценти, який би при введенні в організм тварин сприяв відновленню порушеного обміну речовин, активізував функціональну діяльність організму та підвищував його стійкість до несприятливих факторів зовнішнього середовища.

**Метою** нашої роботи було вивчення впливу біопрепарату на основі екстракту плаценти на показники неспецифічної резистентності організму собак за експериментального імунодефіцитного стану.

**Матеріали та методи.** У ННЦ «ІЕКВМ» розроблено дослідний зразок препарату на основі екстракту тканин плаценти свині. За візуального дослідження даний препарат має вид однорідної рідини солом'яного кольору, при тривалому зберіганні має незначний осад який при легкому струшуванні перетворюється в однорідну рідину.

Дослідженням за ДСТУ 4483-2005 «Препарати ветеринарні і імунобіологічні. Методи визначення бактеріальної, грибової та мікоплазменої контамінації», не встановлено росту мікроорганізмів. Препарат перевіряли за СОУ 85.20-37.391-2006 «Препарати ветеринарні. Метод визначення нешкідливості» на 10 білих мишах масою по 20 г. Їм екстракт плаценти вводили внутрішньом'язово у п'ятикратній дозі 0,5 см<sup>3</sup>, підшкірно. Упродовж 10 добового спостереження серед мишей не встановлено жодного випадку загибелі та порушень їх загального фізіологічного стану, що свідчить про нешкідливість дослідного зразка препарату.

Вивчення дії біопрепарату на основі екстракту плаценти на систему імунітету собак за експериментального імунодефіцитного стану проводили в наступних дослідних групах:

- 1 група – (n=5) – інтактний контроль;
- 2 група – (n=5) – введення тваринам препарату «Дексаметазон»;
- 3 група – (n=5) – введення тваринам препарату «Дексаметазон» та дослідного біопрепарату на основі екстракту плаценти.

Розвиток імунодефіцитного стану у собак викликали шляхом введення тваринам внутрішньом'язово препарату «Дексаметазон» у дозі 1 мг/кг маси тіла тварини на протязі 30 діб з поступовим зниженням дози введення. На 21 добу після введення препарату