

ОСОБЕННОСТИ ДИНАМИКИ СООТНОШЕНИЯ НЕЙТРОФИЛОВ К ЛИМФОЦИТАМ И КЛИНИКИ ИНТОКСИКАЦИИ У МЫШЕЙ НА ФОНЕ ОСТРОГО ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ЛЕТАЛЬНЫХ ДОЗ ЦИКЛОФОСФАНА

Кокая Г.Н.^{1,2}, Кокая А.А.¹, Щелчкова Н.А.³, Васильева Е.А.^{3,4}, Кузьмина Д.М.³, Мавренков Э.М.⁵, Мухина И.В.³

¹Общество с ограниченной ответственностью «Авиастанкосервис», Москва, e-mail: kann1812@yandex.ru;

²ФГБУ «НМИЦ имени В.А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург;

³ИФМ ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России, Нижний Новгород;

⁴Институт биологии и биомедицины ННГУ имени Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород;

⁵Главное военно-медицинское управление МО РФ, Москва

Цитотоксическое действие циклофосфана в дозах 500 и 750 мг/кг сопровождается значительным снижением массы тела у мышей, признаками алопеции, жидким стулом, снижением и отсутствием ориентировочно-исследовательских реакций, а также общей двигательной активности вплоть до потери позы. Гематологическое исследование выявило снижение содержания лейкоцитов в периферической крови у мышей более чем в 6-8 раз по сравнению с исходными значениями и контрольной группой. В мазках крови наблюдали бластные клетки всех ростков кроветворения. За первые 15 суток интоксикации развивающиеся функциональные и гематологические изменения приводили к высокой летальности, которая после введения циклофосфана в дозе 500 мг/кг составляла 50,0-83,3%, а после введения дозы 750 мг/кг – 90-100%. Неспецифические компенсаторные реакции организма на фоне острого токсического действия циклофосфана проявлялись сдвигом соотношения нейтрофилов к лимфоцитам в сторону нейтрофилов. Это приводило к увеличению значений индекса Кребса в 4-5 раз по сравнению с исходными, что способствовало сохранению жизни мышей в первые 3 суток интоксикации. За этот период летальность не превышала 17%. В свою очередь, снижение индекса Кребса до исходных значений на фоне выраженной лейкопении на 6-е сутки интоксикации соответствовало началу массовой гибели мышей. За этот период летальность достигала 40-50%. Увеличение индекса Кребса на 10-15-е сутки интоксикации на фоне увеличения лейкоцитов совпадало с периодом стабилизации в состоянии мышей. Таким образом, экспериментальную модель острого цитотоксического синдрома, вызванного циклофосфаном, можно использовать не только для углубленного изучения патогенетических механизмов цитотоксического действия экстремальных факторов внешней среды, сопровождающихся развитием костномозговой недостаточности, но и для изучения неспецифических компенсаторно-приспособительных реакций организма в ответ на такое воздействие.

Ключевые слова: экспериментальное моделирование, циклофосфан, летальные дозы, острая токсичность, лейкопения, соотношения нейтрофилов и лимфоцитов, костномозговая недостаточность.

DYNAMICS OF NEUTROPHIL TO LYMPHOCYTE RATIO AND INTOXICATION CLINIC IN MICE AGAINST THE BACKGROUND OF ACUTE TOXIC EFFECTS OF LETHAL DOSES OF CYCLOPHOSPHAN

Kokaya G.N.^{1,2}, Kokaya A.A.¹, Schelchkova N.A.³, Vasilyeva E.A.³, Kuzmina D.M.³, Mavrenkov E.M.⁴, Mukhina I.V.³

¹Aviastankoservis Limited Liability Company, Moscow, e-mail: kann1812@yandex.ru;

²V.A. Almazov Scientific Research Center, Ministry of Health of Russia, St. Petersburg;

³IFM, Volga Region Research Medical University, Ministry of Health of Russia, Nizhny Novgorod;

⁴Institute of Biology and Biomedicine, N.I. Lobachevsky NNSU, Nizhny Novgorod;

⁵Main Military Medical Administration of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Moscow

Cytotoxic effects of cyclophosphan in doses of 500 and 750 mg/kg were accompanied by a significant decrease in the weight of mice, signs of alopecia, liquid stool, reduction and absence of orientation and research reactions, as well as general motor activity, up to the loss of posture. Hematological study revealed a decrease in the content of leukocytes in the peripheral blood of mice by more than 6-8 times compared to baseline values and the control group, and in blood smears we observed blast cells of all hematopoiesis branches. During the first 15 days of intoxication, the developing functional and hematological changes led to high lethality, which after cyclophosphan administration at a dose of 500 mg/kg is 50.0-83.3%, and after administration of a dose of 750 mg/kg - 90-100%. Non-specific compensatory reactions of the organism against the background of acute toxic effects of

cyclophosphan were manifested by a shift in the ratio of neutrophils to lymphocytes towards neutrophils. This led to an increase in the Krebs index values by 4-5 times compared to the initial one, which contributed to keeping the mice alive for the first 3 days of intoxication. During this period, the lethality rate did not exceed 17%. In turn, a decrease in the Krebs index to the initial values against the background of pronounced leukopenia on the 6th day of intoxication corresponds to the beginning of mass death of mice. During this period the lethality rate reached 40-50%. The increase in the Krebs index on the 10th-15th day of intoxication against the background of leukocyte increase coincided with the period of stabilization in the state of mice. Thus, the experimental model of acute cytotoxic syndrome caused by cyclophosphan can be used not only for in-depth study of the pathogenetic mechanisms of cytotoxic effects of extreme environmental factors accompanied by the development of bone marrow failure, but also for the study of nonspecific compensatory-adaptive reactions of the body in response to such action.

Keywords: experimental modeling, cyclophosphan, lethal doses, acute toxicity, leukopenia, neutrophil to lymphocyte ratios, bone marrow failure.

В современной медицине большое внимание уделяется изучению цитотоксического действия различных факторов внешней среды химической, физической и бактериальной природы, которые могут приводить к грубым нарушениям системы кроветворения и непосредственному поражению костного мозга [1; 2]. Костномозговая недостаточность и тяжелые патологические состояния, с ней связанные, регистрируются во всех возрастных группах, имеют тяжелое течение и трудно поддаются коррекции [3].

Несмотря на разные механизмы повреждающего действия экзогенных факторов, приводящих к недостаточности костного мозга, в его основе лежат общие звенья патогенеза, приводящие к опустошению гемопоэтической ткани. Это происходит за счет интерфазной гибели клеток и нарушения митотической активности, что снижает образование форменных элементов, поскольку основной функциональной чертой гемопоэза является продукция огромного количества клеточных элементов в единицу времени [2; 4-6].

Для оценки тяжести течения интоксикации наряду с клинической картиной может быть информативен анализ лейкоцитарной формулы. Расчет лейкоцитарных индексов, по данным некоторых авторов, позволяет делать точные прогнозы в оценке тяжести течения заболевания [7]. Несмотря на то что индекс отношения нейтрофилов к лимфоцитам (индекс Кребса) не получил должного распространения в клинической практике, так как не отображает всех элементов лейкоцитарной формулы, по данным некоторых авторов, он объективно отображает степень интоксикации и может являться предиктором летальных исходов различных патологических состояний [8; 9]. Принимая во внимание выраженное цитотоксическое действие сублетальных и летальных доз циклофосфана, которое сопровождается общетоксическими проявлениями, развитием недостаточности костного мозга и высокой летальностью, данное исследование мы посвятили анализу особенностей клиники интоксикации и динамики соотношения нейтрофилов к лимфоцитам как индекса, отражающего соотношение клеток неспецифической и специфической защиты организма. Изучение неспецифических компенсаторно-приспособительных механизмов,

обеспечивающих выживаемость биообъекта в случае повреждающего действия факторов внешней среды, является одним из актуальных направлений современной патологической физиологии [8; 10; 11].

Цель исследования. Оценить динамику соотношения нейтрофилов к лимфоцитам и выявить особенности клиники интоксикации у мышей на фоне острого токсического действия летальных доз циклофосфана.

Материалы и методы исследования. Экспериментальные исследования *in vivo* выполнены в 2 этапа в центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВПО «ПИМУ» Минздрава России на 260 белых беспородных мышах-самцах ICR (CD-1), массой 27-29 г, полученных из питомника «Андреевка» (Московская обл.). Животных содержали в стандартных условиях вивария (температура воздуха 18–24 °С, относительная влажность воздуха 40–80%). Доступ животных к корму и воде не ограничивали (режим питания – *ad libitum*).

Эксперименты осуществляли в соответствии с принципами биоэтики и согласно требованиям нормативно-правовых документов о порядке проведения исследовательских работ с применением животных, которые отражены в руководстве «Guide for care and use of laboratory animals (ILAR publication, 1996, National Academy Press)»; межгосударственном стандарте ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами»; РД-АПК 3.10.07.02-09 «Методические рекомендации по содержанию лабораторных животных в вивариях научно-исследовательских институтов и учебных заведениях». Указанные правила и требования согласованы с этическим комитетом при ФГБОУ ВПО «ПИМУ» Минздрава России.

Перед проведением эксперимента животные проходили карантин в течение 14 суток, после которого мышей распределяли на группы методом рандомизации с исключением из эксперимента больных и ослабленных животных. Общее количество объектов исследования и распределение их по группам представлено в таблице 1.

Таблица 1

Общее количество объектов исследования и распределение их по группам

Этап	Группы	Доза ЦФ (мг/кг)	Экспериментальная модель	Проводимые исследования
I	Контрольная 1 (n=20)	-	Внутрибрюшинное введение 0,9% раствора NaCl	1. Оценка общей и посуточной летальности. 2. Оценка общего функционального состояния мышей на фоне интоксикации
	Опытная 1.1 (n=20)	500	Внутрибрюшинное введение 5% рабочего раствора ЦФ (50 мг/мл)	
	Опытная 1.2 (n=20)	750	Внутрибрюшинное введение 7,5% рабочего раствора ЦФ (75 мг/мл)	

II	Контрольная 2 (n=20)	-	Внутрибрюшинное введение 0,9% раствора NaCl	1. Оценка общей и посуточной летальности. 2. Забор крови для гематологического исследования на 3, 6, 10, 15-е сутки интоксикации у выживших мышей (n=6)
	Опытная 2.1 (n=90)	500	Внутрибрюшинное введение 5% рабочего раствора ЦФ (50 мг/мл)	
	Опытная 2.2 (n=90)	750	Внутрибрюшинное введение 7,5% рабочего раствора ЦФ (75 мг/мл)	

Примечание: ЦФ – циклофосфан.

Острый цитотоксический синдром моделировали всем животным в опытных группах путём однократного внутрибрюшинного введения рабочего раствора циклофосфана: в опытных группах 1.1 и 2.1 циклофосфан вводили в дозе 500 мг/кг массы тела, а в опытных группах 2.1 и 2.2 – в дозе 750 мг/кг массы тела. Рабочие растворы циклофосфана нужной концентрации готовили extempore (5% раствор циклофосфана – 50 мг/мл, 7,5% – 75 мг/мл) и вводили внутрибрюшинно из расчёта 0,1 мл на 10 г массы тела мыши. Животным в 1-й и 2-й контрольных группах осуществляли внутрибрюшинное введение 0,9% раствора NaCl из расчёта 0,1 мл на 10 г массы тела мыши.

Продолжительность наблюдения за животными составила 15 суток. На первом этапе исследования оценивали общую и посуточную летальность, среднюю продолжительность жизни (СПЖ) на фоне интоксикации и динамику изменения коэффициента массы тела ($k_m = 1 - m_0/m_x$). Общее функциональное состояние мышей на фоне интоксикации циклофосфаном оценивали в баллах согласно ранее разработанной методике по 8 параметрам, которые описывали состояние шерстяного покрова, ориентировочно-исследовательские реакции и общую двигательную активность. Показатели общего функционального состояния мышей в экспериментальных группах представляли как среднее значение (M) \pm стандартная ошибка среднего (m_x) [12].

На 2-м этапе исследования помимо оценки летальности и общего функционального состояния у выживших мышей на 3, 6, 10 и 15-е сутки интоксикации циклофосфаном после декапитации проводили забор крови в пробирки с антикоагулянтом К3 EDTA для гематологического исследования и подсчета лейкоцитарной формулы. Мазки крови (по три на каждую особь) были фиксированы по Май-Грюнвальду с последующей окраской по Романовскому-Гимза («Арбис», Россия). Подсчет лейкоцитов проведен из расчёта на 100 клеток, с использованием светооптического микроскопа Leica CME, при увеличении $\times 1000$ с масляной иммерсией. Индекс соотношения нейтрофилов к лимфоцитам (индекс Кребса) рассчитывали как отношение всей суммы процентного содержания нейтрофилов (НФ) к такому же количеству лимфоцитов (ЛЦ) ($ИК = НФ (\%) / ЛЦ (\%)$).

Статистическая обработка данных. Результаты представлены как среднее (M) \pm стандартная ошибка среднего (m_x). Ошибку средней величины частоты встречаемости

признаков (в процентах) с доверительным интервалом для вероятности 95% вычисляли с применением программных пакетов Statistica 10 и MS-Excel. Достоверность различий между экспериментальными группами определяли с применением критерия Стьюдента, критерия Фишера и не параметрического U-критерия Манна - Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. На первом этапе исследования на основании отрицательной динамики коэффициента массы тела, общего функционального состояния мышей и высокой летальности было установлено, что циклофосфан в дозах 500 и 750 мг/кг оказывает выраженное цитотоксическое действие на мышей.

В 1-й контрольной группе динамика массы тела у мышей была положительная и с 6-х суток наблюдения отмечали прирост K_m , который на 15-е сутки наблюдения составил $0,173 \pm 0,014$, что статистически значимо отличалось при сравнении с исходным значением ($p=0,003$). Напротив, после введения циклофосфана в дозе 500 и 750 мг/кг в опытных группах 1.1 и 1.2 наблюдали значительное снижение K_m у мышей, который имел отрицательную динамику и на 15-е сутки интоксикации составил $(-0,348 \pm 0,08)$ и $(-0,984 \pm 0,053)$ соответственно. Начиная с 3-х суток показатели K_m у мышей в опытных группах 1.1 и 1.2 носили статистически значимые отличия при сравнении с 1-й контрольной группой и исходными значениями ($p_{1,2}=0,000$), что соответствует предыдущим исследованиям авторов при моделировании острого цитотоксического синдрома [12].

Острое токсическое действие циклофосфана в дозах 500 и 750 мг/кг сопровождалось значительной отрицательной динамикой общего функционального состояния мышей. В опытных группах 1.1 и 1.2 у мышей наблюдали грязный, тусклый цвет шерсти, признаки алопеции, снижение или полное отсутствие ориентировочно-исследовательских реакций и общей двигательной активности вплоть до потери позы. Начиная с 6-х суток интоксикации циклофосфаном и в течение всего периода наблюдения средние показатели общего функционального состояния мышей в опытных группах 1.1 и 1.2 носили статистически значимые различия с 1-й контрольной группой и исходным состоянием ($p_{1,2}=0,000$) (табл. 2).

Таблица 2

Оценка общего функционального состояния мышей на фоне острого цитотоксического синдрома ($M \pm m$)

Группа	Доза в-ва (мг/кг)	Общее функциональное состояние (баллы)				
		0 сут.	3 сут.	6 сут.	10 сут.	14 сут.
Контроль 1	-	$8,0 \pm 0,0$	$8,0 \pm 0,0$	$8,0 \pm 0,0$	$8,0 \pm 0,0$	$8,0 \pm 0,0$
Опыт 1.1	500	$8,0 \pm 0,0$	$6,8 \pm 0,2$	$5,2 \pm 0,2^{*#}$ ($p_{1,2}=0,000$)	$5,7 \pm 0,2^{*#}$ ($p_{1,2}=0,000$)	$5,9 \pm 0,2^{*#}$ ($p_{1,2}=0,000$)
Опыт 1.2	750	$8,0 \pm 0,0$	$6,3 \pm 0,2$	$4,1 \pm 0,2^{*#}$ ($p_{1,2}=0,000$)	$3,6 \pm 0,0^{*#}$ ($p_{1,2}=0,000$)	- ^{&}

Примечание: * - $p_1 < 0,01$ - различия статистически значимы при сравнении с группой контроля, критерий Стьюдента; # - $p_2 < 0,01$ - различия статистически значимы при сравнении с исходным значением, критерий Стьюдента; & - число животных в группе меньше статистически значимого числа ($n < 4$).

Клиническая картина интоксикации и общее функциональное состояние мышей на 2-м этапе исследования не отличалась от результатов, полученных на 1-м этапе, а острое цитотоксическое действие циклофосфана сопровождалось высокой летальностью. Общую и посуточную летальность оценивали на 1-м и 2-м этапах исследования, так как при проведении экспериментов в разное время года в случае использования дозы токсиканта, близкой к DL_{50} , возможны колебания показателя летальности, что не наблюдается при токсическом действии более высоких доз [12] (рис. 1).

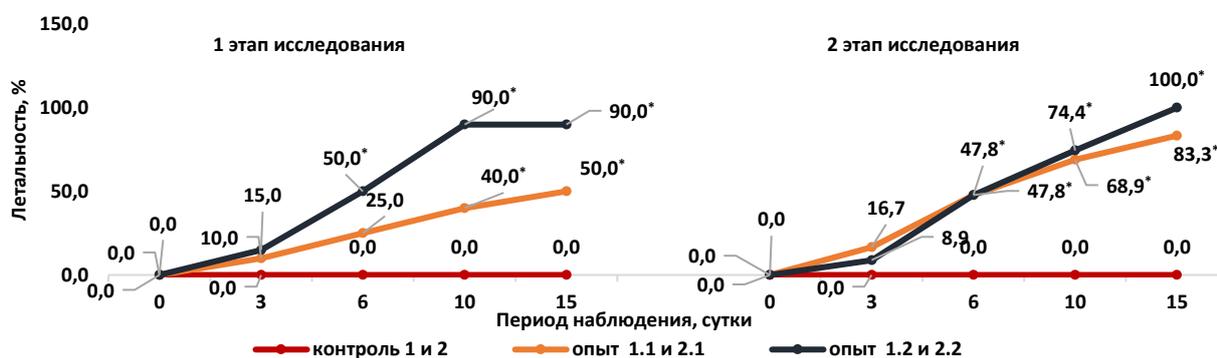


Рис. 1. Посуточная летальность мышей на фоне острого цитотоксического синдрома, вызванного циклофосфаном

Примечание. Контроль 1 и 2 – однократное внутрибрюшинное введение 0,9% раствора NaCl из расчета 0,1 мл на 10 г массы тела мыши. Опыт 1.1 и 2.1 - однократное внутрибрюшинное введение циклофосфана в дозе 500 мг/кг на 1 и 2 этапах исследования. Опыт 1.2 и 2.2 – однократное внутрибрюшинное введение циклофосфана в дозе 750 мг/кг на 1 и 2 этапах исследования. * - статистически значимые различия по сравнению с 1 и 2 контрольными группами, $p < 0,05$ (критерий Фишера).

Первую гибель мышей наблюдали в первые трое суток интоксикации. За этот период не было установлено различий в показателях летальности в опытных группах на 1-м и 2-м этапах исследования. Массовую гибель мышей отмечали с 6-х суток интоксикации: на 1-м этапе исследования в опытной группе 1.1 летальность не превышала 25%, а в опытной группе 1.2 составила 50%; на 2-м этапе в опытных группах 2.1 и 2.2. летальность составила 47,8%. После введения циклофосфана в дозе 500 мг/кг на 10-е и 15-е сутки интоксикации в опытной группе 1.1 летальность составила 40% и 50%, в то время как в опытной группе 2.1 на те же сутки достигала 68,9% и 83,3%. После введения циклофосфана в дозе 750 мг/кг в опытной группе 1.2 на 10-е и 15-е сутки интоксикации летальность достигла 90%, а в опытной группе 2.2 была 74,4% и 100%. Несмотря на разную динамику посуточной летальности на 1-м и 2-м этапах исследования, в первые сутки интоксикации статистически значимых различий между опытными группами установлено не было ($p > 0,05$), при этом начиная с 6-х суток в опытных

группах отмечали статистически значимые различия показателя летальности при сравнении с контрольными группами ($p=0,01$) (рис. 1).

На 2-м этапе экспериментального исследования после введения циклофосфана в дозах 500 и 750 мг/кг в ходе гематологического анализа периферической крови были выявлены значительные изменения содержания форменных элементов у мышей, особенно лейкоцитов. Исходное содержание лейкоцитов в периферической крови у мышей в контрольной и опытных группах было в пределах физиологической нормы, различий между группами установлено не было ($p>0,05$). За период наблюдения содержание лейкоцитов в периферической крови у мышей во 2-й контрольной группе не претерпевало значимых изменений, а анализ лейкоцитарной формулы не выявил отклонений от нормы (рис. 2).

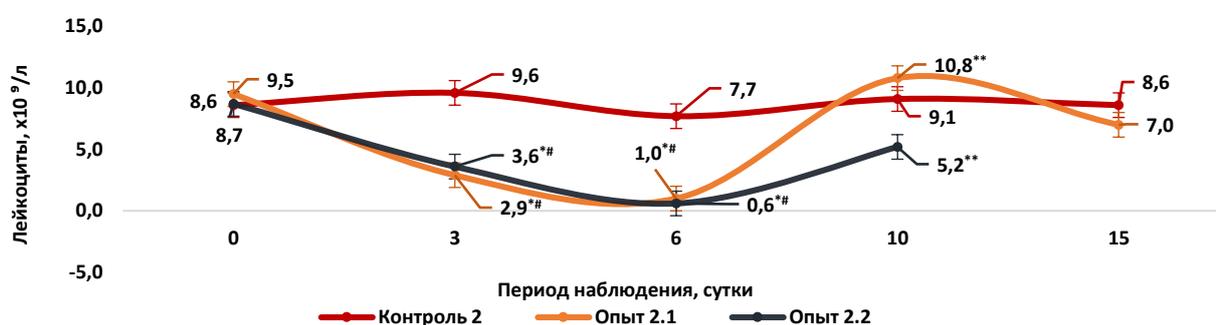


Рис. 2. Динамика изменения лейкоцитов у мышей в периферической крови на фоне острого цитотоксического синдрома, вызванного циклофосфаном

Примечание. Контроль 2 – однократное внутрибрюшинное введение 0,9% раствора NaCl из расчета 0,1 мл на 10 г массы тела мыши. Опыт 2.1 - однократное внутрибрюшинное введение циклофосфана в дозе 500 мг/кг. Опыт 2.2 – однократное внутрибрюшинное введение циклофосфана в дозе 750 мг/кг. * - статистически значимые различия по сравнению с контрольной группой, $p_1 < 0,05$; # - статистически значимые различия по сравнению с исходным значением, $p_2 < 0,05$; ** - статистически значимые различия по сравнению с содержанием лейкоцитов на 6-е сутки интоксикации в опытных группах, $p_3 < 0,05$ (критерий Манна - Уитни).

Напротив, в периферической крови у мышей в опытных группах 2.1 и 2.2 на фоне действия циклофосфана на 3-и сутки интоксикации наблюдали выраженную лейкопению – общее содержание лейкоцитов было в 3 раза меньше, чем исходное значение и во 2-й контрольной группе, а на 6-е сутки лейкоциты не подлежали подсчету гематологическим анализатором (рис. 2). В этот период к лейкопении присоединилась тромбоцитопения. Значения лейкоцитов в опытных группах 2.1 и 2.2 на 3-и и 6-е сутки интоксикации носили статистически значимые отличия по сравнению с исходными значениями и показателями во 2-й контрольной группе ($p_{1,2}=0,01$). Однако следует отметить, что на 10-е и 15-е сутки интоксикации у выживших мышей в опытных группах 2.1 и 2.2 в периферической крови наблюдали статистически значимое ($p_3=0,01$) увеличение содержания общего количества лейкоцитов по сравнению с значениями на 6-е сутки интоксикации. Увеличение общего количества лейкоцитов было обусловлено значительным выбросом сегментоядерных

нейтрофилов, а также появлением юных и морфологически незрелых форм, об этом свидетельствует анализ лейкоцитарной формулы (рис. 2, 3).

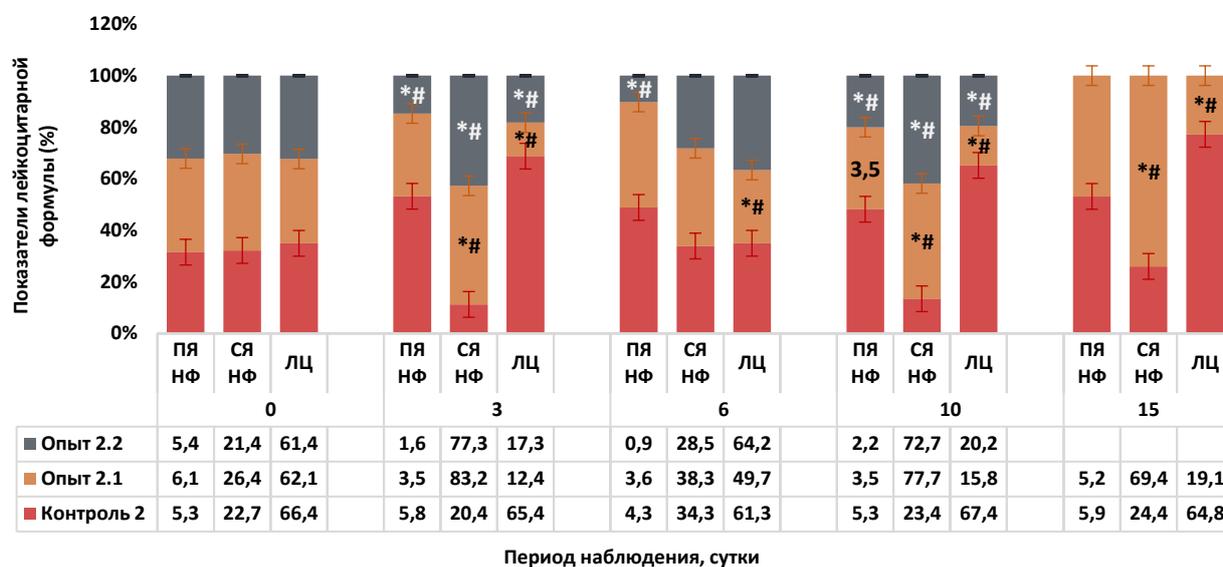


Рис. 3. Основные показатели лейкоцитарной формулы периферической крови у мышей на фоне острого цитотоксического синдрома, вызванного циклофосфаном

Примечание. ПЯ НФ - палочкоядерный нейтрофил; СЯ НФ - сегментоядерный нейтрофил; ЛЦ - лимфоцит. Контроль 2 – однократное внутрибрюшинное введение 0,9% раствора NaCl из расчета 0,1 мл на 10 г массы тела мыши. Опыт 2.1 - однократное внутрибрюшинное введение циклофосфана в дозе 500 мг/кг. Опыт 2.2 – однократное внутрибрюшинное введение циклофосфана в дозе 750 мг/кг. * - статистически значимые различия по сравнению с контрольной группой, $p_1 < 0,05$; # - статистически значимые различия по сравнению с исходным значением, $p_2 < 0,05$ (критерий Манна - Уитни).

Начиная с 3-х суток интоксикации циклофосфаном и весь период наблюдения в опытных группах 2.1 и 2.2 отмечали лимфоцитопению, при этом содержание лимфоцитов в периферической крови носило статистически значимые различия при сравнении с исходными значениями и 2-й контрольной группой ($p_{1,2}=0,03$) (рис. 3). Наряду с этим на 3, 10 и 15-е сутки интоксикации циклофосфаном у мышей опытных групп 2.1 и 2.2 в периферической крови отмечали статистически значимое увеличение содержания сегментоядерных нейтрофилов ($p_{1,2}=0,01$). Следует отметить, что в мазках периферической крови были отмечены незрелые формы всех ростков кроветворения: эритроциты с базофильной, оксифильной и полихроматофильной окраской, метамиелоциты, миелоциты, промиелоциты, бластные клетки и пролимфоциты, а также промегакариоциты и мегакариоциты.

На фоне острого токсического действия циклофосфана динамика соотношения сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов (индекс Кребса) носила ярко выраженный характер, и в некоторых случаях содержание нейтрофилов в 6-8 раз превышало содержание лимфоцитов, что свидетельствует о выбросе в периферический кровоток клеток быстрого

иммунного реагирования – нейтрофилов, на фоне гибели и медленного восстановления клеток более совершенного иммунного ответа – лимфоцитов (рис. 4).

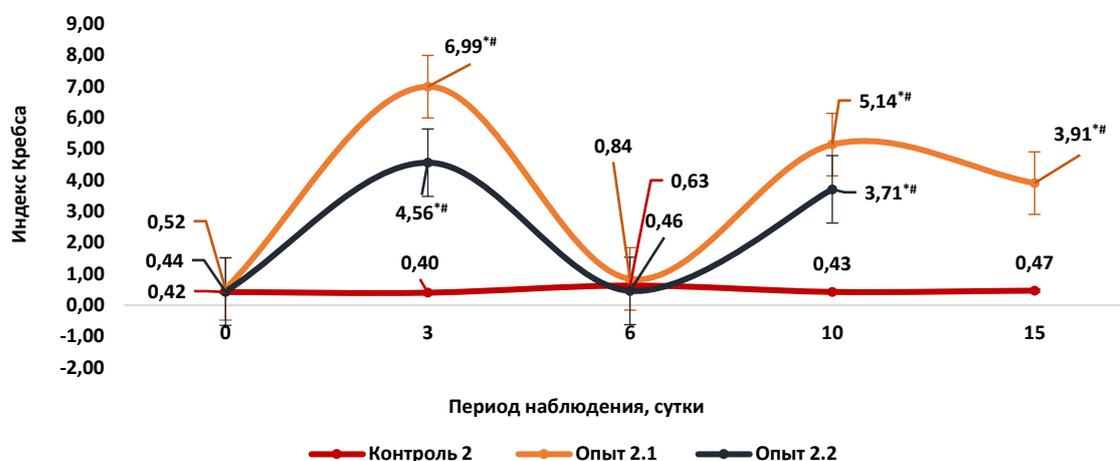


Рис. 4. Динамика индекса Кребса у мышей на фоне острого цитотоксического синдрома, вызванного циклофосфаном

Примечание. Контроль 2 – однократное внутрибрюшинное введение 0,9% раствора NaCl из расчета 0,1 мл на 10 г массы тела мыши. Опыт 2.1 - однократное внутрибрюшинное введение циклофосфана в дозе 500 мг/кг. Опыт 2.2 – однократное внутрибрюшинное введение циклофосфана в дозе 750 мг/кг. * - статистически значимые различия по сравнению с контрольной группой, $p_1 < 0,05$; # - статистически значимые различия по сравнению с исходным значением, $p_2 < 0,05$ (критерий Манна - Уитни).

В течение всего периода наблюдения за животными индекс Кребса у мышей во 2-й контрольной группе не претерпевал значительных изменений и был в диапазоне [0,42-0,47]. Напротив, в опытных группах 2.1 и 2.2 динамика ИК носила волнообразный характер. На 3-и сутки интоксикации отмечали значительное увеличение ИК в опытных группах 2.1 и 2.2, а на 6-е сутки на фоне максимального снижения лейкоцитов в периферической крови у мышей ИК приближался к исходным значениям. На 10-е сутки интоксикации вновь отмечен подъем значений ИК, а незначительное снижение этого показателя отмечали на 15-е сутки у мышей после введения циклофосфана в дозе 500 мг/кг. На 3, 10 и 15-е сутки интоксикации значения ИК в опытных группах 2.1 и 2.2. носили статистически значимые различия по сравнению с исходными значениями и 2-й контрольной группой ($p_{1,2}=0,01$) (рис. 4).

Полагаем, что динамика ИК демонстрирует соотношение неспецифической и специфической защиты организма на фоне острого цитотоксического действия циклофосфана. Подъем ИК на 3-и сутки интоксикации соответствует неспецифической реакции костного мозга, как результат действия гормонов стресса в ответ на массивный распад клеточных элементов. В результате этого происходит значительный выброс в периферический кровоток нейтрофилов, как клеток неспецифического иммунного ответа, при этом снижается

содержание клеток более совершенного, специфического иммунного ответа – лимфоцитов, за счет их гибели и медленного восстановления. На 6-е сутки интоксикации, когда распад лейкоцитов достигает своего максимального значения, ИК снижается до исходных значений за счёт массовой гибели нейтрофилов, поступивших в кровотоки. На 10-е сутки интоксикации у выживших животных вновь активируются неспецифические компенсаторно-приспособительные механизмы, и в периферический кровоток в большом количестве выбрасываются НФ, как клетки неспецифической иммунной защиты, о чем свидетельствует увеличение ИК и общее содержание лейкоцитов в периферической крови. При этом в периферической крови остаётся низким содержание клеток специфической иммунной защиты – лимфоцитов (рис. 2-4).

Следует отметить, что у мышей в опытной группе 2.1 ИК был в 1,5 раза выше, чем у мышей в опытной группе 2.2 (рис. 4). Возможно, это связано с тем, что на фоне действия летальных доз циклофосфана 750 мг/кг наблюдается более выраженный распад клеточных элементов, поступающих из костного мозга, а также угнетение их продукции, что в меньшей степени проявляется при использовании циклофосфана в дозе 500 мг/кг. Таким образом, соотношение общего содержания лейкоцитов, индекса Кребса, общего функционального состояния и посуточной летальности у мышей после введения циклофосфана в дозе 500 мг/кг в опытной группе 2.1 позволяет наглядно проследить реализацию неспецифических компенсаторных реакций у мышей с острым цитотоксическим синдромом (рис. 5).

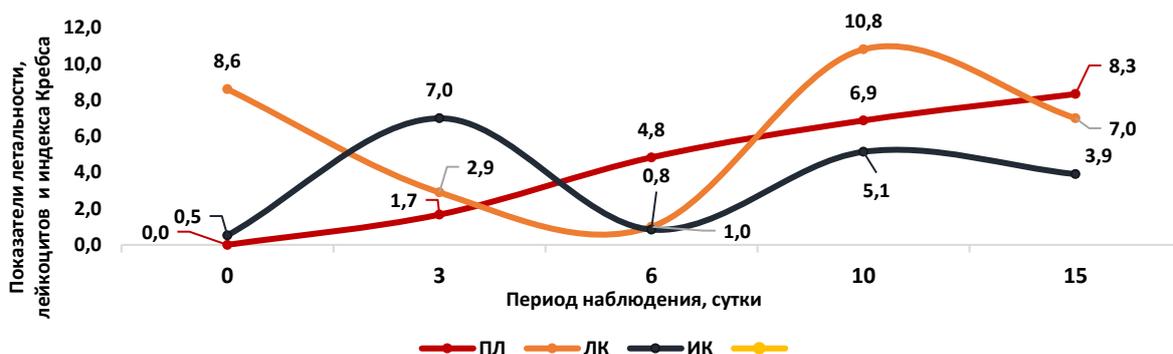


Рис. 5. Соотношение летальности, общего содержания лейкоцитов и индекса Кребса у мышей на фоне острого токсического действия циклофосфана в дозе 500 мг/кг

Примечание. ПЛ - показатель летальности: летальность (%) * 10⁻¹; ЛК – содержание лейкоцитов, *10⁹/л; ИК – индекс Кребса: отношение всей суммы процентного содержания нейтрофилов к такому же количеству лимфоцитов.

На основании динамики показателей, представленных на рисунке 5, полагаем, что на фоне действия сублетальных доз циклофосфана развивается цитотоксический синдром, который приводит к снижению уровня лейкоцитов в периферической крови. В ответ на распад

форменных элементов реализуются неспецифические компенсаторные реакции, в том числе с участием гормонов стресса, которые способствуют выбросу в периферический кровоток неспецифических клеток иммунной защиты. В результате этого соотношение нейтрофилов и лимфоцитов меняется в сторону нейтрофилов, что приводит к увеличению значения ИК. На фоне реализации данной неспецифической компенсаторной реакции летальность у мышей в первые 3 суток интоксикации не превышает 17%. На 6-е сутки интоксикации, на фоне продолжающегося цитотоксического действия циклофосфана, происходит значительный распад клеточных элементов, которые поступили в кровоток. У мышей в опытных группах это проявляется отрицательной динамикой общего функционального состояния, максимальным снижением количества лейкоцитов в периферической крови, относительным выравниванием соотношения НФ к ЛЦ и снижением ИК, что приводит к массовой гибели животных, и летальность может достигать 47,8%. На 10-е сутки интоксикации у выживших мышей при успешной реализации второй волны неспецифических компенсаторных механизмов увеличивается общее содержание лейкоцитов в периферической крови за счет выброса в кровоток клеток неспецифической иммунной защиты нейтрофилов, что снова меняет соотношение НФ к ЛЦ, увеличивается ИК. В результате этого при успешной реализации компенсаторных механизмов летальность не превышает 50%, а при менее успешной достигает 83,3%.

Таким образом, в результате реализации компенсаторно-приспособительных механизмов в ответ на токсическое действие циклофосфана после введения его в дозе 500 мг/кг, у выживших мышей начиная с 15-х суток интоксикации наблюдали стабилизацию состояния. Несмотря на содержание в периферическом кровотоке морфологически незрелых и изменённых клеток крови, это обеспечивало выживаемость мышей и снижало высокий риск развития поздних осложнений острого цитотоксического синдрома – инфекционного и органического поражения центральной нервной системы.

Выводы. Однократное внутрибрюшинное введение циклофосфана в дозах 500 и 750 мг/кг приводит к развитию острого цитотоксического синдрома. Он сопровождается отрицательной динамикой общего функционального состояния мышей и развитием лейкопении, с содержанием в периферической крови бластных клеток всех ростков кроветворения. За первые 15 суток интоксикации развивающиеся функциональные и гематологические изменения приводят к высокой летальности, которая после введения циклофосфана в дозе 500 мг/кг составляет 50,0-83,3%, а после введения дозы 750 мг/кг – 90-100%.

Неспецифические компенсаторные реакции организма на фоне острого токсического действия циклофосфана проявляются сдвигом соотношения нейтрофилов к лимфоцитам в

сторону нейтрофилов. Это выражается увеличением значения индекса Кребса и способствует сохранению жизни мышей. В свою очередь, снижение индекса Кребса до исходных значений на фоне выраженной лейкопении соответствует началу массовой гибели мышей.

Список литературы

1. Владимирская Е.Б. Нормальное кроветворение и его регуляция // Клиническая онкогематология. 2015. № 2. С. 109-119.
2. Дыгай А.М., Жданов В.В. Теория регуляции кроветворения в норме и при патологии // Бюллетень СО РАМН. 2012. № 1. С. 21-30.
3. Тимченко А.С., Залесский В.Н. Регуляторное влияние воспаления на костномозговое кроветворение: геронтологические и онкологические аспекты // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. 2019. № 2. С. 237-248.
4. Никифоров А.С., Иванов И.М., Свентицкая А.М., Гребенюк А.Н. Моделирование острого лучевого костномозгового синдрома в эксперименте на мышах // Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях. 2017. № 4. С. 66-71.
5. Ивницкий Ю.Ю., Шефер Т.В., Тяптин А.А., Рейнюк В.Л. Изменения химического состава крови и головного мозга крыс при моделировании миелоабляционного режима применения циклофосфана // Токсикологический вестник. 2019. № 3. С. 14-18.
6. Кокая Г.Н., Кокая А.А., Козяков В. П., Завирский А.В., Зацепин В.В., Башарин В.А., Цыган В.Н., Мавренков Э.М. Экспериментальная оценка радиомодифицирующей эффективности низкоинтенсивного электромагнитного излучения при остром рентгеновском облучении мышей // Вестник Российской Военно-Медицинской Академии. 2021. № 2. С. 131-138.
7. Банзакшеева В.Г. Лейкоцитарные индексы как способ оценки эндогенной интоксикации организма // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2010. № 3. С. 390-391.
8. Панкратова Ю.С., Карпухин О.Ю. Индекс отношения нейтрофилов к лимфоцитам как показатель тяжести воспалительных осложнений // Поволжский онкологический вестник. 2022. Т. 13. № 2. С. 21-27.
9. Бохчоян М.Р., Космачева Е.Д., Славинский А.А. Индекс соотношения нейтрофилов к лимфоцитам как предиктор неблагоприятного прогноза у пациентов с сердечной недостаточностью некоронарогенной этиологии // Клиническая практика. 2017. № 3. С. 48-53.
10. Дыгай А.М., Жданов В.В., Мирошниченко Л.А., Удут Е.В., Зюзьков Г.Н., Симанина Е.В., Чайковский А. В., Ставрова Л.А., Трофимова Е.С., Бурмина Я.В. Участие

сигнальных каскадов в регуляции эритропоэза при цитостатическом воздействии // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2014. Т. 158. № 9. С. 282-286.

11. Жданов В.В., Мирошниченко Л.А., Зюзьков Г.Н., Хричкова Т.Ю., Удут Е.В., Симанина Е.В., Шерстобоев Е.Ю., Ставрова Л.А., Агафонов В.И., Данилец М.Г., Трофимова Е.С., Минакова М.Ю., Дыгай А.М. Роль внутриклеточных сигнальных молекул в продукции гранулоцитарного КСФ мононуклеарными фагоцитами при стрессе и цитостатическом воздействии // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2021. Т. 171, № 4. С. 413-417. DOI: 10.47056/0365-9615-2021-171-4-413-417.

12. Кокая Г.Н., Кокая А.А., Щелчкова Н.А., Кузьмина Д.М., Зацепин В.В., Мухина И.В. Экспериментальная оценка острого цитотоксического действия циклофосфана // Естественные и технические науки. 2023. № 3. С. 113-123.