

© С.В.Барабанова, Ю.В.Андреева, З.Е.Артюхина, К.Т.Овчинникова, С.В.Перекрест, В.Роджерс, Е.А.Корнева, 2007
УДК 616.5-08.832.42]:611.018.5+611.018.46-092.4

*С.В. Барабанова, Ю.В. Андреева, З.Е. Артюхина, К.Т. Овчинникова,
С.В. Перекрест, В.Роджерс, Е.А.Корнева*

КЛЕТочный СОСТАВ КРОВИ И КОСТНОГО МОЗГА КРЫС ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ЦИКЛОФОСФАМИДА И ОБЛУЧЕНИЯ КОЖИ ЭЛЕКТРОМАГНИТНЫМИ ВОЛНАМИ КРАЙНЕ ВЫСОКОЙ ЧАСТОТЫ

*S.V. Barabanova, Yu.V. Andreeva, Z.E. Artyukhina, K.T. Ovchinnikova,
S.V. Perekrest, V. Rogers, E.A. Korneva*

CELLULAR COMPOSITION OF BLOOD AND BONE MARROW OF RATS AFTER ADMINISTRATION OF CYCLOPHOSPHAMIDE AND IRRADIATION OF SKIN WITH EXTREMELY HIGH FREQUENCY WAVES

Отдел общей патологии и патологической физиологии Научно-исследовательского института экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, Россия, Институт биоинформационных исследований, Филадельфия, США

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬЮ ИССЛЕДОВАНИЯ являлся мониторинг клеточного состава крови и костного мозга крыс через 24 часа и 7 суток после однократной внутрибрюшинной инъекции циклофосфамида (20 и 40 мг/массы тела животного) и попытка коррекции наблюдающихся изменений при помощи облучения кожи электромагнитными волнами крайне высокой частоты (КВЧ). **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Эксперименты проведены на 50 крысах-самцах линии Вистар. Определены изменения относительного и абсолютного количества лейкоцитов крови и миелокарицитов костного мозга через 24 часа и 7 суток после инъекции циклофосфамида (20 и 40 мг/кг массы тела животного), КВЧ-облучения кожи (37-53 GHz, 7,1 мм, 20 мВт) и при сочетании этих воздействий. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** Показано, что однократное в/б введение циклофосфамида приводит к снижению количества нейтрофилов и лимфоцитов в крови, лимфоидных клеток и общего количества недифференцированных клеточных элементов костного мозга через 24 часа после инъекции. Через 7 суток отмечена лимфопения и увеличение количества недифференцированных клеточных элементов в костном мозге. КВЧ-облучение кожи приводит к повышению количества палочкоядерных нейтрофилов в крови, уменьшению количества палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов в костном мозге крыс через 24 часа и нивелирует циклофосфамид-индуцированное повышение количества недифференцированных клеток костного мозга через 7 суток после воздействия. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Введение циклофосфамида вызывает цитопению в крови и костном мозге крыс через 24 часа. Через 7 суток после введения циклофосфамида в костном мозге количество зрелых форменных элементов остается пониженным, но возрастает число недифференцированных клеточных форм. КВЧ-облучение кожи приводит к снижению степени интенсивности наблюдаемых изменений.

Ключевые слова: циклофосфамид, КВЧ, лимфоциты, нейтрофилы, кровь, костный мозг.

ABSTRACT

THE AIM of the research was to monitor the content of blood cells and bone marrow of rats in 24 hours and 7 days after a single intraperitoneal injection of cyclophosphamide (20 and 40 mg of body weight of the animal) and to attempt correction of the observed alterations using irradiation of the skin with extremely high frequency (EHF) waves. **MATERIAL AND METHODS.** The experiments were performed in 50 male Wister rats. The quantity of blood leukocytes and bone marrow myelocytes were determined in 24 hours and 7 days after injection of cyclophosphamide (20 and 40 mg), EHF irradiation of the skin (37-53 GHz, 7.1 mm, 20 mWt), and a combination of these factors. **RESULTS.** A single i.p. injection of cyclophosphamide was shown to result in a decreased quantity of blood neutrophils and lymphocytes, lymphoid cells and total quantity of nondifferentiated cell elements of the bone marrow in 24 hours after injection. Lymphopenia and increased number of nondifferentiated cell elements of the bone marrow were noted in 7 days after injection. EHF irradiation of skin leads to the increased quantity of band neutrophils in blood and decreased band and segmental neutrophils in bone marrow of rats in 24 hours and levels the cyclophosphamide-induced increase of the quantity of nondifferentiated cells in bone marrow in 7 days. **CONCLUSION.** Injection of cyclophosphamide causes cytopenia in blood and bone marrow of rats in 24 hours. In 7 days after injection of cyclophosphamide the quantity of mature cells remains diminished, but the number of nondifferentiated cell forms is increased. EHF irradiation of skin leads to decreased intensity of the observed alterations.

Key words: cyclophosphamide, EHF, lymphocytes, neutrophils, blood, bone marrow.

ВВЕДЕНИЕ

Препараты цитостатического действия широко применяются при комплексной терапии нефро-

логических, онкологических и аутоиммунных заболеваний [1]. Одной из существенных проблем, которые возникают при проведении данной терапии,

является неизбежным повреждающим действием цитостатиков на все быстроделющиеся клетки, в том числе и иммунокомпетентные. Применение циклофосфида (ЦФ) приводит к значительному снижению количества лимфоцитов в крови, подавлению их функциональной активности и оказывает токсическое воздействие на костный мозг [2,3,4]. Последствиями лейкопении являются инфекционные осложнения, которые развиваются в основном в период наибольшего снижения количества лейкоцитов в крови пациентов.

Известно, что применение ЦФ в основном приводит к повреждению или гибели кроветворных клеток, находящихся на поздних стадиях развития. Поскольку препарат не обладает кумулятивным угнетающим действием на костномозговое кроветворение, после прекращения химиотерапии численность популяций костномозговых клеток восстанавливается за счет костномозгового резерва стволовых клеток и клеток-предшественников.

Поскольку показано, что КВЧ-облучение способствует нормализации функционального состояния клеток крови при разных формах патологии [5] и КВЧ-терапия используется в настоящее время при лечении заболеваний различной этиологии: неврологических [6,7], кардиологических [8], онкологических [9] и ряда других, представлялось целесообразным провести анализ изменений количества клеток крови и дифференцированных клеточных элементов костного мозга, вызываемых введением циклофосфида и попытаться воздействовать на интенсивность этих изменений, применив КВЧ-облучение кожи.

Целью данной работы являлось исследование влияния в/б введения циклофосфида и КВЧ-облучения кожи на клеточный состав крови и костного мозга крыс.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперименты выполнены на 50 крысах-самцах линии «Wistar» массой 180-220 г. До введения в эксперимент животных в течение 5 дней адаптировали к экспериментальной обстановке: каждый день в 10 часов утра крыс помещали в пластмассовые цилиндрические контейнеры, соответствующие размеру крысы. Через 2-3 дня животные привыкали к помещению в контейнер и спокойно находились в них сначала в течение 20, а затем – 30 и 40 минут.

Источником КВЧ-излучения служил генератор электромагнитного поля (модель G4-141, г. Пушкино, Россия), с диапазоном частот 37-53 GHz. Крыс подвергали КВЧ-облучению при длине волны 7,1 мм и мощности 20 мВт. Кожу крыс облучали в трех

точках: кожу обеих голени 3 мм ниже и 3 мм латеральнее центра колена и кожу на задней поверхности шеи между 7-м шейным и 1-м грудным позвонками по медиальной линии (соответственно проекциям St 36 и DU 14 акупунктурных точек). КВЧ-облучение проводили двукратно по 40 минут с 40-минутным интервалом между облучениями.

Циклофосфамид вводили однократно, внутривентрально в дозе 20 и 40 мг на кг массы тела животного сразу же после окончания первого 40-минутного КВЧ-облучения.

Все исследования были проведены на животных следующих экспериментальных групп: 1- находящиеся в контейнере, подвергнутые ложному облучению (с присоединением волноводов, но не при включенном аппарате) и однократной в/б инъекции физиологического раствора (ФР); 2 – подвергнутые ложному облучению и однократной в/б инъекции ЦФ в дозе 20 мг/кг; 3 – подвергнутые ложному облучению и получившие однократную в/б инъекцию ЦФ в дозе 20 мг/кг; 4 – подвергнутые КВЧ-облучению двукратно по 40 мин с однократной инъекцией ФР; 5 – подвергнутые КВЧ-облучению двукратно по 40 мин с введением ЦФ в дозе 20 мг/кг; 6 – подвергнутые КВЧ-облучению двукратно по 40 мин с введением ЦФ в дозе 40 мг/кг.

Относительное количество форменных элементов крови и костного мозга определяли, подсчитывая на мазках цельной крови (окрашенных по Май-Грюнвальду) количества отдельных видов клеток на каждые 100 форменных элементов крови. Для пересчета в абсолютные величины подсчитывали в камере Горяева общее количество лейкоцитов крови или миелокариоцитов.

Забор крови осуществляли из левого желудочка сердца. Для оценки морфологического состава костного мозга вычленили бедренную кость крысы, удаляли мягкие ткани и проксимальный эпифиз, в дистальный эпифиз вводили иглу и выдували с помощью резинового баллона костный мозг на предметное стекло. Костный мозг суспендировали на предметном стекле с помощью капилляра. Затем 5 мкл суспензии переносили в 200 мкл аутентичной сыворотки и тщательно перемешивали встряхиванием. Смесь костного мозга и сыворотки разбавляли 3% уксусной кислотой до получения разведения 1:1000. Полученную гомогенную костномозговую взвесь использовали для подсчета абсолютного количества ядросодержащих клеток костного мозга (миелокариоцитов) на единицу объема в камере Горяева по стандартной методике.

Приготовленные нефиксированные мазки из смеси костного мозга и сыворотки окрашивали краской Май-Грюнвальда (неразбавленной) в те-

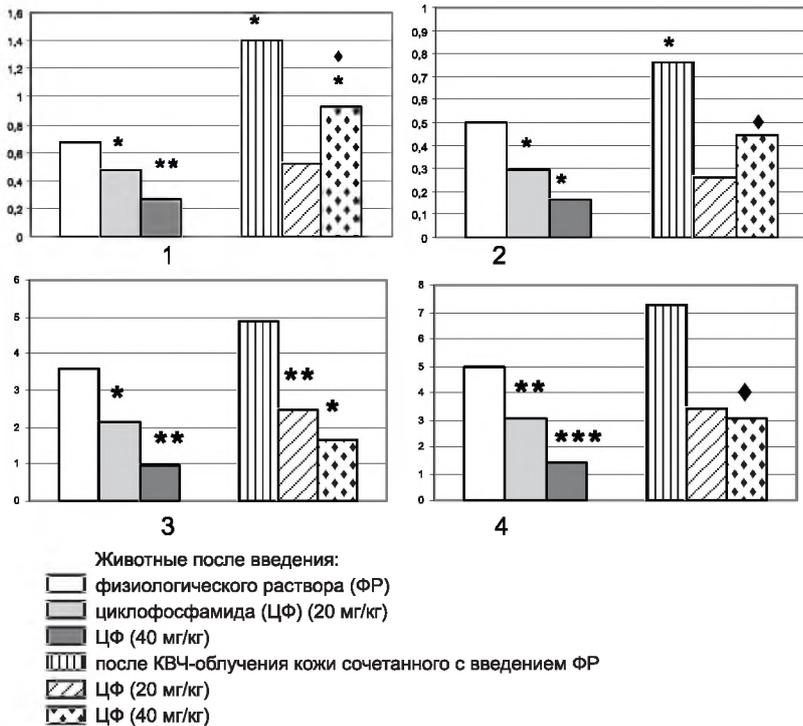


Рис. 1. Количество лейкоцитов крови крыс через 24 часа после в/б введения циклофосфамида и КВЧ-облучения кожи. 1 – палочкоядерные нейтрофилы, 2 – сегментоядерные нейтрофилы, 3 – лимфоциты, 4 – общее количество лейкоцитов. По оси ординат количество клеток ($\times 10^9/\text{мл}$). * – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$; *** – $P < 0,001$ – по сравнению с количеством клеток после введения ФР; ♦ – $P < 0,05$ – по сравнению с количеством клеток после введения циклофосфамида в дозе 40 мг/кг.

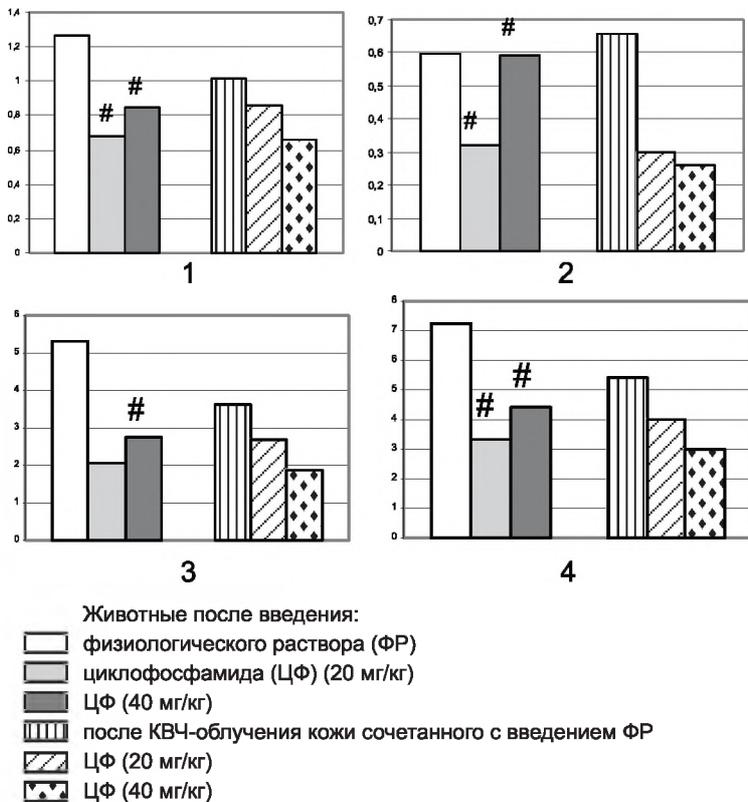


Рис. 2. Количество лейкоцитов крови крыс через 7 суток после в/б введения циклофосфамида и КВЧ-облучения кожи. 1 – палочкоядерные нейтрофилы, 2 – сегментоядерные нейтрофилы, 3 – лимфоциты, 4 – общее количество лейкоцитов. По оси ординат количество клеток ($\times 10^9/\text{мл}$). # – $P < 0,05$ – по сравнению с соответствующими показателями через 24 часа после воздействия.

чение 3 минут, затем с добавлением воды 1:1 в течение 1 минуты. Промывали и высушивали. Затем окрашивали краской Романовского-Гимзе (в разведении 1:30 с PBS) в течение 30 минут. Общую миелограмму подсчитывали путем дифференциации 400 клеток с последующим пересчетом в абсолютные величины.

Полученные результаты анализировали стандартными методами вариационной статистики (программа «Statistica»), определяя достоверность полученных изменений при помощи t-критерия Стьюдента. Для оценки взаимосвязи изменений клеточного состава крови и костного мозга применяли корреляционный анализ.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе работы оценивали лейкоцитарный состав крови и костного мозга: количество палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов крови и костного мозга, общее количество лейкоцитов крови и миелокарицитов костного мозга.

Кроме того, в костном мозге определяли общее число дифференцированных (зрелых форменных элементов) и недифференцированных клеточных форм (ядро-содержащих клеток, у которых отсутствуют характерные морфологические признаки зрелых форменных элементов). Проведенные исследования позволили выявить изменения клеточного состава крови и костного мозга крыс при в/б введении ЦФ и КВЧ-облучении кожи крыс.

Клеточный состав крови крыс после в/б введения ЦФ и КВЧ-облучения кожи. Через 24 часа после инъекций ЦФ в дозах 20 и 40 мг/кг наблюдали снижение числа палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов, лимфоцитов и общего числа лейкоцитов крови крыс по сравнению с показателями, характерными для животных, которым вводили ФР (рис. 1).

КВЧ-облучение кожи приводило к увеличению числа палочкоядерных нейтрофилов в крови животных, которым вводили ФР или ЦФ в дозе 40 мг/кг (см. рис. 1). Общее количество лейкоцитов, палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов при сочетании КВЧ-облучения и введения

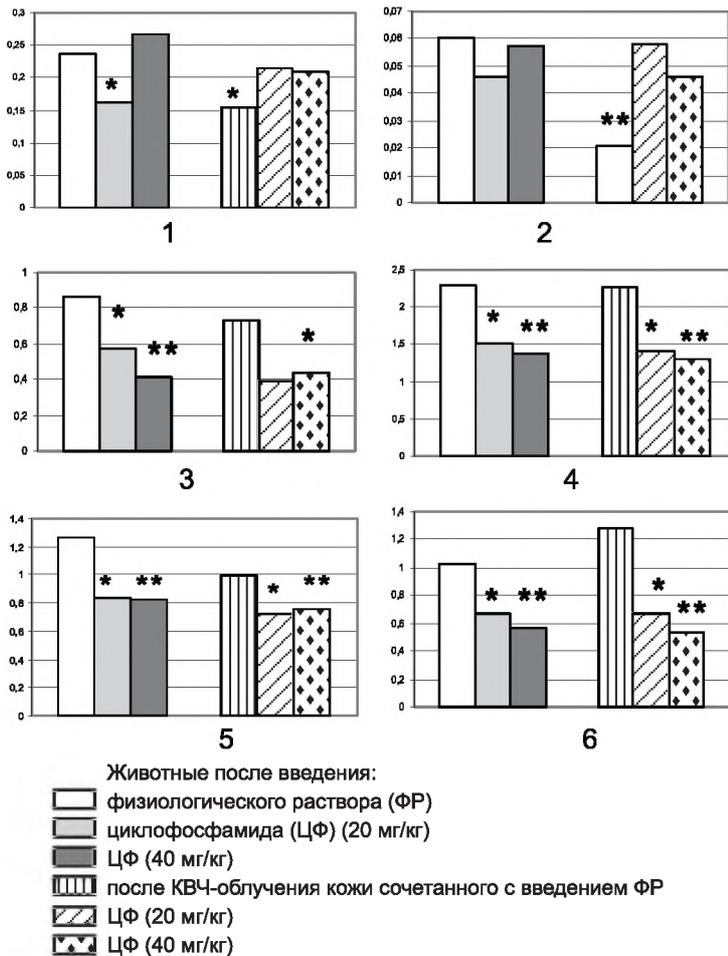


Рис. 3. Количество клеток в костном мозге крыс через 24 часа после в/б введения циклофосфамида и КВЧ-облучения кожи. 1 – палочкоядерные нейтрофилы, 2 – сегментоядерные нейтрофилы, 3 – лимфоциты, 4 – миелокарициты, 5 – дифференцированные клетки, 6 – недифференцированные клетки. По оси ординат количество клеток ($\times 10^9/\text{мл}$). * – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$ – по сравнению с количеством клеток после введения ФР.

циклофосфамида в дозе 40 мг/кг было выше, чем при применении только циклофосфамида.

Через 7 суток после введения ЦФ или КВЧ-облучения кожи достоверных изменений клеточного состава крови крыс не обнаружено (рис. 2).

Количество палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов, лимфоцитов и общее количество лейкоцитов через 7 суток после введения ЦФ (20 и 40 мг/кг) было выше, чем через 24 часа после этих инъекций (рис. 2).

Клеточный состав костного мозга крыс после в/б введения ЦФ и КВЧ-облучения кожи. Применение ЦФ в дозах 20 и 40 мг/кг приводило к уменьшению количества палочкоядерных нейтрофилов, лимфоцитов, общего количества миелокарицитов, дифференцированных и недифференцированных клеток костного мозга через 24 часа после введения (рис. 3).

КВЧ-облучение кожи в сочетании с введением физиологического раствора приводило к снижению

количества палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов через 24 часа после воздействия по сравнению с их числом у интактных животных. На фоне введения циклофосфамида подобного эффекта применения КВЧ-облучения не наблюдали (рис. 3).

Через 7 суток после инъекции ЦФ в дозе 20 мг/кг происходило снижение количества лимфоцитов и общего числа дифференцированных клеточных форм костного мозга крыс (рис. 4) по сравнению с их количеством у животных, которым вводили ФР. Применение ЦФ в дозе 40 мг/кг вызывало уменьшение количества лимфоцитов и общего числа дифференцированных клеток и повышало количество недифференцированных клеточных форм. При сочетании КВЧ-облучения и введения ЦФ в дозе 40 мг/кг выявлено снижение общего количества недифференцированных клеточных форм.

В костном мозге, так же как и в периферической крови, наблюдали различия между изменением количества форменных элементов через 24 часа и 7 суток после воздействия. Через 7 суток после введения ЦФ в дозе 20 мг/кг количество палочкоядерных нейтрофилов, дифференцированных и недифференцированных клеток костного мозга, общее количество лейкоцитов выше, чем через 24 часа после введения препарата. При сочетании введения ЦФ и КВЧ-облучения кожи через 7 дней также наблюдали повышение количества лимфоцитов (20 и 40 мг/кг), дифференцированных (40 мг/кг) и недифференцированных (20 и 40 мг/кг) клеточных форм и общего количества миелокарицитов (40 мг/кг) по сравнению с их количеством, характерным для результатов исследования клеточного состава костного мозга через 24 часа после воздействия (рис. 4).

Таким образом, в ходе проведенного исследования определено, что через 24 часа после введения циклофосфамида наблюдается цитопения в крови и костном мозге крыс. Через 7 суток после введения циклофосфамида количество зрелых форменных элементов в костном мозге остается пониженным, но возрастает число недифференцированных клеточных форм. КВЧ-облучение кожи приводит к снижению степени интенсивности наблюдаемых изменений.

ОБСУЖДЕНИЕ

Как выяснилось в ходе проведенного исследования, уменьшение количества лейкоцитов в крови

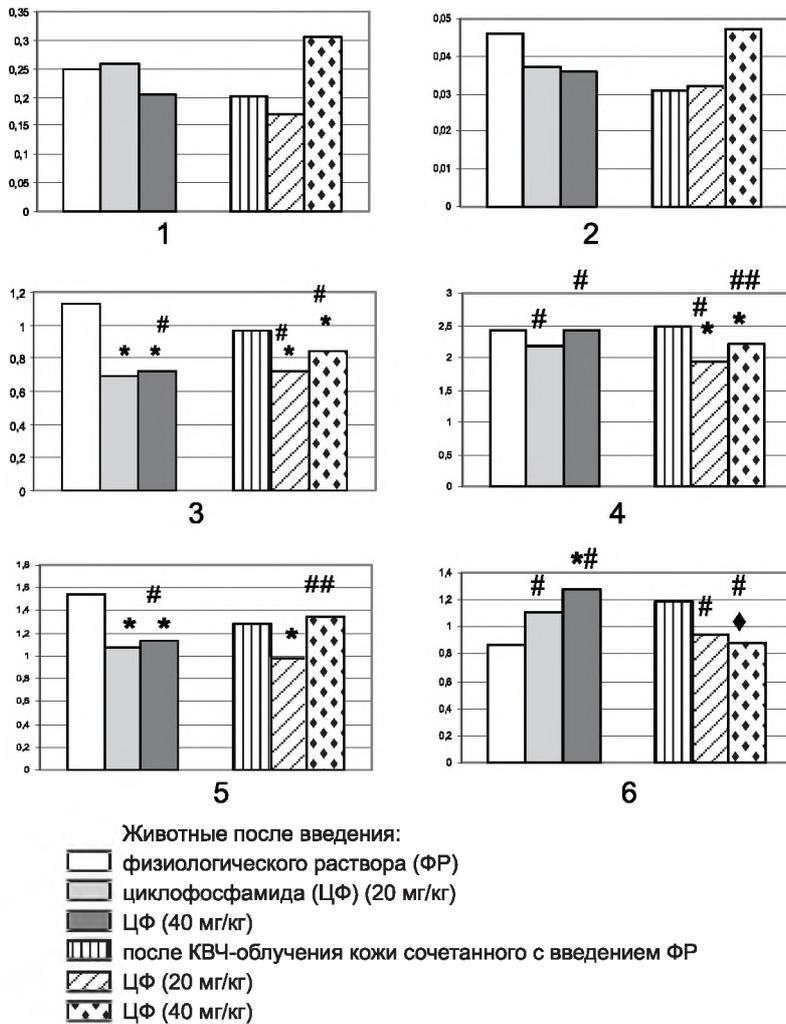


Рис. 4. Количество клеток в костном мозге крыс через 7 суток после в/б введения циклофосфамида и КВЧ-облучения кожи. 1 – палочкоядерные нейтрофилы, 2 – сегментоядерные нейтрофилы, 3 – лимфоциты, 4 – миелокарициты, 5 – дифференцированные клетки, 6 – недифференцированные клетки. По оси ординат количество клеток ($\times 10^9/\text{мл}$). * – $P < 0,05$ – по сравнению с количеством клеток после введения ФР. ♦ – $P < 0,05$ – по сравнению с количеством клеток после введения циклофосфамида в дозе 40 мг/кг; # – $P < 0,05$; ## $P < 0,01$ – по сравнению с соответствующими показателями через 24 часа после воздействия.

крыс, через 24 часа после в/б введения ЦФ (20 и 40 мг/кг) происходит в результате снижения количества клеток основного гранулоцитарного звена (палочкоядерные и сегментоядерные нейтрофилы) и лимфоидных клеток. В костном мозге при введении ЦФ в дозах 20 и 40 мг/кг выявлено уменьшение количества лимфоцитов, общего количества миелокарицитов, дифференцированных и недифференцированных клеток, а при введении ЦФ в дозе 20 мг/кг – палочкоядерных нейтрофилов. Известно, что для нейтрофилов характерна высокая скорость замещения циркулирующих клеток. Одновременное уменьшение количества нейтрофилов в крови и костном мозге может свидетельствовать об угнетении одного или более этапов развития пролиферирующего пула нейтрофильных гранулоцитов. Уменьшение числа лимфоцитов в крови

может быть связано не только с возможной гибелью клеток, находящихся в стадии пролиферации [10], но и их перераспределением между кровью и лимфоидной системой [11].

Через 7 суток после в/б введения ЦФ не обнаружено изменений клеточного состава крови, тогда как в костном мозге наблюдается выраженная лимфопения, а количество недифференцированных клеточных форм увеличивается, что свидетельствует об активации процесса гемопоэза [13]. Данный факт может отражать как развитие компенсаторной реакции на элиминацию клеток при применении цитостатика, так и аномальное увеличение пролиферативной активности клеток костного мозга. Известно, что применение циклофосфамида при противоопухолевой химиотерапии может приводить к возникновению вторичных злокачественных образований, в том числе миелом [12].

Следует отметить, что в ряде случаев зарегистрировано более высокое количество клеточных элементов в крови и костном мозге через 7 суток после воздействия, по сравнению с их количеством, регистрируемым через 24 часа после воздействия. Гипермиелопоэз через 7-10 суток после однократного введения цитостатических препаратов, в том числе цитоксана, показан при исследованиях морфологических изменений костного мозга [13].

Через 24 часа после КВЧ-облучения кожи, сочетанного с введением физиологического раствора, повышается количество палочкоядерных нейтрофилов в крови и уменьшается количество палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов в костном мозге крыс, что может свидетельствовать о стимулирующем влиянии КВЧ-облучения кожи на процесс миграции нейтрофилов из костного мозга в кровяное русло, хотя статистически значимой корреляции между этими изменениями выявлено не было. Не исключено, что возрастание количества нейтрофилов в крови связано также с мобилизацией секвестрированных (находящихся в депонированном состоянии) нейтрофилов. Увеличение количества палочкоядерных форм нейтрофилов в костном мозге через 24 часа происходило также и при КВЧ-облучении кожи на фоне введения ЦФ в дозе 40 мг/кг по сравнению с эффектом действия ЦФ.

Через 7 суток применение КВЧ-облучения кожи нивелировало ЦФ-индуцированное повышение количества недифференцированных клеток костного мозга, но изменений в количестве зрелых форменных элементов крови и костного мозга не наблюдали. Вероятно КВЧ-облучение кожи снижает избыточное повышение пролиферативной активности клеток костного мозга, вызванное действием циклофосфида.

В ряде работ показано, что клетки крови чувствительны к КВЧ-воздействию. Например, при псориазе изменяются морфо-функциональные характеристики эритроцитов, а применение КВЧ-воздействия приводит к их нормализации [5].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, введение циклофосфида вызывает цитопению в крови и костном мозге крыс через 24 часа. Через 7 суток после введения циклофосфида в костном мозге количество зрелых форменных элементов остается пониженным, но возрастает число недифференцированных клеточных форм. КВЧ-облучение кожи приводит к снижению степени интенсивности наблюдаемых изменений, что выражается в нивелировании ЦФ-индуцированного снижения количества нейтрофилов крови через 24 часа и повышения количества недифференцированных клеток костного мозга через 7 суток после воздействия.

Авторы выражают благодарность Фонду Р.Фокса за финансовую поддержку данного исследования.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Donadio J, Glassock R. Immunosuppressive drug therapy in lupus nephritis. *Am J Kidney Dis* 1993; 21(3): 239-250
2. Janni W, Rjosk D, Strobl B et al. Chemotherapy-associated myelosuppression in gynecological oncology. *Gynakol Geburtshilfliche Rundsch* 2001;41(3):166-73
3. Mazur L, Augustynek A, Deptala A et al. Effects of WR-2721 and cyclophosphamide on the cell cycle phase specificity of apoptosis in mouse bone marrow. *Anticancer Drugs* 2002; 13(7):751-758
4. Zandvoort A, Lodewijk ME, Klok PA et al. Slow recovery of follicular B cells and marginal zone B cells after chemotherapy: implications for humoral immunity. *Clin Exp Immunol* 2001;124(2):172-179
5. Преснухина НГ, Дерюгина АВ, Крылов ВН. Влияние электромагнитных волн миллиметрового диапазона на морфо-функциональные показатели периферической крови. *Вестник Нижегородского ун-та. Сер Биология* 2000, 1(6): 51-57
6. Ронкин МА, Бецкий ОВ, Максименко ИМ и др. О лечебном эффекте КВЧ-воздействия у неврологических больных. В: Девятков НД, Бецкой ОВ, ред. *Миллиметровые волны в медицине. Сборник статей*. Том 1. М., 1991; 92-95
7. Скопюк МИ, Соловьева АА. Эффективность и безопасность микроволновой и резонансной терапии в лечении детского церебрального паралича: двойное слепое перекрестное исследование. *Physics Alive* 1994;2(1): 91-101
8. Моисеев ВН, Константинов ИВ, Левыкина ИГ. Результаты лечения больных ишемической болезнью сердца электромагнитным излучением миллиметрового диапазона. В: Девятков НД, Бецкой ОВ, ред. *Миллиметровые волны в медицине. Сборник статей*. Том 1. М., 1991; 48-51
9. Грубник БП, Ситько СП, Шалимов АА. Опыт применения технологии «Ситько-МРТ» для реабилитации онкологических больных III-IV стадии. *Physics Alive* 1998; 6(1): 97-102
10. Латипова НС, Аляви АЛ. Хромосомные aberrации в лимфоцитах больных системной красной волчанкой в динамике цитостатической терапии. *Тер арх* 2002; (5):35-38
11. Мосягина ЕН, Владимирская ЕБ, Торубарова НА, Мызина НВ. *Кинетика форменных элементов крови*. М., 1976; 281
12. Bernard-Marty C, Mano M, Paesmans M et al. Second malignancies following adjuvant chemotherapy: 6-year results from a Belgian randomized study comparing cyclophosphamide, methotrexate and 5-fluorouracil (CMF) with an anthracycline-based regimen in adjuvant treatment of node-positive breast cancer patients. *Ann Oncol* 2003; 14:693-698
13. Дыгай АМ, Жданов ВВ, Поженко НС и др. Участие костномозговых фибробластов в восстановлении гранулоцитопоза при цитостатических миелосупрессиях. *Бюлл эксперим биол мед* 2000; 129(5): 528-531

Поступила в редакцию 15.03.2007 г.

Принята в печать 07.06.2007 г.