

РЕАКЦІЯ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ЩУРІВ НА ОПРОМІНЕННЯ І ВВЕДЕННЯ КСЕНОГЕННОЇ ЦЕРЕБРОСПІНАЛЬНОЇ РІДИНИ

**В. Пикалюк, М. Кривенцов, Н. Дев'ятова*, В. Куниця, Є. Бессалова,
Л. Шаймарданова, В. Кісельов**

ДУ «Кримський державний медичний університет імені С.І. Георгієвського»

Бульв. Леніна, 5/7, Сімферополь 95006, Україна

e-mail: Ninadevyatova@mail.ru

Досліджено вплив ксеногенної цереброспинальної рідини на показники периферичної крові щурів, які зазнали променевого впливу. Підтверджено негативну дію опромінення на клітини крові щурів. При цьому розвивається різка лейкопенія, що супроводжується порушенням лейкоцитарної формули зі зменшенням кількості лімфоцитів і збільшенням числа нейтрофілів, функціональна активність останніх різко зменшується. Встановлено, що одноразове, в дозі 10 мл/кг, введення ліквору не сприяє нормалізації клітинних показників крові та функціональної активності нейтрофілів. Багаторазове (один раз на три дні) введення ліквору в дозі 2 мл/кг сприяє не тільки збільшенню кількості лейкоцитів, а й нормалізації лейкоцитарної формули і відновленню функціональної активності нейтрофілів.

Ключові слова: ліквор, периферична кров, щурі, опромінення.

Реакції організму у відповідь на пошкоджувальну дію радіаційного фактора не супроводжуються автономними змінами фізіологічних параметрів і функцій, а є взаємообумовленою інтегральною відповіддю різноманітних функціональних систем [3]. Серед них істотну роль відіграє кровоносна система. Відповідно до цього, великий теоретичний і практичний інтерес становлять зміни морфологічного складу крові, що зачіпають як червону кров, так і популяцію лейкоцитів, які здійснюють захисні реакції організму [1]. Вивченню питання реакції клітин крові на опромінення присвячено низку досліджень. Однак у них містяться іноді суперечливі дані. Так, навіть на рівні термінальних станів зі смертельним результатом, обумовлених опроміненням із глибокими порушеннями гомеостазу, відзначають, що зміни в самій крові мінімальні [7, 14]. Навпаки, Яблоков [13] вважає, що навіть невеликі дози радіації викликають лейкоцитоз із подальшою лейкемією. Деякі автори вважають, що лімфоцити периферичної крові мають високу радіочутливість, їх

вміст у крові організму, опроміненого високими дозами, незабаром різко знижується [9, 15]. Інші автори інформують, що червона кров після опромінення абсолютно інтактна, але відзначається лейкоцитоз і зміни лейкоцитарної формули в бік лімфоцитозу [10].

Нестійкість радіоекологічної ситуації в країні ставить нові завдання в пошуку та оцінці засобів захисту від опромінення. Класичні радіопротектори через свою високу токсичність і короткочасність дії виявилися малопридатними у сформованих умовах [2]. У рішенні вказаної проблеми важлива роль належить пошуку протипроменевих засобів тривалої дії серед речовин природного походження: зоо- та фітопрепаратів. На кафедрі анатомії людини КДМУ тривалий час вивчаються біоефекти парентерально введеної ксеногенної цереброспінальної рідини (ЦСМ). Вона активно впливає на метаболічні процеси в організмі, проникність гістогематичних бар'єрів, стан системи згортання крові, мікрогемодинамічне русло [6, 8, 12]. Становить неабиякий інтерес можливість радіопротекторної дії ЦСМ на показники периферичної крові та функціональну активність захисних клітин. За наявними літературними даними у собак введення ЦСМ сприяло збереженню в критичний період променевої хвороби (15–20 доба) більш високого рівня лейкоцитів за рахунок нейтрофільних гранулоцитів. Відзначено також істотно більш швидке і раннє відновлення кількості еритроцитів і тромбоцитів, а також менший ступінь збільшення ШОЕ [8]. У дослідженнях інших авторів також вивчали вплив ін'єкцій ліквору на перебіг гострої променевої хвороби. Доведено, що введення ЦСМ тваринам перед опроміненням обтяжувало перебіг гострої променевої хвороби, оскільки посилена проліферація гемопоетичних клітин у результаті введення ЦСМ призводила до появи великої кількості молодих клітин, більш радіочувливих. Ін'єкції ЦСМ після опромінення, навпаки, ведуть до посилення фагоцитарної реакції та сприяють інтенсивності її прояву [5].

Метою нашого дослідження було вивчення реакції лейкоцитів і лейкоцитарної формули периферичної крові щурів, а також функціональної активності нейтрофілів після опромінення і введення різних доз ЦСМ. Ми виходили з того, що вивчення механізмів розвитку реакцій гомеостатичних систем на зовнішній подразник може відкрити перспективи цілеспрямованого впливу на систему крові, а також прогнозувати результат дії стресового фактора, залежно від вихідного стану лімфоендокринних взаємодій [11].

Матеріали та методи

Експериментальне дослідження проведено на білих щурах-самцях лінії Вістар, віку 3,5–5 місяців, масою тіла на момент експерименту 150–170 г. Тварин утримували в стандартних умовах віварію при сталій температурі та вологості повітря з вільним доступом до води та їжі. Дослідження проводили у відповідності до Женевської конвенції «International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals» (Geneva, 1990).

Опромінення проводили на лінійному прискорювачі Clinac 2100, фотонного випромінювання: енергія лінійного прискорювача – 6 MeV, час експозиції – 50 с, разова доза – 5 Грей, розмір поля 40 см x 40 см, глибина проникнення – 2,5 см. Після цього тварини були розподілені на 3 групи (по 18 особин в кожній). Тваринам першої групи (контроль) вводили одноразово фізіологічний розчин у дозі 10 мл/кг, другої групи (після опромінювання) вводили ліквор одноразово також у дозі 10 мл/кг. Тваринам третьої групи ліквор вводили один раз на три дні в дозі 2 мл/кг. Для порівняння показники крові вивчали у інтактних тварин (6 особин). Забір крові здійснювали з хвостової вени на 7, 14, 30 добу після опромінення. У кожній серії налічувалось по 6 щурів. Отриманий матеріал у кількості 1 мл поміщали у стерильні пробірки, що містять 3,8% цитрату натрію (співвідношення крові й цитрату 10:1). Підрахунок лейкоцитів здійснювали в камері Горяєва, підрахунок лейкоцитарної формули проводили в забарвлених мазках (метод фарбування за Романовським), лейкограму виводили з розрахунку на 200 клітин. Фагоцитарну активність нейтрофілів периферичної крові оцінювали методом завершеного фагоцитозу [4]. Для оцінки параметрів фагоцитарної реакції нейтрофілів периферичної крові щурів визначали їх поглинальну і травну здатність щодо до тест-культури стафілокока (штам С-52) після спільної інкубації. Результати оцінювали мікроскопічно. Розраховували комплекс показників: фагоцитарне число (Фч) – відсоток фагоцитів із числа порахованих нейтрофілів (у.о.), фагоцитарний індекс (Фі) – середнє число мікробів, поглинутих одним активним нейтрофілом.

Отримані дані досліджень обробляли статистично за допомогою пакету ліцензованих програм Microsoft Office Excel, обчислюючи середнє арифметичне для всієї групи, середньоквадратичне відхилення, похибку середньої, коефіцієнт варіації, відхилення величини в експерименті від величин у контролі у відсотках. Достовірність отриманих даних визначали на підставі t-критерію Стьюдента. Достовірними вважали результати при значенні $P \leq 0,05$.

Результати і їхнє обговорення

Встановлено, що опромінення істотно впливає на загальну кількість лейкоцитів, а це проявляється вираженою лейкопенією в усі терміни спостереження: на 7-у добу кількість лейкоцитів становило $2,5 \pm 1,4 \times 10^9$, на 14-у – $0,85 \pm 0,8 \times 10^9$, на 30-у – $2,4 \pm 1,0 \times 10^9$. Враховуючи, що у неопромінених щурів рівень лейкоцитів становив $10,2 \pm 1,9 \times 10^9$ (показник відповідає літературним даним), ми встановили значне зниження кількості захисних клітин крові. Характерна деяка хвилеподібність лейкопенії. Зміни крові супроводжувались змінами у поведінці тварин. Щурі були мляві, малорухливі, полохливі, у багатьох на шкірі були трофічні порушення. Навіть через такий тривалий термін, як місяць після опромінення,

кількість лейкоцитів не відновлюється, складаючи лише близько чверті від норми.

Вивчення лейкоцитарної формули дало не менш цікаві результати. У здорових щурів формула нагадувала картину крові новонародженої дитини – переважали лімфоцити до 60-80%, нейтрофіли становили не більше 30%. У наших спостереженнях виявлено, що опромінення призводило до достовірного і вираженого зниження відсоткового числа лімфоцитів: на 7-му добу лімфоцити становили 42,1% ($P<0,01$), на 14-ту – 30% ($P<0,01$), на 30-ту – 33% ($P<0,01$). Паралельно спостерігався відносний нейтрофіліоз. Як і лімфоцити, зміни нейтрофілів схильні до певної зигзагоподібності. На 7-му добу їх кількість сягала 44,7% ($P<0,01$), на 14-ту – 50,5% ($P<0,01$), на 30-ту – 43,0% ($P<0,01$). Причому слід особливо підкреслити, що нейтрофілоцитоз завжди супроводжувався збільшенням числа молодих форм нейтрофілів за рахунок паличкоядерних нейтрофілів до 13–14% ($P<0,05$), при контрольних цифрах не більше 2%. Зміни з боку еозинофілів були менш вираженими кількісно, але у відсотковому співвідношенні їхня кількість збільшувалася до 20 разів, досягаючи максимуму на 14-ту добу – 1,6% (норма в середньому 0,1%). На 7-му добу відзначалася монопенія 0,8% ($P<0,01$), що змінилася на 14-ту і 30-ту добу моноцитозом, відповідно – 9,3% і 10,8% ($P<0,05$).

Вивчення поглинальної здатності фагоцитуючих нейтрофілів периферичної крові показало, що на 7-му добу після опромінення спостерігалось зниження як фагоцитарного індексу (Фі), так і фагоцитарного числа (Фч). Фі у щурів становив на 7-му добу $72\pm 1,9\%$, ($p<0,02$), а Фч – $2,6\pm 0,8$ у.о., до 14-ї доби – $79\pm 1,7\%$ і $2,2\pm 0,3$ у.е. ($p<0,02$), до 30 – відповідно $76\pm 1,8\%$ і $19\pm 0,2$ у.о.

Наведені дані свідчать, що реакція лейкоцитів крові на випромінювання трохи відрізняється від класичної реакції на стресорний вплив. За даними літератури, відомо, що за різноманітних стресових впливів нейтрофіліоз і лімфопенія зберігаються не більше ніж 6 діб після припинення їхньої дії [1]. У наших дослідженнях вони спостерігалися впродовж усього терміну експерименту. Тобто виражені лімфопенія і нейтрофіліоз свідчать про те, що опромінення є потужним стрес-фактором, який може мати негативний наслідок для організму. Хвилеподібність змін показників морфофункціонального стану організму відзначається при дії найрізноманітніших факторів і, очевидно, її слід розглядати як прояв адаптивних перебудов організму. Наступна відмінність отриманих даних від літературних полягає в тому, що ми не спостерігали лейкоцитозу, який притаманний типовій стрес-реакції. Лейкопенія супроводжується зниженням клітинної ланки імунітету й опірності організму до інших зовнішніх впливів. Наші дані спростовують постулат про те, що кров'яна тканина, на відміну від високодиференційованих нервової тканини і паренхіматозних органів, є більш реліктова і менш чутлива до зовнішніх впливів.

У другій групі спостереження на 7-му добу кількість лейкоцитів також значно зменшилася, але була вищою, порівняно з першою групою – $3,9 \pm 1,6 \times 10^9$ ($P < 0,05$); на 14-ту добу кількість лейкоцитів зменшилась до $1,2 \pm 1,5 \times 10^9$ ($P < 0,05$), на 30-ту стала ще меншою – $0,4 \pm 0,2 \times 10^9$ ($P < 0,05$). Зміни стосувалися і формули крові. На 7-му добу лімфоцити становили 49,2% ($P < 0,05$), на 14-ту – 34% ($P < 0,01$), на 30-ту – 32% ($P < 0,05$). Кількість нейтрофілів на 7-му добу становила 46,4% ($P < 0,01$), на 14-ту – 58,5% ($P < 0,01$), на 30-ту – 63,0% ($P < 0,01$). Еозинофіли на початку експерименту зростали до 1,5%, потім практично не виявлялися. Моноцити на 7-му добу відповідали контрольним цифрам, потім, як і в першій групі, збільшувалися в кількості, становлячи, відповідно 5,6% і 7,6% ($P < 0,01$). Фі у щурів становив на 7-му добу $76 \pm 1,8\%$, ($P < 0,02$), а Фч – $3,6 \pm 0,9$ у.о., на 14-ту добу $68,4 \pm 1,4\%$ і $2,0 \pm 0,3$ у.о. ($P < 0,02$) і на 30-ту – відповідно $76 \pm 1,8\%$ і $1,9 \pm 0,2$ у.о. Таким чином, дія одноразового введення ЦСМ на початку спостереження була стимулюючою, гемопротекторною, а наприкінці – навпаки, кількість лейкоцитів була меншою, порівняно з першою групою. Ці порушення були помітні і при вивченні формули крові та імунної активності: депресія показників нейтрофільного фагоцитозу пов'язана з дією випромінювання на кістково-мозкове депо і зрілі нейтрофіли. Ми це пояснюємо початковим виснаженням кісткового мозку, спричиненим поєднанням протилежно спрямованих дій випромінювання і ЦСМ.

Після багаторазового введення ліквору на 7-му добу кількість лейкоцитів становить $1,9 \pm 1,2 \times 10^9$, на 14-у – $3,9 \pm 1,1 \times 10^9$, на 30-у – $6,3 \pm 1,5 \times 10^9$ ($P < 0,05$). Таким чином, введення ЦСМ сприяло поліпшенню показників крові. І хоча цифри менші, ніж у контролі, цей показник дає змогу клітинам крові виконувати свою захисну функцію. Нами встановлено зростання кількості лімфоцитів (відповідно до термінів – 32%, 48% і 59% ($P < 0,01$)). Паралельно відбувається зменшення нейтрофілів (відповідно 56%, 50%, 31% ($P < 0,01$)). На початку експерименту відзначали збільшення еозинофілів з 0,1% до 1,3% і моноцитоз (2,2% у інтактних та 10,8% у 3-й групі). Після багаторазового введення ЦСМ, починаючи з 14-го дня відмічено відновлення кількості еозинофілів і моноцитів; на 30-ту добу їхня кількість не відрізнялася від контролю. На 7-му добу Фі становив $80 \pm 1,6\%$, ($P < 0,02$), а Фч – $3,8 \pm 0,7$ у.о., на 14-ту добу $88,3 \pm 1,9\%$ і $2,9 \pm 0,2$ у.о. ($P < 0,02$) і на 30-ту – відповідно $94 \pm 2,5\%$ і $3,7 \pm 0,4$ у.о.

Таким чином, багаторазове введення ліквору проявляє гемопротекторну дію, сприяючи відновленню формули крові та її імунних функцій. І хоча навіть до 30-ї доби експерименту показники не зовсім дорівнюють контрольним, отримані результати свідчать про потребу продовжувати дослідні роботи з метою подальшої розробки методики застосування ЦСЖ для зменшення наслідків опромінення.

Опромінення призводить до виражених змін периферичної крові. Розвивається лейкопенія, відбувається зсув лейкоцитарної формули в бік зміни співвідношення

нейтрофілів і лімфоцитів, з пригніченням показників клітинного імунітету.

Одноразове введення ліквору в початкові терміни (7 діб) проявляє незначний протекторний ефект, який нівелюється при подальшому спостереженні.

Багаторазове введення ЦСМ покращує показники периферичної крові. На 30-ту добу експерименту кількість лейкоцитів і лейкоцитарна формула наближаються до показників інтактних тварин. Рівень клітинного імунітету піддослідних тварин ненабагато відрізняється від контрольного. Це є підставою застосування ЦСМ та її препаратів при лікуванні променевої хвороби.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Бринкевич В. Н., Мяделец О. Д.* Количественные изменения периферической крови при пролонгированной гипотермии // Проблемы криобиологии. 1991. № 3. С. 51–56.
2. *Даренская Н.Г., Короткевич А.О., Малютина Т.С. и др.* Возможности прогнозирования индивидуальной тяжести поражения при лучевых воздействиях в сверхлетальных дозах. Прогнозирование по ранней реакции на облучение // Радиационная биология. Радиоэкология. 2001. Т. 41. № 2. С. 165–170.
3. *Кузьменко О. В.* Стан деяких показників клітинного імунітету щурів із різною реакцією на стрес залежно від часу опромінення // Уч. записки Таврич. ун-та. Сер. биол., хим. 2012. Т. 25 (64). № 1. С. 132–141.
4. *Кудрявицкий А. И.* Оценка киллерной бактерицидности нейтрофилов периферической крови здоровых доноров и больных в прямом визуальном тесте // Лабораторное дело. 1985. № 1. С. 45–47.
5. *Куприянов С. Н., Мамиева М. Ф.* Влияние инъекций ликвора на течение острой лучевой болезни // Здравоохранение Туркменистана. 1986. № 2. С. 21–26.
6. *Пикалюк В.С., Бессалова Е.Ю., Ткач В.В. и др.* Ликвор как гуморальная среда организма. Симферополь: ИТ «Ариал», 2010. 192 с.
7. *Москвин С. В., Буйлин В. А.* Основы лазерной терапии. Тверь: ООО изд-во «Триада», 2006. 256 с.
8. *Ткач В.В., Атаманова О.М., Чертков К.С. и др.* Новый инъекционный биопрепарат «Ликворин» и его лечебные свойства при острой лучевой болезни у животных // Актуальные вопросы развития инновационной деятельности в государствах с переходной экономикой. Симферополь, 2006. 266 с.
9. *Пикалова Л. В.* Применение цитогенетических методов исследования хромосом в радиологии // Молекулярная биология. 2007. Т. 9. С. 160–168.
10. *Корягин А.С., Ерофеева Е.А., Якимов В.Н. и др.* Сравнительная оценка противолучевых

- свойств животных ядов по состоянию системы крови в условиях многократного гамма-облучения // Поволжский эколог. журнал. 2005. № 2. С. 137–146.
11. Хаитов Р. М., Лесков В. П. Иммуитет и стресс // Рос. физиол. журнал им. И.М. Сеченова. 2001. Т. 87. № 8. С. 1060–1073.
 12. Шаймарданова Л. Р. Изменения картины крови под действием ксеногенной спинномозговой жидкости // Вісн. проблем біології і медицини. 2011. Вип. 1. С. 223–226.
 13. Яблоков А. В. Миф о безопасности малых доз радиации. М.: Книга по требованию, 2003. 302 с.
 14. Sarraf C. E., Otto W. R., Eastwood M. *In vitro* mesenchymal stem cell differentiation after mechanical stimulation // *Cell. Prolif.* 2011. Vol. 44. N 1. P. 99–108.
 15. Shigematsu A., Shi M., Okigaki M. [et al.] Signaling from fibroblast growth factor receptor 2 in immature hematopoietic cells facilitates donor hematopoiesis after intra-bone marrow-bone marrow transplantation // *Stem Cells Dev.* 2010. Vol. 19. N 11. P. 1679–1686.

Стаття: надійшла до редакції 12.05.14

доопрацьована 22.09.14

прийнята до друку 23.09.14

RAT'S PERIPHERAL BLOOD REACTION ON RADIATION EXPOSURE AND XENOGENIC CEREBROSPINAL FLUID ADMINISTRATION

V. Pykaluk, M. Kriventsov, N. Devyatova, V. Kunitsa, Ye.Y Bessalova,

L. Shaymardanova, V. Kisel'ov

State Institution "Crimea State Medical University named after S.I. Georgievskiy"

5/7, Lenin Blvd., Simferopol 95006, Ukraine

e-mail: Ninadevyatova@mail.ru

An influence of xenogenic cerebrospinal fluid administration had been studied on indexes of peripheral blood at radiation-exposed rats. A radiation's negative effect on rat's blood cells had been confirmed. Therewith severe leukocytopenia had been detected accompanied by white cells count shift with lymphocytes quantity reduction alongside high neutrophil count. No normal restitution of blood cells counts and no neutropils' functional recovery had been confirmed for a xenogenic cerebrospinal fluid's single administration at 10 ml per 1 kilo weight dosage. Cerebrospinal fluid's multiple administration (once every 3 days) at 2 ml per 1 kilo weight dosage had promoted leukocyte quantity's growth along with white blood cells count restitution and neutropils' functional recovery.

Keywords: cerebrospinal fluid, peripheral blood, rats, radiation-exposure.

**РЕАКЦИЯ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ КРЫС НА ОБЛУЧЕНИЕ И ВВЕДЕНИЕ
КСЕНОГЕННОЙ СПИННОМОЗГОВОЙ ЖИДКОСТИ**

**В. Пикалюк, М. Кривенцов, Н. Дев'ятова, В. Куница, Е. Бессалова,
Л. Шаймарданова, В. Киселёв**

ГУ «Крымский государственный медицинский университет имени С.И. Георгиевского»

Бульв. Ленина, 5/7, Симферополь 95006, Украина

e-mail: Ninadevyatova@mail.ru

Исследовано влияние ксеногенной спинномозговой жидкости на показатели периферической крови крыс, подвергшихся лучевому воздействию. Подтверждено негативное влияние облучения на клетки крови крыс. При этом развивается резкая лейкопения, сопровождающаяся сдвигом лейкоцитарной формулы с уменьшением лимфоцитов и увеличением числа нейтрофилов, функциональная активность последних резко уменьшается. Установлено, что однократное, в дозе 10 мл/кг, введение ликвора не способствует нормализации клеточных показателей крови и функциональной активности нейтрофилов. Многократное (один раз в три дня) на протяжении эксперимента введение ликвора в дозе 2 мл/кг способствовало увеличению не только количества лейкоцитов, но и нормализации лейкоцитарной формулы и восстановлению функциональной активности нейтрофилов.

Ключевые слова: ликвор, периферическая кровь, крысы, облучение.