

УДК: 612.017.11: 612.014.482.4

Влияние экстракта куриных эмбрионов на состояние нейтрофилов периферической крови мышей после однократного тотального γ -облучения

М.С.Погорелая^{1,2}, Г.Ф.Жегунов¹, О.Н.Щербак²

¹Харьковская зооветеринарная академия (Харьков, Украина)

²ГУ «Институт микробиологии и иммунологии имени И.И.Мечникова НАМН Украины» (Харьков, Украина)

marionimmun@gmail.com

В эксперименте *in vivo* на самках белых лабораторных мышей, которые были подвергнуты однократному тотальному γ -облучению в дозе 5 Гр, было исследовано действие серии внутримышечных введений экстракта из эмбрионов кур на количественные характеристики и функциональное состояние нейтрофильных лейкоцитов периферической крови. Установлено позитивное влияние указанного экстракта на количество сегменто- и палочкоядерных нейтрофилов и стимулирующее действие на их функциональную активность у облученных мышей.

Ключевые слова: белые мыши, экстракт из эмбрионов кур, нейтрофильные лейкоциты, γ -излучение, 5 Гр.

Вплив екстракту з курячих ембріонів на стан нейтрофілів периферійної крові мишей після їх одноразового тотального γ -опромінення

М.С.Погоріла, Г.Ф.Жегунов, О.М.Щербак

В експерименті *in vivo* на самках білих лабораторних мишей після одноразового тотального γ -опромінення досліджено дію серії внутрішньом'язових введень екстракту з ембріонів курей на кількісні характеристики та функціональний стан нейтрофільних лейкоцитів периферійної крові. Встановлено позитивний вплив вказаного екстракту на кількість сегменто- й палочкоядерних нейтрофілів та стимулюючу дію на їх функціональну активність у γ -опроміненних мишей.

Ключові слова: білі миші, екстракт із ембріонів курей, нейтрофільні лейкоцити мишей, одноразове γ -опромінення, 5 Гр.

The effect of the extract from chickens' embryos on the state of peripheral blood neutrophils of mice at total single γ -irradiation

M.S.Pogorila, G.F.Zhegunov, O.N.Sherbak

In the experiment *in vivo* using females of white laboratory mice that were exposed to single total gamma irradiation, there was studied the action of a series of intramuscular injections of extract from chickens' embryos on quantitative characteristics and functional state of neutrophilic leucocytes of peripheral blood. There was established positive influence of this extract on the quantity of segmented and stab neutrophils and stimulating action on their functional activity in radiation exposed mice.

Key words: white mice, extract from chickens' embryos, neutrophilic leucocytes of mice, single γ -irradiation, 5Gr.

Введение

Центральними функціями нейтрофілов, кліток вродженного імунітета, являється захват и уничтожение чужеродных объектов, которые реализуются путем продукции ряда ферментов и мембранолитических веществ. Нейтрофилы способны активизироваться под влиянием фагоцитированных объектов, иммунных комплексов, комплемента, хемокинов и др., а значит, способны к успешному фагоцитозу. Функциональные характеристики, количественный и видовой состав нейтрофилов периферической крови могут существенно изменяться в процессе развития инфекционных заболеваний различного происхождения, при злокачественных новообразованиях, некротических состояниях, травмах, метаболических заболеваниях, иммунопатологических процессах, в ответ на действие токсических веществ и некоторых лекарственных препаратов. Именно

поэтому при оценке состояния системы иммунитета нейтрофилы и приобрели существенное диагностическое значение в современной медицинской практике (Новиков, Новиков, 2009).

На данный момент одной из приоритетных задач экспериментальной медицины и фармакологии является поиск эффективных средств коррекции нарушений системы иммунологической защиты организма. Между тем, наряду с эффективностью, возникает проблема развития разнообразных побочных реакций и противопоказаний при применении профилактических и терапевтических средств, что выводит вопрос безопасности препаратов на первый план (Викторов и др., 2007; Зборовский и др., 2008). Некоторые природные вещества благодаря своему высокому уровню безопасности приобретают особенное значение в рамках этой проблематики. Средства природного происхождения представляют собой сложные комплексы биологически активных соединений с широким спектром биологического и фармакологического действия на разные системы организма, в их состав входят свободные и незаменимые аминокислоты (глутаминовая, аспарагиновая кислоты, триптофан, лизин, лейцин, аргинин) и др. В основе биологической активности препаратов биогенного происхождения лежит их способность активировать рост и размножение клеток, усиливать фагоцитарные свойства лейкоцитов, ускорять процессы регенерации, уменьшать последствия асфиксии, влиять на обмен веществ, оказывать антистрессовое и антиоксидантное действие. Эти свойства обеспечивают препаратам из природного сырья перспективность как в качестве монотерапии, так и в комбинации со специфическими препаратами при лечении различных заболеваний (Логай и др., 1995; Сотникова и др., 1998).

В настоящее время проводятся всесторонние исследования широкого ряда природных веществ, в частности тканевых и эмбриональных экстрактов, с целью дальнейшей разработки на их основе лекарственных и профилактических средств.

Целью нашего исследования было изучение влияния внутримышечного введения экстракта из эмбрионов кур на количественные и функциональные показатели нейтрофильных лейкоцитов в эксперименте *in vivo* на лабораторных мышах, подвергнутых γ -облучению.

Объект и методы исследования

Объектом исследования были самки белых беспородных мышей, массой $22 \pm 1,0$ г, возрастом 2 месяца. Животные удерживались на стандартном питании при стандартных регламентированных условиях в виварии Харьковской зооветеринарной академии.

В работе был использован экстракт из эмбрионов кур, который готовится по разработанной методике (Жегунов, Кузнецова, 2009). Введение экстракта подопытным животным осуществлялось внутримышечно, с промежутком в 1 сутки на протяжении 10 дней, в среднедопустимой дозе для данного вида лабораторных животных и пути введения – по 0,12 мл (Коваленко та ін., 2001).

Тотальное однократное облучение животных осуществлялось на линейном ускорителе «Clinac 600с» Фирмы Varian (США) в дозе 5 Гр на базе ГУ «Институт медицинской радиологии им. С.П.Григорьева» НАМН Украины.

Животные были распределены по следующим группам: Ia группа – интактные животные, выведены из эксперимента на 3 сутки ($n=11$); Ib группа – интактные животные, выведены из эксперимента на 6 сутки ($n=11$); IIa группа – животные, которым с промежутком в 1 сутки на протяжении 10 дней вводили по 0,12 мл внутримышечно экстракт из куриных эмбрионов, выведены из эксперимента на 3 сутки ($n=11$); IIb группа – животные, которым с промежутком в 1 сутки на протяжении 10 дней вводили по 0,12 мл внутримышечно экстракт из эмбрионов кур, выведены из эксперимента на 6 сутки ($n=11$); IIIa группа – животные, которые были однократно, тотально облучены γ -лучами в дозе 5 Гр и были выведены из эксперимента на 3 сутки ($n=11$); IIIb группа – облученные тем же способом животные и выведенные из эксперимента на 6 сутки ($n=11$); IVa группа – животные, которым по указанной схеме вводили экстракт и на 10 сутки введения облучили указанной дозой, выведены из эксперимента на 3 сутки ($n=11$); IVb группа – животные, которым по указанной схеме вводили экстракт и на 10 сутки введения облучили указанной дозой, выведены из эксперимента на 6 сутки ($n=11$). В крови животных всех групп определяли относительное количество палочко- и сегментоядерных нейтрофилов, фагоцитарное число и фагоцитарный индекс нейтрофилов периферической крови (с использованием раствора латекса), а также проводили НСТ-тест (Фрейдлин, 1998). Выведение животных из эксперимента осуществлялось путем декапитации под эфирным наркозом. Работа с животными проводилась согласно Хельсинской декларации, принятой Генеральной ассамблеей Всемирной медицинской ассоциации (1964–2000 гг.), согласно

Национальных «Общих этических принципов исследований на животных» (Украина, 2001 г.), согласованных с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в других научных целях» (Страсбург, 18.03.1986). Статистическая обработка полученных в эксперименте данных осуществлялась с помощью компьютерных программ Origin (проверка на нормальность распределения) и Microsoft Office Excel 2003 (параметрический метод: t-критерий Стьюдента) (Лапач, 2004).

Результаты и обсуждение

При подсчете относительного количества сегментоядерных нейтрофилов в периферической крови облученных мышей наблюдалось достоверное уменьшение этого показателя по отношению к контрольным интактным животным на шестые сутки эксперимента, так, в группе IIIb – $17 \pm 2,05$ % против $27,1 \pm 1,73$ % в Ib группе ($p \leq 0,05$). При введении экстракта облученным мышам на шестые сутки регистрировалось увеличение относительного количества сегментоядерных нейтрофилов в сравнении с облученными мышами, не получавшими экстракт: IVb – $25,1 \pm 2,1$ % против IIIb – $17 \pm 2,05$ % ($p \leq 0,05$). Нужно отметить, что у облученных мышей при применении экстракта значение исследуемого показателя на шестые сутки не имело достоверного отличия от значения у группы интактных животных: IVb – $25,1 \pm 2,1$ % против $27,1 \pm 1,73$ % в Ib группе (рис. 1).

Количество палочкоядерных нейтрофилов также было несколько снижено на третьи и на шестые сутки у облученных животных: IIIa – $2,6 \pm 0,27$ % в сравнении с Ia – $3,6 \pm 0,21$ % и IIIb – $1,2 \pm 0,22$ % против интактной Ib группы – $3,8 \pm 0,18$ % ($p \leq 0,05$). Введение экстракта в указанных дозах облученным мышам приблизило уровень палочкоядерных нейтрофилов к значениям в соответствующем контроле: IVb – $2,9 \pm 0,23$ % против интактной Ib группы – $3,8 \pm 0,18$ % (рис. 2).

Введение экстракта здоровым животным (группы Ia и Ib) не привело к изменениям в относительном количестве нейтрофилов периферической крови ни на третьи, ни на шестые сутки.

Итак, при исследовании относительного количества палочко- и сегментоядерных нейтрофилов в периферической крови мышей, которые были облучены и получали инъекции экстракта из куриных эмбрионов, было установлено, что на шестые сутки после радиационного воздействия указанный экстракт оказывает положительное действие на состояние нейтрофилов. Об этом говорит меньшая степень снижения значений обоих видов нейтрофилов в сравнении с животными, которые были облучены, но не получали инъекций экстракта.

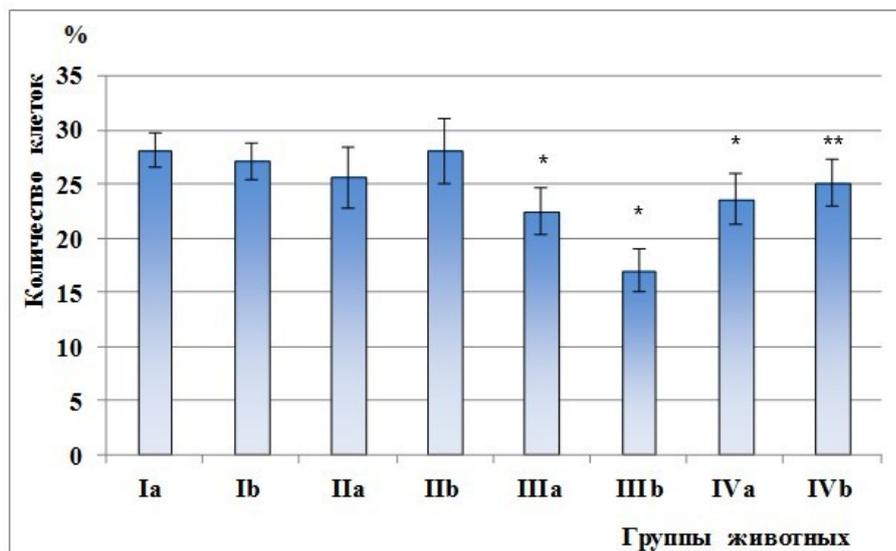


Рис. 1. Относительное количество сегментоядерных нейтрофилов периферической крови мышей после однократного γ -облучения и введения экстракта из куриных эмбрионов

Примечания: * – достоверность различий данных относительно интактных животных, $p < 0,05$; ** – достоверность различий данных относительно групп γ -облученных животных, не получавших экстракт, $p < 0,05$.

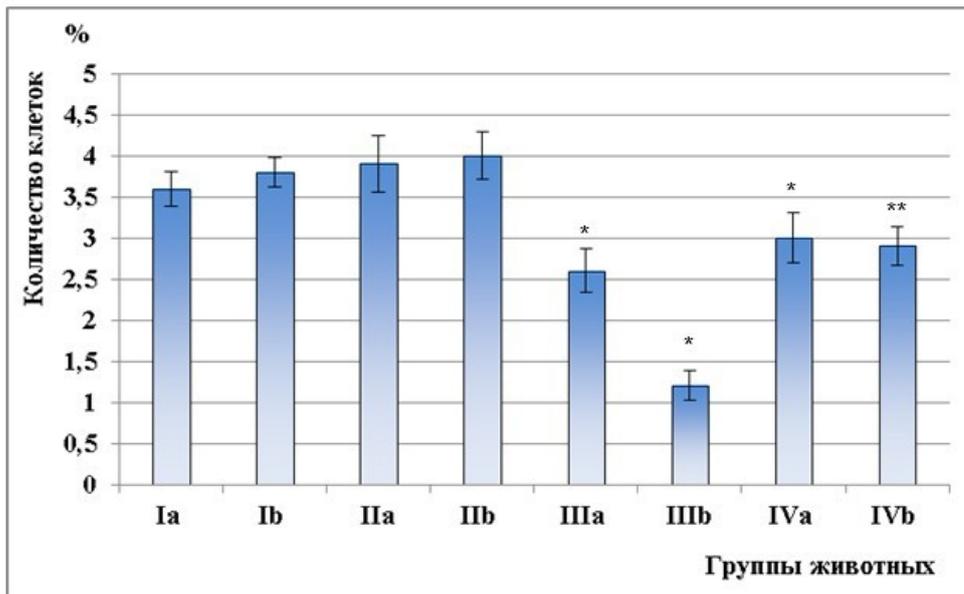


Рис. 2. Относительное количество палочкоядерных нейтрофилов периферической крови мышей после однократного γ -облучения и введения экстракта из куриных эмбрионов

Примечания: * – достоверность различий данных относительно интактных животных, $p < 0,05$; ** – достоверность различий данных относительно групп γ -облученных животных, не получавших экстракт, $p < 0,05$.

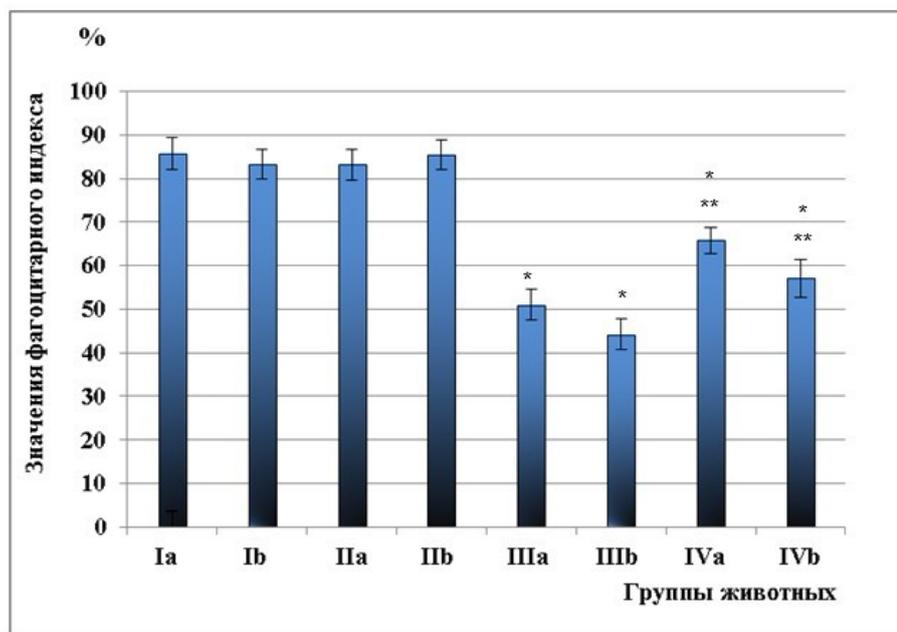


Рис. 3. Фагоцитарный индекс нейтрофилов периферической крови мышей после γ -облучения и введения экстракта из куриных эмбрионов

Примечания: * – достоверность различий данных относительно интактных животных, $p < 0,05$; ** – достоверность различий данных относительно групп γ -облученных животных, не получавших экстракт, $p < 0,05$.

При изучении показателей состояния фагоцитарной активности нейтрофилов у животных, которые были облучены и получали инъекции экстракта, также было отмечено ряд изменений.

У облученных мышей, как на третьи, так и на шестые сутки после радиационного воздействия наблюдалось существенное снижение показателей фагоцитарного индекса (ФИ) и фагоцитарного числа (ФЧ). Так, в группе IVa ФИ составил $65,8 \pm 3,0$ % против $85,8 \pm 3,7$ % в интактной Ia группе; ФЧ – $5,5 \pm 0,6$ усл. ед. против $7,3 \pm 0,4$ усл. ед. ($p \leq 0,05$). В IVb группе ФИ составил $57,1 \pm 4,3$ % против $83,3 \pm 3,5$ % в Ib группе контрольной группы ($p \leq 0,05$); ФЧ – $4,6 \pm 0,6$ усл. ед. против $7 \pm 0,4$ усл. ед. в соответствующем контроле.

При введении экстракта облученным животным регистрировалось достоверное повышение фагоцитарного индекса нейтрофилов на третьи и шестые сутки наблюдения. Так, в группе IVa ФИ составил $65,8 \pm 3,0$ % в сравнении с $51 \pm 4,0$ % у облученных животных группы IIIa ($p \leq 0,05$). ФЧ у этих групп достоверных различий не имел. На шестые сутки ФИ у облученных животных, получавших экстракт (IVb), составил $57,1 \pm 4,3$ % в сравнении с только облученными животными – $44,2 \pm 3,5$ % в IIIb группе ($p \leq 0,05$). На шестые сутки наблюдения ФЧ при введении экстракта облученным животным претерпел изменения. В IVb группе он составил $4,6 \pm 0,6$ усл. ед. в сравнении с $2,9 \pm 0,6$ усл. ед. в IIIb группе ($p \leq 0,05$) (рис. 3 и рис. 4).

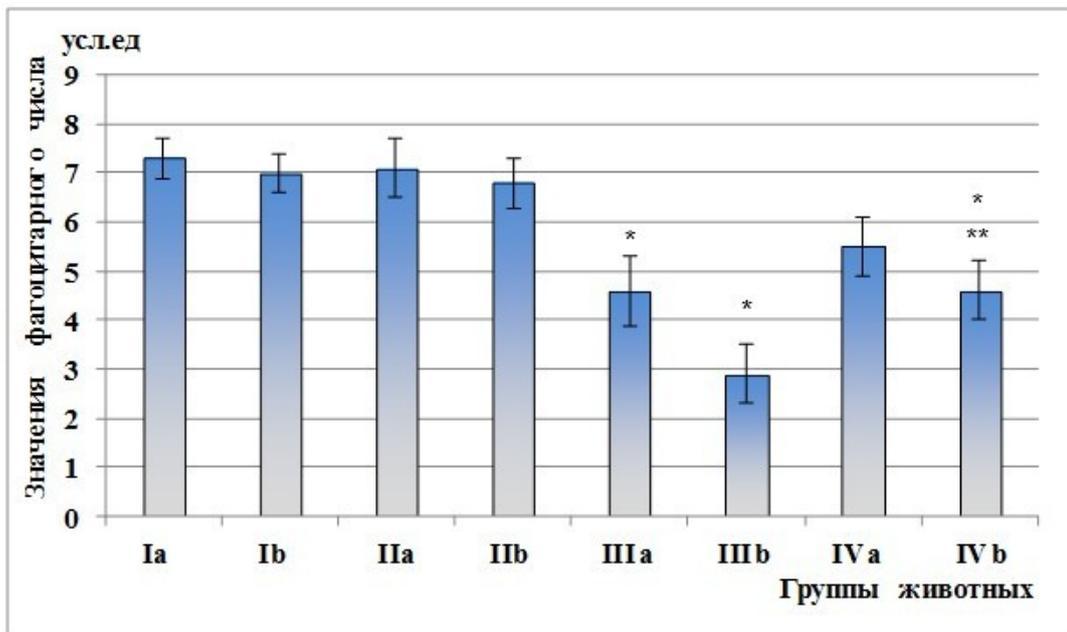


Рис. 4. Фагоцитарное число нейтрофилов периферической крови мышей после γ -облучения и введения экстракта из куриных эмбрионов

Примечания: * – достоверность различий данных относительно интактных животных, $p < 0,05$; ** – достоверность различий данных относительно групп γ -облученных животных, не получавших экстракт, $p < 0,05$.

Метаболическую активность нейтрофильных гранулоцитов определяли при помощи теста восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест). Проведение спонтанной реакции способно предоставить данные о степени функциональной активности нейтрофилов *in vivo*, стимулированная же реакция способна показать функциональный резерв исследуемых клеток и может свидетельствовать о возможных нарушениях в их бактерицидной способности. Коэффициент стимуляции – это функциональный резерв клеток, представляющий собой разницу между числом индуцированных диформазапозитивных клеток и количеством спонтанных диформазапозитивных клеток.

Данные спонтанной и стимулированной зимозаном реакций НСТ-теста представлены в виде коэффициента стимуляции.

Так, показано достоверное снижение этого показателя у групп животных после однократного тотального воздействия на них γ -лучей в дозе 5 Гр (IIIa и IIIb) в сравнении с интактными (Ia та Ib). В группах после радиационного воздействия и введения экстракта, как на третьи (IVa), так и на шестые сутки (IVb) наблюдения было отмечено повышение значений коэффициента стимуляции в НСТ-тесте в сравнении с животными, которых лишь облучили. Но эти значения были достоверно более низкими в сравнении со значениями у интактных животных, что, возможно, обусловлено коротким временем воздействия исследуемого экстракта в эксперименте – 6 суток.

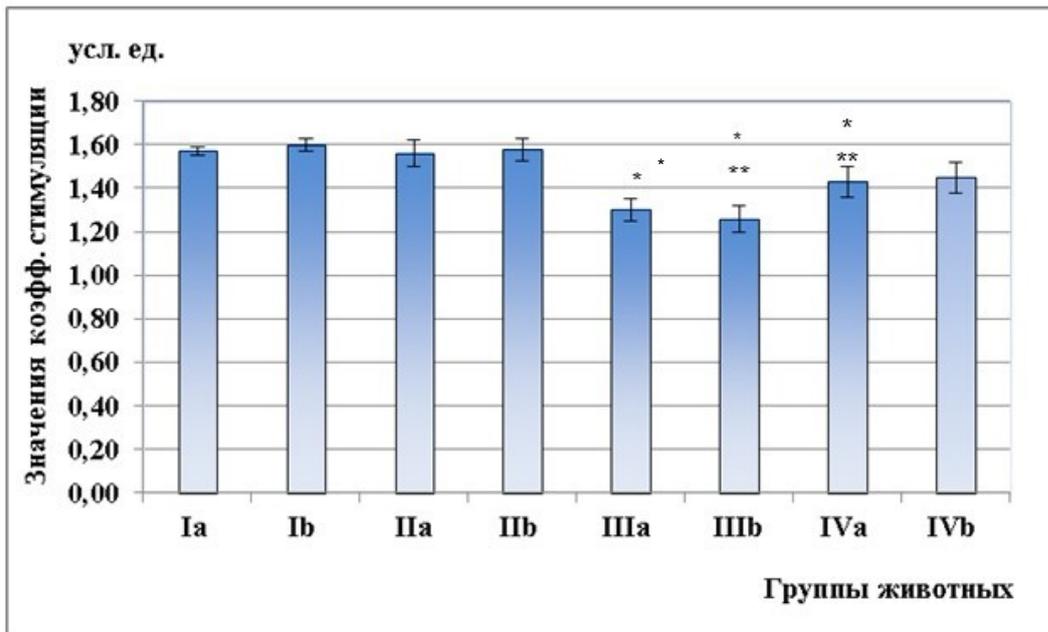


Рис. 5. Коэффициент стимуляции в НСТ-тесте мышей после γ -облучения и его коррекция введением экстракта из куриных эмбрионов

*Примечания: * – достоверность различий данных относительно интактных животных, $p < 0,05$; ** – достоверность различий данных относительно групп γ -облученных животных, не получавших экстракт, $p < 0,05$.*

Таким образом, мы наблюдали прогнозируемое пострадиационное снижение коэффициента стимуляции НСТ-теста нейтрофилов крови животных (Гриневич, Демина, 2006). Серия внутримышечных инъекций экстракта вызвала повышение значений коэффициента стимуляции в НСТ-тесте на фоне радиационного влияния, как на третьи, так и на шестые сутки экспериментальных наблюдений.

Выводы

При проведении серии внутримышечных инъекций экстракта из эмбрионов кур мышам после однократного тотального γ -облучения в дозе 5 Гр наблюдается ускорение нормализации уровня исследуемых показателей, а именно количественного состава и функционального состояния нейтрофилов периферической крови. Подобный результат может свидетельствовать о положительном влиянии эмбрионального экстракта на защитные возможности организма в условиях действия такого фактора, как ионизирующее излучение. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности дальнейших исследований биологического и фармакологического действия экстрактов из эмбрионов кур с целью создания на их основе лекарственных и профилактических средств.

Список литературы

- Викторов А.П., Мальцев В.И., Белоусов Ю.Б. Безопасность лекарств: Руководство по фармаконадзору. – К.:Морион, 2007. – 240с. /Viktorov. A.P., Mal'tsev V.I., Belousov Yu.B. Bezopasnost' lekarstv: Rukovodstvo po farmakonadzoru. – K.:Morion, 2007. – 240s./
- Гриневич Ю.А., Демина Э.А. Иммунные и цитогенетические эффекты плотно- и редкоизионизирующих излучений. – К., 2006. – 200с. /Grinevich Yu.A., Demina E.A. Immunnye i tsitogeneticheskiye efekty plotno- i redkoioniziruyushchikh izlucheniye. – K., 2006. – 200s./
- Жегунов Г.Ф., Кузнецова В.Г. Изучение иммуностимулирующей активности экстрактов из эмбрионов кур // Проблемы зооинженерии та ветеринарної медицини. – 2009. – Вип.19, ч.2, т.2. – С. 116–119. /Zhegunov G.F., Kuznetsova V.G. Izucheniye immunostimuliruyushchey aktivnosti ekstraktov iz embrionov kur // Problemy zoonzhenerii ta veterinaryanoi medytsyny. – 2009. – Vyp.19, ch.2, t.2. – S. 116–119./
- Зборовский А.Б., Тюренок И.Н., Белоусов Ю.Б. Неблагоприятные побочные эффекты лекарственных средств. – М.: ООО «Медицинское информационное агенство», 2008. – 656с. /Zborovskiy A.B., Tyurenkov I.N., Belousov Yu.B. Neblagopriyatnyye pobochnyye efekty lekarstvennykh sredstv. – M.: ООО «Meditsinskoye informatsionnoye agenstvo», 2008. – 656s./
- Коваленко В.М., Стефанов О.В., Максимов Ю.М., Трахтенберг І.М. Экспериментальне вивчення токсичної дії потенційних лікарських засобів // Доклінічні дослідження лікарських засобів: Метод. реком. / За ред. О.В.Стефанова. – К.:ВД «Авіцена», 2001. – С. 74–97. /Kovalenko V.M., Stefanov O.V., Maksymov Yu.M., Trakhtenberg I.M. Eksperymental'ne vyvchennya toksychnoi dii potentsiynykh likars'kykh zasobiv // Doklinichni doslidzhennya likars'kykh zasobiv: Metod. rekom. / Za red. O.V.Stefanova. – K.:VD «Avitsena», 2001. – S. 74–97./
- Лапач С.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. – Киев: Морион, 2004. – 408с. /Lapach S.N. Statisticheskiye metody v mediko-biologicheskikh issledovaniyakh s ispol'zovaniyem Excel. – Kiev: Morion, 2004. – 408s./
- Логай І.М., Соловьева В.П., Сотникова Е.П. Тканевая терапия по В.П.Филатову, основные направления и перспективы // Здоровье. – 1995. – №2. – С. 7–10. /Logay I.M., Solov'yeva V.P., Sotnikova Ye.P. Tkanevaya terapiya po V.P.Filatovu, osnovnyye napravleniya i perspektivy // Zdorov'ye. – 1995. – №2. – S. 7–10./
- Новиков Д.К., Новиков П.Д. Клиническая иммунопатология. – М.: Мед. лит., 2009. – 464с. /Novikov D.K., Novikov P.D. Klinicheskaya immunopatologiya. – M.: Med. lit., 2009. – 464s./
- Сотникова Е.П., Соловьева В.П., Лотош Т.Д. Экспериментальная оценка уровня биологической активности и безопасности адаптогенов // Актуальные проблемы клинической фармакологии. – Винница, 1998. – С. 256–257. /Sotnikova Ye.P., Solov'yeva V.P., Lotosh T.D. Eksperimental'naya otsenka urovnya biologicheskoy aktivnosti i bezopasnosti adaptogenov // Aktual'nyye problemy klinicheskoy farmakologii. – Vinnitsa, 1998. – S. 256–257./
- Фрейдлин И.С. Иммунная система и ее дефекты. Руководство для врачей. – СПб, 1998. – 113с. /Freydlin I.S. Immunnaya sistema i yeye defekty. Rukovodstvo dlya vrachey. – SPb, 1998. – 113s./
- European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. – Strasbourg: Council Treaty Series, 1987. – №123. – 52p.

Представлено: С.В.Бруснік / Presented by: S.V.Brusnik

Рецензент: Л.В.Шеремет / Reviewer: L.V.Sheremet

Подано до редакції / Received: 17.08.2012