

УДК: 616.155.3+616.681:599.323.45

*Д.Ю. Кустов, И.В. Кокина, А.С. Косторев, Т.А. Реготун, Я.С. Валигун***ИЗМЕНЕНИЯ ПОВЕДЕНИЯ И ЛЕЙКОЦИТАРНОЙ ФОРМУЛЫ БЕЛЫХ КРЫС В ДИНАМИКЕ РАЗВИТИЯ АУТОИММУННОГО ГИПОГОНАДИЗМА***Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького*

Реферат. Статья посвящена изучению динамики изменения груминговой, двигательной активности и картины белой крови у интактных крыс, и крыс с моделью аутоиммунного гипогонадизма. Иммунизацию животных осуществляли путём введения аллогенно гомогената ткани семенников и яичников. Регистрация груминга проводилась по собственной методике. В результате проведенных исследований было установлено, что развитие аутоиммунного гипогонадизма приводит к существенному снижению количества элементарных груминговых актов, однако время, затраченное животными на груминг, наоборот, увеличивается. Интенсивность груминга, как показатель комфортного поведения, снижалась на поздних сроках эксперимента. Двигательная активность у опытных особей также была снижена. В лейкоцитарной формуле иммунизированных крыс преобладало относительное прогрессирующее увеличение содержания лимфоцитов на фоне колебания уровня других клеточных элементов в динамике развития аутоиммунного гипогонадизма. В нашем исследовании впервые была проведена оценка груминга в качестве индикатора развития аутоиммунного гипогонадизма, как примера системной аутоиммунной патологии.

Ключевые слова: аутоиммунный гипогонадизм, груминг, лейкоцитарная формула.

Введение. В современном мире всё большее распространение получают заболевания, связанные с дисбалансом иммунной системы, и одной из обширных групп таких заболеваний являются системные аутоиммунные расстройства. При этом следует подчеркнуть, что аутоиммунные нарушения зачастую длительное время находятся в латентной стадии и не имеют чётко сформированной клинической картины. Кроме того, этиопатогенез системных аутоиммунных заболеваний (САЗ) до сих пор во многом остаётся не выясненным. При САЗ нарушения затрагивают различные органы и системы, приводя к образованию «порочных кругов», в результате которых происходит процесс самоподдерживания и усиления патологии. Всё вышеперечисленное затрудняет профилактические, диагностические и терапевтические мероприятия, направленные, в конечном итоге, на поддержание и улучшение качества жизни пациента.

Сложность определения всех многогранных патогенетических механизмов развития САЗ предполагает комплексный подход к данной проблеме, что вызывает необходимость оперировать таким понятием, как единая психонейроиммуноэндокринная система [1].

Среди САЗ аутоиммунный гипогонадизм (АИГ) не занимает доминирующее положение, так как встречается реже других системных патологий и не представляет непосредственной угрозы жизни пациента, однако, он является причиной бесплодия, а потому имеет важное социальное значение. По данным Всемирной Организации Здравоохранения, порядка 15 % всех пар в мире являются бесплодными [17]. При этом, мужское и женское бесплодие встречаются с одинаковой частотой. В более чем 20 % случаев причиной нарушения репродуктивной функции является АИГ с наличием антиспермальных (АС-АТ) и антиовариальных (АО-АТ) антител [11]. Для диагностики АИГ обычно применяют определение уровня аутоантител, гормональный контроль и гистологические исследования. Но в настоящее время не разработан чёткий алгоритм диагностики АИГ, что затрудняет оценку распространённости данной патологии среди населения и проведение эффективного её лечения [3]. Кроме того, АИГ может провоцировать развитие других САЗ, например таких, как ревматоидный артрит и аутоиммунный тиреоидит, и быть, таким образом, частью полисистемного аутоиммунного расстройства.

Безусловно, САЗ вообще и АИГ в частности, влияя на функциональную активность гонад и регуляторные механизмы гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы, будут оказывать опосредованное воздействие на психическую деятельность индивида, в том числе — на поведение.

Груминг (реакции самоочищения поверхности тела) для животных является важным зоосоциальным компонентом поведения, обуславливающим иерархическое положение особи и её способность к воспроизводству потомства. Помимо этого, груминг представляет собой стресс-зависимую форму поведения и, как таковой, может служить маркером «комфортности» животного [6]. Исходя из данного положения, нами была сформулирована цель настоящего исследования.

Цель работы. Установить закономерности изменения груминговой и общей двигательной активности, а также картины белой крови у крыс с моделью аутоиммунного гипогонадизма в процессе развития заболевания.

Материал и методы исследования. Эксперименты проводили на беспородных белых крысах массой 220–300 г. Все животные были разделены на 2 группы — интактную (И), состоящую из 20 особей, и опытную (АИГ), включавшую 100 животных обоего пола. Моделирование АИГ осуществляли внутрибрюшинным введением аллогенного гомогената ткани семенников и яичников (самцам и самкам соответственно) в эмульсии неполного адьюванта Фрейнда (НАФ). К 30-м суткам эксперимента наблюдалось формирование АИГ, подтвержденное исследованием уровня половых гормонов, АС-АТ и АО-АТ в крови.

Наблюдение за реакциями самоочистения проводили в разное время в течение всего светового дня. Для регистрации показателей груминга животных помещали в биоритмокамеру разработки лаборатории теоретической и прикладной нейрофизиологии ДонНМУ. Первые 15 минут отводились для адаптации к условиям камеры, после чего в течение последующих 15 минут проводили визуальное наблюдение и подсчет 4-х разных видов спонтанных движений очищения кожи (умывание, лизание, чесание и отряхивание) [10]. Кроме того, в качестве дополнительных показателей мы определяли общее количество движений самоочистения и общее время, затрачиваемое животным на груминг, за период наблюдения, интенсивность груминга и процент времени груминга [8]. Одно движение самоочистения принималось за один элементарный груминговый акт (э.г.а.). Фиксировалась также общая двигательная активность

животного (то есть перемещение по клетке), которое было выражено в процентном отношении к общему времени наблюдения.

Кровь брали из хвостовой вены стандартным методом [5]. Мазок крови фиксировали в метаноле и окрашивали азур-эозином по Романовскому-Гимзе, после чего подсчитывали различные формы лейкоцитов (на 100 клеток) при масляной иммерсии под бинокулярным микроскопом при увеличении 1×1000 [9].

Регистрацию поведения и лейкоцитарной формулы в опытной группе осуществляли на 30-й, 60-й и 90-й дни после иммунизации.

Анализ результатов наблюдений проводили при помощи программ Excel и Statistica 6.0. Для обработки данных, полученных в процессе исследования, применялись методы описательной статистики, вычислялось значение среднего арифметического (\bar{X}) и доверительного интервала (ДИ) при $\alpha = 0,05$. При сравнении двух выборок нормального распределения использовался критерий Стьюдента, в остальных случаях — критерий Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение. На рисунке 1 представлена динамика изменений элементарных груминговых актов в процессе развития АИГ.

Основываясь на представленном графике, можно говорить о явном снижении всех показателей э.г.а. Так, количество актов умывания в интактной группе равнялось $14,73 \pm 2,35$ э.г.а., на 30-й день снизилось до уровня $6,73 \pm 1,26$ э.г.а., и продолжило достоверно снижаться к 60-му и 90-му дню исследований до уровня $3,90 \pm 0,76$ э.г.а. и $3,04 \pm 0,53$ э.г.а. соответственно.

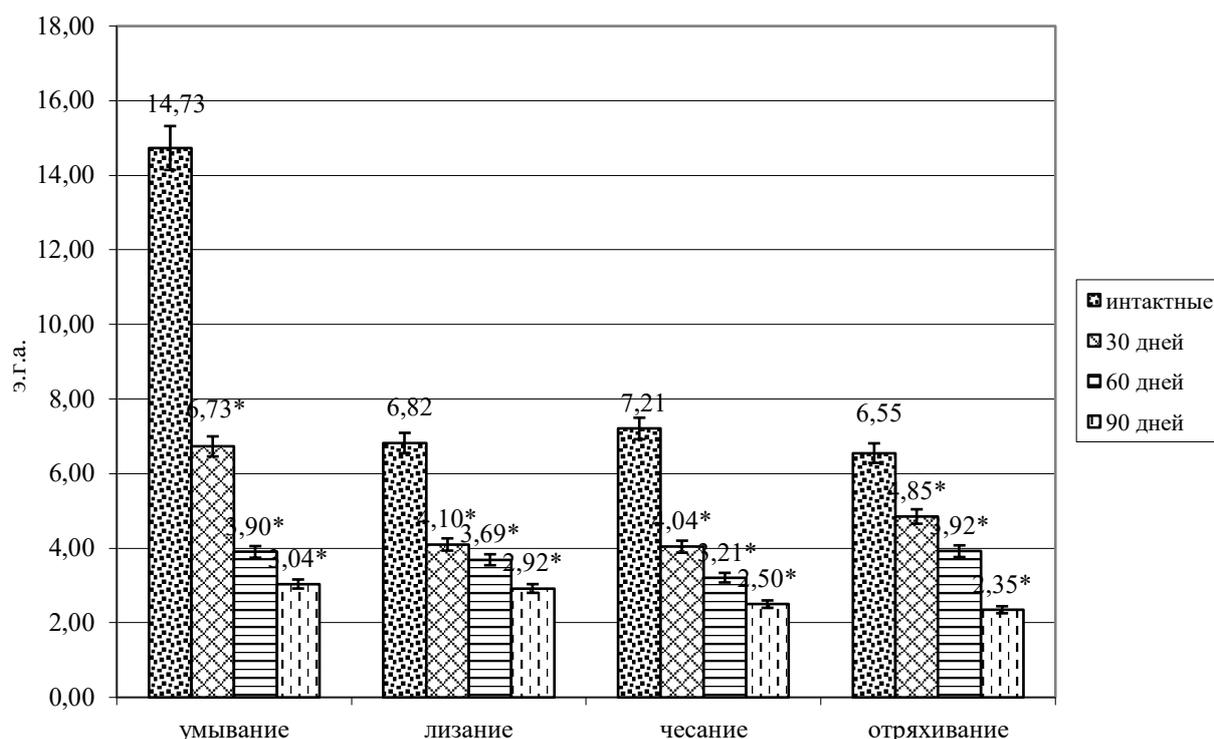


Рис. 1. Изменения груминговой активности у крыс на разных этапах эксперимента. Примечание: * — $p < 0,05$ при сравнении с интактной группой.

Подобное явление наблюдалось и при исследовании актов лизания. У интактной группы показатель был равен $6,82 \pm 1,71$ э.г.а. Однако уже на начальной стадии эксперимента активность крыс значительно снизилась, а количество актов лизания составило $4,10 \pm 0,78$ э.г.а., на средней стадии — $3,69 \pm 1,02$ э.г.а, а в дальнейшем и вовсе опустилось до уровня $2,92 \pm 0,63$ э.г.а.

Такой показатель груминга, как чесание, так же подвергался снижению во всех контрольных точках эксперимента. Так, количество актов в интактной группе достигло $7,21 \pm 2,39$ э.г.а., а уже на 30-й день достоверно снизилось до $4,04 \pm 0,78$ э.г.а. и сохранило данную тенденцию на 60-й ($3,21 \pm 0,72$ э.г.а.) и 90-й день эксперимента ($2,50 \pm 0,71$ э.г.а.).

При исследовании отряхивания в интактной группе этот показатель груминга составлял $6,55 \pm 2,35$ э.г.а. В дальнейшем на всех стадиях эксперимента наблюдалось стремительное достоверное падение уровня отряхивания до $4,85 \pm 1,23$ э.г.а. к 30-му дню, до $3,92 \pm 0,81$ э.г.а. к 60-му дню и до $2,35 \pm 0,59$ э.г.а. к 90-му дню.

Все перечисленные элементы груминга имели сходную направленность изменений на разных этапах эксперимента, заключающуюся в том, что активность животных постепенно снижалась в динамике развития аутоиммунного гипогонадизма.

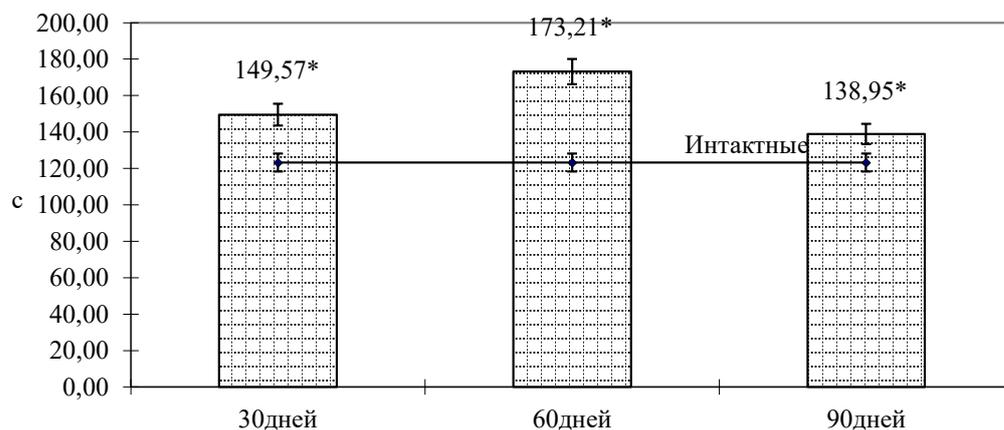


Рис. 2. Сравнение средних значений времени груминга у крыс в динамике развития АИГ. Примечание: * — $p < 0,05$ при сравнении с интактной группой.

Время, затраченное на груминговую активность подопытными крысами, на начальном этапе развития АИГ было выше, чем у интактных особей (рис. 2). Так, если в интактной группе время груминга составляло $123,27 \pm 9,56$ с, то на 30-й день средний показатель достоверно вырос до $149,57 \pm 35,23$ с, к 60-му дню достиг своего пика и составил $173,21 \pm 48,38$ с, а на 90-й день снизился до уровня, достоверно высшего, чем таковой у интактных крыс ($138,95 \pm 31,76$ с).

На протяжении всего периода исследований интенсивность груминговой активности практически не претерпевала изменений. У интактных животных значение этого показателя составило $29,30 \pm 3,73$ %, на 30-й день — $29,77 \pm 14,30$ %, на 60-й день — $29,56 \pm 24,25$ %. Однако, к 90-му дню интенсивность груминга достоверно снизилась и достигла уровня $15,55 \pm 6,28$ % (рис. 3).

Что же касается процента времени груминга, то на протяжении всего времени развития АИГ наблюдалось его динамическое повышение. Если у интактных особей процент времени

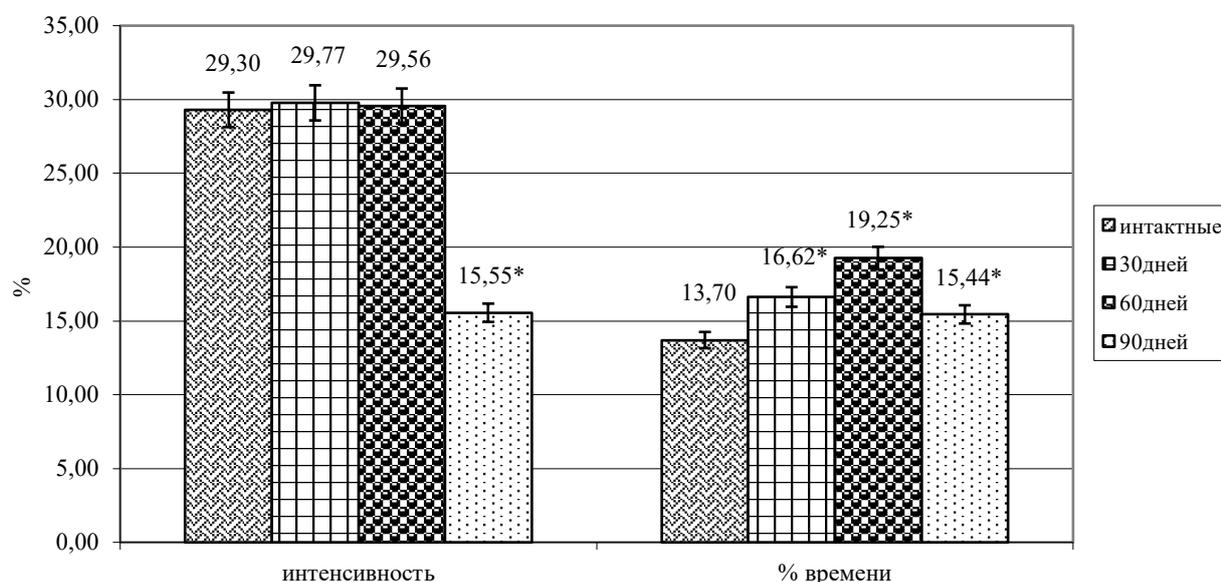


Рис. 3. Интенсивность и процент времени груминга крыс на разных стадиях исследования. Примечание: * — $p < 0,05$ при сравнении с интактной группой.

груминга составил $13,70 \pm 1,06$ %, то на ранней стадии формирования заболевания он повышался до $16,62 \pm 3,92$ %, к 60-му дню ещё более увеличивался до $19,25 \pm 5,38$ %, что достоверно отличалось от нормы данного показателя. Нами наблюдалось значительное снижение значения этого параметра на 90-й день эксперимента ($15,44 \pm 3,53$ %), однако, оно также было достоверно выше установленной нами физиологической нормы.

Уровень двигательной активности животных по сравнению с интактной группой не претерпевал значительных изменений на всех стадиях исследования, кроме последней контрольной точки (рис. 4).

Показатель двигательной активности крыс интактной группы составил $3,67 \pm 0,65$ %. На 30-й день наблюдалось незначительное снижение до $3,33 \pm 1,20$ % и на 60-й до $3,17 \pm 0,60$ %. Однако, на 90-й день эксперимента произошло достоверное падение уровня данного параметра до $1,30 \pm 0,41$ %.

Исходя из вышеизложенного, можно заключить, что груминговая и двигательная активность у крыс с моделью АИГ существенно снижалась, достигая минимума на поздней стадии развития патологии. Тогда же наблюдалось падение интенсивности груминга

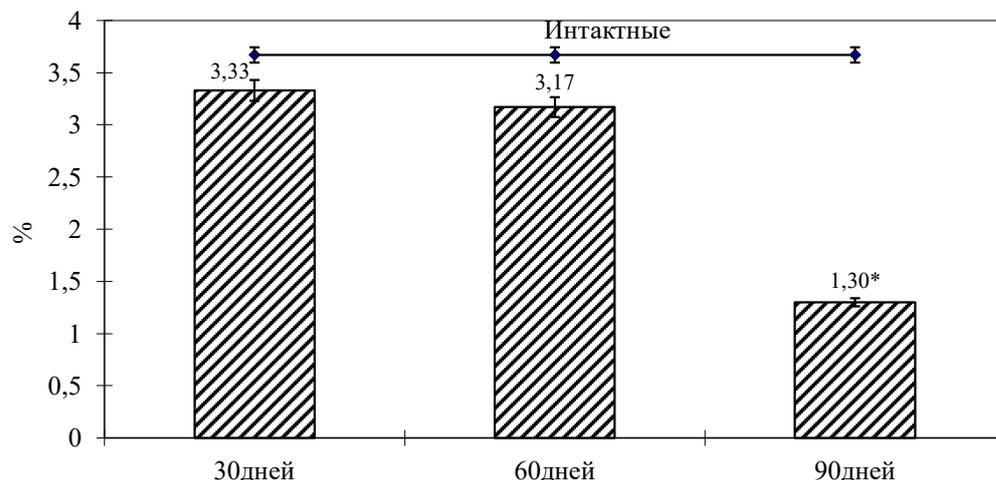


Рис. 4. Двигательная активность опытных крыс на всех этапах эксперимента. Примечание: * — $p < 0,05$ при сравнении с интактной группой.

как интегративного показателя состояния «комфортности» животного. При этом, время груминга в подопытной группе было выше, чем у интактных особей, на всех этапах тестирования. Следует отметить, что аналогичные общие тенденции поведенческих изменений наблюдались нами и при других экспериментальных САЗ — атопическом дерматите, ревматоидном артрите, аутоиммунном тиреоидите, с характерными различиями в структуре э.г.а. [2, 4, 7].

Для установления влияния развивающегося САЗ на иммунитет нами была проанализирована лейкоцитарная формула периферической крови. Были выявлены существенные изменения в картине белой крови подопытных крыс.

Так, если у интактной группы животных уровень палочкоядерных гранулоцитов был равен $5,40 \pm 0,48$ %, то в процессе эксперимента он стремительно снижался (рис. 5).

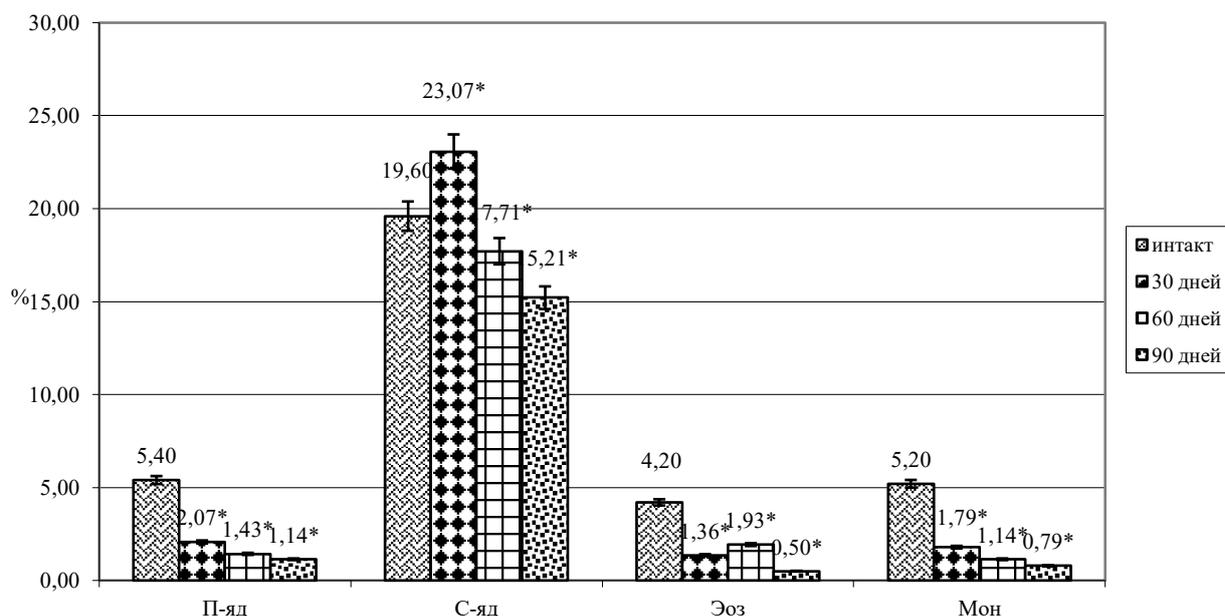


Рис. 5. Уровень гранулоцитов и моноцитов в периферической крови крыс на разных стадиях исследования. Примечание: * — $p < 0,05$ при сравнении с интактной группой.

На 30-й день исследования уровень палочкоядерных нейтрофилов достоверно снизился до $2,07 \pm 0,66 \%$, на 60-й — до $1,43 \pm 0,45 \%$ и на 90-й — до $1,14 \pm 0,71 \%$.

Схожая тенденция наблюдалась при исследовании моноцитов. У интактных животных уровень моноцитов был равен $5,20 \pm 0,73 \%$. К 30-му дню наблюдалось достоверное снижение количества моноцитов до $1,79 \pm 0,83 \%$, к 60-му до $1,14 \pm 0,82 \%$, а к 90-му дню и вовсе достигло своего минимума и составило $0,79 \pm 0,69 \%$.

При исследовании сегментоядерных нейтрофилов наблюдалось увеличение их количества на начальной стадии эксперимента и снижение в более поздние сроки. Так, в интактной группе животных данный показатель составлял $19,60 \pm 1,92 \%$, а уже на начальной стадии исследования достиг достоверно более высокого уровня — $23,07 \pm 3,28 \%$. Однако, в дальнейшем происходило снижение до $7,71 \pm 3,11 \%$ и $5,21 \pm 4,74 \%$ к середине и концу эксперимента соответственно, что было достоверно ниже, чем у интактных особей.

При анализе количества эозинофилов было отмечено, что их уровень претерпевал явные колебания. В крови интактных животных содержание эозинофилов достигало $4,20 \pm 0,73 \%$. На 30-й день этот показатель достоверно снизился до $1,36 \pm 0,76 \%$, однако на 60-й день наблюдалось его незначительное, относительно показателя предыдущей контрольной точки, увеличение до $1,93 \pm 1,02 \%$, а на 90-й день опять снизился до $0,50 \pm 0,45 \%$.

Уровень лимфоцитов у интактных животных был равен $65,60 \pm 2,53 \%$ и в ходе эксперимента непрерывно возрастал. Из рисунка 6 видно, что к 30-му дню исследования содержание лимфоцитов в крови крыс достоверно увеличилось до $71,71 \pm 4,44 \%$, к 60-му продолжило рост до $77,71 \pm 3,37 \%$ и к 90-му дню составило $82,36 \pm 4,76 \%$.

Таким образом, в результате эксперимента в динамике АИГ был выявлен нарастающий лим-

фоцитоз на фоне снижения количества гранулоцитов в периферической крови. Полученные нами данные подтверждают накопленный опыт клинических наблюдений за мужчинами с гипогонадизмом первично неиммунного генеза, например, при синдроме Клайнфельтера, при котором часто развиваются различные САЗ — синдром Шегрена, системная красная волчанка, смешанное заболевание соединительной ткани [13, 16], и тогда заместительная терапия препаратами тестостерона оказывает положительное воздействие как на гормональный статус, так и на аутоиммунные процессы, нередко вызывая даже клинко-лабораторную ремиссию САЗ, при этом стимулируя активность циркулирующих моноцитов и дендроцитов периферической крови; не исключено аналогичное корректирующее воздействие и экзогенных гонадотропных гормонов [12, 14]. Обнаруженное в нашем эксперименте выраженное влияние АИГ на иммунитет можно объяснить и аутокринной ролью гонадотропин-рилизинг-гормона (ГРГ) и его рецептора (ГРГР), которые также локально продуцируются иммунокомпетентными клетками. Рецепторы к эстрогенам и андрогенам экспрессируются как клетками центральных органов иммунитета, так и периферическими иммунными клетками, при этом эстрогены стимулируют гуморальный иммунный ответ, а тестостерон усиливает супрессорную активность Т-клеток, что частично объясняет повышенную частоту аутоиммунных нарушений у женщин с нормальным гормональным профилем и у мужчин с гипогонадизмом [15].

Выводы. В динамике развития аутоиммунного гипогонадизма груминговая и двигательная активность претерпевала существенное снижение, наибольшей выраженности достигавшее на поздней стадии заболевания. При этом время груминга удлинялось.

Анализ лейкоцитарной формулы показал, что по мере прогрессирования аутоиммун-

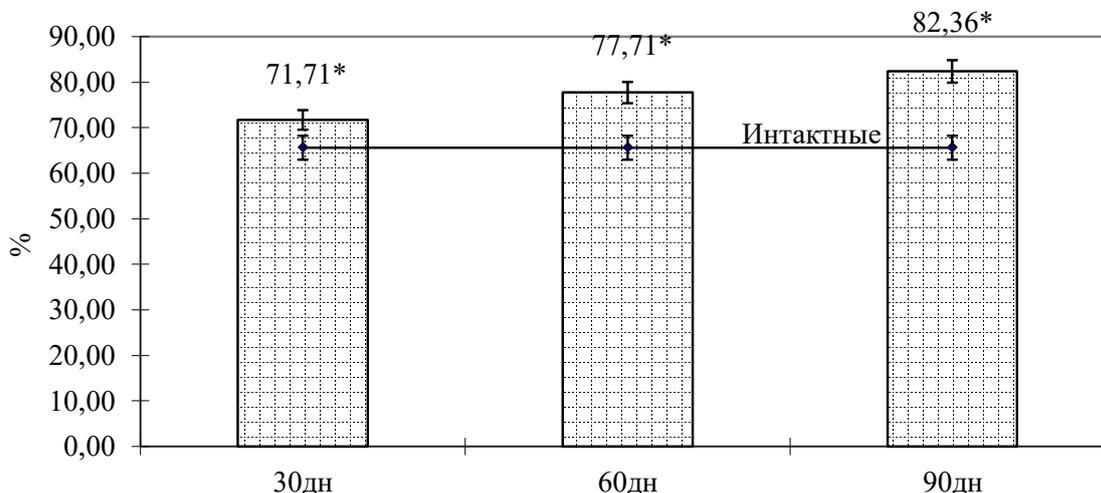


Рис. 6. Уровень лимфоцитов на разных этапах эксперимента. Примечание: * — $p < 0,05$ при сравнении с интактной группой.

ной патологии неуклонно повышался уровень лимфоцитов в периферической крови при снижении количества других клеточных элементов. Исключение составил показатель сегментоядерных нейтрофилов на ранней стадии формирования заболевания, повышение которого может быть связано с неспецифическим воспалительным процессом, вызванным иммунизацией.

Полученные результаты позволяют предложить использование показателей груминга в качестве диагностического маркера при системных аутоиммунных расстройствах, для оценки их влияния на психонейроиммуноэндокринную систему.

Дальнейшие исследования позволят глубже понять механизмы этиопатогенеза аутоиммунного гипогонадизма и разработать эффективные методы коррекции нарушений психонейроиммуноэндокринной системы при данной патологии.

D.Yu. Kustov, I.V. Kokina, A.S. Kostorev, T.A. Regotun, Ya.S. Valigun
CHANGES OF BEHAVIOUR AND WHITE BLOOD PARAMETERS IN RATS IN THE DEVELOPMENT COURSE OF AUTOIMMUNE HYPOGONADISM

Abstract. *The article covers the dynamic study of grooming and locomotor activity, as well as the leukogramme of intact rats versus those with an autoimmune hypogonadism model. The animals were immunised by an allogenic testicular/ovarian homogenate injection. The grooming was registered using our own patented technique. The study showed that autoimmune hypogonadism development caused a significant decrease of elementary grooming acts count while the time spent on grooming was increasing. The late stages of the experiment demonstrated lowered grooming intensity as the evidence of discomfort behaviour. The locomotor activity in the immunised animals was also diminished. A progressive relative lymphocytosis against the background of hesitating levels of the other white cell types was prevailing in the follow-up leukogramme of the rats with autoimmune hypogonadism. Our work is the first one to estimate grooming as a development indicator of such a systemic autoimmune pathology as autoimmune hypogonadism.*

Keywords: *autoimmune hypogonadism, grooming, leukogramme.*

ЛИТЕРАТУРА

1. Акмаев И.Г. Современные представления о взаимодействиях регулирующих систем, нервной, эндокринной и иммунной // *Успехи физиол. наук.* – 1996. – Т.27, №1. – С. 3-20.
2. Влияние индуцированного аутоиммунного тиреоидита на поведение / [Д.Ю. Кустов, И.В. Кокина, Я.С.

Валигун, Т.А. Реготун] // *Вестник здравоохранения.* – Вып. 1, Ч.2. – Донецк, 2016. – С. 294-297.

3. Гзгзян А.М. Клиническая характеристика больных с нормогонадотропным гипогонадизмом аутоиммунного происхождения // *Вестник Санкт-Петербургского Университета* – 2007. – Вып.1. – С. 23-29.
4. Груминговое поведение крыс с моделью ревматоидного артрита до и после коррекции нейротропными веществами / [В.Н. Казаков, Н.И. Тарапата, Д.Ю. Кустов, И.В. Кокина] // *Архив клинической и экспериментальной медицины.* – 2012. – Т.21, №1. – С. 8-10.
5. Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А., Западнюк Б.В. Лабораторные животные: разведение, содержание, использование в эксперименте. – К.: «Вища школа», 1983. – 382 с.
6. Калувев А.В. Стресс, тревожность и поведение. К: Энигма. – 1998. – 92 с.
7. Особенности поведенческих реакций при синдроме нейрогуморальной дисрегуляции в условиях действия галогенизированных производных нитробензола / [В.Н. Ельский, С.В. Зяблицев, И.В. Кокина, Д.Ю. Кустов] // *Достижения клинической и экспериментальной медицины.* – Тернополь, 2010. – №2 (13). – С. 47-50.
8. Патент №16150, UA. МКВ: А61В5/00. Спосіб оцінки стану організму тварини. Кустов Д.Ю., Ракша-Слюсарева О.А., Слюсарев О.А., Друпп Ю.Г. Заявка №u200602422 від 06.03.2006. Друк. 17.07.2006. Бюл. №7.
9. Руководство к практическим занятиям по клинической лабораторной диагностике / Под ред. М.А. Базарновой, В.Т. Морозовой. – К.: Вища школа, 1988. – 318 с.
10. Свицерская Г.Е., Дмитриева Л.Е., Развитие груминга у онтогенезе крыс и мышей // *Журн. эволюционной биохимии и физиологии.* – 1993, Т.29, №4. – С. 36-39.
11. Bronson R.A. Antisperm antibodies: a critical evaluation and clinical guidelines. // *J. Reprod. Immunol.* – 1999. – V.45, №2. – P. 159-183.
12. Influence of testosterone therapy on clinical and immunological features of autoimmunized diseases associated with Klinefelter's syndrome / [A. Bizzarro, G. Valentini, G. Di Martino, A. DaPonte, A. De Bellis, G. Iacono] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 1987, Jan;64(1). – P. 32-36.
13. T-cell abnormalities in mixed connective tissue disease complicated with Klinefelter's syndrome / [K. Ishihara, M. Yoshimura, H. Nakao, Y. Kanakura, Y. Kanayama, Y. Matsuzawa] // *Intern. Med.* 1994 Nov;33(11). – P. 714-717.
14. Testosterone replacement therapy in hypogonadal men is associated with increased expression of LAMP-2 (CD107b) by circulating monocytes and dendritic cells / [J.J. Corrales, M. Almeida, L. Martín-Martín, J.M. Miralles, A. Orfao] // *Clin. Endocrinol. (Oxf).* – 2014., Apr;80(4). – P. 577-584.
15. The hypothalamic-pituitary-gonadal axis: immune function and autoimmunity / [F. Tanriverdi, L.F. Silveira, G.S. MacColl, P.M. Bouloux] // *J. Endocrinol.* – 2003., Mar;176(3). – P. 293-304.
16. Tsung S.H., Ajlouni K. Immune competence in patients with Klinefelter syndrome // *Am. J. Med. Sci.* – 1978., May-Jun;275(3). – P. 311-317.
17. WHO laboratory manual for the examination of human sperm and semem-cervical mucus interaction. - WHO, 4-th edn.: Cambridge universiti press, 1999. – 128 p.