

УДК 612.112.084«46»:615.361:611.018.5:618.48]:57.086.13

В.В. Ломако^{1*}, Л.М. Піроженко²

Вплив кріоконсервованої кордової крові людини на лейкоцитарні показники у щурів

UDC 612.112.084«46»:615.361:611.018.5:618.48]:57.086.13

V.V. Lomako^{1*}, L.M. Pirozhenko²

Effect of Cryopreserved Human Cord Blood on Leukocyte Indices in Rats

Ключові слова: лейкоцити, кріоконсервовані ядровмісні клітини кордової крові, вік, щури.

Key words: leukocytes, cryopreserved cord blood nucleated cells, age, rats.

Ефекти кордової крові (КК) та її компонентів, зокрема стовбурових і ядровмісних клітин, ретельно вивчаються і використовуються для корекції низки патологічних станів. Аналіз популяційного складу CD45⁺-клітин кордової крові людини показав, що CD34⁺-клітини, а також лімфоцити і моноцити демонструють високий рівень збереженості і життєздатності після розморожування [2]. Однак більшість відповідних реакцій організму людини і тварин на введення КК (як ксено-, так алопоходження) дотепер не визначено, особливо з урахуванням вікових відмінностей. Відомо, що зміна співвідношення лейкоцитів крові є значущим маркером стану організму. Повноцінне фізіологічне функціонування лейкоцитів забезпечує підтримку імунного гомеостазу [1, 3]. Тому метою роботи було визначення ефектів внутрішньочеревного введення ядровмісних клітин кордової крові (ЯВК КК) людини на лейкоцитарні показники у інтактних молодих і старих щурів.

Експерименти дозволені комітетом з біоетики Інституту та узгоджені з основними положеннями Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження (№3447-IV від 21.02.2006) та «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986). Роботу проводили на молодих (6–7 місяців) і старих (18–20 місяців) самцях білих безпородних щурів, яких

The impacts of cord blood (CB) and its components, in particular stem and nucleated cells, are being thoroughly studied and used to compensate a number of pathological conditions. Analysis of population composition of CD45⁺-cells of human cord blood revealed the CD34⁺-cells, as well as lymphocytes and monocytes to have the high survival and viability levels after thawing [2]. But so far, most of the responses of human and animal body to CB administration (both of xeno- and allogeneic origin), especially bearing in mind the age differences, have still remained unclear. A change in blood leukocyte ratio is known to be a reliable marker of body's state. An appropriate physiological functioning of leukocytes ensures the maintenance of immune homeostasis [1, 3]. Therefore, this study was aimed to determine the effects of intraperitoneally injection of human cord blood nucleated cells (CB NCs) on leukocyte indices in intact young and aged rats.

Experiments were approved by the Bioethics Committee of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine and agreed with the main provisions of the Law of Ukraine 'On the Protection of Animals Against Cruelty (No. 3447-IV of February 21, 2006) and the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes' (Strasbourg, 1986). The research was carried out in young (6–7-month-old) and aged (18–20-month-old) white out-

¹Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

²КНП «Люботинська міська лікарня» ЛМХО, м. Люботин, Україна

***Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:**

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52
електронна пошта: victoria0regia@gmail.com

Надійшла 21.04.2020

Прийнята до друку 14.12.2021

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

²MNO 'Liubotyn Town Hospital' of Liubotyn Town Council of Kharkiv Region, Liubotyn, Ukraine

***To whom correspondence should be addressed:**

23, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952
e-mail: victoria0regia@gmail.com

Received 21, April, 2020

Accepted 14, December, 2021

до початку експерименту утримували у стандартних умовах виварію. Кількісно-якісну оцінку типів лейкоцитів здійснювали в мазках крові, оброблених фіксатором Май-Грюнвальда («МініМед», Росія) і забарвлених гематологічним барвником (за Романовським) («МініМед»), рахували по 100–200 клітин у кожному. Загальну кількість лейкоцитів оцінювали в камері Горяєва. Розраховували інтегральні лейкоцитарні індекси (ЛІІ) (таблиця), які ретельно описані раніше [4–6]. У експериментах використовували криоконсервовану суспензію ЯВК КК людини в аутологічній плазмі з концентрацією стовбурових CD34⁺-клітин $2,4 \times 10^5$ [2]. Деконсервованій препарат вводили щурам одноразово внутрішньочеревно в 1,0 мл аутологічної плазми у дозі $1,0 \times 10^5$ CD34⁺/кг маси тварини. Через 7 діб після ін'єкції тварин декапітували і проводили забір крові одночасно з фрагментами тканин для біохімічних, морфологічних та інших досліджень.

Тварин кожного віку розділили на експериментальні групи: інтактний контроль та після введення ЯВК КК.

Статистичну обробку результатів проводили за методом непараметричної статистики Крускала-Волліса з використанням програмного забезпечення Statistica 6.0 (MatStat Inc., США).

Аналіз отриманих результатів показав, що після ін'єкції ЯВК КК у молодих щурів загальна кількість лейкоцитів була підвищеною (тобто через 7 діб зберігався лейкоцитоз) на відміну від старих тварин. Кількісно-якісні співвідношення типів лейкоцитів у обох вікових групах змінювалися односпрямовано: відсоток паличкоядерних нейтрофілів та лімфоцитів збільшувався (у старих щурів була тільки тенденція), сегментоядерних та еозинофілів — знижувався, моноцитів — не змінювався (таблиця). Крім того, після введення ЯВК КК у мазках крові молодих щурів спостерігалися бластні клітини (1:200), а у старих щурів — мієлоцити (1:100) та юні клітини (1:100).

Збільшення частки паличкоядерних нейтрофілів і поява у мазках крові юних форм лейкоцитів на тлі лейкоцитозу свідчать про регенеративний зсув лейкоцитарної формули, що вказує на стимуляцію мієлопоезу. Зсув лейкоцитарної формули вліво може також відображати тимчасовий дисбаланс клітин і виникати після певних навантажень, тобто після впливу ендо- та екзогенних факторів (наприклад, введення ЯВК КК). Наявність у крові недиференційованих бластних клітин є ознакою активації функцій кісткового мозку [1, 3].

Зменшення відсотка сегментоядерних нейтрофілів у крові може бути наслідком нейтропенії, які пов'язані з міграцією нейтрофілів у тканині, або розвитку патології. Збільшення частки лімфоцитів

bred male rats, prior to experiment housed in animal facility. Leukocyte types were quantitatively and qualitatively evaluated in blood smears fixed with May-Grunwald solution (MiniMed, Russia) and stained with hematological dye (according to Romanovsky) (MiniMed), by counting 100–200 cells in each sample. The total leukocyte number was measured in Goryaev chamber. The integral leukocyte indices (ILIs) (Table), that we described previously [4, 5, 7], were calculated. A cryopreserved suspension of human CB NCs in autologous plasma with the stem CD34⁺ cell concentration of 2.4×10^5 [2] was used in the experiment. The warmed preparation was injected to rats once intraperitoneally in 1.0 ml of autologous plasma at a dose of 1.0×10^5 CD34⁺/kg of body weight. In 7 days after injection, the animals were decapitated, blood samples and tissue fragments were taken for biochemical, morphological and other studies.

Animals of each age were divided into the following experimental groups: intact control and that after CB NCs administration. The obtained results were statistically processed using the non-parametric Kruskal-Wallis statistic method with Statistica 6.0 software (MatStat Inc., USA).

The analysis of findings revealed the total leukocyte count to be increased in young rats after CB NCs injection (*i. e.* the leukocytosis persisted in 7 days), in contrast to the aged animals. Quantitative and qualitative ratios of leukocyte types in both age groups changed in one way: the percentage of band neutrophils and lymphocytes increased (only a tendency in aged rats), that of segmented ones and eosinophils decreased, and the percentage of monocytes remained unchanged (Table). In addition, following CB NCs injection, the blast cells (1:200) were found in blood smears of young rats, but myelocytes (1:100) and immature cells (1:100) were observed in aged ones.

An elevated band neutrophil count and appearance of immature leukocytes in blood smears together with leukocytosis testify to a regenerative shift of leukocyte formula, thereby indicating the myelopoiesis stimulation. A left shift of leukocyte formula may also suggest a temporary cell imbalance, appearing after certain loads, *i. e.* after exposure to endo- and exogenous factors (*e. g.* CB NCs administration). The presence of undifferentiated blast cells in blood testifies to the activation of bone marrow functions [1, 3].

Decreased percentage of segmented neutrophils in blood may be due to neutropeniae, associated either with neutrophil migration into tissues or pathology development. Increased lymphocyte count is related to an intensive proliferation of lymphoid cells during specific immunity development. Eosinopenia may suggest a decrease in body's resistance [1, 3].

Вплив ін'єкції криоконсервованих ядровмісних клітин кордової крові людини на лейкоцитарні показники крові у молодих і старих щурів ($M \pm SE$)

Impact of injection of cryopreserved human cord blood nucleated cells on blood leukocyte indices in young and aged rats ($M \pm SE$)

Лейкоцитарні показники Leukocyte indices	Вік, місяці Age, months			
	6		18	
	Контроль ($n = 15$) Control ($n = 15$)	ЯБК ($n = 5$) NCs ($n = 5$)	Контроль ($n = 8$) Control ($n = 8$)	ЯБК ($n = 5$) NCs ($n = 5$)
Загальна кількість, $10^9/l$ Total number, $10^9/l$	6,5 ± 0,09	12,5 ± 0,29*	7,3 ± 0,35	7,75 ± 0,43
Типи лейкоцитів, % Types of leukocytes, %				
Паличкоядерні Band	1,93 ± 0,42	5,5 ± 0,29*	2,5 ± 0,5	5,2 ± 1,03*
Сегментоядерні Segmented	27,07 ± 1,53	17,7 ± 2,6*	32,62 ± 1,99	26,5 ± 2,9*
Лімфоцити Lymphocytes	65,53 ± 1,34	74,75 ± 3,06*	56,25 ± 4,81	63,5 ± 2,33
Еозінофіли Eosinophils	3,53 ± 0,72	1,25 ± 0,25*	6,86 ± 0,75	1,0 ± 0,0*
Моноцити Monocytes	1,27 ± 0,2	1,5 ± 0,29	2,37 ± 0,37	2,0 ± 0,41
Інтегральні лейкоцитарні індекси Integral leukocyte indices				
Індекс ядерного зсуву Nuclear shift index	0,06 ± 0,0	0,45 ± 0,06*	0,21 ± 0,06	0,29 ± 0,06
Лейкоцитарний індекс Leukocyte index	2,54 ± 0,22	3,52 ± 0,52*	2,37 ± 0,6	1,91 ± 0,07
Лейкоцитарний індекс інтоксикації Кальф-Каліфа Leukocyte index of intoxication by Kalf-Kaliph	0,13 ± 0,02	0,15 ± 0,01	0,12 ± 0,03	0,33 ± 0,02*
Індекс зсуву лейкоцитів Leukocyte shift index	0,49 ± 0,03	0,32 ± 0,05*	0,8 ± 0,15	0,51 ± 0,04*
Лімфоцитарно-гранулоцитарний індекс Lymphocyte-granulocyte index	20,09 ± 1,3	33,32 ± 5,28*	16,38 ± 3,72	18,71 ± 1,77
Індекс співвідношення нейтрофілів і лімфоцитів Index of neutrophil to lymphocyte ratio	0,43 ± 0,04	0,31 ± 0,05*	0,71 ± 0,15	0,5 ± 0,05
Індекс співвідношення лімфоцитів і еозінофілів Index of lymphocyte to eosinophil ratio	17,83 ± 2,89	64,83 ± 13,14*	9,21 ± 1,24	63,5 ± 2,33*
Індекс співвідношення нейтрофілів і моноцитів Index of neutrophil to monocyte ratio	23,6 ± 2,4	15,75 ± 1,36*	20,6 ± 5,72	17,92 ± 3,56
Індекс співвідношення лімфоцитів і моноцитів Index of lymphocyte to monocyte ratio	54,2 ± 1,9	58,37 ± 13,07	28,48 ± 5,5	37,8 ± 10,48
Індекс алергізації Index of allergization	3,9 ± 0,45	4,27 ± 0,45	4,41 ± 0,99	2,52 ± 0,24*
Індекс адаптації Гаркаві Index of adaptation by Garkavi	2,57 ± 0,22	4,82 ± 1,07	2,44 ± 0,75	2,51 ± 0,07
Індекс імунореактивності Index of immune reactivity	59,5 ± 5,82	58,25 ± 13,14	31,92 ± 5,56	38,37 ± 10,64

Примітка: * — відмінності значущі порівняно з контрольною групою відповідного віку, $p < 0,05$.

Note: * – differences are significant if compared with the control of corresponding age, $p < 0,05$.

пов'язують з інтенсивною проліферацією лімфоїдних клітин у процесі розвитку специфічного імунітету. Еозинопенія може вказувати на зниження резистентності організму [1, 3].

За допомогою ІЛІ, які є високоінформативними діагностично-прогностичними показниками, можна визначати функціональну активність багатьох ланок імунної системи [4–6]. Розрахунок ІЛІ показав, що введення ЯВК КК молодим щурам посилювало гуморальний імунітет (підвищення лейкоцитарного індексу) та інфекційну інтоксикацію (підвищення лімфоцитарно-гранулоцитарного індексу), а також збільшувало вміст молодих форм нейтрофілів (підвищення індексу ядерного зсуву). У старих щурів відзначали збільшення рівня ендогенної інтоксикації (підвищення лейкоцитарного індексу інтоксикації) та зниження індексу алергізації (таблиця).

У щурів обох вікових груп ін'єкції ЯВК КК посилювали активність клітин специфічного захисту (зниження індексу співвідношення нейтрофілів і лімфоцитів), сприяли активації процесів гіперчутливості негайного типу (підвищення індексу співвідношення лімфоцитів і еозинофілів) та зниженню індексу зсуву лейкоцитів. Останнє є позитивним фактором, оскільки підвищення індексу зсуву лейкоцитів свідчить про активний запальний процес та порушення імунореактивності. Крім того, за індексом співвідношення лімфоцитів і моноцитів, що відображає взаємовідношення афекторної і ефекторної ланок імунологічного процесу, тварин обох вікових груп можна було розподілити на підгрупи з нормальним (контрольним) і високим індексом, тобто у частини тварин після введення ЯВК КК переважали компоненти макрофагальної системи. Імунореактивність за цих умов підвищувалася у частини як молодих, так і старих щурів (підгрупи тварин із високим значенням індексу імунореактивності) (таблиця).

За умов фізіологічного старіння динаміка лейкоцитарних показників має наступні особливості [4]: з 12-місячного віку у щурів підвищується загальна кількість лейкоцитів (лейкоцитоз), з 18-місячного віку — збільшуються частки нейтрофілів, еозинофілів і моноцитів і зменшується вміст лімфоцитів. За старіння тварин зміни ІЛІ вказують на збільшення (з 18-місячного віку) інфекційної інтоксикації і запального процесу, активацію ефекторної та клітинної ланок імунітету, переважання клітин неспецифічного захисту (нейтрофілів) й їхніх незрілих форм, посилення процесів гіперчутливості уповільненого типу, зниження імунореактивності та рівня адаптації організму [4].

Зміни нормального функціонування імунної системи як за старіння організму, так і у відповідь на

Functional activity of many components of immune system can be determined using the ILIs, that are the highly informative diagnostic and prognostic indices [4, 5, 7]. The ILIs calculation showed the enhancement of a humoral immunity (increased leukocyte index) and infectious intoxication (elevated lymphocyte-granulocyte index) after CB NCs administration to young rats, as well as a rise of immature neutrophil count (augmented nuclear shift index). Aged rats demonstrated an increased level of endogenous intoxication (elevated leukocyte index of intoxication) and a reduced index of allergization (Table).

In rats of both age groups, the CB NCs injection enhanced the activity of specific immune cells (reduced index of neutrophil to lymphocyte ratio), ensured the activation of immediate type hypersensitivity (elevated index of lymphocyte to eosinophil ratio) and decreased the leukocyte shift index. The latter was a positive sign, since a rise of leukocyte shift index testified to an active inflammation and immune reactivity disorder. In addition, according to the index of lymphocyte to monocyte ratio, reflecting the relationship between the effector and effector components of immunological process, the animals of both age groups could be divided into the subgroups with a normal (control) and high index, *i. e.* the components of macrophage system were predominant in some animals after CB NCs administration. Under these conditions, the immune reactivity increased in some young and aged rats (subgroups of animals with a high immune reactivity index) (Table).

During physiological aging, the dynamics of leukocyte parameters has the following features [5]: the total leukocyte count (leukocytosis) increases in rats starting from a 12-month age, and the augmentation of neutrophil, eosinophil and monocyte counts and a decrease in lymphocyte one occur from the age of 18 months. During animal aging, the changes in ILIs indicate the enhancement (from the 18-month age) of infectious intoxication and inflammation, activation of effector and cell immunity, the predominance of nonspecific immune cells (neutrophils) and their immature forms, intensification of delayed-type hypersensitivity, a decrease in immune reactivity and body's adaptation level [5].

Changes in normal functioning of immune system both during body's aging and in response to any impacts (in particular, CB NCs administration in our experiments) can occur in different directions, namely either a decrease/enhancement of activity or disagreement of its various links and structural components [6].

Thus, the administration of cryopreserved human CB NCs to young and aged rats has both age-dependen-

будь-які впливи (зокрема, введення ЯВК КК у наших експериментах) можуть відбуватися у різних напрямках, а саме: зниження/посилення активності або розкоординація її різних ланок і структурних складових [7].

Отже, введення кріоконсервованих ЯВК КК людини молодим і старим щурам чинить як залежний від віку, так і подібний вплив на їхні лейкоцитарні показники крові. До позитивних ефектів можна віднести посилення імунореактивності у частини тварин, зниження індексу зсуву лейкоцитів (в обох вікових групах) та індексу алергізації у старих щурів, а також зростання гемопоетичної активності кісткового мозку, показникамим якого є збільшення кількості молодих форм нейтрофілів, наявність у мазках крові бластних клітин (у молодих тварин), метамієлоцитів і мієлоцитів (у старих тварин).

Література

1. Абдулкадыров КМ, редактор. Гематология, новейший справочник. Москва: ЭКСМО; 2004. 928 с.
2. Бабійчук ЛО, Грищенко ВІ, Гуріна ТМ, та ін. винахідники; Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, патентовласник. Спосіб кріоконсервування ядровмісних клітин кордової крові, у тому числі стовбурових гемопоетичних клітин. Патент України № 92227. 11.10.2010.
3. Долгушин ИИ, Бухарин ОВ. Нейтрофилы и гомеостаз. Екатеринбург: УрО РАН; 2001. 284 с.
4. Ломачко В.В. Лейкоцитарные показатели у самцов крыс разного возраста. Успехи геронтологии. 2019; 32(6): 923–9.
5. Сперанский ИИ, Самойленко ГЕ, Лобачева МВ. Общий анализ крови – все ли его возможности исчерпаны? Интегральные индексы интоксикации как критерии оценки тяжести течения эндогенной интоксикации, ее осложнений и эффективности проводимого лечения. Здоровье Украины. 2009; 19(6): 51–7.
6. Dong CH, Wang ZM, Chen SY. Neutrophil to lymphocyte ratio predict mortality and major adverse cardiac events in acute coronary syndrome: A systematic review and meta-analysis. Clin Biochem. 2018; 52: 131–6.
7. Ponnappan S, Ponnappan U. Aging and immune function: molecular mechanisms to interventions. Antioxid Redox Signal. 2011; 14(8): 1551–85.

dent and similar effects on their blood leukocyte counts. Positive impacts include an enhancement of immune reactivity in some animals, a decrease in leukocyte shift index (in both age groups) and allergization index in aged rats, as well as a rise in hematopoietic activity of bone marrow, characterized by an increased number of immature neutrophils, presence of blast cells in blood smears (in young animals), metamyelocytes and myelocytes (in aged ones).

References

1. Abdulkadyrov KM, editor. [Hematology, the newest guidance]. Moscow: EKSMO; 2004: 928 p. Russian.
2. Babiichuk LO, Grischenko VI, Gurina TM, et al., inventors; Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, assignee. [Method of cryopreservation of cord blood nucleated cells, including hematopoietic stem cells]. Patent of Ukraine N92227. 11.10.2010. Ukrainian.
3. Dolgushin II, Bukharin OV. [Neutrophils and homeostasis]. Ekaterinburg: UrO RAS Publishing 2001: 284 p. Russian.
4. Dong CH, Wang ZM, Chen SY. Neutrophil to lymphocyte ratio predict mortality and major adverse cardiac events in acute coronary syndrome: A systematic review and meta-analysis. Clin Biochem. 2018; 52: 131–6.
5. Lomako VV. Blood leukocyte indices in male rats of different ages. Advances in Gerontology. 2020; 10(2): 135–41.
6. Ponnappan S, Ponnappan U. Aging and immune function: molecular mechanisms to interventions. Antioxid Redox Signal. 2011; 14(8): 1551–85.
7. Speransky AI, Samoilenko GE, Lobachev MV. [General blood test – are all its possibilities exhausted? Integral intoxication indices as criteria for assessing the severity of endogenous intoxication, its complications and the effectiveness of the treatment]. Health of Ukraine. 2009; 19 (6): 51–7. Russian.

