

© Коллектив авторов, 2017
УДК 616.155.194.18-021.5-092

Косарева П.В., Сивакова Л.В., Самodelкин Е.И., Шаклеина С.М., Федык О.В.

Аутоиммунные реакции и реакция костного мозга крыс при приобретенной токсической гемолитической анемии на фоне острого стресса

Государственное бюджетное учреждение высшего профессионального образования «Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера» Минздрава России, 614000, г. Пермь, Россия, ул. Петропавловская, д. 26

Цель исследования — изучение в эксперименте иммунных реакций и реакции костного мозга при приобретенной токсической гемолитической анемии на фоне острого стресса. **Методика.** Использовано 120 нелинейных белых крыс; моделирование гемолитической анемии (ГА) осуществляли однократным внутривенным введением 2,5% раствора фенилгидразина — 20 мг/кг или 2-бутоксизэтанола — 20 мг/кг массы тела. У части животных применяли острый холодный стресс (температура +4°C, экспозиция — 1,5 ч) через 1 сут. после введения токсического агента. **Результаты.** Фенилгидразин (ФГ) и бутоксиэтанол (БЭ) вызывают развитие токсической гемолитической анемии с аутоиммунным компонентом. В случае действия ФГ анемия была макроцитарной, гиперрегенераторной, гипохромной, в случае действия БЭ — нормохромной. Оба агента стимулируют в конечном итоге эритропоэз в костном мозге, но их действие принципиально различно в отношении мегакариоцитарного ростка. ФГ статистически значимо подавляет мегакариоцитопоэз, БЭ, напротив, интенсивно его стимулирует. Вероятно, этот эффект БЭ связан с его способностью влиять на дифференцировку клеток мегакариоцитарного ростка посредством изменения структуры аминокислот или ферментов. В условиях воздействия на костный мозг токсических агентов с гемолитическим эффектом характерные изменения со стороны эритроцитарного и мегакариоцитарного ростков, возникающие при остром стрессе, могут усиливаться или ослабляться в зависимости от природы действующего токсического агента.

Ключевые слова: токсическая гемолитическая анемия; фенилгидразин; бутоксиэтанол; мегакариоцитопоэз; аутоиммунные реакции.

Для цитирования: Косарева П.В., Сивакова Л.В., Самodelкин Е.И., Шаклеина С.М., Федык О.В. Аутоиммунные реакции и реакция костного мозга крыс при приобретенной токсической гемолитической анемии на фоне острого стресса. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(1): 58–64.

Для корреспонденции: Косарева Полина Владимировна, доктор мед. наук, гл. науч. сотр. отдела морфологических и патофизиологических исследований ЦНИЛ, зав. курсом клинической лабораторной диагностики каф. микробиологи, вирусологии с курсом КЛД, e-mail: perm-bagira@narod.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 10.06.2016.

Kosareva P.V., Sivakova L.V., Samodelkin E.I., Shakleina S.M., Fedyk O.V.

Autoimmune reactions and reactions of rats bone marrow at acquired toxic hemolytic anemia with acute stress

SBEI HPT «Perm State University of Medicine named after ac. E.A. Wagner» of the RF Ministry of Health; 614000, Russia, Perm, Petropavlovskaya street, 26

The purpose: to study of immune responses and bone marrow toxic reaction at hemolytic anemia with acute stress in experiment. **Methods.** 120 nonlinear albino rats; GA simulation was performed by a single intraperitoneal injection of 2.5% solution of phenylhydrazine (FG) — 20 mg/kg, or 2-butoxyethanol (BE) — 20 mg/kg body weight. Some animals used acute cold stress (temperature of 4°C, the exposure — 1.5 hours), a day after the introduction of a toxic agent. **Results.** FG and BE cause toxic acquired GA with an autoimmune component, macrocytic, hyper regenerative, but in the case of actions FG — hypochromic, in the case of actions EB — normochromic. With respect to effects on bone marrow, both agents stimulate erythropoiesis eventually, but their action is fundamentally different in relation megakaryocytic germ. FG significantly suppresses megakaryocytopoiesis, BE, on the contrary, it actively promotes. Probably the effect of EB attributable to its ability to influence the differentiation of the germ cells of megakaryocytic by changing the structure of the amino acids or enzymes.

Keywords: acute stress, toxic hemolytic anemia; phenylhydrazine; butoxyethanol; megakaryocytopoiesis; autoimmune reaction.

For citation: Kosareva P.V., Sivakova L.V., Samodelkin E.I., Shakleina S.M., Fedyk O.V. Autoimmune reactions and reactions of rats bone marrow at acquired toxic hemolytic anemia with acute stress. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal). 2017; 61 (1): 58—64. (in Russ.)*.

For correspondence: Pauline V. Kosareva, Doctor of Medical Sciences, Head of Department of Morphological and Pathophysiological Studies of State Budgetary Institution of Higher Professional Education «Perm State Medical University named after EA Wagner» of Ministry of Health of Russian Federation, 26, ul. Petropaulovskaya, Perm, 614990, Russian Federation, Professor of Department of Human Ecological and life safety of Perm State National Research University, e-mail: perm-bagira@narod.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Information about authors: Kosareva P.V.: <https://orcid.org/0000-0002-0853-925X>

Received 10.06.2016

Введение

Приобретенные гемолитические анемии (ГА) — как аутоиммунные, так и токсические — чрезвычайно актуальны в последнее время в связи с постоянно возрастающими антигенными, в том числе, лекарственными, нагрузками и антропогенными факторами [1, 2]. При развитии приобретенной токсической гемолитической анемии нередко присутствует иммунный компонент [3—7]. Как правило, у таких больных отмечается положительный прямой антиглобулиновый тест: появление IgG или IgG и комплемента, в ряде случаев, комплемента, IgG и IgA [8—12]. Стандарты диагностики и терапии приобретенных гемолитических анемий остаются неизменными уже много лет. Необходимость длительного приема кортикостероидных препаратов, вновь выявляемые закономерности патогенеза диктуют разработку новых подходов к терапии ГА [13, 14].

Чрезвычайно актуально дальнейшее изучение отдельных моментов в патогенезе приобретенной токсической гемолитической анемии, иммунных реакций, сопровождающих токсические ГА, реакции костного мозга на введение различных токсических агентов с гемолитическим действием. Ответы на эти вопросы могут дать только экспериментальные исследования.

Цель исследования — изучение в эксперименте иммунных реакций и реакции костного мозга при приобретенной токсической гемолитической анемии на фоне острого стресса.

Методика

В эксперименте использовано 120 нелинейных белых крыс (самцов и самок) массой 150—200 г в возрасте 4 мес. Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к пище и воде и 12—14-часового светового дня. Эксперименты выполнены в соответствии с «Правилами проведения

работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 г. № 755) и «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» от 18.III.1986

Моделирование приобретенной гемолитической анемии осуществляли двумя следующими способами:

1 — однократным внутривенным введением 2,5% раствора фенилгидразина (ФГ) в дозе 20 мг/кг массы тела;

2 — введение бутоксиэтанола (БЭ) в дозе 20 мг/кг массы тела.

Часть животных подвергалась острому голодному стрессу (температура +4°C, экспозиция — 1,5 ч) через сутки после введения токсического агента.

Экспериментальные группы животных (в каждой группе по 20 крыс):

- интактные животные;
- введение фенилгидрозина — (ФГ);
- введение фенилгидрозина с последующим острым голодовым стрессом (ФГ + стресс);
- изолированный острый голодовой стресс — (стресс);
- введение бутоксиэтанола — (БЭ);
- введение бутоксиэтанола с последующим острым голодовым стрессом — (БЭ + стресс).

Ежедневное наблюдение за животными включало регистрацию поведения, внешнего вида, физиологических функций. До начала и по окончании исследования у животных регистрировали показатели периферической крови при помощи гематологического автоматического анализатора (Medonic M20, производство Boule Medical A.B., Швеция), для подсчета ретикулоцитов пользовались унифицированным методом подсчета ретикулоцитов после их окраски азуром II в пробирке. Кровь брали в количестве 100 мкл для получения эритромазсы, которую хранили при темпе-

ратуре +4°C с гемоконсервантом «Глюгидир» (Декстроза+Натрия цитрат&; ОАО «Синтез»; Россия, г.Курган) из расчета 1 объем глюгицира на 4 объема крови (согласно прилагаемой инструкции к препарату). По окончании исследований животных выводили из эксперимента путем перерезки спинного мозга под эфирным наркозом с соблюдением правил эвтаназии, брали материал для цитологического исследования — костный мозг из бедренной кости (для приготовления мазка). Осуществляли также взятие венозной крови для получения сыворотки и постановки реакции агглютинации с аутологичными эритроцитами, взятыми до эксперимента. Пробы инкубировали в течение 2 ч при температуре +4°C и затем — в течение 30 мин при температуре +37°C (для выявления действия тепловых и холодных антител). Результаты реакции оценивали общепринятым способом и выражали с учетом log-нормального распределения данных в виде log₂-обратных титров антител (Инструкция по применению диагностикума клещевого энцефалита сухого для РТГА, РСК, РРГ и РТНГА Минмедпрома СССР; 1990). Расчет log осуществляли при помощи таблицы log. Статистический анализ выполнен при помощи программного пакета Biostat и приложения Microsoft® Excel полнофункционального офисного пакета Microsoft Office 2007. При проведении исследований, характеризуя выборки, определяли выборочные средние величины, ошибку среднего и выборочное стандартное отклонение. Сравнение двух выборочных средних между собой осуществляли при помощи критерия Стьюдента. Для оценки различий между несколькими случайными выборками использовали метод однофакторного дисперсионного анализа. Результаты повторных измерений оценивали при помощи парного критерия Стьюдента. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали равным $p < 0,05$. Приводимые в статье числовые значения являются первичными, за исключением значений логарифмов, которые являются производными значениями.

Результаты и обсуждение

При проведении анализа показателей периферической крови животных установлено, что в группах ФГ и ФГ + стресс по окончании эксперимента наблюдалось статистически значимое снижение концентрации гемоглобина и количества эритроцитов по сравнению с исходными данными (табл. 1). В группе интактных животных и в группе стресс изменений в составе красной крови на протяжении эксперимента не отмечалось.

В группах ФГ и ФГ + стресс выявляли статистически значимое увеличение количества ретикулоцитов периферической крови; в группе стресс и контрольной группе этого явления не наблюдалось: интактные животные: $1,43 \pm 0,19\%$ до начала эксперимента, $1,79 \pm 0,24\%$ по окончании эксперимента ($p > 0,05$); ФГ: $1,557 \pm 0,129\%$ до начала эксперимента, $8,9 \pm 1,3\%$ по окончании эксперимента ($p < 0,05$); ФГ + стресс: $1,35 \pm 0,12\%$ до начала эксперимента, $7,68 \pm 0,41\%$ по окончании эксперимента ($p < 0,05$); стресс: $1,66 \pm 0,14\%$ до начала эксперимента, $1,99 \pm 0,15\%$ по окончании эксперимента ($p > 0,05$).

В опытных группах БЭ и БЭ + стресс к концу эксперимента также отмечалось статистически значимое снижение концентрации гемоглобина и уменьшение количества эритроцитов по сравнению с исходными данными (табл. 1). Статистически значимым было увеличение количества ретикулоцитов периферической крови: введение БЭ: $1,49 \pm 0,12\%$ до начала эксперимента, $4,02 \pm 0,46\%$ по окончании эксперимента ($p < 0,05$); введение БЭ в сочетании с острым стрессом: $1,66 \pm 0,12\%$ до начала эксперимента, $4,28 \pm 0,23\%$ по окончании эксперимента ($p < 0,05$).

Установлено, что введение ФГ сопровождается увеличением содержания гемоглобина в эритроцитах (MCH), среднего объема эритроцитов (MCV), распределения эритроцитов по объему (RDW) и снижением показателя MCHC. Изолированный стресс не меняет этих показателей (табл. 2), то есть, при моделировании ГА при помощи введения ФГ указанным способом была получена макроцитарная, гипохромная

Таблица 1

Концентрация гемоглобина (г/л) и количество эритроцитов ($\times 10^9$ в 1 мкл крови) в периферической крови экспериментальных животных, (M \pm m)

Экспериментальная группа	Количество эритроцитов в начале эксперимента	Количество эритроцитов в конце эксперимента	Уровень Hb в начале эксперимента	Уровень Hb в конце эксперимента
Интактные животные, n = 20	6,456 \pm 0,57	6,532 \pm 1,88	118,4 \pm 9,82	122,8 \pm 5,57
ФГ, n = 20	6,342 \pm 0,88	4,556 \pm 0,15*	127 \pm 6,708	70,2 \pm 5,426*
ФГ + стресс, n = 20	6,455 \pm 0,97	4,108 \pm 1,22*	130 \pm 5,899	77,4 \pm 3,945*
Стресс, n = 20	6,271 \pm 0,98	6,345 \pm 0,34	123,4 \pm 7,86	127,9 \pm 8,32
БЭ, n = 20	6,342 \pm 0,88	4,556 \pm 0,15*	122,4 \pm 3,544	84,0 \pm 5,177*
БЭ + стресс, n = 20	6,455 \pm 1,23	3,742 \pm 0,87*	126,8 \pm 2,437	72,8 \pm 3,72*

Примечание. Метод статистического анализа — критерий Стьюдента; * $p < 0,05$ по отношению к исходным данным

и, учитывая количество ретикулоцитов, — гиперрегенераторная анемия.

Определение эритроцитарных индексов показало, что в группах БЭ и БЭ + стресс, подобно группам ФГ и ФГ + стресс отмечается увеличение показателя МСН, показателя MCV и показателя RDW, а в группе стресс этот показатель не менялся (табл. 2). При этом в группах БЭ и БЭ + стресс не выявляется изменение показателя МНС, так же, как и в группе со стрессом. То есть, при моделировании ГА при помощи введения БЭ получили макроцитарную, нормохромную и, учитывая количество ретикулоцитов, — гиперрегенераторную анемию.

Учет результатов ГА у животных опытных групп с введением ФГ показал наличие гемолиза — в единичных случаях, отсутствие агглютинации — также в единичных случаях; у большинства животных, которым вводили ФГ (ФГ, ФГ + стресс) выявлена агглютинация: ФГ — средние значения \log — $3,6 \pm 0,79$; ФГ + стресс — средние значения \log — $4,3 \pm 1,13$ ($p = 0,617$; критерий Стьюдента). То есть в группе со стрессом агглютинация более выражена, чем при изолированном введении ФГ, но разница между группами не значима. В группе контроля и в группе с изолированным стрессом наблюдалось отсутствие агглютинации во всех лунках планшета.

При проведении реакции агглютинации присутствие антител к собственным эритроцитам выявлено как в группе БЭ (средние значения \log — $8,9 \pm 1,3$), так и в группе БЭ + стресс (средние значения \log — $9,7 \pm 0,76$; $p = 0,603$ критерий Стьюдента). То есть введение бутоксиэтанола провоцирует развитие аутоиммунной реакции, направленной в отношении собственных эритроцитов. При этом в группе БЭ + стресс агглютинация более выражена, но так же, как и в случае с введением ФГ, эта разница статистически

незначима. Однако при сравнении группы с введением ФГ и введением БЭ $p = 0,003$. То же можно сказать и по поводу сравнения групп ФГ + стресс и БЭ + стресс: $p = 0,000$ (критерий Стьюдента). То есть, БЭ в большей степени, нежели ФГ, способен провоцировать аутоиммунные реакции, направленные против собственных эритроцитов.

Показатели, характеризующие количественный состав клеток эритроидного ростка миелограммы, у животных с изолированным острым стрессом не отличались от показателей интактных животных. Что касается групп с введением ФГ, то в обеих экспериментальных группах (ФГ, ФГ + стресс) выявлено статистически значимое (по отношению к контролю) увеличение количества клеток эритроидного ростка в костном мозге за счет повышения количества эритробластов, пронормоцитов, базофильных и полихроматофильных нормоцитов, что согласуется с увеличением количества ретикулоцитов в периферической крови животных этих групп к концу эксперимента. В группах БЭ и БЭ + стресс выявлено статистически значимое (по отношению к контролю) увеличение количества клеток эритроидного ростка в костном мозге за счет повышения количества эритробластов, пронормоцитов, базофильных и полихроматофильных нормоцитов, что согласуется с увеличением количества ретикулоцитов в периферической крови животных этих групп к концу эксперимента (табл. 3).

Количество тромбоцитов крови во всех экспериментальных группах имело тенденцию к росту, но статистически незначимую (табл. 4). Каких-либо качественных изменений со стороны тромбоцитов в экспериментальных группах со стрессом и введением ФГ не выявлено (табл. 5). Введение БЭ сопровождается качественными изменениями тромбоцитов — в частности, уменьшением их объема (табл. 5), что позво-

Таблица 2

Среднее содержание гемоглобина в эритроците (МСН, пг/эр), эритроцитах (МНС, г/л), средний объем эритроцита (MCV, фЛ), показатель распределения эритроцитов по объему (RDW, %) у экспериментальных животных, ($M \pm m$)

Экспериментальная группа	МСН	p	МНС	p	MCV	p	RDW	p
Интактные животные	$17,82 \pm 0,28$		$343,0 \pm 2,08$		$52,11 \pm 1,07$		$17,93 \pm 0,52$	
ФГ	$21,84 \pm 0,59$	$p = 0,000^*$	$327,36 \pm 2,25^*$	$p = 0,000^*$	$66,79 \pm 1,85^*$	$p = 0,000^*$	$30,05 \pm 0,96^*$	$p = 0,000^*$
ФГ + стресс	$22,14 \pm 0,82$	$p = 0,000^*$	$322,15 \pm 3,42$	$p = 0,000^*$	$67,5 \pm 2,54$	$p = 0,000^*$	$29,58 \pm 1,14$	$p = 0,000^*$
Стресс	$18,12 \pm 0,43$	$p = 0,562$	$339,0 \pm 2,88$	$p = 0,267$	$54,3 \pm 1,09$	$p = 0,160$	$16,93 \pm 0,89$	$p = 0,338$
p (ANOVA)	$p = 0,000^{\#}$		$p = 0,000^{\#}$		$p = 0,000^{\#}$		$p = 0,000^{\#}$	
БЭ	$22,07 \pm 0,69$	$p = 0,000^*$	$337,75 \pm 1,87$	$p = 0,068$	$66,79 \pm 1,85$	$p = 0,000^*$	$26,78 \pm 2,05$	$p = 0,000^*$
БЭ + стресс	$21,11 \pm 0,52$	$p = 0,000^*$	$344,7 \pm 3,56$	$p = 0,682$	$68,22 \pm 2,05$	$p = 0,000^*$	$25,92 \pm 1,88$	$p = 0,000^*$
p (ANOVA)	$p = 0,000^{\#}$		$p = 0,224$		$p = 0,000^{\#}$		$p = 0,000^{\#}$	

Примечание. * $p < 0,05$ по отношению к группе контроля (интактные животные); Метод статистического анализа — критерий Стьюдента; $\# p < 0,05$; Метод статистического анализа — однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA).

ляет высказать гипотезу о том, что БЭ влияет на мегакариоцитарный росток, изменяя, возможно, структуру аминокислот или ферментов.

При этом количество мегакариоцитов (МКЦ) в костном мозге животных с изолированным стрессом

имело тенденцию к росту, с введением ФГ — статистически значимо уменьшалось по отношению к контролю (табл. 4). Что же касается групп с введением БЭ, то количество МКЦ статистически значимо возросло (табл. 4).

Таблица 3

Количественный состав клеток эритроидного ряда миелограмм экспериментальных животных, (M ± m)

Экспериментальная группа	Абсолютное число клеток, $\times 10^6$ /костный мозг бедренной кости						
	Эритробласты	Пронормоциты	Нормоциты			Митоз клеток	Весь эритроидный ряд
			Базофильные	Полихроматофильные	Оксифильные		
Интактные животные	0,35 ± 0,09	0,83 ± 0,19	4,57 ± 0,82	30,01 ± 4,28	5,4 ± 1,12	0,55 ± 0,12	38,37 ± 4,83
ФГ	1,28 ± 0,42*	1,96 ± 0,5*	14,28 ± 4,56*	45,22 ± 7,87*	4,17 ± 0,97	1,12 ± 0,52	68,03 ± 10,47*
ФГ + стресс	1,31 ± 0,28*	1,87 ± 0,21*	15,33 ± 5,51*	43,17 ± 5,29*	4,82 ± 0,88	1,17 ± 0,43	67,67 ± 9,24*
Стресс	0,28 ± 0,07	0,9 ± 0,08	5,12 ± 0,44	33,95 ± 5,17	5,2 ± 0,88	0,5 ± 0,07	45,95 ± 3,27
БЭ	1,42 ± 0,27*	1,88 ± 0,43*	15,22 ± 3,82*	44,39 ± 5,47*	5,28 ± 0,35	1,14 ± 0,28	69,33 ± 7,85*
БЭ + стресс	1,55 ± 0,14*	1,92 ± 0,18*	16,47 ± 2,91*	45,31 ± 4,88*	5,96 ± 0,57	1,16 ± 0,28	72,37 ± 8,35*

Примечание. * $p < 0,05$ по отношению к интактным животным (группа контроля); Метод статистического анализа — критерий Стьюдента.

Таблица 4

Количество мегакариоцитов (МКЦ) в костном мозге, тромбоцитов в венозной крови $\times 10^9$ /л, у экспериментальных животных, (M ± m)

Экспериментальная группа	Кол-во МКЦ	p (критерий Стьюдента)	Кол-во тромбоцитов	p (критерий Стьюдента)
Интактные животные	48,70 ± 4,12		786,2 ± 95,5	
ФГ	18,00 ± 3,67*	0,000	952,6 ± 102,3	p = 0,242
ФГ + стресс	32,54 ± 3,92*	0,007	988,4 ± 106,5	p = 0,166
Стресс	55,67 ± 4,83	0,279	933,3 ± 89,9	p = 0,269
p (ANOVA)	0,000#		p = 0,492	
БЭ	72,00 ± 4,91	0,000*	895,1 ± 48,38	p = 0,315
БЭ + стресс	88,43 ± 7,85	0,000*	928,3 ± 57,81	p = 0,211
p (ANOVA)	0,000#		p = 0,487	

Примечание. * $p < 0,05$ по отношению к группе контроля (интактные животные); Метод статистического анализа — критерий Стьюдента; # $p < 0,05$; Метод статистического анализа — однофакторный дисперсионный анализ

Таблица 5

Показатели тромбокрита (PCT, %), среднего объема тромбоцитов (MPV, fL), степени анизоцитоза тромбоцитов (PDW, %), у экспериментальных животных, (M ± m)

Экспериментальная группа	PCT	p (критерий Стьюдента)	MPV	p (критерий Стьюдента)	PDW	p (критерий Стьюдента)
Интактные животные	0,499 ± 0,058		6,44 ± 0,125		9,73 ± 0,173	
ФГ	0,611 ± 0,063	p = 0,199	6,48 ± 0,118	p = 0,817	9,69 ± 0,156	p = 0,865
ФГ + стресс	0,652 ± 0,071	p = 0,103	6,51 ± 0,127	p = 0,697	9,54 ± 0,122	p = 0,375
Стресс	0,624 ± 0,056	p = 0,129	6,49 ± 0,098	p = 0,755	9,67 ± 0,146	p = 0,792
p (ANOVA)	p = 0,329		p = 0,979		p = 0,826	
БЭ	0,546 ± 0,032	p = 0,482	6,078 ± 0,118	p = 0,042*	9,69 ± 0,156	p = 0,865
БЭ + стресс	0,573 ± 0,042	p = 0,308	6,045 ± 0,078	p = 0,011*	9,54 ± 0,122	p = 0,375
p (ANOVA)	p = 0,325		p = 0,004#		p = 0,826	

Примечание. * $p < 0,05$ по отношению к группе контроля (интактные животные). Метод статистического анализа — критерий Стьюдента; # $p < 0,05$; Метод статистического анализа — однофакторный дисперсионный анализ.

Таким образом, при внутрибрюшинном введении как ФГ, так и БЭ, развивалась гемолитическая анемия — в случае действия ФГ — гипохромная, а в случае действия БЭ — нормохромная. По данным литературы, ФГ-анемия характеризуется анизо- и пойкилоцитозом, увеличением содержания микро- и макроцитов на 35% по отношению к нормоцитам, выявлением микросфероцитов [15].

При ФГ-анемии отмечается увеличение среднечелочного диаметра эритроцитов — характерный признак макроцитарной анемии, уменьшается концентрация Hb и Эр, МСНС, увеличивается MCV по сравнению с интактными животными [16]. То есть полученные результаты соответствуют представлениям о гемолитической анемии, вызванной ФГ. В отношении БЭ основной повреждающий эффект со стороны системы кроветворения (по данным клинических наблюдений) характеризуется как макроцитарная, нормохромная и гиперрегенераторная анемия (National Toxicology Program. 2000), что соответствует представленным в работе экспериментальным данным.

Известно, что при стрессе количество тромбоцитов увеличивается вследствие их мобилизации в кровоток — в рамках стресс-реакции [17]. Этим объясняется увеличение количества и тромбоцитов, и мегакариоцитов в группе с изолированным стрессом. В группе с введением ФГ отмечается, напротив, уменьшение количества мегакариоцитов, что может быть связано с цитолитическим действием ФГ, включая аутоиммунные реакции. В группе с сочетанием введения ФГ и острого стресса их количество статистически значимо не изменилось, поскольку увеличение количества мегакариоцитов при стрессе нивелировалось их снижением, обусловленным введением ФГ.

Существует мнение, что ряд факторов, в том числе химические агенты, вызывает тромбоцитопению, индуцируя апоптоз мегакариоцитов и их предшественников [18]. Апоптоз является важным этапом отшнуровки тромбоцитов от мегакариоцитов — нормальной составной части процесса тромбоцитопоэза, посредством активации стресса цитоплазматического ретикулума [19]. Мегакариоциты обладают большей чувствительностью к стрессу, чем миелоидные предшественники [20]. В условиях *in vitro* показано, что стресс ускоряет процесс тромбоцитопоэза — как за счет отшнуровки и мобилизации тромбоцитов, так и стимуляции дифференцировки стволовых клеток в этом направлении [21]. Активные формы кислорода, образующиеся при стрессе, являются активаторами клеточной деятельности, в том числе дифференцировки клеток, и, в частности, клеток мегакариоцитарной линии [22].

По данным литературы, при ФГ-индуцированной ГА происходит активация как эритроидного, так и тромбоцитарного ростков за счет эритропоэтина и тромбопоэ-

тина, что расценивается как компенсаторная реакция [23]. Но у эритроцитарного и мегакариоцитарного ростков существует единый предшественник — мегакариоцитарно-эритроидный предшественник (МК-erythroid progenitor) [24]. На сегодняшний день существуют данные о том, что при стрессе биопотентный мегакариоцитарно-эритроидный предшественник дифференцируется как в направлении эритроидной, так и в направлении мегакариоцитарной линий — по мере возникающей необходимости [25]. Кроме того, известно, что некоторые эндогенные факторы, сопровождающие различные патологические состояния, в том числе трансформирующий фактор роста- β_1 , ингибируют развитие МКЦ [24]. То есть уменьшение количества МКЦ в костном мозге экспериментальных животных при введении ФГ может быть объяснено этими причинами.

Увеличение количества МКЦ в группе с введением БЭ может быть объяснено с позиций учения о стрессе, либо может трактоваться как специфическое действие бутоксиэтанола [26]. Увеличение количества мегакариоцитов костного мозга (мегакариоцитарная гиперплазия) может наблюдаться при некоторых видах анемий: так, например, ежедневные инъекции полиэтиленгликоля Valb/c мышам в течение 2 нед., индуцировали гиперплазию мегакариоцитов, миелоидную гиперплазию и эритроидную гипоплазию в костном мозге; заметное увеличение числа мегакариоцитов отмечается также и при введении самцам и самкам крыс F344 через зонд 2-бутоксиэтанола [26], что подтверждают и наши данные.

Заключение

Таким образом, оба гемолитических агента — ФГ и БЭ — в конечном итоге приводят к формированию, с одной стороны, сходных, с другой — противоположных изменений в организме экспериментальных животных. Так, оба агента вызывают приобретенную токсическую ГА с аутоиммунным компонентом, макроцитарную, гиперрегенераторную, но в случае действия ФГ — гипохромную, в случае действия БЭ — нормохромную. В отношении действия на костный мозг оба агента стимулируют в конечном итоге эритропоэз, но их действие принципиально различно в отношении мегакариоцитарного ростка. ФГ значимо подавляет мегакариоцитопоэз, что связано с активацией апоптоза мегакариоцитов и их предшественников [18]; БЭ, напротив, интенсивно его стимулирует. Выявленный эффект БЭ подтверждает данные Travlos G.S. [26]. Вероятно, этот эффект БЭ связан с его способностью влиять на дифференцировку клеток мегакариоцитарного ростка посредством изменения структуры аминокислот или ферментов. В условиях воздействия на костный мозг токсических агентов с гемолитическим эффектом характерные изменения со сто-

роны эритроцитарного и мегакариоцитарного ростков, возникающие при остром стрессе, могут усиливаться или уменьшаться — в зависимости от природы действующего токсического агента.

References

- Schick P., Besa E.C. Hemolytic Anemia Treatment & Management. *Drug, Diseases & Procedures*. 2011; 8: 1234-7.
- Schwartz R.S. Autoimmune and intravascular hemolytic anemias. In: Goldman L, Ausiello D. *Cecil Medicine*. 23rd ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier; 2007: chap 164.
- Garratty G., Arndt P.A. An update on drug-induced immune hemolytic anemia. *Immunohematology*. 2007; 23(3): 105-19.
- Johnson S.T., Fueger J.T., Gottschall J.L. One center's experience: the serology and drugs associated with drug-induced immune hemolytic anemia — a new paradigm. *Transfusion*. 2007; 47(4): 697-702.
- Garratty G. Drug-induced immune hemolytic anemia. *ASH Education Book*. 2009; 1: 73-9.
- El-Ashmawy I.M., Gad S.B., Salama O.M. Grape seed extract prevents azathioprine toxicity in rats. *Phytother Res*. 2010; 24(11): 1710-5.
- Moreira-Rodrigues M., Henriques-Coelho T., Moura C., Vasques-Novoa F., Sampaio-Maia B., Pestana M. et al. Cardiac dysfunction in HgCl₂-induced nephrotic syndrome. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2010; 235(3): 392-400.
- Bollotte A., Vial T., Bricca P., Bernard C., Broussolle C., Seve P. Drug-induced hemolytic anemia: A retrospective study of 10 cases. *Rev Med Interne*. 2014; 35(12): 779-89.
- Haley K.M., Russell Th.B., Boshkov L., Leger R.M., Garratty G., Recht M. et al. Fatal carboplatin-induced immune hemolytic anemia in a child with a brain tumor. *J Blood Med* 2014; 15(5): 55-8.
- Betensky M., Witmer C., Fisher M.J., Nance S., Weiss M.J., Sesok-Pizzini D.A. Immune hemolytic anemia with drug-induced antibodies to carboplatin and vincristine in a pediatric patient with an optic pathway glioma. *Transfusion*. 2014; 54 (11): 2901-5.
- Haddad H., Mohammad F., Dai Q. Bendamustine-induced immune hemolytic anemia in a chronic lymphocytic leukemia patient: A case report and review of the literature. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*. 2014 Dec; 7(4): 162-4.
- Joybari A.Y., Sarbaz S., Azadeh P., Mirafsharieh S.A., Rahbari A., Farasatinasab M. et al. Oxaliplatin-induced renal tubular vacuolization. *Ann Pharmacother*. 2014; 48(6): 796-800.
- Nikulina OF, Tsvetaeva NV, Well SV Shurhina ES, MG Dmitriev, autoimmune hemolytic anemia (AIHA): activity monitoring and treatment of hemolysis. *Problemy gematologii*. 2005; 1: 46. (in Russian)
- Powers A, Silberstein LE. Autoimmune hemolytic anemia. In: Hoffman R, Benz Ej, Shattil SS, et al. eds. *Hematology: Basic Principles and Practice*. 5th ed. Philadelphia, Pa: Elsevier Churchill Livingstone; 2008: chap 47.
- Zhernov Y. The study of the antioxidant effect of humic acids peloids when acquired hemolytic anemia. *Kislород i antioksidanty*. 2009; 1: 73-4. (in Russian)
- Moyseenko N.A., Ivankov Zh.E., Repin E.N., Volodin V.V. Hematoprotective effect of ecysteroid serpisten substance. *Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoy biologii imeni Yu.A. Ovchinnikova*. 2011; 7 (3): 24-9. (in Russian)
- Smirnova L.A., Semenihih A.V., Costco N.A. Thrombocytosis. *Medical News* 2005; 9: <http://www.mednovosti.by/journal.aspx?article=1019>. (in Russian)
- Josefsson E.C., James C., Henley K.J., Debrincat M.A., Rogers K.L., Dowling M.R. et al. Megakaryocytes possess a functional intrinsic apoptosis pathway that must be restrained to survive and produce platelets. *JEM* 2011; 208(10): 2017-31.
- Lopez J.J., Palazzo A., Chaabane C., Albarran L., Polidano E., Lebozec K. et al. Crucial Role for Endoplasmic Reticulum Stress During Megakaryocyte Maturation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2013; 33: 2750-8.
- Xu Y., Kashiwakura I. and Takahashi T.A. High sensitivity of megakaryocytic progenitor cells contained in placental/umbilical cord blood to the stresses during cryopreservation. *Bone Marrow Transplantation*. 2004; 34: 537-43.
- Jiang J., Woulfe D.S., Papoutsakis E.T. Regular Article Platelets and thrombopoiesis. Shear enhances thrombopoiesis and formation of microparticles that induce megakaryocytic differentiation of stem cells. *Blood*. 2014; 124(13): 2094-103.
- Nurhayati R.V., Ojima Y., Taya M. Promoted megakaryocytic differentiation of K562 cells through oxidative stress caused by near ultraviolet irradiation. *Cellular & Molecular Biology Letters*. 2014; 19(4). DOI:10.2478/s11658-014-0215-3.
- Vannucchi A.M., Paoletti F., Linari S., Cellai C., Caporale R., Ferrini P.R. et al. Identification and characterization of a bipotent (erythroid and megakaryocytic) cell precursor from the spleen of phenylhydrazine-treated mice. *Blood*. 2000; 15: 2559-68. DOI: <http://dx.doi.org/>
- Deutsch V.R. and Tomer A. Megakaryocyte development and platelet production. *British Journal of Haematology*. 2006;) : 453-66.
- Sanchez M., Weissman I.L., Pallavicini M., Valeri M., Guglielmelli P., Vannucchi A.M. et al. Differential Amplification of Murine Bipotent Megakaryocytic/Erythroid Progenitor and Precursor Cells During Recovery from Acute and Chronic Erythroid Stress. *STEM CELLS* 2006; 24: 337-48 www.StemCells.com
- Travlos G.S. Histopathology of Bone Marrow. *Toxicol Pathol*. 2006; 34(5): 566-98.

Сведения об авторах:

Самоделькин Евгений Иванович, доктор мед. наук, проф., каф патологической физиологии

Сивакова Людмила Владимировна, канд мед. наук, доцент каф. патологической физиологии, ст. преп. каф. микробиологии, вирусологии с курсом КЛД

Федык Оксана Владимировна, аспирант заочной формы обучения каф. иммунологии

Шаكلةина Светлана Мячеславовна, ассистент каф. микробиологии, вирусологии с курсом клинической лабораторной диагностики