

Життєздатність та види загибелі лейкоцитів крові щурів з синдромом полікістозних яєчників за умов переривчастого холодового впливу

М.В. Жулікова¹, М.С. Мирошниченко¹, О.А. Наконечна¹, О.О. Жуліков²,
В.О. Бібіченко¹, С.О. Мирошниченко³, О.В. Зайцева¹, М.В. Ковальцова¹

¹ Харківський національний медичний університет;

² Медичний центр «Марія», Харків;

³ Комунальне некомерційне підприємство Ізюмської міської ради «Центральна міська лікарня Піщанської Богоматері»; e-mail: msmyroshnychenko@ukr.net

Метою нашої роботи є оцінка життєздатності та визначення видів загибелі лейкоцитів крові щурів з синдромом полікістозних яєчників (СПКЯ) за умов переривчастого холодового впливу. Дослідження проведено на 40 статевонезрілих самицях щурів популяції WAG віком 27 днів, які були розділені на 5 груп (по 8 тварин у кожній групі): 1-ша група – інтактні щури; 2-га група – щури, яким щоденно протягом 25 днів підшкірно вводили 0,2 мл очищеної та стерилізованої оливкової олії; 3-тя група – щури, яких щоденно протягом 25 днів піддавали переривчастому холодовому впливу; 4-та група – щури, яким моделювали дегідроепіандростероніндукований СПКЯ; 5-та група – щури, яким на тлі переривчастого холодового впливу вводили дегідроепіандростерон. Життєздатність лейкоцитів та види їх загибелі були визначені за допомогою проточного цитометра FACS Canto II (Vecton Dickinson, США). У щурів з СПКЯ було виявлено зменшення відсотка життєздатних лейкоцитів та збільшення відсотка лейкоцитів, що знаходяться на початковій стадії апоптозу, при цьому кількість лейкоцитів, що знаходяться на пізній стадії, та некротично змінених лейкоцитів відповідала нормі. У щурів на тлі введення дегідроепіандростерону у разі переривчастого холодового впливу відсоток життєздатних лейкоцитів, а також лейкоцитів, що знаходяться на різних стадіях апоптозу та у стані некрозу, відповідав фізіологічній нормі. Таким чином, виявлено зниження життєздатності нейтрофільних лейкоцитів крові щурів з СПКЯ внаслідок активації процесів апоптозу, про що свідчило збільшення відсотка лейкоцитів, які знаходяться на початковій стадії апоптозу. Переривчастий холодовий вплив (4 год щодня при +4°C протягом 25 днів) на тлі введення щурам дегідроепіандростерону чинив антиапоптотичний ефект, нормалізуючи життєздатність нейтрофільних лейкоцитів крові.

Ключові слова: життєздатність; лейкоцити; кров; щури; синдром полікістозних яєчників; переривчастий холодовий вплив; апоптоз; некроз.

ВСТУП

Найпоширенішим та гетерогенним ендокринним розладом у жінок у всьому світі є синдром полікістозних яєчників (СПКЯ), також відомий як гіперандрогенна ановуляція або синдром Штейна-Левенталя [1]. Частота цієї патології коливається від 5 до 10%, а інколи – навіть на рівні 26% [2]. Нині СПКЯ, за даними світової статистики, діагностовано у 1,55 млн жінок [1]. Він може відмічатися

на будь-якому етапі репродуктивного життя жінки, але найчастіше у підлітковому віці [2]. Ця патологія маніфестує широким спектром ознак та симптомів, зокрема акне, порушеннями менструального циклу, гірсутизмом, надлишковою масою тіла, інсулінорезистентністю, безпліддям, високим ризиком розвитку багатьох ускладнень вагітності та злоякісних новоутворень [3]. Патогенез СПКЯ є складним, багатофакторним, дискутабельним та

© Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, 2023

© Видавець ВД “Академперіодика” НАН України, 2023

ISSN 2522-9028 Фізіол. журн., 2023, Т. 69, № 3

не повністю з'ясованим, що актуалізує проведення комплексних клініко-експериментальних досліджень [4].

Протягом останніх років науковці світу визначальну роль у механізмі розвитку СПКЯ надають надмірній продукції активних форм кисню, розвитку системного та оваріального оксидативного стресу [5]. На системному та місцевому (оваріальному) рівнях існують різні джерела, що їх продукують. Раніше ми повідомляли про роль нейтрофільних лейкоцитів крові у гіперпродукції активних форм кисню при СПКЯ у щурів [6]. Надмірна продукція активних форм кисню може призводити до змін життєздатності нейтрофільних лейкоцитів та їх загибелі, проте в наявній літературі ми не знайшли інформації з приводу цього питання.

Розповсюдженість СПКЯ та його наслідки вимагають проведення досліджень, спрямованих на пошук ефективних методів лікування та профілактики розвитку цього синдрому у жінок. Раніше нами при морфологічному дослідженні було показано, що переривчастий холододовий вплив у щурів на тлі введення дегідроепіандростерону, який використовувався також іншими вченими для моделювання СПКЯ, перешкоджає розвитку кістозних змін у яєчниках щурів [7–9]. Патогенетичні механізми, що лежать в основі зазначеного відновлення яєчничкової тканини в умовах холододового впливу, є невідомими. Нині залишається не вивчене питання щодо життєздатності та видів загибелі лейкоцитів крові при СПКЯ за умов застосування переривчастого холододового впливу.

Мета нашого дослідження – оцінка життєздатності та визначення видів загибелі лейкоцитів крові щурів з СПКЯ за умов переривчастого холододового впливу.

МЕТОДИКА

Проведене авторами експериментальне дослідження повністю відповідає загальноприйнятим вимогам «Європейської конвенції

з захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986) та Директиви Європейського Союзу 2010/10/63 ЄС щодо експериментів на тваринах.

Дослідження проведено на 40 статевонезрілих самицях щурів популяції WAG віком 27 днів, масою тіла 80–90 г, які були розділені на 5 груп (по 8 тварин у кожній). До 1-ї групи ввійшли інтактні щури, до 2-ї групи – щури, яким щоденно протягом 25 днів підшкірно вводили 0,2 мл очищеної та стерилізованої оливкової олії, до 3-ї – тварини, яким протягом 25 днів піддавали переривчастому холододовому впливу, до 4-ї – щури, яким моделювали дегідроепіандростероніндукований СПКЯ, до 5-ї – щури, яким на тлі переривчастого холододового впливу вводили дегідроепіандростерон.

Переривчастий холододовий вплив моделювали у щурів 3-ї і 5-ї груп щоденним витриманням тварин протягом 4 год у камері, в якій підтримували світловий режим і температуру +4°C. Останні 20 год доби тварини перебували у звичайних умовах.

Щурам 4-ї та 5-ї груп застосували розроблену авторами методику моделювання СПКЯ з щоденним підшкірним введенням протягом 25 днів дегідроепіандростерону в дозі 8 мг на кожні 100 г маси тіла тварини, розчиненого в 0,2 мл очищеної та стерилізованої оливкової олії [10]. Ефективність такої методики була підтверджена морфологічним дослідженням, під час якого було виявлено кістозно-перероджені фолікули, гіперплазію текальних клітин, зменшення кількості зрілих фолікулів та жовтих тіл, тобто характерні мікроскопічні знахідки для полікістозної морфології яєчників [4]. Подібні гормональні втручання для моделювання СПКЯ також були використані іншими вченими [7].

Щури всіх груп отримували однаковий раціон та на 26-ту добу були виведені з експерименту за допомогою цервікальної дислокації. Після декапітації тварин цільну кров відбирали у вакутейнери, що містили дика-

лієву сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти («Guangzhou Improve Medical Instruments Co., Ltd», Китай). Протягом 2 год на холоді проби (цільна кров) транспортували в Інститут експериментальної та клінічної медицини Харківського національного медичного університету, де їх готували для дослідження на проточному цитометрі згідно з протоколом.

Проводили лізування, промивання проб здійснювали двічі розчином Pharmalyse («BD Pharmlyse™», США). Зразки крові (100 мкл) вносили у пробірку з полістиролу розміром 12×75 мм («Corning Science», Мексика), додавали 2 мл 1x FACSLyse розчину («Dickinson and Company BD Biosciences», США). Перемішували та інкубували в темряві при 23°C протягом 15 хв. Далі впродовж 5 хв центрифугували при 500g. Надосадову рідину виливали та додавали 2 мл натрій-фосфатного буфера (PBS, pH 7,4; «BDTM Cell Wash», Польща).

Після проведеного лізування еритроцитів та подальшого відмивання клітини ресуспендували в 1 мл анексинзв'язуючого буфера («BD Biosciences», США). Далі аліквоти (100 мкл) інкубували з анексином V, міченим флуоресцеїном ізотіоціанатом (FITC) («BD Biosciences», США). Потім додавали до суспензій лейкоцитів 5 мкл 7-аміноактиноміцину D (7-AAD, «BD Biosciences», США), інкубували протягом 20 хв та одноразово додавали 400 мкл анексинзв'язуючого буфера. Флуоресценцію 7-AAD визначали в каналі FL-3. Життєздатність лейкоцитів та шляхи їх загибелі були встановлені за допомогою проточного цитометра FACS Canto II («Becton Dickinson», США), де за одне вимірювання підраховували 10000 подій. Для оцінки результатів проточної цитометрії використовували програмне забезпечення FACSDiva™ («Becton Dickinson», США).

Кон'югований з барвником анексин V, як відомо, здатний мітити фосфатидилсерин, ранній маркер апоптозу, на позаклітинній мембрані. На пізній стадії апоптозу, коли цілісність клітини пошкоджена, він зв'яже його на внутрішньому боці плазматичної мембра-

ни. 7-AAD – це флуорохром, який проникає через клітинну мембрану, зв'язується з дволанцюговою ДНК і може використовуватися для забарвлення нежиттєздатних клітин [11].

Надалі було проведено гейтування та визначено життєздатні лейкоцити (анексин V⁻, 7-AAD⁻); такі, що знаходяться на початковій стадії апоптозу (анексин V⁺, 7-AAD⁻); що знаходяться на пізній стадії апоптозу (анексин V⁺, 7-AAD⁺); некротично змінені лейкоцити (анексин V⁻, 7-AAD⁺). Зазначений аналіз життєздатності лейкоцитів, з нашої точки зору, стосувався саме нейтрофільних лейкоцитів, адже в лейкоцитарній формулі на них припадає найбільший відсоток.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням програми Graph Pad Prism 5 («Graph Pad Software», США). За допомогою непараметричного критерію Манна-Уїтні (U) проводили порівняння між двома незалежними групами змінних. Одержані результати представляли у вигляді медіани (Me) та інтерквартильного інтервалу (Me [25%; 75%]). Відмінності при P < 0,05 вважали вірогідними.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати аналізу життєздатності лейкоцитів крові щурів усіх груп представлено в таблиці.

У крові щурів 1-ї групи виявлено превалювання відсотка життєздатних нейтрофільних лейкоцитів над кількістю загинувих клітин, тобто тих, що знаходяться в стані апоптозу або некрозу. На рис. 1 приведено аналіз життєздатності нейтрофільних лейкоцитів щура № 3 1-ї групи (життєздатних лейкоцитів – 97,3%; лейкоцитів, що знаходяться на початковій стадії апоптозу, – 2,39%; лейкоцитів, що знаходяться на пізній стадії апоптозу, – 0,26%; некротично змінених лейкоцитів – 0,06%). Одержані в цій групі показники надалі будуть використані як нормативні.

Нейтрофільні лейкоцити є найбільшою популяцією циркулюючих у крові лейкоци-

Життєздатність лейкоцитів крові щурів та види їх загибелі

| Досліджувана група | Кількість клітин, % | | | |
|--|---|---|---|---|
| | Анексин V ⁻ , 7-AAD ⁻ клітини | Анексин V ⁺ , 7-AAD ⁻ клітини | Анексин V ⁺ , 7-AAD ⁺ клітини | Анексин V ⁻ , 7-AAD ⁺ клітини |
| 1-ша (інтактні щури) | 96,56 [95,53; 97,52] | 1,13 [0,59; 2,21] | 1,04 [0,65; 1,60] | 1,08 [0,60; 1,49] |
| 2-га (щури, яким щоденно протягом 25 діб підшкірно вводили 0,2 мл очищеної та стерилізованої оливкової олії) | 96,34 [95,76; 97,47] | 0,96 [0,47; 1,33] | 1,65 [1,07; 2,23] | 0,98 [0,46; 1,26] |
| 3-тя (щури, які щоденно протягом 25 діб піддавались переривчастому холододовому впливу) | 95,74 [92,99; 97,68] | 1,96 [0,73; 4,04] | 1,08 [0,78; 1,77] | 0,98 [0,81; 1,03] |
| 4-га (щури, яким моделювали дегідроепіандростероніндукований СПКЯ) | 85,70 [81,97; 87,18] | 12,01 [11,49; 14,49] | | |
| | $P_{1-4} < 0,05$ | $P_{1-4} < 0,05$ | | |
| | $P_{2-4} < 0,05$ | $P_{2-4} < 0,05$ | 1,39 | 1,09 |
| | $P_{3-4} < 0,05$ | $P_{3-4} < 0,05$ | [0,64; 2,0] | [0,59; 1,59] |
| 5-та (щури, яким на тлі переривчастого холододового впливу вводили дегідроепіандростерон) | 93,30 [92,26; 94,46] | 3,57 [3,32; 4,04] | 0,99 [0,84; 1,50] | 1,50 [1,03; 2,77] |
| | $P_{4-5} < 0,05$ | $P_{4-5} < 0,05$ | | |

Примітка: P – розбіжності між показниками відповідних дослідних груп.

тів, які є ключовими учасниками вродженої імунної відповіді, враховуючи їх здатність виконувати різні ефекторні функції. У них короткий життєвий цикл, який характеризу-

ється проліферацією та дозріванням у кістковому мозку (близько 6 днів), циркуляцією у крові протягом 10–24 год, їх міграцією в тканини, де вони перебувають там протягом

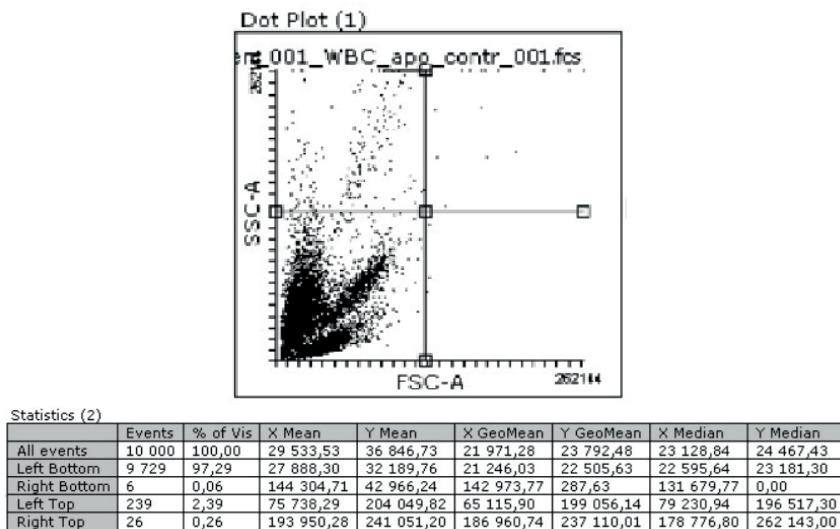


Рис. 1 Репрезентативна цитограма та статистичне визначення відсотка життєздатних лейкоцитів та лейкоцитів, що знаходяться в стані апоптозу або некрозу, у інтактного щура № 3 1-ї групи

1-2 днів та гинуть [12]. Нині вченими описані різні шляхи загибелі нейтрофільних лейкоцитів, однак найбільш значимими є некроз та апоптоз [13].

Показники у групах 2 і 3 не мали значимих відмінностей порівняно з 1-ю групою. У них було виявлено превалювання відсотка життєздатних нейтрофільних лейкоцитів над кількістю загиблих клітин через некроз або апоптоз. На рис. 2 та 3 представлено результати оцінки життєздатності лейкоцитів, відповідно, щура № 5 2-ї групи (життєздатних лейкоцитів – 96,47%; лейкоцитів, що знаходяться на початковій стадії апоптозу, – 0,59%; лейкоцитів, що знаходяться на пізній стадії апоптозу, – 1,64%; некротично змінених лейкоцитів – 1,30%) та щура № 1 3-ї групи (життєздатних лейкоцитів – 89,07%; лейкоцитів, що знаходяться на початковій стадії апоптозу, – 7,97%; лейкоцитів, що знаходяться на пізній стадії апоптозу, – 0,67%; некротично змінених лейкоцитів – 2,29%).

При аналізі показників 4-ї групи було виявлено, як і в попередніх групах (1–3), превалювання відсотка життєздатних лейкоцитів над кількістю загиблих лейкоцитів. У цій групі, порівняно з відповідними показниками груп 1–3, зменшувався відсоток життєздатних лейкоцитів, та збільшувався відсоток лейкоцитів, що знаходяться на початковій стадії апоптозу. Однак кількість лейкоцитів, що знаходяться на пізній стадії апоптозу, та некротично змінених не мала значимих відмінностей. На рис. 4 представлено результати оцінки життєздатності нейтрофільних лейкоцитів крові щура № 2 4-ї групи (життєздатних лейкоцитів – 86,68%; лейкоцитів, що знаходяться на початковій стадії апоптозу, – 11,96%; лейкоцитів, що знаходяться на пізній стадії апоптозу, – 0,27%; некротично змінених лейкоцитів – 1,09%). Таким чином, у андрогенізованих щурів з СПКЯ знижувалася життєздатність нейтрофільних лейкоцитів крові внаслідок їх загибелі через апоптоз, про що свідчило збільшення відсотка клітин, що знаходяться на початковій стадії апоптозу.

Дегідроепіандростерон, що використувався нами для моделювання СПКЯ, є стероїдним гормоном, який продукується наднирковими і статевими залозами, а також мозковою тканиною [14]. Він характеризується протизапальними та імунорегулюючими властивостями; не впливає на життєздатність нейтрофільних лейкоцитів (антиапоптотична дія); підвищує активність загальної антиоксидантної здатності та супероксиддисмутази, зменшує вміст активних форм кисню [15]. Можна припустити, що виявлене нами зниження життєздатності нейтрофільних лейкоцитів є результатом введення тваринам дегідроепіандростерону. Проте вищезазначені властивості цього гормону свідчать, що зниження життєздатності лейкоцитів внаслідок активації процесів апоптозу зумовлено саме змодельованим СПКЯ у тварин.

Активація процесів апоптозу нейтрофільних лейкоцитів у щурів з СПКЯ спричинена, з нашої точки зору, підвищеною генерацією цими клітинами активних форм кисню, що було визначено нами у попередніх дослідженнях [6]. Гіперпродукція активних форм кисню з характерною для них пошкоджувальною дією на клітинні структури, в тому числі на фізико-хімічні властивості цитоплазматичних мембран, на тлі виснаження резервів антиоксидантного захисту є одним із головних індукторів запуску апоптозу або некрозу нейтрофільних лейкоцитів [12, 13, 16].

Апоптоз нейтрофільних лейкоцитів є динамічним та стадійним процесом, у якому виділяють фази: ініціювання, вбивання та вилучення загиблої клітини. Нині відомі два основні шляхи активації апоптозу: зовнішній (рецепторопосередкований, «апоптоз по команді») та внутрішній (мітохондріальний, «апоптоз зсередини») [16]. Шлях активації апоптозу нейтрофільних лейкоцитів залежить від походження джерел продукції активних форм кисню. У проведеному раніше дослідженні була доведена роль нейтрофільних лейкоцитів крові щурів з СПКЯ у надмірній генерації активних форм кисню, що, з нашої

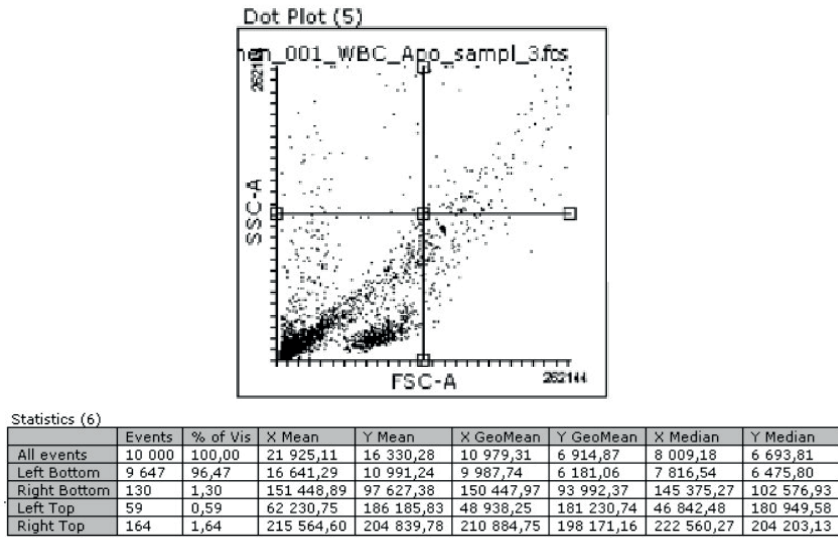


Рис. 2. Репрезентативна цитограма та статистичне визначення відсотка життєздатних лейкоцитів, та лейкоцитів, що знаходяться в стані апоптозу або некрозу, у щура № 5, якому щоденно протягом 25 днів підшкірно вводили 0,2 мл очищеної та стерилізованої оливкової олії

точки зору, запускає внутрішній шлях апоптозу цих клітин [6]. Активні форми кисню пошкоджують мітохондріальні мембрани, спричиняють вихід біологічно активних речовин у цитозоль (цитохром С, апоптозіндукуючий фактор), які запускають каскад каспазних реакцій та призводять до апоптозу. Цікавим є те, що мітохондрії, як основні мішені вільних

радикалів, одночасно виступають джерелом продукції активних форм кисню в клітині, які, в свою чергу, також можуть активувати апоптоз, що тим самим створює так зване «замкнуте коло» [17].

СПКЯ є захворюванням, яке спричинене змінами співвідношення вмісту факторів клітинного росту та загибелі клітин, оксидатив-

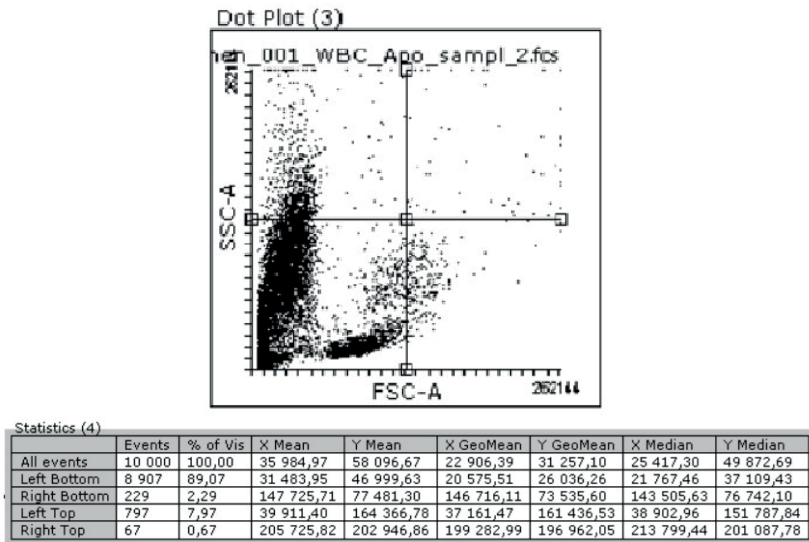


Рис. 3. Репрезентативна цитограма та статистичне визначення відсотка життєздатних лейкоцитів, та лейкоцитів, що знаходяться в стані апоптозу або некрозу, у щура № 1, якого щоденно протягом 25 днів піддавали переривчастому холододовому впливу

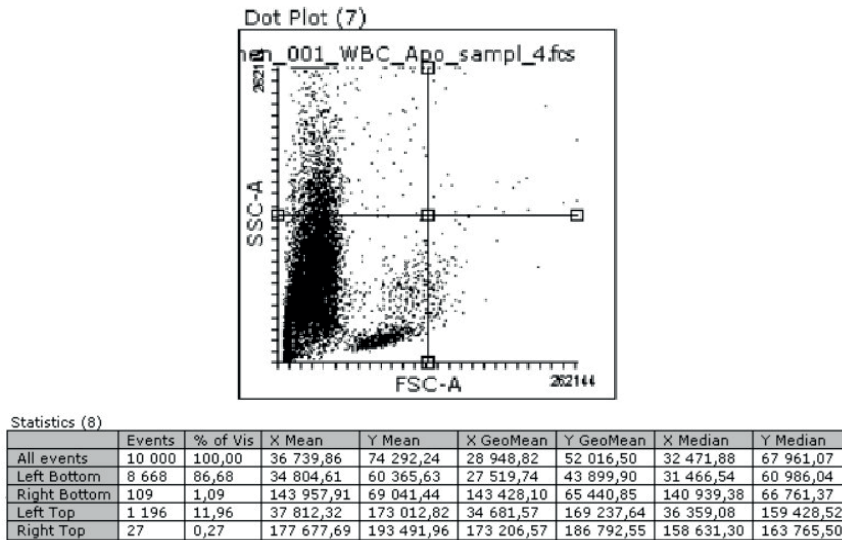


Рис.4. Репрезентативна цитограма та статистичне визначення відсотка життєздатних лейкоцитів, та лейкоцитів, що знаходяться в стані апоптозу або некрозу, у щура № 2, якому моделювали дегідроепіандростероніндукований СПКЯ

ним стресом, що призводять до зупинки росту фолікулів та їх кістозному перетворюванню. Також було виявлено активацію процесів апоптозу в яєчниковій тканині при СПКЯ, що був індукований введенням дегідроепіандростерону, за рахунок мітохондріальноопосередкованого каспазного шляху [18].

Учені зазначають, що активні форми кисню можуть ініціювати апоптоз і генотоксичним впливом на ДНК та активації гена p53; каспазозалежну загибель нейтрофільних лейкоцитів тощо. Крім того, можливим є ініціація внутрішнього шляху апоптозу нейтрофільних лейкоцитів у взаємодії із зовнішнім, що неминуче призводить до загибелі клітин [19].

У жінок з СПКЯ вчені виявили в різних органах та системах, у тому числі в тканині яєчників, пошкоджені та нежиттєздатні клітини з характерними морфофункціональними змінами або їх фрагменти, видалення яких з організму людини може відбуватися за допомогою професійних фагоцитів – нейтрофілів через фагоцитоз [20]. Під час останнього активована НАДФН-оксидаза транспортує електрони з НАДФН і запускає процес утворення надмірної кількості активних

форм кисню, який у нейтрофілах називають «кисневим вибухом» [21]. У результаті останнього активується фагоцитозіндукований апоптоз нейтрофільних лейкоцитів. Цей факт також може пояснити виявлене у дослідженні зниження у щурів з СПКЯ життєздатності лейкоцитів та їх загибель через апоптоз, а в попередньому дослідженні – надмірну продукцію активних форм кисню нейтрофільними лейкоцитами [6].

У 5-й групі, як і в попередніх чотирьох групах, у крові превалював відсоток життєздатних нейтрофільних лейкоцитів над кількістю загинувших лейкоцитів різними шляхами. На рис. 5 наведено результати оцінки життєздатності нейтрофільних лейкоцитів крові у цій групі на прикладі щура № 4 (життєздатних лейкоцитів – 91,19%; лейкоцитів, що знаходяться на початковій стадії апоптозу, – 4,07%; лейкоцитів, що знаходяться на пізній стадії апоптозу, – 1,04%; некротично змінених лейкоцитів – 3,7%).

У щурів 5-ї групи порівняно з 4-ю кількість життєздатних лейкоцитів збільшувалася, число лейкоцитів, що знаходяться на початковій стадії апоптозу, зменшувалося, а тих, що знаходяться на пізній стадії апоптозу,

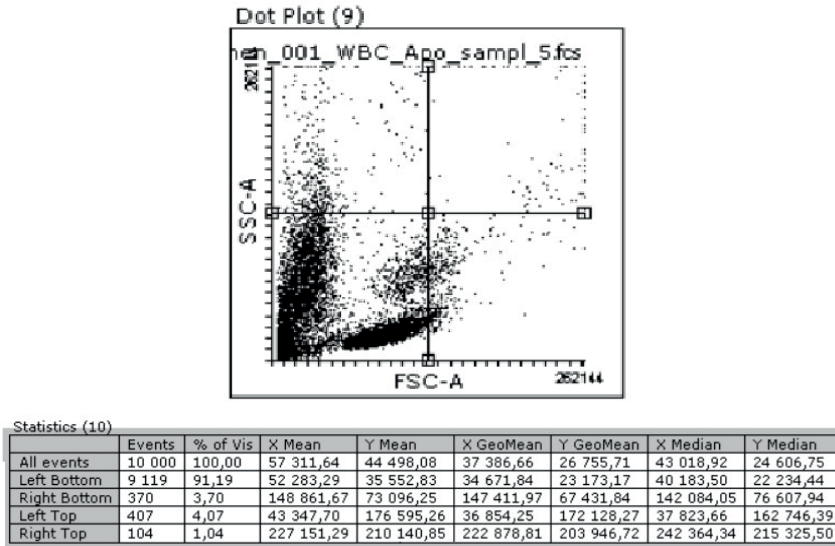


Рис. 5. Репрезентативна цитограма та статистичне визначення відсотка життєздатних лейкоцитів, та лейкоцитів, що знаходяться в стані апоптозу або некрозу, у щура № 4, якому на тлі переривчастого холодового впливу вводили дегідроепіандростерон

у стані некрозу, не змінювалося. Показники цієї групи не відрізнялися від значень у 1–3 групах. Одержані під час порівняльного аналізу результати свідчать про те, що переривчастий холодовий вплив на тлі введення тваринам дегідроепіандростерону чинить антиапоптотичний ефект, тим самим нормалізує життєздатність нейтрофільних лейкоцитів. Зазначений позитивний ефект холодового фактора зумовлений тим, що він стабілізує продукцію активних форм кисню нейтрофільними лейкоцитами та діяльність редокс-системи [6, 22]; підвищує адаптаційні можливості організму, в розвитку яких певне значення мають індукований холодом РНК-зв'язуючий білок (cold-inducible RNA binding protein) і тіоредоксин (thioredoxin) [23]. Проведене нами раніше морфологічне дослідження яєчників також довело позитивний ефект переривчастого холодового впливу у щурів на тлі введення дегідроепіандростерону порівняно зі щурами з дегідроепіандростероніндукованим СПКЯ, про що говорить збільшення кількості преантральних і антральних фолікулів, відсутність кіст, нормалізація кількості жовтих тіл та товщини шару текальних клітин [9].

Холодовий фактор, згідно даних літератури, може запускати процеси апоптозу лейкоцитів, пригнічувати їх або навіть зупиняти клітинний цикл у фазі «гібернації» (G0) [24, 25], що залежить від тривалості холодового впливу, величини і швидкості температурного зсуву та ін.

ВИСНОВКИ

Проведене комплексне дослідження виявило зниження життєздатності нейтрофільних лейкоцитів крові щурів з дегідроепіандростероніндукованим СПКЯ внаслідок активації процесів апоптозу, про що свідчило збільшення відсотка лейкоцитів, які знаходяться на початковій стадії апоптозу. Переривчастий холодовий вплив (4 год щодня при +4°C протягом 25 днів) на тлі введення щурам дегідроепіандростерону чинив антиапоптотичний ефект, нормалізуючи життєздатність нейтрофільних лейкоцитів крові.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations

and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co-authors of the article.

**M.V. Zhulikova¹, M.S. Myroshnychenko¹,
O.A. Nakonechna¹, O.O. Zhulikov²,
V.O. Bibichenko¹, S.O. Myroshnychenko³,
O.V. Zaytseva¹, M.V. Kovaltsova¹**

VIABILITY AND TYPES OF DEATH OF BLOOD LEUKOCYTES IN RATS WITH POLYCYSTIC OVARY SYNDROME UNDER CONDITIONS OF INTERMITTENT COLD EXPOSURE

¹ *Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine;*

² *Medical Center Maria, Kharkiv, Ukraine;*

³ *Public Non-profit Organization of the Izium City Council Central City Hospital of Sandy Mother of God; e-mail: msmyroshnychenko@ukr.net*

The aim of our work is to assess the viability and determine the types of death of blood leukocytes in rats with polycystic ovary syndrome (PCOS) under conditions of intermittent cold exposure. The study was performed on 40 immature female rats of the WAG population, aged 27 days, divided into 5 groups of 8 animals each. Group 1 included intact rats. In group 2, rats were subcutaneously injected with 0.2 ml of purified and sterilized olive oil daily for 25 days. In group 3, rats were exposed to periodic cold exposure daily for 25 days. In group 4, dehydroepiandrosterone-induced PCOS was modeled in rats. In group 5, rats were injected with dehydroepiandrosterone against the background of periodic cold exposure. Leukocyte viability and death pathways were determined using a FACS Canto II flow cytometer (Becton Dickinson, USA). Rats with dehydroepiandrosterone-induced PCOS showed a decrease in the percentage of viable leukocytes and an increase in the percentage of leukocytes in the early stage of apoptosis, while the number of leukocytes in the late stage of apoptosis and necrotic leukocytes did not change. In rats, on the background of the introduction of dehydroepiandrosterone under conditions of intermittent cold exposure, the percentage of viable leukocytes, as well as leukocytes at different stages of apoptosis and necrosis, corresponded to the physiological norm. Thus, the authors revealed a decrease in the viability of neutrophilic leukocytes in the blood of rats with dehydroepiandrosterone-induced PCOS due to the activation of apoptosis processes, as evidenced by an increase in the percentage of leukocytes at the initial stages of apoptosis. Intermittent cold exposure (4 h daily at +4°C for 25 days) against the background of dehydroepiandrosterone administration to rats had an anti-apoptotic effect, normalizing the viability of neutrophilic blood leukocytes.

Key words: viability; leukocytes; blood; rats; polycystic ovary syndrome; intermittent cold exposure; apoptosis; necrosis.

REFERENCES

1. Singh S, Pal N, Shubham S, Sarma DK, Verma V, Marotta F, Kumar M. Polycystic ovary syndrome: etiology, current management, and future therapeutics. *J Clin Med.* 2023;12(4):1454.
2. Chudzicka-Strugała I, Gołębowska I, Banaszewska B, Brudecki G, Zwoździak B. The role of individually selected diets in obese women with PCOS - a review. *Nutrients.* 2022;14(21):4555.
3. Tong C, Wu Y, Zhang L, Yu Y. Insulin resistance, autophagy and apoptosis in patients with polycystic ovary syndrome: association with PI3K signaling pathway. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022;13:1091147.
4. Christ JP, Cedars MI. Current guidelines for diagnosing PCOS. *Diagnostics (Basel).* 2023;13(6):1113.
5. Zhang B, Pan C, Feng C, Yan C, Yu Y, Chen Z, Guo C, Wang X. Role of mitochondrial reactive oxygen species in homeostasis regulation. *Redox Rep.* 2022;27(1):45-52.
6. Zhulikova MV, Myroshnychenko MS, Nakonechna OA, Zhulikov OO, Pustova NO, Bibichenko VO, Lytyvnenko OYu, Kucheriavchenko MO. Reactive oxygen species generation by blood leucocytes of rats with polycystic ovary syndrome under the conditions of intermittent cold exposure. *Wiad Lek.* 2023; 76(7): in press.
7. Olaniyan OT, Bamidele O, Uche S, Femi A, Ayobami D, Ayoola O, Builders M, Mali PC. Ovarian metabolic activity in dehydroepiandrosterone-induced polycystic ovary in Wistar rats treated with aspirin. *JBRA Assist Reprod.* 2020;24(1):41-54.
8. Kuzmina IYu, Zhulikova MV, Bozhok GA. Influence of general cooling on morphometric indicators of ovarians and brown fatty tissue in rats in experiment. *Ukr J Med, Biol Sport.* 2017;2(4):20-25. [Russian].
9. Kuzmina IYu, Nikolayeva OV, Zhulikova MV, inventor; Kharkiv National Medical University, assignee. Method for preventing the development of polycystic ovary syndrome in experiment. Ukraine patent 129472U. 2018 Oct 25.
10. Kuzmina IYu, Nikolayeva OV, Zhulikova MV, inventor; Kharkiv National Medical University, assignee. Method of polycystic ovary syndrome modeling. Ukraine patent 119800U. 2017 Oct 10.
11. Babenko O, Vasylyeva I, Nakonechna O, Popova L, Voitenko S, Pustova N. The viability of leukocytes and reactive oxygen species generation by them in rats with chronic colitis. *Wiad Lek.* 2022;75(9 pt 2):2270-4.
12. Pérez-Figueroa E, Álvarez-Carrasco P, Ortega E, Maldonado-Bernal C. Neutrophils: many ways to die. *Front Immunol.* 2021;12:631821.
13. Palytsia LM, Korda MM. C60 fullerenes increases toluene induced levels of apoptotic and necrotic neutrophils. *Bull Probl Biol Med.* 2017;1(135):161-5. [Ukrainian].
14. Brauer VS, Zambuzi FA, Espindola MS, Neto MPC, Prado MKB, Silva PMC, Soares LS, Lima LJJ, Cardoso CRB, Leopoldino AM, Frantz FG. The influence of dehydroepiandrosterone on effector functions of

- neutrophils. Braz. J. Pharm. Sci. 2022;57. e19139.
15. Cao J, Yu L, Zhao J, Ma H. Effect of dehydroepiandrosterone on the immune function of mice in vivo and in vitro. Mol Immunol. 2019;112:283-90.
 16. Dyugovskaya L, Polyakov A. Neutrophil apoptosis and hypoxia. Fiziol Zh. 2010;56(5):115-24.
 17. Pavlyshyn HA, Sarapuk IM, Yuhymchuk AT. Current views on the role of neutrophils and their apoptosis in the pathogenesis of inflammatory processes. Int J Pediatr, Obstetrics Gynecol. 2014;5(1):69-81. [Ukrainian].
 18. Azhar A, Naseem Z, Haider G, Farooqui N, Farhat S, Rehman R. PCOS model: apoptotic changes and role of vitamin D. Electron J Gen Med. 2022;19(5):em398.
 19. Marushchak MI. Mitochondrial apoptosis mechanisms in experimental acute lung injury. Bull Sci Res. 2017;1:121-4. [Ukrainian].
 20. Sayed GA, Radwan AF, Reda AM, Salman AT, Youssef AA, Abd-Allah GM. Dysregulation of apoptotic genes in polycystic ovarian syndrome patients undergoing in vitro fertilization. ERURJ. 2023;2(2):320-30.
 21. Gavrilenko TI, Rizhkova NA, Parkhomenko OM, Dovgan EV, Dovgan NV, Pasichnichenko OM, Babiy SM. Modern views on the role of neutrophils in the immune response. Fiziol Zh. 2021;67(3):75-86. [Ukrainian].
 22. Xue G, Yin J, Zhao N, Liu Y, Fu Y, Zhang R, Bao J, Li J. Intermittent mild cold stimulation improves the immunity and cold resistance of spleens in broilers. Poult Sci. 2021 Dec;100(12):101492.
 23. Wang X, Che H, Zhang W, Wang J, Ke T, Cao R, et al. Effects of mild chronic intermittent cold exposure on rat organs. Int J Biol Sci. 2015;11(10):1171-80.
 24. Teległów A, Romanovski V, Skowron B, Mucha D, Tota Ł, Rosińczuk J, Mucha D. The effect of extreme cold on complete blood count and biochemical indicators: a case study. Int J Environ Res Publ Health. 2021;19(1):424.
 25. Gulevsky AK, Akhatova YuS, Shchenyavsky II. Features of apoptosis, induced by temperature reduction. Probl Cryobiol Cryomed. 2017; 27(2): 97-109.

*Матеріал надійшов
до редакції*