

УДК 612.419+612.83:611-08

© В. С. Пикалюк, А. И. Абсеттарова, Л. Р. Шаймарданова, 2013

## ИЗМЕНЕНИЯ МИЕЛОГРАММЫ ЖИВОТНЫХ ПОСЛЕ ОБЛУЧЕНИЯ С ПОСЛЕДУЮЩЕЙ КОРРЕКЦИЕЙ КСЕНОГЕННОЙ ЦЕРЕБРОСПИНАЛЬНОЙ ЖИДКОСТЬЮ

В. С. Пикалюк, А. И. Абсеттарова, Л. Р. Шаймарданова

Кафедра нормальной анатомии человека (зав. – д. мед. н., проф. Пикалюк В. С.), ГУ «Крымский государственный медицинский университет им. С. И. Георгиевского». 95006 Украина, г. Симферополь, ул. А. Невского, 27 а. e-mail: doctor-alie@rambler.ru

### CHANGES OF ANIMALS MYELOGRAM AFTER AN IRRADIATION WITH A CONSEQUENT CORRECTION BY THE XENOGENIC CEREBROSPINAL FLUID

V. S. Picaluk, A. I. Absettarova, L. R. Shaimardanova

#### SUMMARY

The goal of the study was to examine the age-related morphological and functional indices of the aplastic bone marrow after the correction by the xenogenic cerebrospinal fluid (XCSF). After the injections of the XCSF to irradiated animals, the differences in the myelogram were observed from the 5th-7th day, that indicated its effect on the earliest stages of haemopoiesis. The priority directions of BM cellularity restoring were the red blood cells and lymphocytes, and then all the remaining. XCSF from the adult donor had the best stimulating effect on the third group of recipients (mature reproductive age). The adult rats on the 21-st day after the infusion of the XCSF the cellularity was increased more in erythroid line – by 58.30 %, and in megakaryocytes line – by 47.00 %, compared to the control group. The granulocytes number after correction with the XCSF was 33.32 % higher than the value in the control group. It appears that using of the XCSF as the correcting substance has a positive impact on all stages of maturing of the bone marrow cells – blasts, proliferating and differentiating cells. The obtained results will be used to develop a new biological drug on the base of the XCSF for preventing the severe outcomes after the radiation exposure, both of medical or accidental origin.

### ЗМІНИ МІЕЛОГРАМИ ТВАРИН ПІСЛЯ ОПРОМІНЮВАННЯ З ПОДАЛЬШОЮ КОРЕКЦІЄЮ КСЕНОГЕННОЮ ЦЕРЕБРОСПІНАЛЬНОЮ РІДИНОЮ

В. С. Пикалюк, А. И. Абсеттарова, Л. Р. Шаймарданова

#### РЕЗЮМЕ

Метою цього дослідження було вивчення вікових морфофункціональних показників аплазованного кісткового мозку при корекції ксеногенної цереброспінальної рідиною (КЦСР). Після введення КЦСР опроміненим тваринам, відмінності в мієлограмі почали спостерігати з 5–7 доби, що свідчить про її вплив на самі ранні ланки гемоцитопоеза. Першим реагував на КЦСР еритроїдний ріст, потім лімфо-і гранулоцитарний ріст. КЦСР дорослого донора надає найкращу стимулюючу дію на 3 групу реципієнтів (зрілий репродуктивний вік). У цих тварин на 21-у добу після інфузій КЦСР цитоз збільшувався у всіх ростках гемоцитопоеза, причому найбільше в еритроцитарному – на 58,30 %, в мегакаріоцитарному – на 47,00 %. Число гранулоцитів перевищувало значення в контролі на 33,32 %. Виявилось, що КЦСР в якості коректора має позитивний вплив на всі стадії розвитку клітин КМ – бластні, проліферуючі і диференціюючі. Отримані результати будуть використані для розробки нового біологічного препарату на основі КСМР щодо попередження тяжких наслідків радіаційного опромінення як медичного, так і випадкового походження.

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

Исследования по изучению свойств ксеногенной цереброспинальной жидкости (КЦСЖ), которая рассматривается как возможное сырье для производства нового иммунобиологического препарата проводятся *in vivo* в Крымском государственном медицинском университете им. С. И. Георгиевского на базе кафедры нормальной анатомии человека. Физиологическая активность цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) определяется наличием широкого спектра биологически активных веществ (1, 3). На сегодняшний день накоплен значительный экспериментальный опыт применения ЦСЖ с целью коррекции разнообразных патологических состояний, известен ряд фундаментальных работ по изучению биологических свойств ликвора представителями Крымской морфологической школы

(1, 3–6). Целью настоящего исследования являлось изучение возрастных морфофункциональных показателей аплазированной костного мозга при коррекции ксеногенной цереброспинальной жидкостью.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для эксперимента были отобраны белые крысы линии Вистар обоих полов 4 возрастных категорий: новорожденные, неполовозрелые (инфантильные), половозрелые (молодой репродуктивный возраст) и животные предстарческого возраста. Аплазия костного мозга достигалась тотальным однократным гамма-облучением животных в дозе 5 Гр на установке «Тератрон» на базе КРУ«ОКД». Цереброспинальную жидкость получали субокципитальной пункцией от лактирующих коров в стерильную полузакрытую систему по методу авторов [2], про-

водили через бактериальные фильтры «Миллипор» и запаивали в ампулы для хранения. КЦСЖ вводили однократно, трехкратно и десятикратно с интервалом в два дня из расчета 2 мл/кг массы животного. В контрольных и экспериментальных сериях на отпечатках и мазках костного мозга, окрашенных по Романовскому-Гимза, определяли миелограмму на 500 клеток, затем пересчитывали в процентном соотношении и проводили статистический анализ количественных параметров.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ данных миелограммы облученных новорожденных животных после коррекции КЦСЖ показал весьма слабое восстановление клеточности всех ростков гемопоэза даже к 30 суткам после облучения. К этому сроку эксперимента очевидно преобладающее влияние введенной КЦСЖ на лимфодный росток костного мозга, хотя остальные клеточные линии также испытывали стимулирующее влияние КЦСЖ. Клеточность костного мозга к 30 дню эксперимента 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%. Однако, среди бластных клеток наибольшее отличие данных опытной и контрольной групп наблюдали в эритроидном и плазмоцитарном 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. Показатель клеточности в плазмоцитарном ростке достоверно вырос в 1,63 раза в сравнении с контролем.

Сравнение данных контрольной и экспериментальной серий неполовозрелых животных показало примерно равное общее количество клеток различных клеточных линий. В обеих сериях на 7 сутки эксперимента наблюдали снижение количества лимфоцитов и abortивный подъем гранулоцитов, связанный с возобновлением пролиферации выживших после облучения стволовых клеток. К 7 суткам в мазках и отпечатках КМ отмечали наличие гигантских нейтрофилов и двуядерных лимфоцитов. Поскольку в формуле миелограммы мегакариоциты 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 клеточной патологии, поскольку представляли собой зрелые и, следовательно, радиорезистентные клетки. Коррекция с помощью КЦСЖ привела к увеличению количества бластных

клеток во всех клеточных линиях. Это свидетельствует об ускорении восстановления КМ после облучения в данной группе животных. На 7 сутки эксперимента 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 в КМ 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 выделяется возросшее относительное количество монобластов и в опытной и в контрольной сериях животных.

На 14 сутки эксперимента наблюдали снижение клеточности ростков костного мозга. Это, однако, не затронуло мегакариоцитарный и лимфоидный ростки. 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 достоверно увеличился на 53,46% и 65,67%, соответственно. Количество гранулоцитов в сравнении 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, бластные клетки которого доминировали 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 мегакариоцитов. Очевидно, не все бластные формы пройдут полноценное созревание; большая их часть в связи с накоплением в цитоплазме токсических веществ в результате пострadiационных метаболических изменений, приобретет уродливые формы и будет подвергнута апоптозу. Об этом свидетельствует тотальная цитопения в крови в сочетании с наличием пролиферации в КМ. Существенно (почти вдвое) цитоз увеличился в лимфоцитарном и мегакариоцитарном ряду на 21 сутки после облучения во группе неполовозрелых животных, превышая контрольные значения у животных без коррекции в 2,19 и 2,20 раз. Минимальные изменения в абсолютных величинах при сравнении в пропорциональном отношении показывают увеличение количества бластных клеток в ростках от 2,00 раз (для гранулоцитарного) до 3,34 раз (для лимфоцитарного роста). При этом, количество бластных клеток после 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 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 достоверно выше в 1,83 раза в эритроидном ряду, в 2,5 раза – в гранулоцитарном, в 1,33 раза – в мегакариоцитарном ряду.

В группе половозрелых животных на 7 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 %. При сравнении миелограмм крыс контрольной и экспериментальной групп выявили начало пролиферации эритробластов, число которых превышало контрольное в 8,31 раз. На 14 сутки в данной возрастной группе в эритроцитарном, моноцитарном и лимфоцитарном рядах общее количество клеток превышало контрольное значение на 23,98 %, 17,67 и 56,73 %, соответственно. Количество бластных форм также увеличивалось на 40,96 %, 50 % и 77,27 % в эритроцитарном, моноцитарном и плазмоцитарном ростках. Количество миело- и лимфобластов увеличивалось не так значительно – на 9,09 % и 11,33 %, соответственно. 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 с помощью КЦСЖ превышало значение в контроле на 33,32 %. К 30-м 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 сутки, постепенно снижаясь к 14, 21 и 30 суткам.

Динамика восстановления пролиферации бластных клеток также была положительной во всех клеточных линиях. Наибольшие различия в значениях контрольной и опытной серий на 21 сутки наблюдали среди эритробластов – у экспериментальных

животных их число в миелограмме было достоверно выше в 2,28 раз. Не настолько резкая разница 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 бластных клеток не приводило к нормализации, или хотя бы приближению к нормальным значениям их в крови, становится очевидным их дифференцирование не в полном объеме.

В группе животных предстарческого возраста на 7 сутки после облучения картина костного мозга напоминала миелограмму половозрелых животных. Abortивный 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-м суткам 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 сутки после облучения в данной группе животных во всех ростках общий цитоз был немного выше после коррекции КЦСЖ. Клеточность в эритроидном ростке у экспериментальных животных была достоверно 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 сроков наблюдения (7, 14 сутки), когда пролиферировали моно- и плазмобласты, на 21 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 пострадиационном периоде. На 30 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 сутки от начала эксперимента от картины на 21 сутки наблюдения.

Анализ экспериментальных данных позволил сделать некоторые заключения, важные с точки зрения прогнозирования последствий облучения и понимания реакции костного мозга на применение различных препаратов с целью коррекции таких состояний, в данном случае, использование КЦСЖ. По-

сле введения КЦСЖ облученным животным, различия в миелограмме стали наблюдать с 5–7 суток, что свидетельствует о ее воздействии на самые ранние звенья гемоцитопоэза, возможно, на колониеобразующие единицы, или же стволовые клетки. КЦСЖ оказывала стимулирующий эффект на все ростки гемоцитопоэза, однако, в различные сроки. Первым реагировал на КЦСЖ эритроидный росток, затем лимфо- и гранулоцитарный ростки.

Увеличение количества клеток плазмочитарного ряда связывали с необходимостью в присутствии большого числа макрофагов, элиминирующих неполноценные и уродливые клетки, возникающие вследствие сбоя фаз клеточных циклов после облучения. В ходе эксперимента наблюдали волнообразную пролиферацию бластных форм по конкурирующему типу, что, вероятно, связано с дефицитом энергетических ресурсов в костном мозге для полноценной непрерывной пролиферации и дифференцировки клеток КМ после облучения. Приоритетными направлениями восстановления клеточности крови после облучения являются: образование эритроцитов и лимфоцитов, а затем уже остальных клеток крови. В этой связи в эксперименте отмечали сохранение приоритетности пострадиационного заселения костного мозга новыми клетками, однако с учетом фазности митотического цикла и различной кинетики развития клеточных популяций от стадии бластов до зрелых клеток и выхода в кровь. Данный фактор и обусловил неправильный волнообразный характер восстановления клеточности дифферонов.

Как показывает анализ данных эксперимента, резистентность к облучению не увеличивается с возрастом, однако, КЦСЖ взрослого донора оказывает наилучшее стимулирующее действие на реципиентов зрелого репродуктивного возраста. Вероятно, это можно связать с возраст-зависимой мембранной чувствительностью к биологически активным веществам в составе КЦСЖ. Наиболее показательными данными были значения в бластограммах животных после коррекции. Увеличение их количества означало прогнозирование всплеска количества зрелых клеточных форм различных дифферонов, поскольку длительность их развития с точностью до часов уже достаточно хорошо известна. Более высокий процент сохранности зрелых клеток после облучения позволяет предположить мембраностабилизирующий эффект

воздействия КЦСЖ, предотвращающий гибель клеток вследствие токсических пострадиационных эффектов на клеточные мембраны.

#### ВЫВОДЫ

Таким образом, оказалось, что КЦСЖ в качестве корректора имеет положительное влияние на все стадии развития клеток КМ – бластные, пролиферирующие и дифференцирующиеся.

Полученные результаты будут использованы для разработки систем профилактических мероприятий по предупреждению последствий негативного влияния на организм человека комплекса вредных факторов окружающей среды радиационной природы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ликвор как гуморальная среда организма./В. С. Пикалюк, Е. Ю. Бессалова, В. В. Ткач, и др.//ИТ «Ариал».- Симферополь, 2010.- 192 с.
2. Патент на корисну модель № 65154, Україна. Спосіб отримання біологічного препарату ліквору/Пикалюк В. С., Ткач В. В., Бессалова Є. Ю., и др.//Зареєстровано в Державному реєстрі патентів України на корисні моделі 25.11.2011.
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//Клінічна анатомія та оперативна хірургія.- 2004.- № 3.- С. 61.
4. Ткач В. В. Определение тератогенных и эмбриотоксических свойств биопрепарата "Ликворин"/В. В. Ткач, А. В. Кубышкин, В. В. Ткач (мл.)/Проблемы, достижения и перспективы развития медико-биологических наук и практического здравоохранения: сб. тр. Крым. мед. ун-та. – Симферополь, 1998. – Т. 134. – С. 89–95.
5. Ткач В. В. (мл.). Влияние ксеногенной цереброспинальной жидкости на клеточный иммунитет в эксперименте/В. В. (Ткач мл.), В. В. Ткач, М. А. Кривенцов//Клінічна анатомія та оперативна хірургія.- 2006.- Т. 5, № 2.- С. 61–62
6. Ткач В. В. (мл.). Влияние ксеногенной цереброспинальной жидкости на реакции гуморального иммунитета/В. В. Ткач (мл.), В. В. Ткач, М. А. Кривенцов//Клінічна анатомія та оперативна хірургія.- 2006.-Т. 5, № 2.- С. 62.