

На правах рукописи

БОГДАНОВА АЛЬБИНА ВАРИСОВНА

**ИЗМЕНЕНИЯ В ЭРИТРОНЕ В ВОССТАНОВИТЕЛЬНОМ
ПЕРИОДЕ ПОСЛЕ ПОДОСТРОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ
РАЗЛИЧНЫХ ДОЗ ПОЛИХЛОРИРОВАННЫХ БИФЕНИЛОВ
(ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

14.00.16 – патологическая физиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Екатеринбург – 2006

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Башкирском государственном медицинском университете Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Каюмова Алия Фаритовна

Официальные оппоненты:

академик РАМН, доктор медицинских наук,

профессор

Захаров Юрий Михайлович

доктор медицинских наук, профессор

Осипенко Артур Васильевич

Ведущая организация:

Гематологический научный центр РАМН (г. Москва)

Защита диссертации состоится «8» июня 2006 года в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 208.102.03 при Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Уральская государственная медицинская академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию» по адресу: 620028, г.Екатеринбург, ул.Репина, д.3.

С диссертации
по адресу:

Авторефер

Ученый се
Д.м.н., пр

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В последние 30 лет уделяется повышенное внимание группе стойких органических загрязнителей, которые воздействуют на среду обитания на чрезвычайно низком уровне (нижний предел обнаружения – 10^{-8} - $10^{-13}\%$), к которым относятся, в первую очередь, полихлорированные бифенилы (ПХБ), полихлорированные дибензо-р-диоксины (ПХДД) и фураны, обладающие рядом специфических признаков: биоаккумуляция; глобальная распространенность за счет способности переноситься на большие расстояния; чрезвычайная стойкость к физическим, химическим и биологическим изменениям; способность оказывать токсическое воздействие на организмы в крайне малых дозах (Юфит С.С., 2001).

Период полувыведения наиболее изученного изомера ПХДД 2,3,7,8-тетрахлордибензо-пара-диоксина (ТХДД), который по своим отравляющим свойствам сопоставим с 3,3,4,4-тетрахлорбифенилом, наиболее токсичным изомером ПХБ, обычно у крыс, мышей и хомяков варьирует от 12 до 30 суток, а у морских свинок от 23 до 94 суток, в то время как у макаков-резусов этот показатель для ТХДД составляет около года, а у человека от 2 до 6 лет (Худолей В.В. с соавт., 2000). По данным EPA (Environmental Protection Agency) в результате экспериментов на крысах было выяснено, что при введении дозы 650 мг/кг ТХДД период полувыведения составляет 10,82 дня (Neal R.A. et al., 1982; Olson J.R. et al., 1994), при 50 мг/кг – 17,4 дня (Piper W.N. et al., 1973), при введении крысам 1 мг/кг ТХДД – 31 день (Rose J.Q. et al., 1976), т.е. с уменьшением дозы введенного токсиканта увеличивается период его полувыведения.

Основным путем поступления ПХБ в организм человека и животных является желудочно-кишечный тракт (с продуктами и водой), при профессиональном контакте с ПХБ – органы дыхания и кожа (Кратов И.А., 1991; Zuccato E. et al., 1999). По данным ВОЗ, в организм человека, не

имеющего профессионального контакта с ПХБ, поступает с пищей, водой и воздухом от 5 до 100 мкг токсиканта в сутки (Kannan K. et al., 2002).

Для человека ПХБ является потенциальным фактором риска развития бесплодия, спонтанных аборт, мертворождений, врожденных пороков развития (Курляндский Б.А., 2002; Ревич Б.А., 2002; Hardell L., 2002); выявлены их тератогенный и эмбриотоксический эффекты (Боев В.М., 1999; Eriksson P., 1997; Akita M. et al., 2002; Guvenius D.M., 2002); показано снижение неспецифической резистентности у детей и подростков, также снижение поствакцинального иммунитета под влиянием поступивших в организм хлорбифенилов (Попова А.Ю., 1997; Ревич Б.А., 2002). При экспериментальных исследованиях системы крови отмечались лейкопения, нейтропения и лимфопения (Муфазалова Н.А., 2002; Сабирова И.Р., 2004), гемолитическая анемия с явлениями дисэритропоэза в костном мозге (Гайсина А.Ф. 2002) у экспериментальных животных при воздействии ПХБ.

Токсическое действие ПХБ, в основном, рассматривается в ходе острых, подострых интоксикаций, а также при хроническом воздействии на организм человека и животных, и в то же время в доступной литературе нет данных о влиянии ПХБ на функции органов и систем в течение длительного периода после прекращения их поступления в организм человека и животных. В проведенных экспериментальных исследованиях Гайсиной А.Ф. (2002) было выяснено, что в системе эритрона у животных, подвергшихся воздействию различных доз ПХБ в подостром периоде, развиваются гематологические нарушения с явлениями дисэритропоэза (нарушение созревания эритроидной короны островков и волны амплификации эритробластов) в костном мозге крыс. Остается открытым вопрос о дальнейшем характере изменений компонентов периферического и центрального звеньев эритрона в восстановительном периоде после интоксикации ПХБ, о сроках полного восстановления возникающих нарушений в системе крови, а также о степени выраженности отдаленных последствий воздействия ПХБ на животных.

В связи с этим нами проведено исследование состояния эритрона в восстановительном периоде после подострого воздействия различных доз ПХБ с использованием гематологических, патофизиологических, биохимических и гистохимических методов.

Цель исследования. Выявить хронологические и дозозависимые закономерности течения восстановительного периода в эритроне после подострого воздействия различных доз полихлорированных бифенилов.

Задачи исследования.

1. Оценить общее состояние экспериментальных животных в период после подострого воздействия различных доз ПХБ.

2. Исследовать динамику показателей периферической крови: содержание эритроцитов, гемоглобина, ретикулоцитов, индексы красной крови (цветовой показатель, среднее содержание гемоглобина в эритроците, средняя концентрация гемоглобина в эритроците, средний объем эритроцита) и гематокрит в восстановительном периоде после подострой интоксикации различными дозами ПХБ.

3. Исследовать качественные и количественные изменения в эритробластических островках костного мозга (характер волн амплификации эритробластов и их созревание в эритробластических островках, характер реконструкции эритропоэза) в динамике после подострого воздействия различных доз ПХБ.

4. Выявить изменения осмотической и кислотной резистентности эритроцитов периферической крови в восстановительном периоде после окончания подострой интоксикации различными дозами ПХБ.

5. Исследовать характер отложения железа в селезенке крыс в восстановительном периоде после подострой интоксикации различными дозами ПХБ.

Научная новизна исследования. Проведенные исследования позволили впервые экспериментально оценить характер изменений параметров системы

«красной» крови в восстановительном периоде после завершения введения различных доз ПХБ крысам по динамике изменений показателей периферической «красной» крови, по количественным изменениям и качественным характеристикам ЭО в костном мозге, по характеру осмотической и кислотной резистентности эритроцитов, отложению железа в макрофагах селезенки у экспериментальных животных. Полученные данные позволили установить наличие взаимосвязи между изменениями в формировании и развитии ЭО костного мозга и периферическим отделом эритрона в период после подострой интоксикации различными дозами ПХБ.

Практическое значение работы. Экспериментальное подтверждение возможности восстановления нарушений в системе «красной» крови после подострого воздействия различных доз ПХБ и характера отдаленных последствий интоксикации, что послужит основанием для разработки специализированных охранных, профилактических и лечебных мероприятий, включая необходимость периодического контроля показателей периферической крови и проведения целенаправленных реабилитационных мероприятий в восстановительном периоде после прекращения контакта с ПХБ у рабочих, занятых на производстве, а также лиц, имевших контакт с соединениями данной группы.

Положения, выносимые на защиту

1. Восстановление нормальных показателей эритропоэза в ЭО, качественных характеристик эритроцитов и кроворазрушения в селезенке после подострого воздействия различных доз ПХБ на организм крыс занимает не менее двух месяцев, с более выраженными негативными проявлениями в отношении системы «красной» крови после завершения введения меньших доз интоксиканта.

2. Восстановительный период после завершения подострого введения различных доз ПХБ характеризуется сложными компенсаторными перестройками в центральном и периферическом звеньях эритрона и имеет

определенные особенности в сроках и характере проявлений в зависимости от дозы поступившего в организм ПХБ.

Внедрение результатов работы в практику. Результаты работы внедрены в учебную и научно-исследовательскую работу кафедры морфологии и физиологии человека и животных Башкирского государственного университета; кафедры патологической физиологии, кафедры общей гигиены с экологией Башкирского государственного медицинского университета.

Апробация работы. Основные положения диссертации представлены на Всероссийской научно-практической конференции «Молодые ученые в медицине» (Казань, 2004), 70-й Республиканской научной конференции студентов и молодых ученых БГМУ (Уфа, 2005), Всероссийской конференции молодых исследователей «Физиология и медицина» (С.-Петербург, 2005), I-м съезде физиологов СНГ «Физиология и здоровье человека» (Сочи, 2005), межрегиональной научно-практической конференции с международным участием «Типовые патологические процессы» (Уфа, 2005), Республиканской конференции молодых ученых «Новые технологии в медицине – 2005» (Уфа, 2005), расширенном межкафедральном заседании кафедры нормальной физиологии, биологической и биоорганической химии, военной и экстремальной медицины, гистологии и эмбриологии БГМУ (Уфа, 2006).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 8 печатных работ.

Структура диссертации. Диссертация состоит из введения, главы «Обзор литературы», главы «Материалы и методы исследований», главы «Собственные результаты», главы «Обсуждение полученных результатов», выводов, практических рекомендаций и списка литературы.

Диссертация изложена на 181 страницах машинописи, включает 23 таблицы, 19 рисунков и 7 микрофотографий. Указатель литературы включает 234 источника (отечественных – 126, иностранных – 108).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследований. Исследования выполнены на 405 белых беспородных крысах (самцах), весом 170-240 г.

Модель подострой интоксикации полихлорированными бифенилами создавали путем введения крысам коммерческой смеси “Совол” в объеме 1мл ежедневно в течение 28 дней с помощью зонда внутривентрикулярно, так как в обычных условиях токсикант поступает в организм человека и животных в основном с пищей. “Совол” вводили в суммарной дозе 3000 мг/кг (0,5ЛД₅₀), 300 мг/кг (0,05ЛД₅₀) и 150 мг/кг (0,025ЛД₅₀). В зависимости от вводимой дозы токсина животные подразделялись на три группы (табл. 1). Контрольной (интактной) группе животных (n=45) вводили по 1 мл растительного масла в течение 28 дней.

Таблица 1

Схема эксперимента и количество подопытных животных.

Группа	Доза ПХБ	Сроки введения ПХБ	Количество животных
1	0,5 ЛД ₅₀ (3000 мг/кг веса крысы)	1-28 сутки	120
2	0,05ЛД ₅₀ (300 мг/кг веса крысы)	1-28 сутки	120
3	0,025ЛД ₅₀ (150 мг/кг веса крысы)	1-28 сутки	120
Контроль	1мл растительного масла	1-28 сутки	45

Сроки забора экспериментального материала составили 7-, 14-, 21-, 28-, 35-, 42-, 49-, 56-е сутки после завершения периода подострой интоксикации ПХБ для каждой группы животных, включая контрольную группу.

В эти сроки у экспериментальных крыс исследовали следующие показатели:

1. Традиционными методами число эритроцитов, ретикулоцитов и показатель гематокрита периферической крови. Количество гемоглобина крови определяли унифицированным цианметгемоглобиновым методом на гемоглобинометре ГФ-Ц-04. Рассчитывали цветовой показатель крови (ЦП), среднее содержание гемоглобина в одном эритроците (ССЭ), средний объем

эритроцита (СОК), среднюю концентрацию гемоглобина в одном эритроците (СКЭ) (Тодоров Й., 1968; Тиц Н., 1997).

2. Методы исследования эритробластических островков костного мозга:

2.1. Метод выделения и подсчета эритробластических островков (Захаров Ю. М., Мельников И. Ю., Рассохин А. Г., 1984).

2.2. Распределение эритробластических островков костного мозга по классам зрелости (Захаров Ю. М., Мельников И. Ю., Рассохин А. Г., 1990).

2.3. Определение функциональных показателей эритропоэза: общее количество КОЕз, вступивших в эритроидную дифференцировку в ЭО; показатель вовлечения КОЕз в дифференцировку проэритробласта в ЭО; показатель длительности созревания; показатель повторного вовлечения макрофагов ЭО в эритропоэз (Воргова Л.В., Захаров Ю.М., 1990).

3. Определение осмотической резистентности мембраны эритроцитов по методу Waugh T., Asherman E.(1938) в модификации Василевской Н. Л. (1955) и Cohen (1958).

4. Метод кислотных эритрограмм по Гительзону И. И. и Терскову И. А. (1959)

5. Способ выявления железа в селезенке методом Перлса.

Кровь для исследования бралась из хвостовой вены. Для взятия костного мозга и селезенки под эфирным наркозом проводилась декапитация экспериментальных животных.

СОБСТВЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

После завершения введения ПХБ в дозе $1/2$ ЛД₅₀, улучшение общего состояния крыс (нормализация аппетита, повышение двигательной активности) наблюдалось с первой недели, в группе $1/20$ ЛД₅₀ позже, с 21-х суток опыта, в группе животных, подвергнутых воздействию дозы $1/40$ ЛД₅₀, в восстановительном периоде происходило более длительное сохранение последствий интоксикации (в течение месяца) с ухудшением к концу опыта (56-е сутки), что можно объяснить выраженным кумулятивным действием

ПХБ, причем их кумулятивные эффекты возрастают с уменьшением доз, ежедневно вводимых в организм (Мышкин В.А, 2000; Савлуков А.И., 2000).

В периферической крови наблюдалось повышение количества эритроцитов к концу эксперимента во всех опытных группах, причем восстановление эритроцитов в группе 1/2 ЛД₅₀ происходило с первой недели. В то же время остаются измененными качественные характеристики эритроцитов (снижение содержания гемоглобина, цветового показателя, ССЭ, СКЭ и СОК), т.е. продолжает сохраняться гипохромия эритроцитов периферической крови у крыс в группах 1/20 ЛД₅₀ и 1/40 ЛД₅₀, наряду с тенденцией к ликвидации имеющейся гипохромии эритроцитов в группе 1/2 ЛД₅₀ на 56-е сутки. Данное явление может быть объяснено резким изменением показателей метаболизма железа - его транспорта и потребления костным мозгом при стрессе эритропоэза, когда регенерация эритроцитов сопровождается использованием для эритропоэза более трети резерва железа, поэтому в костном мозге возрастает величина и скорость утилизации Fe⁵⁹ ядерными эритроидными клетками для синтеза гемоглобина (Charlton R.W., Bothwell T.H., 1983).

Если рассматривать с точки зрения стресса эритропоэза, то, ретикулоцитоз в группе 1/2 ЛД₅₀ с третьей недели и сохраняющийся вплоть до конца эксперимента, вероятно, связан с возрастанием амплификации в эритроидной ткани и феноменом «перескока» терминального деления, т.е. преждевременного прекращения митотической активности клетки, когда эритробласт, не использовав свой митотический потенциал, останавливает синтез ДНК и дифференцируется до эритроцита. Время выхода ретикулоцитов из костного мозга укорачивается, вследствие чего возникает ретикулоцитоз. Восстановление количества эритроцитов в периферической крови указывает на сохранность компенсаторных возможностей в ЭО костного мозга за счет быстрой элиминации ПХБ из организма опытных животных в данной группе, а также, вероятно, ускоренного отсоединения ретикулоцитов из «короны» ЭО, ослаблением их связи с удерживающими их в костном мозге молекулами фибронектина, увеличением числа «отбывших» пор костно-мозговых синусов, а

также ускорением «сборки» цитоскелета ретикулоцитов, что повышает их деформабельность и выход в кровь через поры синусоидов (Сторожок С.А. с соавт., 1997) под влиянием эритропоэтина.

Ретикулоцитопению в группах $1/20$ ЛД₅₀ и $1/40$ ЛД₅₀ на фоне повышенного содержания эритроцитов в периферической крови можно объяснить ускоренным созреванием ретикулоцитов крыс после воздействия ПХБ. Время жизни эритроцитов крыс составляет 45-68 дней (Schalm O.W. et al., 1975), а скорость созревания ретикулоцитов этих животных (определённая с помощью культивирования крови *in vitro* и интерпретации кривых созревания) в среднем составляет 23,2 часа (Самардакова А.Г., Стржижовский А.Д., 1967; Самардакова А.Г., 1970), а при большой концентрации эритропоэтина, продукция которого увеличивается при стрессе эритропоэза, этот процесс значительно ускоряется (Захаров Ю.М., 1973).

В группе $1/2$ ЛД₅₀ кислотная резистентность эритроцитов повышается с 28-х суток опыта, в группах $1/20$ ЛД₅₀ и $1/40$ ЛД₅₀ - стойкость эритроцитов к кислотному гемолизику в течение всего срока эксперимента остается низкой, с повышением в течение первых двух недель в группе $1/40$ ЛД₅₀, причем наименьшая доза интоксиканта после завершения его введения, через два месяца дает картину наибольшего снижения стойкости мембраны эритроцитов периферической крови. Осмотическая резистентность эритроцитов имеет такую же закономерность.

Данные диаграмм распределения эритроцитов по группам стойкости показывают, за счет каких эритроцитов происходит увеличение их стойкости в группе $1/2$ ЛД₅₀, и понижение резистентности эритроцитов в группах $1/20$ и $1/40$ ЛД₅₀ к концу эксперимента (рис. 1-3). Так, повышение стойкости эритроцитов в группе $1/2$ ЛД₅₀ происходит за счет увеличения процента повышенностойких эритроцитов в 2,7 раза по сравнению с контролем и снижения пониженно- и низкостойких эритроцитов в 1,8 и 1,3 раза соответственно по сравнению с 28-ми сутками подострого периода.

В группе $1/20$ ЛД₅₀ снижение стойкости эритроцитов происходит за счет



Рис. 1. Диаграмма распределения эритроцитов по группам стойкости у крыс в восстановительном периоде после подострого воздействия ПХБ в дозе 1/2 ЛД₅₀.

повышения низкостойких эритроцитов в 7,4 раза, пониженностойких эритроцитов – в 1,9 раза, снижения среднестойких эритроцитов в 1,5 раза в сравнении с 28-ми сутками подострого периода. Кстати, минимальные показатели индекса устойчивости (ИУ) эритроцитов в группе 1/20 ЛД₅₀ отмечались на 14-е, 49-е и 56-е сутки, т.е. на момент преобладания низкостойких форм эритроцитов. В группе 1/40 ЛД₅₀ анализ распределения эритроцитов по группам стойкости на 49-е и 56-е сутки выявил исчезновение среднестойких эритроцитов и повышение пониженностойки в 7,4 (23,3) и 7,5 (23,7) раза соответственно в указанные сроки по отношению к 28-м суткам подострого периода. Количество низкостойких эритроцитов увеличилось, тем самым был выявлен период максимального снижения стойкости эритроцитов (49-е и 56-е сутки).

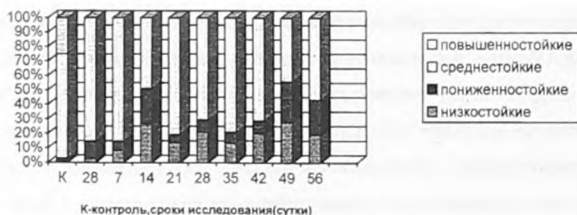


Рис. 2. Диаграмма распределения эритроцитов по группам стойкости у крыс в восстановительном периоде после подострого воздействия ПХБ в дозе 1/20 ЛД₅₀.



Рис. 3. Диаграмма распределения эритроцитов по группам стойкости у крыс в восстановительном периоде после подострого воздействия ПХБ в дозе 1/40 ЛД₅₀.

Снижение ИУ в экспериментальных группах, вероятно, связано с поражением костного мозга ПХБ, в результате чего в периферической крови появляется большое количество низкостойких форм эритроцитов, что подтверждают диаграммы распределения эритроцитов по группам стойкости. Повышение ИУ в группе 1/2 ЛД₅₀ с 28-х суток до 56-х суток в сравнении с 28-ми сутками подострого периода, возможно, обусловлено внутриклеточными адаптационно-компенсаторными перестройками в клетках эритроидного ряда (Щепанский В.О. с соавт., 1995), вновь производимых костным мозгом в восстановительном периоде. Данное явление можно охарактеризовать как «структурный след долговременной адаптации» (Меерсон Ф.З., 1986) эритроцитов к повреждающему воздействию токсиканта.

В пользу вышесказанного говорят и данные кислотных эритрограмм. В группе 1/2 ЛД₅₀ в указанные сроки (56-е сутки) произошло увеличение среднего времени гемолиза до $3,7 \pm 0,05$ мин. ($p_1 < 0,05$) (контроль- $3,0 \pm 0,26$ мин.), ширины интервала стойкости до $2,7 \pm 0,22$ мин. (контроль- $2,0 \pm 0,26$ мин.), снижение высоты максимума до $46,27 \pm 6,49$ % (контроль- $47,98 \pm 4,49$ %), сдвиг максимума эритрограммы вправо до $4,67 \pm 0,17$ мин. ($p_1 < 0,05$) (контроль- $3,7 \pm 0,3$ мин.) с подъемом правого крыла эритрограммы по сравнению с контролем, что характеризует повышение стойкости эритроцитов. Кислотные эритрограммы в группах 1/20 и 1/40 ЛД₅₀ доказывают снижение стойкости эритроцитов к концу эксперимента – укорочение среднего времени гемолиза до $2,85 \pm 0,05$ мин. и

2,85±0,1 мин. ($p_1<0,05$), ширины интервала стойкости до 1,69±0,1 мин. и 1,53±0,17 мин. ($p_1<0,05$), увеличение высоты максимума до 51,23±10,39 % и 49,27±7,2 %, сдвиг максимума эритрограммы влево до 3,33±0,17 мин. ($p_1=0,05$) и 3,0±0,0 мин. ($p_1<0,05$) к концу эксперимента (56-е сутки).

Усиление гистохимической реакции на железо в селезенке, наблюдаемое в отдаленные сроки опыта (28-е и 56-е сутки), возрастание выраженности реакции с уменьшением дозы ПХБ и увеличением срока эксперимента, свидетельствует о повышении утилизации поврежденных эритроцитов макрофагами селезенки, что подтверждает качественную неполноценность производимых костным мозгом эритроцитов, более выраженную после воздействия дозы 1/40 ЛД₅₀, когда в кровеносном русле к концу опыта отмечалось наличие только низко- и пониженностойких эритроцитов.

Для картины стресса эритропоэза характерно также явление эритродиереза (гемолиза), при котором образующиеся продукты распада эритроцитов активируют эритропоэз, ускоряя регенерацию красной крови (Ужанский Я.Г., 1968), причем таким свойством обладают продукты распада зрелых эритроцитов, продукты же разрушения ретикулоцитов, напротив, тормозят эритропоэз (Новиков Н.М., 1986).

В костном мозге под влиянием эритропоэтина активируется пролиферация и дифференциация колониеобразующих клеток, проэритробластов и эритробластов, увеличивается количество уже коммитированных стволовых клеток – БОЕэ, КОЕэ, возрастает амплификация, одновременно в костном мозге резко увеличивается количество образующихся *de novo* и *de repeto* эритробластических островков (Захаров Ю.М., Рассохин А.Г., 2002).

После окончания введения ПХБ в дозе 1/2 ЛД₅₀ (рис.4) на 7-е сутки произошло увеличение количества пролиферирующих классов ЭО (ЭО1, ЭО2, ЭОрек.) с одновременным снижением ЭОинв., что свидетельствует об активации эритропоэза за счет пролиферативных процессов в костном мозге. Увеличение количества ЭО2 в этот период (в 8,6 раза выше контроля) отражает нарастание амплификации эритробластов. Отсутствие же синхронного

прироста ЭОЗ может быть объяснено ускорением их созревания и повторным вовлечением в реконструкцию (Захаров Ю.М., Рассохин А.Г., 2002).



Рис. 4. Диаграмма распределения абсолютного количества эритробластических островков костного мозга крыс по классам зрелости в восстановительном периоде после подострого воздействия ПХБ в дозе 1/2 ЛД₅₀.

На 21-е и 35-е сутки в группе 1/2 ЛД₅₀ также наблюдалась аналогичная активация процессов эритропоэза в костном мозге, хотя следует отметить:

-на 21-е сутки нет выраженного увеличения ЭОрек., однако показатель повторного вовлечения макрофагов в эритропоэз увеличивается (в 4,5 раза на 21-е сутки по сравнению с контролем), так как реконструкция эритропоэза в ЭО реализуется на основе взаимодействия КОЕэ с функционально активным макрофагом ЭО, то в данном случае можно допустить изменение комплементарности клеток в ЭО со зрелыми эритроидными элементами на фоне метаболической и структурной перестройки компонентов ЭО, вызванных воздействием ПХБ; пролиферативная активность ЭО костного мозга возрастает в основном, вероятно, за счет резкого снижения ЭОЗ из-за ускоренного высвобождения созревающих клеток из «короны» островков, на что указывают снижение показателя длительности созревания эритробластов в ЭО (в 5,4 раза по сравнению с контролем) и увеличение количества ретикулоцитов в периферической крови (в 1,9 и 2,9 раза в сравнении с данными контроля и 28-х суток подострого периода соответственно);

-на 35-е сутки стимуляция эритропоэза с наибольшим увеличением ЭОрек. и максимальным ретикулоцитозом в крови (в 2,2 и 2,5 раза больше контроля соответственно), скорее всего, обусловлена развитием тканевой гипоксии

вследствие “рецидива” интоксикации, связанный с липофильностью токсиканта и повторным его выходом из жировых депо организма (Наймушин А.А., 1997).

Обращает на себя внимание тот факт, что с 7-х по 14-е сутки в группе 1/2 ЛД₅₀ происходит постепенное снижение количества пролиферирующих классов ЭО с возрастанием ЭОЗ и ЭОинв., наблюдается тенденция к снижению показателей интенсивности вовлечения КОЕэ в дифференциацию в ЭО, повторного вовлечения макрофагов ЭО в эритропозз и увеличение показателя длительности созревания эритробластов в ЭО. Все эти данные свидетельствуют о замедлении амплификации эритробластов в «короне» ЭО к началу третьей недели после окончания введения ПХБ и смещении баланса процессов пролиферации и созревания в пользу последнего в указанные сроки наблюдения. С 28-х по 56-е сутки эксперимента в группе 1/2 ЛД₅₀ значительно повысилось содержание ЭОЗ при одновременном снижении количества ЭОинв.

В группе с наибольшей дозой введенного интоксиканта (1/2 ЛД₅₀) наблюдается типичная реакция сохраняющегося стресса эритропозза, в результате которого практически сразу после прекращения введения ПХБ в течение месяца идет интенсивная перестройка в системе красной крови, а в последующие сроки до конца эксперимента (56-е сутки) сохраняющийся компенсационный эритропозз приводит к восстановлению количества эритроцитов, повышению их резистентности к гемолитикам, обнаруживается тенденция к ликвидации имеющейся гипохромии эритроцитов.

В группе 1/20 ЛД₅₀ (рис.5) в течение всего эксперимента наблюдалась наиболее выраженная активность пролиферативных процессов за счет: возрастания количества пролиферирующих классов ЭО и снижения ЭОинв.; увеличения дифференциации КОЕэ в проэритробласты с формированием новых ЭО, о чем свидетельствует повышенное содержание ЭО1 почти во все исследуемые сроки; возрастания вовлечения КОЕэ в дифференциацию дополнительно из-за повторного вовлечения макрофагов в эритропозз (показатель повторного вовлечения макрофагов ЭО в эритропозз во все сроки,

кроме 7-х суток, значительно превышал контрольные данные, особенно на 28-е, 42-е и 49-е сутки в 47,8; 27,1 и 50,9 раза соответственно); ускорения процессов созревания в ЭО (показатель длительности созревания ЭО был значительно ниже контроля в течение всего эксперимента), причем ретикулоцитопения наблюдалась во все сроки исследования, что, наряду с ускорением созревания ретикулоцитов, возможно, связано либо с торможением высвобождения зрелых эритроидных клеток из «коронь» островков из-за нарушения комплементарности между ретикулоцитами и плазматической мембраной макрофагов, либо повреждением и гибелью ретикулоцитов ЭО до выхода в периферическую кровь (Захаров Ю.М., Рассохин А.Г., 2002).



Рис. 5. Диаграмма распределения абсолютного количества эритробластических островков костного мозга крыс по классам зрелости в восстановительном периоде после подострого воздействия ПХБ в дозе 1/20 ЛД₅₀.

В то же время в группе 1/20 ЛД₅₀ с 21-х до 35-х суток наблюдалось торможение созревания ЭО3 в ЭО инв., что доказывается отсутствием одновременного увеличения ЭО инв. при последовательном увеличении ЭО3 и тенденцией к повышению показателя длительности созревания ЭО в указанные сроки. В данной же группе с 42-х до 56-х суток эксперимента отмечалось постепенное снижение количества ЭО1, ЭО2, ЭО3. Таким образом, в группе 1/20 ЛД₅₀ первоначальная наибольшая активность пролиферативных процессов сменяется к концу опыта (56-е сутки) угнетением созревания ЭО2 в ЭО3 и ЭО инв., возможно, в связи с нарушением обмена железа, на что указывает, в

частности, увеличение нарастания содержания гипохромных эритроцитов в крови крыс с 42-х суток.

В группе 1/40 ЛД₅₀ (рис.6) на 7-е сутки вовлечение КОЕз в дифференциацию обеспечивалось повышением ассоциации КОЕз в проэритробласты, о чем свидетельствует максимальное увеличение содержания ЭО1 в 9,6 раза в сравнении с контролем. Нарастание пролиферативных процессов в ЭО, вероятно, является причиной появления ретикулоцитоза в эти сроки. С 7-х до 14-х суток произошло синхронное снижение пролиферирующих классов ЭО - ЭО1, ЭО2, ЭОрек. в 10,5; 6,1 и 2,8 раза; увеличение ЭО3 и ЭОинв. в 1,4 и 2,7 раза соответственно на 14-е сутки по сравнению с 7-ми сутками наблюдения.

Перераспределение пулов пролиферирующих и созревающих классов ЭО в пользу последних отразилось в снижении показателей вовлечения КОЕз в дифференциацию в ЭО (в 5,4 и 2,9 раза), повторного вовлечения макрофагов ЭО в эритропоэз (в 7,5 и 3,7 раза) и максимальном увеличении показателя длительности созревания ЭО (в 12,1 и 2,5 раза) к 14-м суткам по отношению к предыдущим данным (7-е сутки) и к контролю соответственно.



Рис. 6. Диаграмма распределения абсолютного количества эритробластических островков костного мозга крыс по классам зрелости в восстановительном периоде после подострого воздействия ПХБ в дозе 1/40 ЛД₅₀.

В дальнейшем, на 21-е и 35-е сутки, в данной группе вновь повысились количество пролиферирующих и, наоборот, снизилось содержание созревающих ЭО. В указанные сроки (21-е и 35-е сутки) увеличился показатель

повторного вовлечения макрофагов ЭО в эритропоз в 10,0 раз, снизился показатель длительности созревания ЭО в 12,9 и 5,6 раза соответственно в сравнении с контролем. Все это свидетельствует об активации процессов новообразования эритроцитов. На 42-е и 49-е сутки в группе 1/40 ЛД₅₀ наблюдалось уменьшение и ЭО1 в 1,4 раза, ЭО2 в 2,8 и 2,1 раза соответственно, чем в контроле, что указывает на синхронное уменьшение волны амплификации в ЭО с пролиферирующей эритроидной «короной». Однако к 49-м суткам произошло увеличение числа ЭОрек. (в 2,6 раза), одновременно увеличились показатели вовлечения КОЕэ в дифференциацию в ЭО (в 2,2 раза) и повторного вовлечения макрофагов ЭО в эритропоз (в 7,2 раза) по сравнению с 42-ми сутками. Субстратом для образования ЭОрек., вероятно, являются ЭОинв., численность которых уменьшалась (в 2,7 раза, чем на 42-е сутки) синхронно росту количества ЭОрек. В то же время увеличилось число ЭО3 (в 1,1 раза, чем на 42-е сутки) без роста количества ЭО1 и ЭО2, в связи с чем можно сделать предположение, что увеличение ЭО3 связано с их образованием из числа ЭОрек. Повышение количества ЭОинв. (в 2,3 раза) к 56-м суткам эксперимента с одновременным падением количества ЭО3 (в 2,4 раза) по сравнению с 49-ми сутками завершило волну амплификации, которая началась с взаимодействия КОЕэ с ЭОинв.: ЭОинв. → ЭОрек. → ЭО3 (Захаров Ю.М., Медяник Б.В., 1994), прослеживается выраженная активация эритропоза с формированием ЭО de novo и на основе реконструкции эритропоза в инволюцирующих островках (Захаров Ю.М., Рассохин А.Г., 2002).

Прооксидантное действие малых доз ксенобиотика, ведущее к повышенной энергетической потребности клетки (Аглетдинов Э.Ф., 2000; Муфазалова Н.А., 2001) в результате воздействия ПХБ, позволяют предположить наличие наиболее сильного гипоксического раздражителя в виде интоксиканта в наименьшей дозе (1/40 ЛД₅₀) с развитием выраженного стресса эритропоза. Однако, как видно по результатам наших исследований, восстановления нарушений, произошедших в эритропозе в подостром периоде, в дальнейшем

после прекращения введения ПХБ в группе 1/40 ЛД₅₀ не происходит, даже наблюдается еще большее ухудшение состояния системы крови. В то же время в данной группе в картине костного мозга в течение эксперимента, особенно в последние три недели опыта, прослеживается выраженная стимуляция эритропоэза, которая, возможно, связана как со стимуляцией эритропоэза продуктами разрушения эритроцитов (Ужанский Я.Г., 1968), поскольку «доля» низкостойких к гемолитикам эритроцитов резко возрастает, так и с кислородрегулируемой экспрессией субъединицы α гипоксией индуцированного фактора-1 (ГИФ-1), контролирующей ген эритропоэтина, в клетках почек и клетках крови, а также активацией второй субъединицы – ГИФ-1 β – арилгидрокарбонатного ядерного транслокатора, который вовлечен в ответ клетки не только на гипоксию, но и на ксенобиотики, так как необходим для реализации сигнала с диоксинового Ah-рецептора (Michiels C., 2004). Если учесть вышесказанное прооксидантное действие малых доз ксенобиотика и, следовательно, последующий рост уровня активных форм кислорода, то формирование гипоксической сигнализации геному клетки должно тормозиться благодаря подавлению активности ГИФ-1 увеличенным образованием активных форм кислорода (Захаров Ю.М., 2005). Возможно, неоднозначная реакция периферического и центрального звеньев эритрона на гипоксию связана, во-первых, с большей чувствительностью клеток костного мозга к гипоксии, во-вторых, со специфичностью «батареи» генов-мишеней ГИФ-1 для разных типов клеток, экспрессирующих в ответ на гипоксию (Wenger R.H., 2000; Semenza G.L., 2001).

Таким образом, результаты проведенной нами работы свидетельствуют о наибольшем повреждающем эффекте малых доз ПХБ, который продолжает усиливаться в отдаленные сроки наблюдения (два месяца), что обусловлено более длительным периодом полувыведения меньших доз интоксиканта из организма крыс.

Итоговые схемы изменений в эритроне в восстановительном периоде после подострого воздействия ПХБ в различных дозах приведены в нижеследующих рисунках 7-9.

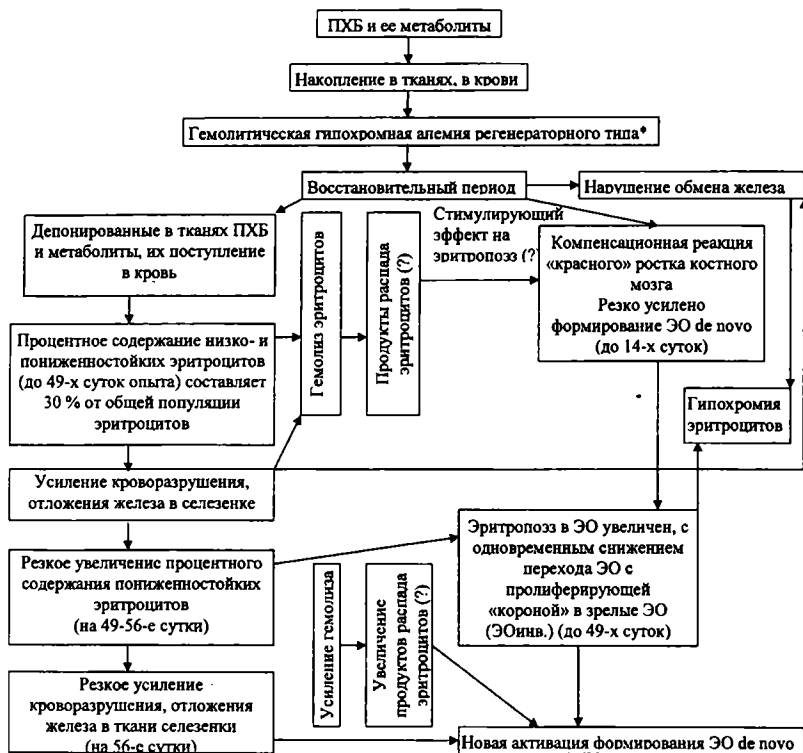


Рис. 7. Схема изменений в эритропе в восстановительном периоде после подострого воздействия ПХБ в дозе 1/2 ЛД₅₀



* Гайсина А.Ф., 2002

Рис. 8. Схема изменений в эритропе в восстановительном периоде после подострого воздействия ПХБ в дозе 1/20 ЛД₅₀



* Гайсин А. Ф., 2002

Рис. 9. Схема изменений в эритропе в восстановительном периоде после подострого воздействия ПХБ в дозе 1/40 ЛД₅₀

ВЫВОДЫ

1. Восстановительный период после введения различных доз ПХБ составляет не менее двух месяцев, характеризуется значительными нарушениями как в периферическом, так и в центральном звене эритрона.
2. При дозе 1/2 ЛД₅₀ улучшение общего состояния крыс (нормализация аппетита, повышение двигательной активности) наблюдается с первой недели, в группе 1/20 ЛД₅₀ - с 21-х суток, в группе 1/40 ЛД₅₀ отмечается более

длительное сохранение последствий интоксикации вплоть до 56-х суток восстановительного периода.

3. В группе крыс, получивших интоксикант в дозе $1/2 \text{ ЛД}_{50}$ к 56-м суткам восстановительного периода эритропоэз активируется за счет дифференциации КОЕэ в эритробластических островках, в том числе в «короне» ЭОЗ, повышается осмотическая и кислотная резистентность эритроцитов (в крови увеличивается содержание повышеннотойких и снижается - пониженно- и низкостойких эритроцитов), что сочетается с умеренным ретикулоцитозом, также снижается кроворазрушение в селезенке.

4. В группе крыс, получивших интоксикант в дозе $1/20 \text{ ЛД}_{50}$ в течение всего срока наблюдения в восстановительном периоде обнаружено снижение осмотической и кислотной резистентности эритроцитов (повышается содержание низкостойких, пониженнотойких эритроцитов и снижено содержание среднестойких эритроцитов), что синхронизуется с признаками усиленного кроворазрушения в селезенке. До 42-х суток восстановительного периода регистрируется активация пролиферативных процессов в эритроидном ростке костного мозга, а с 42-х по 56-е сутки отмечается снижение формирования ЭО de novo к контрольному уровню, торможение созревания ЭО2 в ЭОЗ и ЭОинв. На протяжении всего опыта у крыс насыщение эритроцитов гемоглобином было снижено, с наименьшими значениями к 42-м и 56-м суткам после окончания поступления интоксиканта в организм крыс.

5. В группе крыс, получивших интоксикант в дозе $1/40 \text{ ЛД}_{50}$ в восстановительном периоде имеет место повышение доли низко- и пониженнотойких эритроцитов, составляющих до 30% от общей популяции эритроцитов, на 28-49-е сутки наблюдения после прекращения поступления интоксиканта в организм крыс, с резким нарастанием (до 75%) доли пониженнотойких эритроцитов на 49-56-е сутки опыта. Интенсивность гистохимической реакции на железо в тканях селезенки была резко выраженной уже на 28-е сутки восстановительного периода с максимальными ее значениями также к 56-м суткам.

6. В костном мозге крыс, получивших интоксикант в дозе $1/40 \text{ ЛД}_{50}$ до 7-х суток восстановительного периода преобладало формирование ЭО de novo, с увеличением против контроля в 9 и 6 раз соответственно абсолютного

количества ЭО1 и ЭО2. С 14-х по 49-е сутки интенсивность формирования ЭО1 снижалась, но абсолютное содержание ЭО2 в 2-6, ЭО3 – в 1,8-4,5 раза превышали контрольный уровень, при резко сниженном, по сравнению с нормой, содержании абсолютного количества ЭОинв. Подъем доли низкостойких эритроцитов на 49-56-е сутки опыта был синхронизирован с активацией формирования ЭО de novo.

7. В восстановительном периоде во всех опытных группах крыс повышенное кроворазрушение эритроцитов не приводило к снижению уровня эритроцитов ниже значений, зарегистрированных у контрольных животных. Это свидетельствует о сохранных компенсационных возможностях эритроидного ростка костного мозга и регуляторных систем, стимулирующих воспроизводство эритроцитов, у получивших ПХБ животных в дозах $1/2$ ЛД₅₀, $1/20$ ЛД₅₀ и $1/40$ ЛД₅₀ в восстановительном периоде.

8. Установлена обратная зависимость проявлений нарушений в эритроне от дозы ПХБ после прекращения поступления интоксиканта в организм крыс. Выраженность нарушений в периферическом и центральном отделе эритрона наблюдалась после введения меньших доз ПХБ.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Результаты проведенной нами работы свидетельствуют о наибольшем повреждающем эффекте малых доз ПХБ, который продолжает усиливаться в течение срока эксперимента (два месяца), что требует постоянного контроля системы крови у лиц, длительно контактирующих с диоксиноподобными соединениями в производстве, а именно исследования развернутой картины крови с обязательным обследованием индексов красной крови, что позволяет судить о характере полноценности производимых костным мозгом эритроцитов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Анализ гематологических показателей крыс при интоксикации полихлорированными бифенилами [Текст] // Материалы Республиканской научной конференции молодых ученых «Медицинская Наука – 2003». – Уфа. – с.50-51.

2. Исследование характера кроворазрушения по отложению железа в селезенке и печени крыс при интоксикации полихлорированными бифенилами [Текст] // Материалы IX Всероссийской научно-практической конференции «Молодые ученые в медицине». – Казань. - 2004. - с. 122.
3. Изменения в периферическом звене эритрона при воздействии различных доз полихлорированных бифенилов у экспериментальных животных [Текст] // Материалы Всероссийской конференции молодых исследователей «Физиология и медицина». – С.-Петербург. - 2005. - с. 14.
4. Оценка общего состояния экспериментальных животных при воздействии различных доз полихлорированных бифенилов [Текст] // Материалы Всероссийской конференции молодых исследователей «Физиология и медицина». – С.-Петербург. - 2005. - с. 14.
5. Анализ изменения резистентности эритроцитов при интоксикации полихлорированными бифенилами [Текст] // Материалы 70-й Республиканской научной конференции молодых ученых с международным участием. – Уфа. - 2005. - с. 45.
6. Анализ показателей периферической крови в восстановительном периоде после подострой интоксикации экспериментальных крыс полихлорированными бифенилами [Текст] // Материалы Межрегиональной научно-практической конференции с международным участием «Типовые патологические процессы». – Уфа. - 2005. – с. 42-44.
7. Динамика показателей эритрона в восстановительном периоде после подострой интоксикации экспериментальных крыс полихлорированными бифенилами [Текст] // Материалы Республиканской конференции молодых ученых Республики Башкортостан «Новые технологии в медицине - 2005». – Уфа. – 2005. – с. 10-12.
8. Исследование показателей периферической крови в восстановительном периоде после подострой интоксикации крыс полихлорированными бифенилами [Текст] // Материалы I Съезда физиологов СНГ. – Сочи. - 2005. - с. 173-174.