

УДК 611:611-018.46:611.832:612.6

**А.И. Абсеттарова***Кафедра нормальной анатомии (зав. – проф. В.С. Пикалюк),  
Крымского государственного медицинского университета, г. Симферополь***КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ КЛЕТОК КРАСНОГО КОСТНОГО  
МОЗГА КРЫС ПОСЛЕ ОБЛУЧЕНИЯ И КОРРЕКЦИИ КСЕНОГЕННОЙ  
ЦЕРЕБРОСПИНАЛЬНОЙ ЖИДКОСТЬЮ****КІЛЬКІСНІ ЗМІНИ КЛІТИН ЧЕРВОНОГО КІСТКОВОГО МОЗКУ ЩУРІВ ПІСЛЯ ОПРОМІНЕННЯ  
І КОРЕКЦІЇ КСЕНОГЕННОЮ СПИННОМОЗКОВОЮ РІДИНОЮ**

**Резюме.** У статті відображені результати експерименту з дослідження впливу ксеногенної спинномозкової рідини (КСМР) на структуру опроміненого кісткового мозку щурів лінії Вістар. Аналіз порівняльних даних мієлограм показав виражену радіопротективну дію 3 і 10-кратних інфузій КСМР у опроміненних в дозі 5 Гр щурів.

**Ключові слова:** кістковий мозок, спинномозкова рідина, опромінення.

Проблема восстановления нормального кроветворения после радиационного воздействия техногенного или терапевтического генеза, остается критической, несмотря на присутствие на фармакологическом рынке гемостимуляторов и радиопротекторных средств [1, 2] Их происхождение и механизмы действия разнообразны, тем не менее, проблема остается достаточно острой, а разрешение ее – востребованным исследованием. Одним из рассматриваемых в качестве радиопротекторных средств является ксеногенная цереброспинальная жидкость (КЦСЖ). На сегодняшний день накоплен значительный экспериментальный опыт применения КЦСЖ с целью коррекции разнообразных патологических состояний [3-6]. В 2007 г. были показаны эффекты КЦСЖ на интактный костный мозг крыс [6]. Целенаправленного изучения влияния КЦСЖ на гипоплазированный костный мозг не проводилось.

**Цель исследования:** уточнить морфофункциональные характеристики гипоплазированного костного мозга при коррекции КЦСЖ в возрастном аспекте.

**Материал и методы.** Эксперимент проведен на 144 белых крысах линии Wistar обоих полов 4 возрастных категорий: новорожденные, неполовозрелые, молодые половозрелые и особи предстарческого возраста. Поражение костного мозга достигалась тотальным однократным гамма-облучением животных в дозе 5Гр на установке “Тератрон” на базе КРУ “ОКД”. В каждой возрастной группе после облучения 3-кратно или 10-кратно с интервалом в 2 дня вводили КЦСЖ, забор материала производили на 7-е, 14-е, 21-е и 30-е сутки. За референсные контрольные значения показателей костного мозга без радиооблучения, принимали данные, отраженные ранее в диссертационной работе [6], как части общей кафедральной научной темы “Онтогенетические особенности морфофункциональных характеристик и регенераторных потенций различных органов и систем при введении

КЦСЖ”. Использовали 2 группы контроля – облученных животных без вмешательства, и с введением физиологического раствора по схеме эксперимента. Отбор и подготовку КЦСЖ к введению производили по методу В.В. Ткача. Материалом для исследования морфофункциональных изменений гипоплазированного костного мозга в возрастном аспекте контрольной и опытной серий служили бедренные кости крыс. Мазки и отпечатки костного мозга окрашивали по Романовскому-Гимза, на каждом стекле подсчитывали 500 клеточных элементов, определяли количество клеток каждого вида и пересчитывали в процентное соотношение. Достоверными считали результаты при значении  $P < 0,05$ . При работе с животными придерживались биоэтических норм и правил.

**Результаты исследования и их обсуждение.** Для определения возможности использования КЦСЖ с целью коррекции миелоаблятивных состояний, а также оценки степени стимулирующего влияния КЦСЖ на клеточные линии, проводили тотальное однократное облучение крыс различных возрастных групп с последующим внутримышечным введением КЦСЖ.

Анализ данных миелограммы облученных животных 1 группы показал процессы восстановления клеточности всех ростков гемопоэза к 30 суткам после облучения. К этому сроку очевидно преобладающее влияние введенной КЦСЖ на лимфоидный росток, хотя остальные клеточные линии также испытывали стимулирующее влияние. Клеточность костного мозга к 30-му дню у облученных животных с коррекцией КЦСЖ превышала данные контрольных животных (без коррекции) на 58,25% в мегакариоцитарном ростке; в лимфоидном и эритроцитарном ростках клеточность увеличивалась на 52,56% и 51,45% соответственно. В гранулоцитарном ряду этот показатель увеличился на 34,52%. Среди бластных клеток наибольшее отличие данных опытной и контрольной групп наблюдали в

эритроидном и плазмочитарном ряду. Количество эритробластов в миелограмме животных после коррекции превышало данные контрольных животных в 2,01 раза, что позволяет ожидать, согласно кинетике их дифференцирования, резкое увеличение количества эритроцитов через 7 дней при условии их полноценного созревания. Также, показатель клеточности в плазмочитарном ростке вырос в 1,63 раза в сравнении с контролем. Сравнение данных контрольной и экспериментальной серий второй группы животных показало примерно равное общее количество клеток различных клеточных линий. В обеих сериях на 7 сутки наблюдали снижение количества лимфоцитов и abortивный подъем гранулоцитов, связанный с возобновлением пролиферации выживших после облучения стволовых клеток. К 7 суткам в мазках и отпечатках отмечали наличие гигантских нейтрофилов и двуядерных лимфоцитов. Поскольку в формуле миелограммы мегакарициты являются наиболее малочисленной группой, падение их количества после облучения, даже с последующей коррекцией, кажется критичным. Несмотря на это, тромбоциты, выявленные в мазках и отпечатках костного мозга, были без признаков патологии, поскольку представляли собой зрелые и, следовательно, радиорезистентные клетки.

Коррекция с помощью КЦСЖ привела к увеличению количества бластных клеток во всех линиях. Это свидетельствует об ускорении восстановления костного мозга после облучения в данной группе животных. На 7-е сутки отмечали накопление клеток эритроцитарного ряда за счет роста кривой содержания эритробластов. Коррекция КЦСЖ вызвала увеличение количества эритробластов в 2,94 раза в сравнении с данными в контроле. Количество монобластов у животных, получавших коррекцию, превышало те же показатели в контрольной серии на 14,66%. Число плазмобластов увеличилось в 2,06 раза, а миелобластов выросло до 2 клеток на 100 подсчитанных. В сравнении с другими сериями растет относительное количество монобластов в опыте и в контроле.

На 14-е сутки наблюдали снижение клеточности ростков костного мозга. Это не затронуло мегакариоцитарный и лимфоидный ростки. При сравнении данных контрольной и опытной групп обнаружили благотворное влияние коррекции КЦСЖ на количественные характеристики в пределах каждого дифферона. Общее число клеток красной крови превышало контрольное значение на 49,86%. Оживление пролиферации в 5,0 раз наблюдали в мегакариоцитарном ряду; Цитоз в моно- и лимфоцитарном рядах увеличился на 53,46% и 65,67%. Количество гранулоцитов по сравнению с 7-сутками эксперимента, уменьшено, но в экспериментальной серии их число превышает контрольное значение на 28,64%.

При анализе миелограммы по самым ранним идентифицируемым предшественникам, очевиден расцвет пролиферации бластных форм, однако за счет эритроидного ряда, бласты которого диминировали в предыдущих сериях с коррекцией КЦСЖ у животных после облучения. Цитоз клеток лимфоидного ряда

превышал контрольное значение на 94,11%. Количество моно- и плазмобластов увеличилось на 17,65% и 49,25% соответственно. На 29,41% выросло число мегакариобластов. Очевидно, не все бластные формы пройдут полноценное созревание; большая их часть в связи с накоплением в цитоплазме токсических веществ в результате пострадиационных метаболических изменений, приобретет уродливые формы и будет подвергнута апоптозу. Об этом свидетельствует тотальная цитопения в крови в сочетании с пролиферацией в костном мозге.

Почти вдвое цитоз увеличился в лимфоцитарном и мегакариоцитарном ряду на 21-е сутки после облучения во II возрастной группе, превышая контрольные значения у животных без коррекции в 2,19 и 2,20 раза. Минимальные изменения в абсолютных величинах при сравнении в пропорциональном отношении показывают увеличение количества бластов в ростках от 2,00 раз (для гранулоцитарного) до 3,34 раза (для лимфоцитарного ростка). При этом, количество бластов поле инфузий КЦСЖ значительно отличалось в положительную сторону, не превышая, однако, порог 5%, который считается признаком гемобластоза. В целом, картина влияния инфузий КЦСЖ на облученный костный мозг на 21 и 14 сутки выглядит сходной. На 30 сутки эксперимента количество гранулоцитов в контрольной группе снижено до критических величин. Введение КЦСЖ уменьшает тяжелые последствия облучения, что выражается в увеличении общей клеточности в каждом диффероне. В эритроидном ряду это преимущество достигает увеличения цитоза на 40,29%, в мегакариоцитарном – на 48,55%, моноцитарном – на 39,30%, лимфоцитарном – на 40,84%. Однако, наиболее резко количество клеток различается в гранулоцитарном ростке – их количество в экспериментальной группе превышает то же значение в контроле в 4,93 раза. К 30 суткам в миелограмме животных контрольной и экспериментальной серий среди бластных клеток наблюдали значительные различия. Показатель пролиферации миелобластов после коррекции КЦСЖ оказался выше в 1,83 раза в эритроидном ряду, в 2,5 раза – в гранулоцитарном, в 1,33 раза – в мегакариоцитарном ряду.

В III возрастной группе на 7-е сутки эксперимента количество гранулоцитов относительно других клеточных линий повышено за счет зрелых форм. Цитоз эритроидных в миелограмме подопытных животных превышал контрольное значение на 6,34%. Интересной находкой являлось обнаружение наличия большего количества бластов, переживших облучение в миелограммах контрольных животных 2 и 3 возрастной групп, что, вероятно, обусловлено более зрелыми адаптационными механизмами животных 3 группы. На 14-е сутки в III-й возрастной группе в эритроцитарном, моноцитарном и лимфоцитарном рядах общее количество клеток превышало контрольное значение на 23,98%, 17,67% и 56,73% соответственно. При сравнении миелограмм крыс контрольной и экспериментальной групп выявили начало пролиферации эритробластов, число которых превышало контрольное в

8,31 раза. Количество бластных форм также увеличилось на 40,96%, 50% и 77,27% в эритроцитарном, моноцитарном и плазмоцитарном ростках. Количество миело- и лимфобластов увеличивалось меньше – на 9,09% и 11,33% соответственно.

Картина костного мозга на 21-е и 30-е сутки эксперимента у животных 3-й группы напоминала таковую у животных 2 группы на тех же сроках эксперимента. На 21-й день после инфузий КЦСЖ цитоз увеличивался во всех ростках гемоцитопоза, причем более всего в эритроцитарном ростке – на 58,30%, в мегакариоцитарном – на 47,00%. Наблюдался рост числа гранулоцитов – их число после коррекции КЦСЖ превышало значение в контроле на 33,32%. К 30 суткам различия в значениях опытной и контрольной групп составляли 106,68% и 78,24% для эритроцитарного и мегакариоцитарного ростков; 31,72% и 15,98% для лимфоцитов и гранулоцитов. Очевидно, что эффект влияния КЦСЖ проявляется с максимума на 7-е сутки, постепенно снижаясь к 14, 21 и 30 суткам.

Динамика восстановления пролиферации бластов также была положительной во всех клеточных линиях. Наибольшие различия в значениях контрольной и опытной серий на 21-е сутки наблюдали среди эритробластов – их число в миелограмме было выше в 2,28 раза. Не настолько резкая разница была видима среди остальных бластов. Количество лимфобластов после коррекции на 21 сутки выше на 85,87%, на 30 сутки – на 27,32%.

Однако поскольку в дальнейшем такое обильное количество бластов не приводило к нормализации, или хотя бы приближению к нормальным значениям их в крови, становится очевидным их дифференцирование не в полном объеме.

В IV группе животных на 7-е сутки после облучения картина костного мозга напоминала миелограмму животных III группы. Абортивный подъем гранулоцитов у животных после коррекции был выше на 12,10%, остальные показатели отличались не столь значительно. Бластный состав, как и в предыдущей возрастной группе, был представлен значениями, близкими к нулю. К 14 дню эксперимента цитоз в костном мозге был выше у животных опытной группы во всех клеточных линиях, однако значения эти были статистически недостоверны. При этом, бластный состав костного мозга был представлен преимущественно эритро-, моно- и плазмобластами, число которых превышало контрольные значения в 2 раза, в 1,44 и 1,52 раза соответственно.

На 21-е сутки после облучения в IV-й группе животных картина костного мозга напоминала миелограмму животных III группы. Во всех ростках общий цитоз был немного выше после коррекции КЦСЖ. Клеточность в эритроидном ростке у экспериментальных животных была выше на 11,14%, в гранулоцитарном – на 5,32%, в мегакариоцитарном – на 44,67%, моно- и лимфоцитарном – на 11,57% и 11,26% соответственно.

В бластограмме, в отличие от более ранних сро-

ков наблюдения (7, 14-е сутки), когда пролиферировали моно- и плазмобласты, на 21-е сутки эксперимента в опытной группе после коррекции отмечали доминирование миело-, лимфо- и мегакариобластов на 39,76%, 21,31% и 66,0% соответственно, что являлось прогностически благоприятным фактором для выживания животных в пострadiaционном периоде.

На 30-е сутки в той же возрастной группе у животных после коррекции разница в цитозе с контрольными значениями была более всего заметна в эритроцитарном, гранулоцитарном и лимфоцитарном ростках, составляя 16,65%, 7,61% и 20,96% соответственно. Бластный состав превышал численность в контроле абсолютно во всех клеточных линиях, включая моно- и плазмоцитарный (на 14,0% и 14,16%), что отличало бластограмму на 30-е сутки от начала эксперимента от картины на 21-е сутки наблюдения.

**Выводы и перспективы дальнейших исследований.** Анализ данных позволил прийти к заключениям, важным с точки зрения прогнозирования последствий облучения и понимания реакции костного мозга на КЦСЖ. После ее введения облученным животным, различия в миелограмме наблюдали с 5-7-е суток, что свидетельствует о воздействии на самые ранние звенья гемоцитопоза: колониеобразующие единицы или стволовые клетки. КЦСЖ оказывала стимулирующий эффект на все ростки в разные сроки. Первым реагировал эритроидный росток, затем лимфо- и гранулоцитарный. Увеличение числа клеток плазмоцитарного ряда связывали с необходимостью присутствия макрофагов, элиминирующих неполноценные клетки, возникающие вследствие сбоя фаз клеточных циклов при облучении. Наблюдалась волнообразную пролиферацию бластных форм по конкурирующему типу, что, вероятно, связано с дефицитом энергетических ресурсов в костном мозге для полноценной пролиферации и дифференцировки клеток после облучения. Приоритетными направлениями восстановления клеточности крови после облучения являются: образование эритроцитов и лимфоцитов, а затем уже остальных клеток. В этой связи в эксперименте отмечали сохранение приоритетности пострadiaционного заселения костного мозга новыми клетками, однако с учетом фазности митотического цикла и различной кинетики развития клеточных популяций от бластов до зрелых форм и выхода в кровь. Данный фактор обусловил волнообразный характер клеточности дифферонов. Резистентность к облучению не увеличивается с возрастом, но КЦСЖ взрослого донора оказывает наилучшее стимулирующее действие на реципиентов зрелого возраста. Это можно связать с возраст-зависимой мембранной чувствительностью к веществам в составе КЦСЖ. Более высокий процент сохранности зрелых клеток после облучения позволяет предположить мембраностабилизирующий эффект КЦСЖ, предотвращающий гибель клеток вследствие пострadiaционных эффектов. Таким образом, КЦСЖ в качестве имеет положительное влияние на все стадии развития клеток – бластные, пролиферирующие и дифференцирующиеся.

## Список использованной литературы

1. Радиобиология / А.Д. Белов, В.А. Киришин, Н.П. Лысенко [и др.]. – М.: Колос, 1999. – 384 с. 2. Василенко О.И. Радиационная экология / О.И. Василенко. – М.: Медицина, 2004. – 216 с. 3. Ткач В.В. Нормальный химический состав и содержание некоторых биологически активных веществ в цереброспинальной жидкости крупного рогатого скота / В.В. Ткач, В.В. Ткач (мл.), В.В. Киселев // *Клн. анатом. та оператив. хірург.* – 2004. – № 3. – С. 61. 4. Бессалова Е.Ю. Морфофизиологические эффекты ксеногенной спинномозговой жидкости на репродуктивную систему самок полиэстричных млекопитающих / Е.Ю. Бессалова, В.В. Ткач, В.А. Королев // *Таврический мед.-биолог. вестн.* – 2006. – Т. 9, № 3. – Ч. 1. – С. 175-178. 5. Кривенцов М.А. Структурные изменения брыжеечных лимфатических узлов при парентеральном введении ксеногенной спинномозговой жидкости: Автореф. дис. ... канд.мед. наук: спец. 14.03.01 / М.А. Кривенцов. – Симферополь, 2009. – 21 с. 6. Шаймарданова Л.Р. Возрастные морфофункциональные изменения костного мозга под действием ксеногенной спинномозговой жидкости: Автореф. дис. ... канд.мед. наук: спец. 14.03.01 / Л.Р. Шаймарданова. – Симферополь, 2011. – 22 с.

**КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ КЛЕТОК КРАСНОГО КОСТНОГО МОЗГА КРЫС ПОСЛЕ ОБЛУЧЕНИЯ И КОРЕКЦИИ КСЕНОГЕННОЙ СПИНОМОЗГОВОЙ ЖИДКОСТЬЮ**

**Резюме.** В статье отражены результаты эксперимента по исследованию влияния ксеногенной цереброспинальной жидкости (КЦСЖ) на структуру облученного костного мозга крыс линии Вистар. Анализ сравнительных данных миелограмм показал выраженное радиопротективное действие 3 и 10-кратных инфузий КЦСЖ у облученных в дозе 5 Гр крыс.

**Ключевые слова:** костный мозг, цереброспинальная жидкость, облучение

**QUANTITATIVE CHANGES IN CELLULARITY OF THE RED BONE MARROW IN RATS AFTER IRRADIATION AND XENOGENIC CEREBROSPINAL FLUID CORRECTION**

**Abstract.** The article presents certain results of the experiment studying the influence of xenogenic cerebrospinal fluid (XCSF) on the structure of the irradiated bone marrow of Wistar rats. Pronounced radioprotective effect was proved by the analyses of comparative data of myelograms in rats exposed to total body radiation at 5 Gr and 3- and 10-times infusions of XCSF.

**Key words:** bone marrow, cerebrospinal fluid, radiation.

S.I. Georgievskiy Crimea State Medical University (Sympheropol)

Надійшла 22.06.2014 р.

Рецензент – проф. Гнатюк М.С. (Тернопіль)