

Міністерство освіти і науки України
Національний університет «Києво-Могилянська академія»
Факультет природничих наук

Кафедра лабораторної діагностики біологічних систем

Магістерська робота

на тему «**ДОСЛІДЖЕННЯ КРОВОТВОРНОЇ СИСТЕМИ ЩУРІВ ПРИ
ДІЇ ОПРОМІНЕННЯ ТА ЗА УМОВ ВПЛИВУ РАДІОПРОТЕКТОРА**»

Виконала: студентка 2-го року навчання
Галузь знань: 09 Біологія
Спеціальність: 091 Біологія
Освітньо-наукова програма: Лабораторна
діагностика біологічних систем
Києнко Людмила Петрівна

Керівник

Білько Н. М.,

доктор медичних наук, професор, зав.
кафедри лабораторної діагностики
біологічних систем НаУКМА

Рецензент Талько В. В.,

доктор медичних наук, професор

Кваліфікаційну роботу захищено
з оцінкою _____

Секретар ЕК

Пахаренко М. В.

«___» червня 20__ року

Київ – 2020

ЗМІСТ

ВСТУП _____	Стор. 3
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ _____	6
1.1. Роль гемопоетичної стовбурової клітини у відновленні кровотворення _____	6
1.1.1. Визначення гемопоетичних стовбурових клітин _____	6
1.1.2. Проліферативний потенціал клітин попередників _____	9
1.2. Вплив іонізуючої радіації на гемопоез _____	10
1.3. Радіопротектори _____	13
1.4. Сорбенти _____	19
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА _____	24
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ _____	24
2.1. Список використаних матеріалів _____	24
2.1.1. Витратні матеріали _____	24
2.1.2. Реактиви _____	25
2.1.3. Лабораторний посуд _____	25
2.1.4. Обладнання _____	26
2.2. Використана методика _____	27
2.2.1. Синтез активованого вугілля _____	27
2.2.2. Тваринна модель _____	28
2.2.3. Опромінення _____	29
2.2.4. Гематологічні показники (периферична кров і кістковий мозок)	29
2.2.5. Функціональна активність клітин кісткового мозку	30
2.2.6. Експеримент _____	30
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ _____	37
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ _____	51
ВИСНОВКИ _____	53
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ _____	54

ВСТУП

Проблема радіопротекції у сучасному світі залишається дуже актуальною як з точки зору екстреного захисту організму від гострого радіаційного ураження у разі аварійних або надзвичайних ситуацій, так і зростання потреби застосування радіопротекторних агентів у радіаційній медицині та онкології. Тому розробка сучасних радіопротекторів та пошук речовин що мають ефективну нетоксичну протекторну дію – цілий напрямок сучасних досліджень в радіобіології та онкології.

Загроза іонізуючої радіації продовжує залишатися в світі війн і катастроф. Ще до сих пір вченим і лікарям не вдалося подолати наслідки Чорнобильської катастрофи, а вже стався вибух на атомній станції у Фукусимі. Люди стають заручниками приватних компаній, які утримують атомні станції і мають величезні прибутки. Вони є беззахисними перед радіацією, яка не має ні смаку, ні запаху. З іншого боку, іонізуюча радіація використовується в діагностичних цілях, а також при лікуванні ракових захворювань, як терапевтична тактика. На сьогодні ще не існує радіопротектора, який одночасно володів високою ефективністю, довготривало дією і був би нетоксичним. Тому важливим є продовження пошуків радіопротекторів, які би відповідали всім вимогам людства.

Радіопротектор — це речовина (препарат або рецептура), введення якої тваринам або додавання у клітинне середовище перед дією іонізуючої радіації значно знижує радіаційний ефект [1]. У представлений роботі було використано речовину яка за припущеннями може мати радіопротекторну дію.

Синтезоване гранульоване активоване вугілля із високорозвиненою активною поверхнею ($S_{\text{ВЕТ}} \sim 2700 \text{ м}^2/\text{г}$) застосовується як медичний радіопротектор при гострій променевій хворобі у щурів після загального

рентгенівського опромінення тіла. Активоване вугілля демонструє позитивні результати при лікуванні гострої променевої хвороби, виражені в: зменшенні втрати маси тіла; захисті здатності формування колоній клітинами кісткового мозку; зменшенні кількості хромосомних аберацій кісткового мозку та пошкодження тканин тонкої кишки та селезінки; збільшення кількості лейкоцитів; відновлення швидкості генерації іонів супероксиду в печінці. Пероральне призначення активованого вугілля представляється перспективною розробкою лікування гострої променевої хвороби.

Метою роботи є виявлення впливу ентеросорбента на кровотворення лабораторних тварин в разі дії опромінення та за умов використання радіопротектора.

Відповідно до мети було поставлено такі завдання:

- 1.Провести аналіз показників периферичної крові здорових і експериментальних тварин, опромінених у сублетальній дозі (6 Гр) на 1-у і 9-у добу після опромінення.
2. Вивчити особливості проліферації і диференціювання клітин кісткового мозку у опромінених щурів у порівнянні з контролем на 1-у і 9-у добу після опромінення.
3. Культивувати кістковий мозок щурів Wistar у гелевих дифузійних камерах, занурених у черевну порожнину мишей *in vivo* .
4. Дослідити дію іонізуючої радіації на стан кровотворення опромінених тварин, яким разом з їжею давали сорбент за добу до опромінення.

Об'єктом дослідження є кровотворення опромінених у сублетальній дозі щурів Wistar в разі дії опромінення та за умов використання ентеросорбента.

Предметом дослідження є показники периферичної крові, кісткового мозку і гемопоетичних клітин-попередників опромінених щурів в разі використання ентеросорбента і без нього.

Експериментальну частину роботи було виконано на базі Центру молекулярних та клітинних досліджень Національного Університету «Києво-Могилянська академія».

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Роль гемопоетичної стовбурової клітини у відновленні кровотворення

1.1.1. Визначення гемопоетичних стовбурових клітин.

Професор А.А. Максимов, російський гістолог, на початку ХХ століття запропонував і обґрунтував унітарну теорію кровотворення. Отже, 1908 рік по праву можна вважати роком початку історії розвитку нових досліджень тоді ще невивчених стовбурових клітин. Тому на сьогоднішній день ми говоримо про те, що процес оновлення клітин в організмі підтримується невеликою популяцією клітин кісткового мозку, які називають гемопоетичними стовбуровими клітинами [2], [3].

Гемопоетична стовбурова клітина - це недиференційована клітина, здатна до самовідтворення і диференціювання в будь-яку клітину крові або клітину імунної системи [3]. На відміну від гемопоетичної стовбурової клітини клітини-попередники наступних етапів розвитку комітованих в певні лінії диференціювання і не мають здатність до постійного самовідтворення. Стовбурові клітини спроможні до самовідновлення, а також сегрегації в дуже велику кількість різноманітних спеціалізованих типів клітин органів і тканин. Це стало відомо в 1990-х рр, коли вчені виявили, що головний мозок дорослої людини містить також і стовбурові клітини, здатні давати, так би мовити, початок аж цілим трьом типам основних клітин головного мозку. Стовбурові клітини організму дорослої людини зазвичай розвиваються в клітини тих

тканин, в яких вони перебувають. Однак у великій кількості експериментів за останні кілька років доведено, що стовбурові клітини однієї тканини здатні бути початком різним типам клітин інших тканин. Цей феномен відомий як пластичність стовбурових клітин [4].

Очевидно стовбурові клітини повинні бути здатні до самооновлення, щоб підтримувати довгостроковий характер постачання нащадків і здатність диференціюватися на множинні гемопоетичні лінії, включаючи лімфоцити. До того ж, ця концепція стовбурових клітин була встановлена ранніше безпосередніх досліджень гемопоетичних стовбурових клітин, адже цьому перешкоджав брак конкретних маркерів для їх виявлення. Тому дослідження механізмів регуляції стовбурових клітин базувалися на функціональних та непрямих аналізах таких як аналіз колоній селезінки [5], клональний [6] і дослідження суспензійної культури [7], та відтворення смертельно опромінених або генетично дефектних мишей [8].

У стовбурових клітин є дві важливі особливості, що відрізняють їх від всіх інших типів клітин. По-перше, це неспеціалізовані клітини, здатні протягом довгого часу самовідновлення шляхом ділення. По-друге, певні фізіологічні або експериментальні умови можуть викликати їх перетворення в спеціалізовані клітини - наприклад, в кардіоміоцити (клітини серцевої мускулатури) або в що виробляють інсулін клітини підшлункової залози. В ембріональному розвитку ці клітини дають початок всьому людському організму. У дорослому організмі стовбурові клітини є одним з механізмів відновлення і поновлення деяких клітин і тканин [9].

Стовбурові клітини протягом усього життя людини оновлюють його тканини і відновлюють нормальну функцію органів. В ядрі клітини зосереджена генетична інформація, що перебуває на такому собі "старті" або ж "нульовій точці" – це властивість стовбурової клітини номер один. Суть в тому, що всі нестатеві клітини усіх живих організмів (соматичні клітини)

пройшли поділ, тобто виконують відповідні їм спеціалізовані функції: клітини кісткової тканини відповідають за формування скелеу, клітини крові – за імунітет і переносять кисень, нервові – проводять електричний імпульс. На відміну від соматичних клітин, механізми диференціації та спеціалізації стовбурова клітина ще досі не ввімкнула та не розпочала програму розмноження [10].

Як правило, вважається, що в стаціонарному стані більшість стовбурових клітин сплять у клітинному циклі і лише деякі клітини постачають всі кровотворні клітини в даний момент часу. Спочатку Лайта [11] запропонував концепцію стану справжнього спокою і назвав це фазою "G0". Пізніше він зробив припущення що гемопоетичні стовбурові клітини знаходяться в "G0" і запускають клітинний цикл випадковим чином [12]. Було доведено, що фаза "G0" визначає час стовбурової клітини для відновлення пошкодження ДНК, таким чином дозволяючи підтримувати генетичну цілісність популяції стовбурових клітин. Було проведено ряд досліджень, що підтримують концепт стану спокою в клітинному циклі у стовбурових клітин. Раніше було продемонстровано що короткочасний вплив на культуру клітин кісткового мозку *in vitro* тимідину з високою питомою радіоактивністю не зменшує кількість мультипотентних клітин-попередників [13], [14]. Лікування мишей з високою дозою 5-фторурацилу (5-FU) не інгібує розвиток колоній селезінки [15], або колоній бластних клітин [16]. Докази про стан спокою примітивних гемопоетичних клітин попередників людини також було отримано в культурі збагачених клітин попередників [17],[18]. Ці дослідження документально підтвердили, що окремі клітини попередники залишаються самостійними клітинами протягом 2-х тижнів в культурі і починають розмноження після стимуляції комбінаціями цитокінів.

1.1.2. Проліферативний потенціал клітин попередників.

Загалом, існує кореляція між кількістю виражених ліній та розміром колоній, що вказує на загальну симетрію кровотворення. Однак, коли було проаналізовано колонії, отримані від парних клітин попередників, які досліджувалися, то було виявлено значну асиметрію проліферації в експресуючих колоніях тієї ж лінії [19],[20]. Крім того, цитологічний аналіз гемопоетичних колоній людини, отриманих з одиничних клітин, показав що проліферативний потенціал комітованих клітин попередників може бути надзвичайно мінливим [21]. В загальному можна сказати, що усі результати свідчать про те, що розповсюдження (розподіл) комітованих клітин попередників не є жорстко регульованим процесом [22],[23].

Наявні дані свідчать про те, що якісні зміни в гемопоетичних стовбурових клітинах та клітинах попередниках, такі як рішення стовбурових клітин про самовідновлення або диференціювання, або вибір лінії поділу мультипотентними клітинами попередниками протягом диференціації (комітованість), притаманні властивостям клітин попередників і мають стохастичний характер. На противагу цьому, проліферативна кінетика клітин попередників, а саме виживання та ріст клітин попередників, схоже, контролюється певною кількістю взаємодіючих цитокінів [24].

Вся попередня інформація говорить про стовбурові клітини та клітини-попередники та їх проліферативний потенціал. Стовбурові ж клітини що відповідають за проліферацію гемопоетичних клітин знаходяться в червоному кістковому мозку. У нормі, як відомо, основне призначення кісткового мозку - це продукція зрілих диференційованих клітин крові. Під дією ж випромінювання в системі поновлення червоного кісткового мозку відбуваються різкі порушення, які обумовлені основними радіобіологічними

реакціями клітин, які є типовими для порушення в будь-якій системі клітинного оновлення з високою проліферативною активністю [25].

1.2. Вплив іонізуючої радіації на гемопоез

На ранньому етапі вивчення впливу іонізуючої радіації на кістковий мозок було встановлено, що основною причиною зменшення клітин кісткового мозку і крові при гострому променевому ураженні є їх мітотична і інтерфазна загибель. В кістковому мозку в період інтерфази гинуть молоді гранулоцитарні, тромбоцитарні і еритроїдні клітини. Придушення клітинного ділення в кістковому мозку настає вже через 3-7 год., При цьому їх число значно зменшується. Спад кровотворних клітин відбувається протягом двох діб після опромінення. Слідом за цим відбувається клітинне спустошення функціонального пулу, тобто периферичної крові [26].

Порушення клітинної проліферації кісткового мозку призводить до кістковомозкового синдрому. У більшості ссавців в діапазоні доз кістковомозкового синдрому розвиваються чотири ступені променевої хвороби: легка, середня, важка і вкрай важка [26].

При цьому пошук стабільних нетоксичних і ефективних радіопротекторів стає більш потрібним. У першу чергу це пов'язано з широким використанням іонізуючих випромінювань в науці, техніці, медицині, в сільському господарстві [27].

Багато результатів досліджень ще раз підтверджують високу чутливість клітин кісткового мозку ссавців до впливу радіації. Природні біологічні

препарати проявляють властивості радіопротекторів в поєднанні з попередніми опроміненням в малій дозі і тим самим забезпечують компенсаторні можливості еритроцитарного, гранулоцитарного і агранулоцитарної паростків гемопоезу в кістковому мозку стегнової кістки щурів, підданих впливу зовнішньої радіації в середньолетальній дозі [28]

У нормальних умовах життєдіяльність організму на всіх рівнях тканинної організації - молекулярному, органоїдному, клітинному - відбувається безперервне оновлення структур, що отримало назву фізіологічної регенерації. «Внутрішньоклітинна регенерація» властива клітинам всіх органів без винятку. Найбільш стійкою структурою клітини є її ядро, регулює всі біосинтетичні процеси в цитоплазмі. При посиленому функціонуванні в клітинах розвиваються гіперпластичні процеси, які виражаються в поліплоїдизації ядер, збільшення числа і розміру ядерців, появи двоядерних клітин [57].

Давно встановлено факт функціональної неоднорідності клітинних представників всіх гемопоетичних рядів в руслі крові [58]. Але, що особливо важливо, всупереч усталеній думці про те, що ядро клітини функціонуючого пулу крові втрачає здатність до перетворення, а сама зріла клітина поступово втрачає функціональну активність, багато авторів вказують на зберігається поліпотентної ядер зрілих клітин, їх здатність в певних умовах повертатися до ретро -, де- або дісдифференційованим аналогам з проліферативною активністю. В дослідженні було обґрунтовано положення про те, що сегментація ядер нейтрофілів характеризує собою не ступінь зрілості клітини, а рівень її функціональної активності і реактивності системи.

При різних несприятливих впливах, особливо під впливом іонізуючого випромінювання здійснюватиме, закономірно реєструється реакція у вигляді наростання числа нейтрофільних гранулоцитів зі зрушенням ядерної формули

нейтрофілів (ЯФН) вліво. При цьому реакція виявляється тим виражено, чим вище доза опромінення [59].

Великий інтерес представляють повідомлення про те, що під впливом опромінення в кістковому мозку (КМ) нарастає число малодиференційованих і мікроформ лейкоцитів, клітин з подвійними і аномальними ядрами. Подібні перетворення ядер клітин крові і зміни реакції бласттрансформації лімфоцитів (БТЛ) відзначалися також при впливі на організм неспецифічних (в тому числі больових) подразників, цитостатиків, під впливом космічного польоту. З цього можна зробити висновок, що трансформація ядра клітин крові також є загальнобіологічним явищем і відображає перебіг захисної реакції організму. Більш того, наростання в ПК і КМ числа молодих, мало- і недиференційованих клітин є неодмінною умовою успішного перебігу репаративної регенерації[59].

Інша важлива спостереження радіобіологів: в перші години, добу після гострого опромінення в крові експериментальних тварин відзначаються не тільки пригнічення проліферації родоначальних клітин (блокування мітозів), а й суттєве зниження функціональної активності нейтрофілів (зменшення активності лужної фосфатази, мієлопероксидази, пригнічення фагоцитозу). Таке ж пригнічення функціональних властивостей лімфоцитів і особливо нейтрофілів спостерігається також і при інших несприятливих впливах на організм: при високих фізичних навантаженнях у спортсменів [57]; при впливі на організм підвищеної температури і шуму; у моряків після тривалого плавання в низьких широтах; у людей при акліматизації в умовах Арктики й Антарктиди; у тварин після введення радіопротекторів. При цьому виявилось, що в умовах занепаду функціональної активності клітин в тканинах, в тому числі в системі кровотворення, радіорезистентність організму підвищується. Закономірність змін показників функціонального стану лейкоцитів полягає в тому, що їх найбільше зниження відзначається тоді, коли кількість лейкоцитів збільшується. Це дало підставу деяким авторам висловити судження про те,

що зазначені процеси в організмі відіграють захисну роль і є складовою частиною феномена охоронного гальмування зі зниженням чутливості клітин до будь-яких екстремальних впливів [60].

Таким чином, можна вважати встановленим: що функціонує пул системи кровотворення представлений в руслі крові клітинами з різним рівнем функціональної активності; що число лейкоцитів в ПК може мати зворотну залежність від цього рівня; що під впливом різних специфічних і неспецифічних впливів в ПК наростає кількість малодиференційовані форм клітин, клітин з подвійними і аномальними ядрами; що ядра зрілих форм лейкоцитів зберігають свою поліпотентної і здатність в певних умовах трансформуватися в більш молоді і дісдиференційовані аналоги; що при наявності занепаду функціональної активності клітин в системі кровотворення радіорезистентність організму в цілому проте підвищується[61].

1.3. Радіопротектори

В даний час однією з найважливіших і вкрай актуальних проблем практичної фармакології залишаються питання протирадіаційного захисту людини. Розширення контактів з джерелами іонізуючих випромінювань в техніці і медицині, аварійні ситуації у сфері атомної енергетики і ядерних силових установках, польоти пасажирських літаків на великих висотах, особливо в період спалахів на Сонці, і, нарешті, плановані польоти на Марс і інші планети - все це визначає необхідність мати в арсеналі сучасної медицини спеціальні лікарські засоби, що ослабляють наслідки радіаційних впливів [29].

Радіопротектор — це речовина (препарат або рецептура), застосування якої тваринами або додавання у клітинне середовище перед дією іонізуючої радіації значно знижує радіаційний ефект; неефективним є їх введення після опромінювання. Ось таке визначення дав бельгійський фармаколог Z. Васq для радіопротекторів. Саме він заклав основи їх класифікації [1]. У сучасній класифікації найбільш прийнятим є розподіл на радіопротектори короткочасної дії, радіозахисні засоби пролонгованої дії та стимулятори радіорезистентності[30].

Проблема лікарської профілактики і терапії променевих уражень має більш ніж 50-річну історію. Початок систематичних досліджень в галузі радіаційної фармакології було викликано появою в кінці 40-х років атомної зброї. Для вирішення завдань по розробці засобів захисту від радіаційних уражень у багатьох країнах були створені наукові установи і залучені значні наукові сили і засоби, затверджені державні програми зі створення радіопротекторів і схем лікування променевих уражень[31].

Крім того, зважаючи на складнощі і важкою прогнозованості радіаційної обстановки при аварійних ситуаціях, різноманітності завдань, що вирішуються аварійно-рятувальними командами, виникає необхідність в наявності таких засобів, які раніше не розроблялися. Тому було звернено увагу на створення препаратів екстреної профілактики уражень, лікувально-профілактичних засобів радіаційного захисту, препаратів що будуть ефективні в широкому діапазоні доз опромінення, засобів профілактики уражень, що викликаються низькодозованим і хронічним опроміненням [32].

Окрему проблему становить розробка радіопротекторів для застосування в клінічній онкології, здатних вибірково захищати нормальні тканини [33].

Як уже точно відомо і підтверджено, медичне опромінення є важливою дозоутворюючою ланкою в сумарному потоці впливу на людину іонізуючих випромінювань. Його дії піддаються всі категорії осіб, що опромінюються: як професіонали, так і населення, в тому числі критичні групи ризику, включаючи ліквідаторів і чорнобильців, які проживають на забруднених територіях, а також медичних працівників та фахівців тих галузей, де необхідне використання іонізуючого випромінювання [34], [35].

Медичне рентгенодіагностичне опромінення стоїть на другому місці слідом за природним опроміненням по сумарній дозі опромінення населення, але в порівнянні з природним медичне опромінення відрізняється високою потужністю дози випромінювання, в мільйон разів перевищує потужність дози природного, а також відсутністю адаптації до гострого опромінення, яким є медичне діагностичне опромінення. На відміну від природного компоненти медичного опромінення нерідко направлено на хворий або ослаблений організм; медичне опромінення є вкрай нерівномірним, багаторазово завдаючи вплив на одні й ті ж органи, в тому числі на найбільш радіочутливі (кістковий мозок, тимус); медичне опромінення характеризується дуалізмом - приносить користь і одночасно завдає шкоди [36].

При цьому медичне діагностичне опромінення пацієнтів до сих пір не нормується, тобто не обмежується. Це єдиний подібний випадок при використанні людиною іонізуючого випромінювання. Зроблено це навмисно і виправдано такими міркуваннями: вважається, що користь від проведення обґрунтованих рентгенорадіологічних досліджень перевищує шкоду; рівні опромінення при проведенні дослідження повинні не перевищувати діапазону так званих «малих» доз; проведення процедури дозволяється лише за медичними показаннями. Однак слід мати на увазі, що дія медичного опромінення, як і будь-якого іншого, починається з нуля, але носить імовірнісний характер. Це означає, що навіть незначна доза може викликати небажані негативні наслідки (злоякісні захворювання, генетичні порушення)

які проявлять себе лише через певний час. Тому все вищесказане змушує максимально ефективно захищати пацієнтів [37].

Тим часом на сучасному етапі розвитку технічного прогресу слід враховувати зростаючий рівень променевого навантаження від використання іонізуючого випромінювання в різних сферах людської діяльності. Стрімке впровадження радіаційних технологій в різні галузі медицини і збільшення масштабів використання іонізуючого випромінювання відбуваються на тлі загострення екологічних (в тому числі радіаційних) проблем. Взаємодія різних факторів найчастіше характеризується їх синергізмом і може вести до потенційно негативних ефектів[38].

Безліч фахівців в наукових центрах в усьому світі зайняті вивченням і пошуком радіозахисні коштів з єдиною метою - послабити негативний або побічний ефект опромінення [39]. Завдяки такій діяльності до теперішнього часу створено цілий арсенал ефективних протирадіаційних засобів, але їх використання розглядається головним чином стосовно до аварійних умов або іншим надзвичайних ситуацій (терористичним актам, військових конфліктів і т.д.) Останнім часом інтенсивно розробляються засоби, призначені для завчасної профілактики і купірування тих ефектів, які можуть проявитися лише через тривалі терміни після радіаційного впливу - канцерогенез, мутагенез, скорочення тривалості життя, катаракта, нейроендокринні і серцево-судинні розлади і т.д. [40].

У цьому напрямку випробовуються найрізноманітніші речовини біогенної природи і отримані шляхом хімічного синтезу сполуки. До перших належать різноманітні речовини рослинного, бактеріального (дріжджі, лактобактерії та ін.) І тваринного походження (продукти бджільництва, препарати ракоподібних, моллюсків, риб, птахів та ін., В тому числі людські матеріали, наприклад препарат з плаценти - біоглобін). Це можуть бути і високомолекулярні сполуки (хітозан, Мана, трансп, дезоксінат, дріжджова

РНК), полісахариди, амінополісахарід, інші біополімери (гепарин, меланін) і низькомолекулярні сполуки [цитаміни, цитокіни, біогенні аміни, метаболіти енергетичного обміну (сукцинат), нуклеинового обміну (рибоксин), інгібітори і кофактор ферментів, біогенні анти-оксиданти, гормони та інші. Найважливіша роль в профілактиці радіаційних уражень відводиться антиоксидантів природного походження або їх синтетичним аналогам [41].

Щоб населення було здоровим, йому необхідне збалансоване харчування. Однак населення, в тому числі діти, досі по багатьох позиціях відчують нутрієнтний дефіцит (часткове голодування). У подоланні дефіциту, що стосується більшості вітамінів-антиоксидантів, а також макро- і мікроелементів, приховані можливості оздоровлення населення, в тому числі підвищення радіорезистентності. Це особливо важливо для тих його верств, які піддаються дії несприятливих впливів [42].

Найбільш ефективним способом подолання нутрієнтного дефіциту є збагачення раціону вітамінами, мінералами, амінокислотами (білками) і іншими незамінними продуктами харчування. Однак цей шлях не може зняти проблему цілком (через індивідуальний вибір їжі, за причинами матеріального достатку сімей). Тому залишається актуальним і може бути взято на озброєння радіаційною медициною додаткове індивідуальне призначення полівітамінних антиоксидантних комплексів, збагачених мінералами, які адаптовані до віку і статі пацієнтів і які лікар, в тому числі педіатр, може призначати виходячи з анамнезу, фізичного стану і наявності будь-яких захворювань у пацієнта[43].

Не можна скидати з рахунків і численні присутні на фармацевтичному ринку харчові добавки (БАД) з антиоксидантними властивостями. Багато з них випускаються надійними і перевіреними фірмами і містять в концентрованому вигляді необхідні і, як правило, відсутні в організмі корисні речовини. Застосування таких добавок можна вважати виправданим, а в окремих випадках необхідним [42].

Порушення вітамінного балансу та його особливості добре вивчені в експериментах і діагностовані в клініці у людей, які зазнали радіаційного впливу. Тому застосування різних вітамінів і вітамінних комплексів стало одним з найбільш доступних методів корекції пострадіаційних порушень і послужило відправним моментом для розробки і випробування різних комплексів на основі вітамінів-антиоксидантів як протирадіаційних засобів. Це можуть бути навіть мінімальні набори антиоксидантів (бета-каротин, аскорбінова кислота) [43]. На основі відомих вітамінів створюються аналоги, що володіють підвищеною ефективністю. Вираженим радіозахисним дією має глікозид вітаміну С (ЛЛО). Експериментально на мишах виявлено, що ЛЛО має захисну дію на кровотворення в умовах опромінення, імовірно шляхом нормалізації роботи системи глутатіону [44].

Поряд з цим слід зазначити, що серед безлічі фармакопейних сертифікованих препаратів є доступні і ефективні засоби з вираженою антиоксидантною, адаптогенною, антиканцерогенною, а в ряді випадків встановленим протипроменевою ефектом, які вже зараз можуть застосовуватися в якості премедикації і превентивного лікування наслідків медичного опромінення при наявності показань. Це препарати, що містять бурштинову кислоту, рибоксин [45], численні природні адаптогени, біостимулятори, імуностимулятори, що підвищують резистентність, що володіють загальнозміцнюючим і тонізуючим діями, давно застосовуються в медицині в складі комплексної терапії. Однак призначати такі препарати може тільки лікар при наявності відповідних показань.

Як уже зазначалося, доцільно призначати до моменту опромінення пацієнта і узаконити прийом радіопротекторів як до, так і після проведення процедури як складової базової терапії основного захворювання виходячи з анамнезу, природи і стадії захворювання, загального фізичного стану і тих лікарських засобів, які пацієнт вже приймає за приписом лікаря (щоб уникнути несумісності). Слід не забувати, що при опроміненні в низьких

дозах, особливого значення набувають індивідуальні особливості людини. При цьому потенціал його радіорезистентності визначається резервом всіх антиоксидантних і захисно-адаптивних механізмів у їх неповторному поєднанні, стійкістю психіки, стабільністю геному, станом імунних механізмів, віковими особливостями, станом судинної системи, гормональним статусом і адекватністю роботи регуляторних систем [46].

Важливе завдання, яке необхідно вирішити – це премедикація при масових привентивних обстеженнях, де використовується опромінення в малих дозах. Відбір спеціалізованих засобів, які слід рекомендувати для медичного опромінення при організації подібних масових флюорографічних обстежень (прийом до вищих навчальних закладів, мобілізація в армію і т.д.), не повинен лімітувати їх високою вартістю. Тим часом доскональне обстеження всіх цих осіб та виявлення серед них найбільш радіочутливих, що найбільше потребують хіміопрофілактики, - надзвичайно дорогий і навряд чи необхідний захід. Простіше, дешевше і ефективніше провести її всім без винятку особам, організовано направляються на рентгенівське обстеження. Отже, фармакопрофілактика - це резервний ешелон протирадіаційного захисту, який використовується далеко не повною мірою, оскільки він практично не застосовується в тій сфері радіаційного впливу, де це зробити простіше і найпотрібніше - при медичному опроміненні [47].

1.4. Сорбенти

Бурхливий розвиток промисловості призвів до антропогенного перерозподілу хімічних сполук, зміни матеріального складу навколишнього

середовища, що, безумовно, негативно вплинуло на біосферу Землі, умови існування і життєдіяльності людини, зокрема, порушило сформовані взаємодії організму людини з навколишнім середовищем. Збільшення в усьому світі кількості техногенних, екологічних катастроф і надзвичайних ситуацій чинить сильний вплив як стресові психотравмуючі фактори: небезпечні токсичні агенти; радіація; надмірні фізичні навантаження; страх заразитися інфекційними хворобами, страх втратити роботу і т.д. Виникають стани з загострення колишніх хвороб, в тому числі і психічних, з агресивною і суїцидальною налаштованістю [48].

Токсичні агенти (хімічні речовини, мікробні клітини і т.д.), потрапляючи в організм, призводять до порушення гомеостазу і виникнення стану, званого ендогенної інтоксикацією. Етіологічними факторами, які зумовлюють появу ендогенної інтоксикації, є порушення функції органів детоксикації та екскреції, пошкодження епітеліальних покривів і масивні порушення тканин, ішемія органів і тканин, екзотоксікози, імуносупресія, недостатність системи неспецифічної резистентності. Ендотоксинами можуть виступати і природні сполуки, які беруть участь у метаболізмі і з'являються в тканинах і біологічних рідинах. До них відносять продукти природного обміну у високих концентраціях, активовані ферменти, здатні пошкоджувати тканини, медіатори запалення, перекисні продукти, неоднорідні за складом інгредієнти нежиттєздатних тканин, агресивні компоненти комплементу, бактеріальні токсини (екзо- і ендотоксини) [49].

Серед широко застосовуваних сорбційних методів в залежності від способу і принципів виведення токсичних агентів розрізняють гемо-, лімфо-, плазмо-, лікворо-, ентеросорбцію, імуносорбцію, аплікаційну сорбцію. В даний час найчастіше віддають перевагу методу ентеросорбції, як неінвазивного і простого у виконанні. Інтерес до сорбційних методів не

слабшає, тому що еферентні методи з використанням сорбентів засновані на виведенні з організму отруйних, баластних речовин екзо- і ендогенної природи, при цьому зменшується навантаження на органи, що забезпечують детоксикацію (печінка, нирки, імунна система) [50].

Вимоги до сорбентів для медицини. Вони повинні бути механічно міцними, хімічно стійкими, мати заданими стандартизованими гранулометричного і текстурними параметрами, мати певний хімічний склад, мінімально травмувати біологічні тканини, не чинити токсичного впливу на органи і тканини, не поглинати білок і кисень з крові і лімфи, не порушувати мінерального балансу в організмі, бути селективними щодо певних класів речовин, виконувати свої функції протягом всього шлунково-кишкового тракту, добре і повністю евакуюватися з нього [51].

Перелік захворювань, при яких показані сорбційні технології. Це - гострі отруєння, алергічні захворювання, хвороби печінки і жовчних шляхів, хвороби нирок, хвороби легенів, гострі запальні та гнійно-септичні захворювання, психоневрологічні і психічні захворювання, абстинентні синдроми у наркоманів і алкоголіків, імунозалежними захворювання, наслідки травм, гострі порушення кровообігу, порушення основних видів обміну, онкозахворювання, променеві ураження, шкірні захворювання, ендокринні захворювання та інші. Так, при патологіях печінки сорбенти виводять з організму білірубін, аміак, жовчні кислоти, бактеріальні токсини; при захворюваннях нирок - продукти білкового і пуринового обміну (сечовина, сечова кислота, креатинін), середньо-молекулярні пептиди, електроліти, біогенні аміни, катехоламіни; при бронхолегеневих захворюваннях - кініни, катехоламіни, біогенні аміни, регуляторні пептиди, гормони, простагландини і інші біологічно активні речовини; при захворюваннях шлунково-кишкового тракту - бактеріальні токсини, індол,

скатол, жовчні кислоти, регуляторні пептиди, гормони, кінцеві і проміжні продукти основних видів обміну [52].

Механізм лікувальної дії сорбентів. Механізм сорбції пов'язаний з прямим і опосередкованим ефектом. Пряма дія сорбентів - це сорбція токсинів, отрут, що виділяються в хімус з секретом слизових оболонок, печінки, підшлункової залози, ендогенних продуктів секреції і гідролізу, сорбція біологічно активних речовин (нейропептидів, простагландинів, серотоніну, гістаміну), патогенних бактерій і їх токсинів, газів, а також роздратування зон шлунково-кишкового тракту. На прикладі ентеросорбції можна більш наочно уявити собі цей механізм. Токсини, перш ніж покинути організм, багаторазово всмоктуються і знову екскретуються кишковою системою. Це багаторазове дію сильно отруює організм. Ентеросорбент перериває виник порочне коло, фіксуючи токсини на своїй поверхні і виводячи їх з організму природним шляхом. Опосередкована дія - це запобігання або ослаблення токсико-алергічних реакцій, профілактика екзотоксикозу, зниження метаболічної навантаження на органи екскреції і детоксикації, корекція обмінних процесів, відновлення цілісності і проникності слизових оболонок, поліпшення кровопостачання, стимуляція моторики кишечника [53].

Модифіковані сорбенти. Зрозуміло, що вплив сорбенту на органи і тканини зростає в тих випадках, коли на його поверхню наносяться лікувальні, біологічно активні речовини (антибіотики, ферменти, клітини та ін.). Сорбційні методи цілком можна застосувати для введення лікувальних препаратів за умови оборотності сорбції речовин-модифікаторів. Сорбент попередньо насичують необхідними препаратами, і систему застосовують в режимі десорбції [54].

Одним з найбільш ефективних методів лікування при гострих отруєннях вважається застосування сорбентів. Відрізняються сорбенти і за своєю хімічною структурою: вугільні - на основі активованого вугілля; силікатні - на основі солей кремнію, в тому числі гелеві; гелі на основі солей алюмінію - алюмосилікати і цеоліти, а також на основі глинистих мінералів; препарати рослинного походження, включаючи харчові волокна і пектини [55].

Розглянемо процес на прикладі класичного деревного активованого вугілля, як найбільш доступного і максимально вивченого препарату. Крім безпосередньо сорбційної здатності він, крім того, стимулює перехід деяких ліків з кровоносного русла в просвіт кишечника (теофілін, карбамазепін, фенobarбітал).

Активоване вугілля також розглядається як ентеросорбент. Приймають його перорально і використовують для лікування патологічних станів, пов'язаних із екзогенними та ендогенними інтоксикаціями. Синтезоване гранульоване активоване вугілля із високорозвиненою активною поверхнею ($S_{\text{вст}} \sim 2700 \text{ м}^2/\text{г}$) застосовується як медичний радіопротектор при гострій променевій хворобі у щурів після загального рентгенівського опромінення тіла. Активоване вугілля демонструє позитивні результати при лікуванні гострої променевої хвороби, виражені в: зменшенні втрати маси тіла; захисті здатності формування колоній клітинами кісткового мозку; зменшенні кількості хромосомних аберацій кісткового мозку та пошкодження тканин тонкої кишки та селезінки; збільшення кількості лейкоцитів; відновлення швидкості генерації іонів супероксиду в печінці. Пероральне призначення активованого вугілля представляється перспективною розробкою лікування гострої променевої хвороби.

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Список використаних матеріалів

2.1.1. Витратні матеріали:

- ємності для дезінфекції;
- дезрозчин;
- спиртові серветки;
- пробірки;
- нестерильні пастерівські піпетки;
- пластикові насадки для автоматичних піпеток;
- стерильні пеніцилінові флакони;
- гумові корки для пеніцилінових флаконів;
- предметні скельця (“АРТАСА”, Італія);
- нестерильні рукавички;
- дистильована вода;
- фільтрувальний папір;
- мийний засіб для скелець;
- шприци на 1, 5, 10 мл (“Terumo”, Бельгія);
- голки для шприців різного діаметру (“Microlance”, Іспанія);
- стерильні чашки Петрі (“Termo”, США);
- камера Горяєва;
- дифузійні камери;
- стерильні 24-лункові планшети (“Termo”, США);
- підстилка у вигляді маленьких чіпчів деревини широколистих порід

дерев;

- корм для лабораторних тварин (ПП “РЕЗОН-1”, Україна).

2.1.2. Реактиви:

- барвник Гімза (“ACROS ORGANICS”, США);
- імерсійне масло;
- барвник Май-Грюнвальд (“ACROS ORGANICS”, США);
- лимонна кислота;
- перекис водню 3 % (“Віола”, Україна);
- мідний купорос (“Bayer”, Німеччина);
- натрію хлорид (“Дарниця”, Україна);
- пеніцилін (“Arterium”, Україна);
- стрептоміцин (“Arterium”, Україна);
- вода для ін'єкцій (“Дарниця”, Україна);
- ростовий фактор (GM-CSF), ();
- агар-агар ();
- середовище MEM у модифікації Дульбекко (DMEM), (“GIBCO”, США);
- FBS 9 % ();
- пенстром 1 % ();
- етиловий спирт 96 % (“Біолік”, Україна);
- етиловий спирт 70 %.

2.1.3. Лабораторний посуд:

- склянки для миття скелець;

- скляні банки з кришками для розчинів;
- вимірювальні циліндри;
- скляні стакани для розчину барвника Романовського-Гімза;
- флакони для води;
- леза для скальпелів (“Swann-Morton”, Великобританія);
- хірургічні ножиці;
- пінцети;
- затискачі;
- тримачі скелець.

2.1.4. Обладнання:

- ваги (“SARTORIUS”, Німеччина);
- автоклав();
- термостат (“JP Selecta”, Іспанія);
- морозильна камера (“Nova Scotia”, Канада);
- витяжна шафа (“Labcaire”, Великобританія);
- ламінарний бокс (“Inter Med”, США);
- бактерицидні лампи (“Медпромсервіс”, Україна);
- цитоцентрифуга (“Shandon”, США);
- холодильник (“Атлант”, Україна);
- світловий мікроскоп (“LEICA”, Німеччина);
- автоматичні мікропіпетки (“Termo”, США);
- камера для світлового мікроскопа (“Canon”, Японія);
- інвертований мікроскоп (“OLYMPUS”, Японія);
- таймер;
- лічильник лабораторний СЛ-1 (Україна);

- операційні столики;

2.2. Використана методика

2.2.1. Синтез активованого вугілля

Таблетки активованого вугілля діаметром частинок $0,1 \text{ мм} \leq d \leq 0,25 \text{ мм}$ і насипною щільністю $0,12 \text{ г / см}^3$ були підготовлені в кілька етапів, що включають:

1. Синтез кульок 2-метил-5-вінілпіридинового сополімеру зі стирольним дивінілбензолом;
2. Карбонізація цієї кульки при 4000°C в атмосфері азоту в обертовій печі;
3. "Консолідація" в атмосфері азоту при 8000°C ;
4. Перша активація карбонізату парою при 8600°C у обертовій печі до густини $0,28 \text{ г / см}^3$;
5. Друга активація у киплячому шарі лабораторної печі парою до насипної щільності $0,12 \text{ г / см}^3$;
6. Просіювання.

2.2.2. Тваринна модель

За два тижні до початку дослідження за правилами, затвердженими Комітетом з біоетики Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології (ІЄПОР), протокол №4 від 16.04.2015 р., було отримано тридцять щурів Wistar (вік шість тижнів) з тваринного будинку ІЄПОР масою тіла 140 г , яких було розміщено по одному у клітках з метою визначення індивідуальних рівнів споживання їжі. Усі тварини не мали доступу до їжі та води відповідно до положень Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986). У період адаптації тварин годували додатково вівсяною кашею. Тварин було розподілено на 3 групи: 1 - опромінені щури - Ір. контроль (n = 10); 2 - опромінені щури, які отримували ентеросорбент (С) - Ір + С (n = 10); 3 - здорові щури- Н. контроль (n = 10). Добова доза С становила 1,2 г на 1 кг маси щура, змішаної з невеликою кількістю (чайна ложка) вівсяної каші. Це споживання дози контролювалося візуально, оскільки кожен щур знаходився в окремій клітці, а попереднє вилучення протягом 2-3 годин звичайної їжі забезпечило добове споживання дози С. С подавали щурам за 3 дні до опромінення, в день опромінення та 9 днів після опромінення. Обидві контрольні групи отримували тільки овес за тією ж схемою, що і група 2. Половину тварин кожної групи (5 щурів) вбивали під загальним хлороформним наркозом для забору крові та органів у перший день після Ір, друга половина (5 щурів) - на 9-й день після Ір.

2.2.3. Опромінення

Щурів віком 8 тижнів масою $196 \text{ г} \pm 20$ опромінювали за допомогою рентгенівського опромінювача RUM-17 (СРСР) з робочим струмом 10 мА, 0,5-мм фільтром Cu, на відстані 30 см у спеціальній коробці (24x15 см) для 4 щурів. З метою іммобілізації тварин проводили анестезію внутрішньочеревинним введенням пентобарбіталу 0,5% (10 мл / кг маси тіла) за 12 хв до опромінення з метою забезпечення втрати рефлексорної активності. Тварини контрольної групи пройшли ту ж процедуру, виключаючи опромінення. Поглинена доза на одного щура становила 6 Гр (54,5 cGy / хв протягом 11 хв), яку застосовували вранці між 10-11:00.

2.2.4. Гематологічні показники (периферична кров і кістковий мозок)

Зразки крові були отримані за допомогою пункції серця та підрахунок клітин проводили у камері Горяєва. Суспензія і мазки з кісткового мозку готували з стегнових кісток. Стегнова кістка була розсічена, очищена, а епіфіз відрізаний. Кістковий мозок вимивали зі стегнової кістки в 1 мл живильного середовища і канал кісткового мозку ретельно промивали тим же розчином. Підраховували щонайменше 1000 клітин на одного щура, а мазки забарвлювали за Паппенгеймом і аналізували склад кісткового мозку всіх 30 щурів.

2.2.5. Функціональна активність клітин кісткового мозку

Клітини кісткового мозку стегна у стерильних умовах культивували *in vivo* у напівтвердому агарі з додаванням 20% сироватки плоду (Sigma, США), 0,33% бактеріального агару ("Difco", США та антибіотиків (50 О / мл пеніциліну, 50 мг / мл стрептоміцину). Культивування тривало 7 днів. Після закінчення культивування кількість колоній та кластерів підраховували під інвертованим мікроскопом (Nicon, Японія). За кластер (кластер-утворююча одиниця - CFU) було прийнято агрегат клітин, який включав не більше 39 клітин. Типова колонія (колонієутворююча одиниця-гранулоцит / макрофаг - CFU-GM) включала від 40 до декількох сотень клітин. Статистичний аналіз результатів проводився за допомогою непараметричного рівняння Манна - Вітні. Статистична значимість була встановлена на рівні $p < 0,05$.

2.2.6. Експеримент

Підготовка гелевих дифузійних камер (для мишей).

Гелеві дифузійні камери знаходяться в пробірках по 45 мл в стерилізуючому розчині (стерильні умови). Використовують дві камери на одну мишу. Одну камеру готують прозапас.

За добу до експерименту переносимо гелеві дифузійні камери в фізіологічний розчин (далі фізрозчин). Банка з фізрозчином має бути на 400 мл. Цей етап називається : етап відмивки. Ні в якому разі не чіпаємо руками.

Весь процес проходить в стерильних умовах і для перенесення камер з пробірки у банку з фізрозчином використовуємо стерильний пінцет.

Підготовка тварин до експерименту.

Також за добу до експерименту проводимо наступну маніпуляцію. Обробляємо циклофосфаном (внутрішній опромінювач). Цей препарат пригнічує імунну систему і каталізує проліферацію клітин. Комерційна назва препарату – «Ендоксан».

Готуємо розчин препарату. Для цього на 200мг сухої речовини додаємо 10 мл стерильного фізрозчину. Суха речовина повинна повністю розчинитися.

Перед введенням препарату розраховуємо необхідну кількість за допомогою пропорції. На 20г ваги необхідно 0,2мл розведеного розчину. Для визначення маси миші важимо її за допомогою електронних вагів. Після цього робимо розрахунок і набираємо в інсуліновий шприц необхідну кількість розчину та вводимо її миші підшкірно.

Підготовка інструментів та розчинів.

Операційний столик готуємо в три етапи. Вперше миємо водою. Вдруге протираємо перекисом водню. Втретє протираємо спиртом (70%). Так столик чистимо за день до експерименту і безпосередньо перед самим експериментом.

Розчин пеніциліну готуємо за інструкцією. В флакон з сухою речовиною ставимо 2 голки, одна - для проходження повітря і додаємо 10 мл води для ін'єкцій. Мішаємо для повного розчинення сухої речовини.

Розчин стрептоциду готуємо за інструкцією. у флакон з сухою речовиною ставимо голку для проходження повітря і додаємо 10 мл води для ін'єкцій. Мішаємо для повного розчинення сухої речовини.

В пластикові стерильні (одноразові) чашки Петрі вносимо 10мл фізрозчину, 4 краплі пеніциліну, 4 краплі стрептоміцину. Готуємо з розрахунком: 2 чашки Петрі на 1 тварину з якої буде взятий матеріал.

Для проведення операцій готуємо робочі набори: ножниці плюс пінцет. Розраховуємо 1 набір на 1 тварину та 1 про запас.

Всі інструменти повинні бути стерильні. Тому вони проходять стерилізацію в автоклаві на протязі 30хв.

Варимо агар. На 0,035мг агару використовуємо 5 мл води для інекцій.

Готуємо середовище: DMEM, 10% FBS, 1% пен/стреп/ельглют.

Експеримент.

Готуємо столик та інструменти.

Беремо крапельку крові з хвоста і робимо мазок. Після цього проводимо евтаназію. Кріпимо на столику. Місце розрізу обробляємо спочатку перекисом водню, а потім спиртом. Біля стегна робимо розріз. Вирізаємо стегову кістку. Стараємося зробити це максимально акуратно і обрізати усі зайві м'язи.

Поміщаємо кістку в завчасно підготовлену чашку Петрі з фізрозчином та антибіотиками. Промиваємо і переносимо кістку в наступну таку ж чашку. Обробляємо чашку спиртом і переносимо в стерильний бокс.

В боксі така ж чашка Петрі з розчином. В старій чашці стерильними інструментами очищуємо кістку від залишків м'язів і переносимо в стерильну чашку.

Беремо новий стерильний набір (ножиці плюс пінцет). По центру затискаємо кістку пінцетом і ножицями відрізаємо епіфізи. Попередньо у шприц на 1мл набираємо середовище повного складу (DMEM, 10% FBS, 1%

пен/стреп/L-глутамін). Беремо стерильний пеніциліновий флакон з гумовим корком і над ним у вертикальному положенні тримаємо кістку за діафіз. Беремо шприц з середовищем (і при цьому на шприці голка з найбільшим діаметром) і через канал кістки пропускаємо середовище. Вимиваємо до моменту вилучення кісткового мозку. Ресуспендуємо кілька разів. Змінюємо голку на голку з меншим діаметром і ресуспендуємо кістковий мозок кілька разів. Ще раз змінюємо голку на голку з меншим діаметром і ресуспендуємо кістковий мозок кілька разів.

Розбавлення: в новий стерильний пеніциліновий флакон вносимо 100мкл суспензії та 900мкл середовища. Автоматичною піпеткою відбираємо 10мкл розбавленої суспензії і вносимо в камеру Горяєва. Підраховуємо кількість клітин по діагоналі (Рис.2.1.).

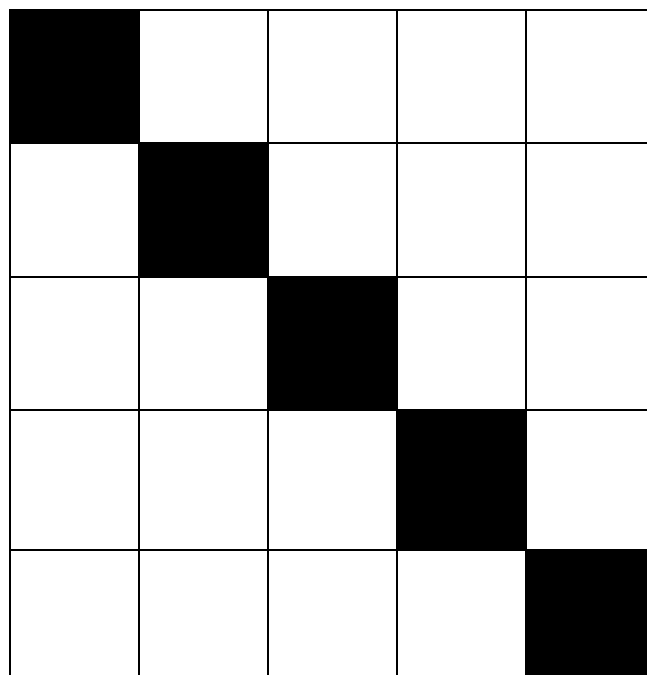


Рис.2.1. Схема підрахунку кількості клітин у камері Горяєва

Отримане число перемножуємо на 5 (бо квадратів в камері Горяєва 25). Перемножуємо ще на 1000 (бо 1000мкл) і на 10 (бо розвели в 10 разів).

Готуємо мікс для культивування. Робимо розрахунки кількості клітин для постановки експерименту. У одну дифузійну камеру нам потрібно 100000 клітин. В одну камеру вносять 0,2мкл загального міксу. В цьому міксі має бути середовище, клітини в потрібному об'ємі і агар в співвідношенні 50% від загального об'єму суспензії. Порядок внесення компонентів міксу в стерильний пеніциліновий флакон: середовище, агар (перемішуємо, завдяки чому агар трохи охолоджується) і тоді тільки вносимо клітини.

Беремо дифузійні камери. Зливаємо фізрозчин і висипаємо в стерильну чашку Петрі.

Беремо зручний пінцет. В шприц набираємо підготований нами мікс. Вносимо в камеру рівно 2мкл. Голкою пробиваємо бокову стінку камери. Акуратно витягуємо шприц і заміняємо його на шприц з напіврідким агаром, закриваємо агаром канал, який створився в результаті проколу бокової стінки камери. Для цього поступово витягуємо голку, весь час надавлюючи на поршень. Обов'язково до камер в чашці Петрі додаємо фізрозчин, який повинен покривати камери, щоб вони не підсихали.

Залишаємо дифузійні камери в чашці Петрі, яку кладемо на заморожений кріогель і у кріосумці транспортуємо в приміщення, де буде проходити операція.

Операція

Для наркозу готуємо розчин Сагаталу. До 0,2мл препарату додаємо 1,8 мл фізрозчину.

Беремо мишу і зважуємо, використовуючи електронні ваги. Розраховуємо необхідну кількість наркозу в залежності від маси миші.

На 20 г ваги миші необхідно 0,2 мл розчину. Інсуліновим шприцом робимо ін'єкцію. Чекаємо поки миша засне.

Коли миша заснула можна починати операцію. На столик кладемо фільтрувальний папір, на папір – мишу, фіксуємо її лапки. Обробляємо черевце мишки спочатку перекисом водню, потім спиртом 70%. Беремо стерильний набір (ножниці та пінцет) і робимо розріз по білій лінії черевця. Розрізаємо і шкіру і черевце.

Ложечкою акуратно поміщаємо дифузійні камери всередину черевної порожнини (2 камери на 1 мишу). Додаємо антибіотики: 4 краплі пеніциліну, 4 краплі стрептоміцину. Зашиваємо

Підбираємо голку та нитку. Голкою в одному стьожку проколюємо послідовно шкіру, черевце, черевце, шкіру. При першому стьожку залишаємо 5-10 см нитки для вузла вкінці.

Зашивши все, зав'язуємо вузол, фіксуємо вузол стерильним зажимом і робимо другий вузол. Відрізаємо залишок нитки, залишаючи 1,5-2см нитки. Місце оперативного втручання обробляємо йодом.

Знімаємо мишку з операційного столика і переносимо на столик з підігрівом. Чекаємо поки миша отямиться. В чисту підписану клітку на тирсу кладемо паперову серветку і переносимо на неї мишу, коли та прийде до тями.

Переносимо клітку в віварій і чекаємо 7 днів.

Зняття результатів

Через 7 днів потрібно дістати дифузійні камери. Для цього мишам провели евтаназію методом дислокації шийного хребця. Дифузійні камери дістали пінцетом і помістили в чашку Петрі з фізрозчином.

Кожну камеру очистили від тканини, що на ній наросла. Це було зроблено за допомогою пінцета та скальпеля. Очищену камеру поміщали на предметне скельце та проводили мікроскопіювання за допомогою інвертованого мікроскопа.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Тварини були розділені на три групи (Таблиця 3.1). Перша група – здорові тварини, опромінені (О), друга група – опромінені тварини, які отримували сорбент (О+С), третя група – здорові тварини (контроль К)

Таблиця 3.1

Кількісний розподіл піддослідних тварин на групи.

Група	Кількість досліджених тварин	
	1-й день	9-й день
Опроміненні	5	5
О+С	5	5
Контроль К	5	5
Загалом	15	15

Загальна кількість досліджених тварин – 30. На перший день після опромінення досліджено 15 тварин: контрольна група (5), опромінені тварини, які отримували сорбент (5) та опромінені, які не отримували сорбент(5).

Тварини, які досліджувалися на 9-й день, отримували сорбент з їжею кожного дня як до опромінення, так і на протязі 9 днів після опромінення.

Підрахунок кількості клітин крові (рис. 3.1) у тварин через 24 години після опромінення показав типове падіння рівня лейкоцитів та лімфоцитів у першій і другій групі тварин. Виявилося, що в обох опромінених групах їх кількість була у 10-12 разів менша порівняно з контролем (здорові тварини). Ніяких помітних змін рівня тромбоцитів практично не спостерігалось в цей період після опромінення.

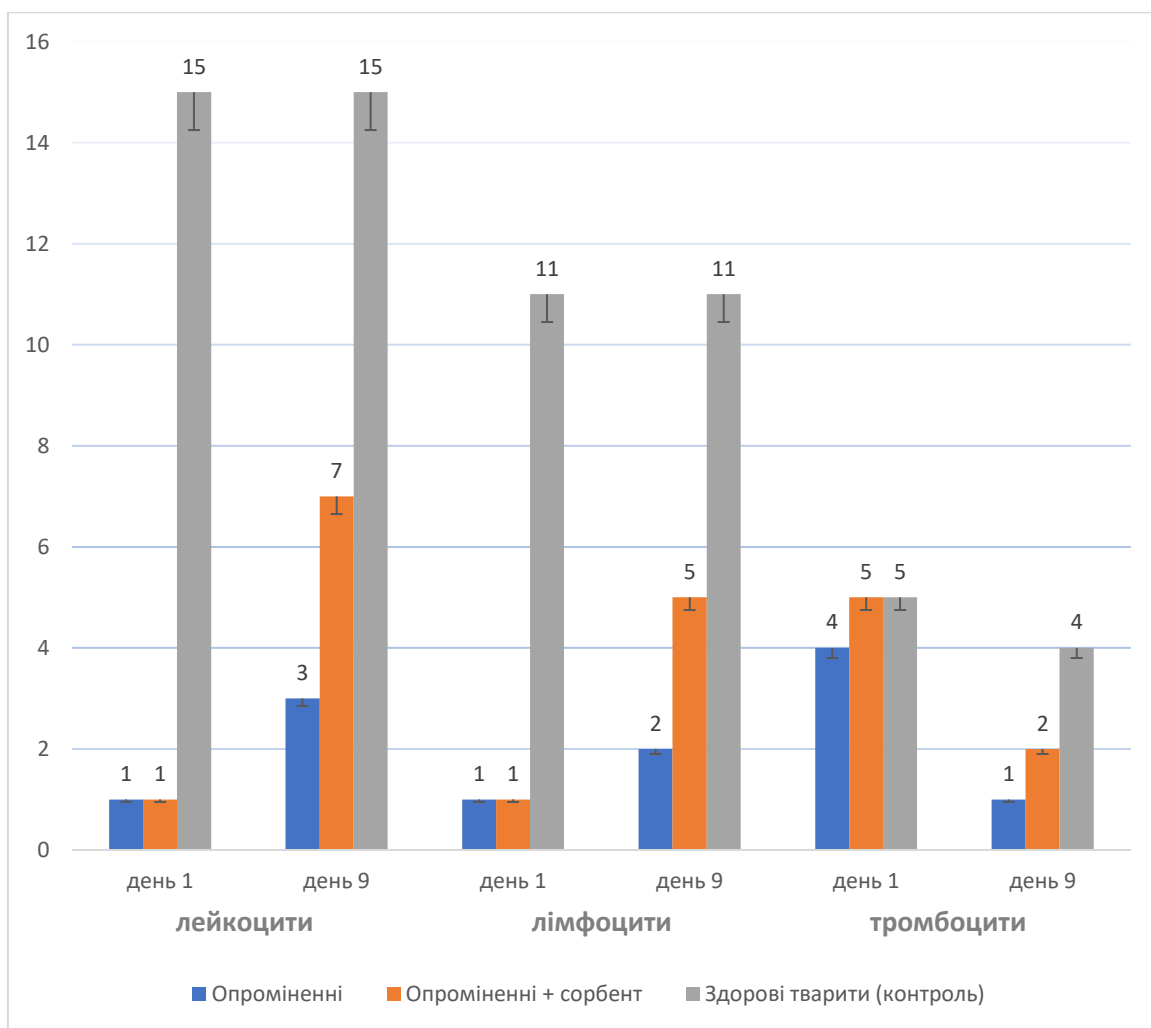


Рис. 3.1. Лейкоцити та лімфоцити ($10^9 / л$); тромбоцити ($10^{11} / л$) у щурів у перифірічній крові на 1-й та 9-й день після опромінення.

У перший день після опромінення в обох групах відповідно кількість клітин кісткового мозку (10^6 на стегнову кістку) була в 2,4–2,7 рази менша ($38,2 \pm 9,4$; $35,4 \pm 12,0$), ніж у здорових тварин ($88,0 \pm 14,7$). В результаті підрахунку (10^6 на стегнову кістку) всіх клітин кісткового мозку та його складових: гранулоцитів на етапах диференціювання, зрілих гранулоцитів, еритроїдних клітин, лімфоцитів (рис. 3.2) достовірні статистичні відмінності було виявлено між групою опромінених тварин, яким давали з їжею сорбент та опроміненою групою тварин, які сорбент не отримували.

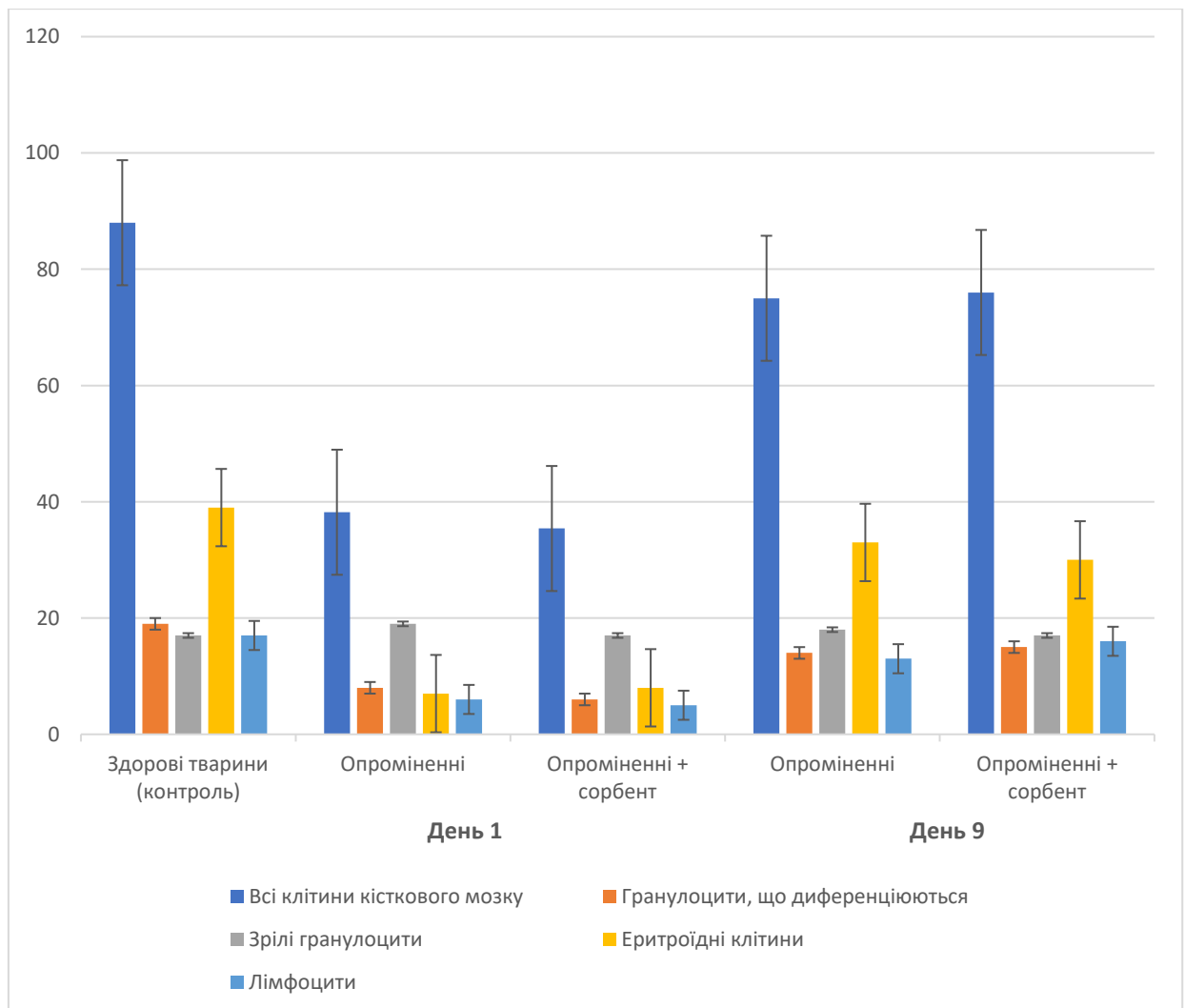


Рис.3.2. Клітини кісткового мозку (10^6 на стегнову кістку) у щурів на 1-й та 9-й день після опромінення.

Проте результати культивування клітин кісткового мозку, взятого у тварин через 24 години після опромінення, демонструють статистичну різницю в ефективності формування колоній (рис. 3.3.), а саме $6,0 \pm 0,8$ колоній та $5,0 \pm 1,1$ кластерів на 1×10^5 експлантованих клітин у опроміненої контрольної групи без сорбента та $9,0 \pm 1,3$ колоній та $20,0 \pm 2,4$ кластерів на 1×10^5 клітин, що експлантовані, у тварин, які отримували сорбент до та після опромінення. В обох групах О і О+ С після опромінення ефективність утворення колоній дорівнювала відповідно ($6,0 \pm 0,8$ та $9,0 \pm 1,3$) і виявилась зниженою відповідно в 3,7 та 2,4 рази порівняно з контрольними здоровими тваринами ($22,0 \pm 1,2$) на 1×10^5 експлантованих клітин.

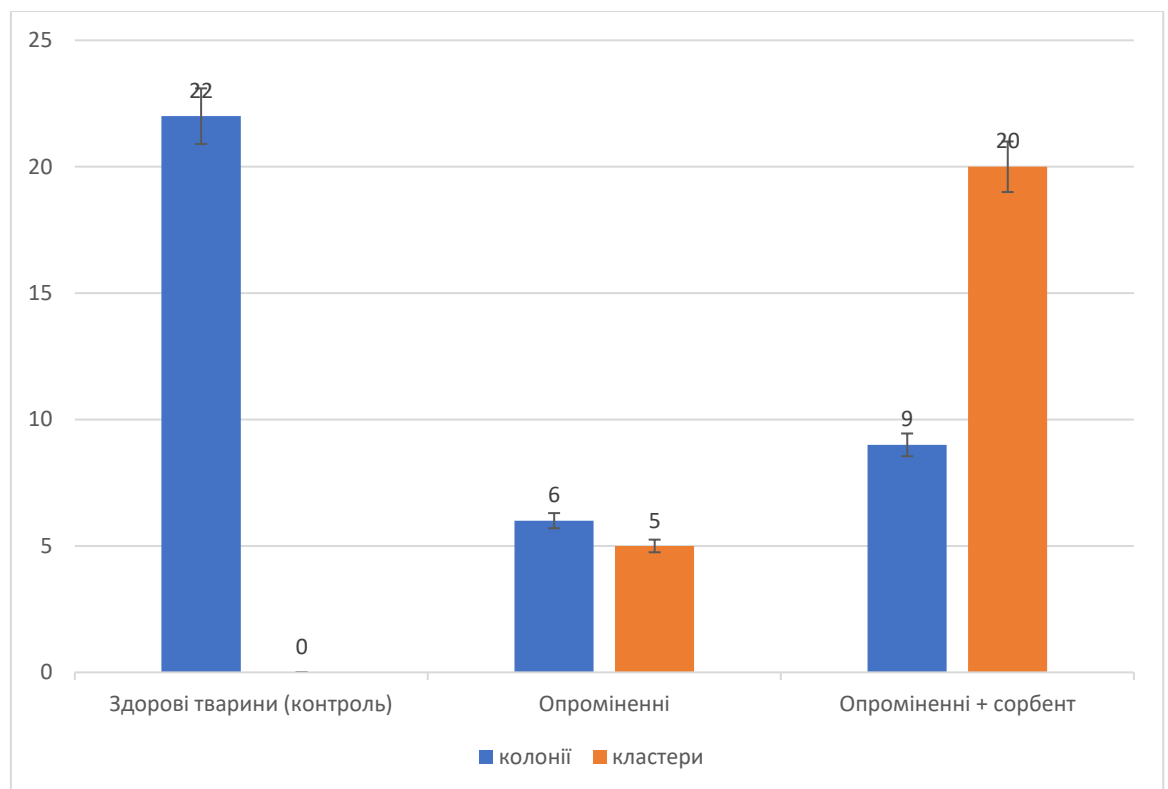


Рис.3.3. Результати культивування клітин кісткового мозку, взятого у тварин через 24 години після опромінення.

На 9-й день після опромінення ентеросорбція у щурів сприяла значному прискоренню відновлення кількості лейкоцитів та лімфоцитів у крові щурів ($7,2 \pm 0,8$; $5,0 \pm 0,7$) порівняно з контрольною групою, яка була опромінена, але сорбента не отримувала ($2,7 \pm 1,1$; $1,7 \pm 1,8$). Рівень тромбоцитів значно знизився в цей період після опромінення як в групі, яка отримувала сорбент, так і в групі, яка його не отримувала. Але рівень тромбоцитів був вищий у групі з сорбентом, ніж в опроміненій групі, якій сорбент не давали. Проте різниця носила характер тенденції.

Клітинний склад кісткового мозку опромінених тварин на 9-й день опромінення свідчив про відновлення кровотворення на 80-90% (рис.3.2) У цей період після опромінення виявлено достовірну статистичну різницю між опроміненими групами (О і О+С) в кількості клітин кісткового мозку (з розрахунку 10^6 клітин на стегнову кістку) та його складових (крім мітотичного показника).

Мітотичний показник клітин кісткового мозку (Таблиця 3.1) у групі, що отримувала сорбент, статистично вищий ($13,8 \pm 1,5$), ніж у необробленій опроміненій групі ($8,8 \pm 1,0$). У опроміненій контрольній групі, на відміну від групи, що отримувала сорбент, мітотичний показник клітин еритроїдного кісткового мозку ($4,2 \pm 1,2$) менший, ніж показник здорового контролю.

Таблиця 3.1

Мітотичний індекс (кількість мітозів на 1000 клітин): у всьому кістковому мозку, в клітинах еритроїдного та білого ростків кісткового мозку на 9-й день після опромінення.

Групи of rats	Мітотичний індекс кістковомозкових клітин		
	Всі клітини	Еритроїдні клітини	Лейкоцити
Опромінений контроль n=5	8,8±1,0	4,2±1,2*	4,6±1,6
Опромінені тварини, які отримували сорбент n=5	13,8±1,5**	7±1,4	6,8±0,7
Здоровий контроль n=5	11,6±2,0	6,8±1,6	4,8±1,6

$p < 0.05$ у порівнянні з здоровим контролем; ** $p < 0.01$ у порівнянні з опроміненим контролем.

На 9-й день згідно аналізу отриманих лабораторних показників відбувалося відновлення кровотворної функції (картина кісткового мозку і його складових покращалась) як в групі О, так і О+С. Проте відновлення виявилось більш інтенсивним у групі щурів, які до опромінення були оброблені сорбентом. Це означає, що опромінення в сублетальній дозі, яке

призводить щура до гострої променевої хвороби, впливає на найбільш чутливий до радіації клас гемопоетичних клітин-попередників, викликаючи пригнічення колонієутворення, що ми виявили на 1-шу добу після опромінення. Не зважаючи на таке опромінення відновлення на 9-й день все ж таки відбувається в обох опромінених групах. Проте в групі опромінених тварин, яких обробляли сорбентом, колонієутворення виявилось вищим як ну 1-й день, так і на 9-й. Це свідчить про радіопротекторний ефект сорбента, що пропонується. Підрахунок мітотичного індекса (кількості мітозів на 1000 підрахованих клітин) на 1-й і 9-й день після опромінення підтвердив наші міркування. Але вважаю, що пошуки кращого радіопротектора, який би був більш ефективним, повинні продовжуватися.

Загальне опромінення тварин в сублетальними дозах закономірно викликає зниження загального числа лімфоцитів (інтенсивність і тривалість лімфоцитопенії залежить від ступеня тяжкості) з одночасним зростанням в лімфоцитограммі кількості елементів з трансформованими ядрами. Підвищена кількість таких лімфоїдних клітин міститься в крові немовлят і, очевидно, не випадково. Звідси випливає, що стимуляція бласттрансформації лімфоцитів зі збільшенням в крові кількості малоактивних лімфоцитів теж є захисною реакцією. Напередодні загибелі опроміненого організму вона зникає. Реєстрація аналогічних змін в щурів, підданих помилковому опроміненню або впливу інтенсивного шуму, вказує на неспецифічну природу цієї реакції.

Таким чином, на будь-який екстремальний вплив система крові відповідає початковим збільшенням в кровотоці числа лейкоцитів зі зниженою функціональною активністю, що грає роль охоронного гальмування зі зниженням чутливості таких клітин до різноманітних стимулів і до фактор, що ушкоджує. Запускається вона гуморальним шляхом в результаті появи в крові продуктів розпаду клітин і накопичення в руслі крові різних біологічно активних речовин, які служать стимулом для відповідних компартментів системи кровотворення.

За відносної радіочувствительности з урахуванням проліферативної потенції і ступеня диференціювання розрізняють кілька класів клітин ссавців. Клас 1 - вегетативні клітини. Це швидко діляться, короткоживучі, радіочутливі клітини, дочірні клітини яких або диференціюються, або утворюють клітини, подібні батьківським. У цей клас входять такі клітини як лімфобластів, еритробласти, мієлобласти, клітини крипт кишечника, клітини слизової оболонки шлунка, сперматогонії типу А, овогонії, епідермальні клітини, лімфоцити. Лімфоцити належать до цього класу не тому, що вони швидко проліферують, а завдяки їх високій радіочутливості, що лежить в основі інтерфазної загибелі при низьких дозах радіації. Клас 2 – диференціюючі клітини. Вони мають досить високою швидкістю проліферації. Утворені дочірні клітини диференціюються і стають радіорезистентними. Це клітини проміжних стадій мієлопоезу, еритропоезу, сперматогонії типу В і овогонії. Клас 3 - мультипотентні сполучнотканинні клітини. Ці клітини діляться нерегулярно у відповідь на пошкодження і роздратування. До них відносяться ендотелій, фібробласти і мезінхімальні клітини. Клас 4 - постмітотичні клітини. Ці клітини щодо радіорезистентності і в нормі не діляться. Прикладами їх можуть служити епітеліальні клітини слинних залоз, печінки, нирок, підшлункової залози і легенів, ретикулярні клітини кровотворної тканини. Клас 5 - фіксовані постмітотичні клітини. Ці клітини не діляться, вони високорадіорезистентні.

Визначальним фактором індивідуальної радіочутливості є система регуляції гомеостазу. При радіаційному впливі, що викликає порушення рівноваги різних систем, настає пошкодження систем, функціонування яких направлено на усунення пошкодження.

Реакції організму у відповідь на шкідливу дію радіації не вичерпуються автономними змінами фізіологічних параметрів і функцій, а являють собою взаємообумовлених інтегральний відповідь різноманітних функціональних

систем. Істотну роль в їх інтеграції грають кровотворна і імунна системи, що є важливим джерелом інформації про стан внутрішніх резервів організму.

Багато авторів використовували в прогностичних цілях інформацію про стан системи кровотворення. Участь системи крові в адаптації організму до екстремальних факторів визначається, як природою впливу, так і станом кровотворної тканини.

Найбільша радіочутливість відзначається у стовбурових і коммитирование клітин. Мієлобласти більш стійкі до дії радіації, а промієлоцити і мієлоцити вельми радіорізистентні. Для еритробластів становить близько 1,0 Гр, для базофільних нормобластів - 0,5 Гр, поліхроматофільних нормобластів - 4,7 Гр, оксифільних нормобластів - 8,3 Гр, для ретикулоцитів - 12,9 Гр. Зрілі клітинні елементи досить стійкі до дії іонізуючого випромінювання.

Після впливу радіаційного агента в кістковому мозку швидко зменшується число клітин, а їх спад не компенсується достатньою мірою надходженням нових клітин з виснажених відділів. Клітини, які зберегли життєздатність клітки пролиферирующего відділу (можливо, і частково пошкоджені, але здатні до деякій кількості поділів стовбурові клітини) після відновлення мітотичної активності забезпечують підвищення клітинної кісткового мозку. Цей процес найбільш чітко проявлятися у гіперреактивних тварин в порівнянні з гипореактивность.

Істинне відновлення кісткомозкового кровотворення в опромінену організмі відбувається на основі проліферації стовбурових клітин, що зберегли життєздатність. Чим більше стовбурових клітин зберегло життєздатність, тим раніше почне відновлюватися число функціональних клітин в крові. Кількість збережених стовбурових клітин залежить від дози

опромінення, їх радіочутливості, а також від індивідуальних особливостей організму.

Пікноз ядра, каріорексис, руйнування ядра зазвичай вдається зареєструвати в перші години після опромінення. Зруйновані клітини досить швидко видаляються. Пізніше починають виявлятися клітини з порушеннями мітозу: гігантські клітини, клітини з гіперсегментованим ядром, з аномальними мітотичними фігурами, хромосомні фрагменти в інтерфазних клітинах. Максимум виходу цих клітин припадає на 12-24 год. Після опромінення. До третього дня більшість таких клітин також зникає.

Спад числа функціональних клітин починається, коли останні клітини, що надійшли до моменту опромінення в дозріваючий відділ, вийдуть в периферичну кров, тобто через термін, відповідний часу проходження клітин через цей відділ в нормі. Зміст в крові нейтрофілів, проходження яких через відділ дозрівання становить 5-6 діб, починає знижуватися саме з цього часу.

Лімфоцити гинуть вже в ранні терміни після опромінення, відповідно їх рівень в периферичній крові швидко знижується. Щодо малий вміст моноцитів в периферичній крові ускладнює оцінку змін їх числа після опромінення, тим більше що процентний вміст цих клітин у лейкоцитарній формулі істотно не змінюється. Тому при різкому зниженні після опромінення загального числа лейкоцитів в крові можна говорити про не менш глибокому зменшенні абсолютної кількості моноцитів.

Динаміка вмісту тромбоцитів після опромінення має схожість зі змінами кількості нейтрофілів. Абортивний підйом буває виражений тільки після опромінення в порівняно невисоких дозах. У фазі вторинного спустошення спостерігається глибока тромбоцитопенія: після опромінення в середньолетальній дозах кількість тромбоцитів досягає 5-8% від нормального рівня.

Зміст еритроцитів після опромінення зменшується в повільному темпі і помірно, оскільки зрілі еритроцити досить радіорезистентні, а тривалість життя цих клітин становить близько 100 днів. Навіть при повному припиненні їх утворення число еритроцитів в крові внаслідок природного відмирання знижується приблизно на 1% за день.

Крім кількісних зрушень, в клітинах крові після опромінення виявляються і морфологічні зміни: гомогенізація ядер лімфоцитів, поява лімфоцитів з мікроядра, гігантських гіперсегментованих нейтрофілів, гігантських тромбоцитів і тд.

Таким чином, іонізуючі випромінювання істотно впливають на кровотворну систему.

Лімфоцити відносяться до числа найбільш радіочутливих клітин в організмі і загибель їх відзначається вже після радіаційного впливу в десятих частках гріючи, а також більшою мірою залежить від індивідуальної чутливості організмів. При цьому гинуть не тільки молоді діляться клітини, але і зрілі лімфоцити. Серед радіочутливих клітин виділяються Т-лімфоцити (Т-хелпери і Т-супресори), В-лімфоцити і тімоцити вилючкової залози. Радіочутливість В-лімфоцитів вище, ніж Т-лімфоцитів, а радіаційна стійкість Т-супресорів дещо більше, ніж Т-хелперів. Тимоцити також розрізняються за своєю радіочувствительности: максимальна радіопоражаємості відзначається у камбіальних клітин, а найбільша радіорезистентність - у епітеліальних клітин. Крім того, серед Т-лімфоцитів є порівняно невелика популяція радіостійких клітин, які зберігають свою функціональну активність після опромінення в досить високих дозах (6-10 Гр, а за деякими даними - до 20 Гр). Розмір даної популяції може залежати від індивідуальних особливостей організму.

З високої радіочутливості зрілих популяцій лімфоцитів крові і їх інтерфазної. Інтерфазна загибель лімфоцитів починається через 6 годин і завершується через 3 доби. після радіаційного впливу. Руйнування лімфоцитів після опромінення відбувається як в лімфоїдних органах (тимус, лімфатичні вузли, селезінка, лімфоїдні утворення в кишечнику), так і в периферичній крові і лімфі. В результаті зниження числа лімфоцитів в крові можна виявити вже через десятки хвилин після опромінення, а до 3-ї доби число лімфоцитів знижується до мінімальних величин. Глибина зниження рівня лімфоцитів, так само як і інших клітин периферичної крові, прямо залежить від дози опромінення і індивідуальної реактивності організмів.

Вплив радіації на лімфоїдну тканину призводить не тільки до загибелі лімфоцитів, але і викликає значні зміни їх функціональної активності. Це, в свою чергу, може призводити до перекручення імунної відповіді як в найближчі терміни, так і (що особливо важливо) у віддаленому періоді після променевої дії.

Так, вже в найближчі хвилини - години після опромінення, як для В-лімфоцитів, так і особливо для Т-лімфоцитів, характерна втрата наявних на їх поверхні клітинних рецепторів для різних антигенів. Пострадіаційна зміна експресії молекул адгезії призводить до порушення розподілу лімфоцитів в крові і лімфоїдних органах, і фактично спотворює просторову організацію імунної системи.

Уже в ранні терміни після опромінення значно знижується робота В-лімфоцитів. Це пригнічення прямо корелює з динамікою депопуляції лімфоїдних органів і індивідуальною чутливістю організмів, а найбільш виражено в разі введення антигену через 1-2 діб після опромінення. Ще одним найближчим результатом радіаційного впливу є зниження проліферативної активності Т-лімфоцитів, їх міграційних властивостей. Загибель в результаті

опромінення Т-лімфоцитів супроводжується зниженням в організмі їх цитотоксичних функцій.

В даний час не викликає сумнівів твердження про те, що країни, що розвиваються зміни в стовбуровій системі опромінених є визначальними для результату променевого ураження. Променева дія викликає загибель певної частки стовбурових кровотворних клітин, причому величина її залежить від дози випромінювання. Криві доза - ефект мають загальновідомий вид кривих з плечем в області малих доз. Наявність плеча на кривій виживання означає, що до втрати репродуктивної здатності клітини повинні накопичити певний обсяг сублетальними пошкоджень. Характеризує радіочутливість величина (доза, що викликає загибель 63% клітин) істотно не відрізняється у ссавців різних видів в кістковому мозку, отриманому з різних кісток, і становить від 0,5 до 1 Гр. Для кровотворних колонієутворюючих клітин селезінки (КУО-С) До знаходиться в межах 0,75 -1,5 Гр. В силу високої проліферативної активності є певний ліміт стійкості системи родоначальних клітин, що дозволяє справлятися з наслідками одноразового, повторного або хронічного променевого впливу.

В цілому відсутність зрушень в морфологічному складі крові при дії випромінювання в межах допустимих доз спостерігаються на різних етапах нормування професійного опромінення радіаційні пошкодження паренхіми кісткового мозку оборотні, а зміни з боку системи крові та механізми, що лежать в їх основі, вважаються багато в чому неспецифічними і розглядаються з позицій адаптаційної сутності протікають в кровотворної тканини процесів .

Таким чином, якщо прийняти, що радіаційні пошкодження паренхіми кісткового мозку оборотні, то і кількісні показники периферичної крові повинні повертатися до нормального рівня. Обґрунтовано гіпотеза, що поряд з тканинними компенсаторними реакціями, типовими для ураженої тканини з

можливістю істинної репарації, при опроміненні мають місце і інші механізми пошкодження кровотворення.

Таким чином, ми отримали дані, які свідчать про захисну дію сорбента, який пропонується, на кровотворну систему, а саме на рівень гемопоетичних клітин-попередників. Хоча їх рівень після опромінення був меншим, ніж контроль, але він був вищий у порівнянні з групою опромінених тварин. Ці дані ми отримали через добу після опромінення. В цей час показники кісткового мозку були значно пригнічені.

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Механізм впливу іонізуючої радіації на кровотворну систему, як найбільш чутливу до дії опромінення, на сьогоднішній день, в загальних рисах, ясний. Радіація впливає на стовбуровоклітинний пул і на морфологічно ідентифіковані проліферуючі клітини. Тому всі події, які відбуваються на рівні дозріваючих зрілих клітин, є наслідком порушень на більш ранньому рівні. Тому, вивчаючи дію ентеросорбента на життєдіяльність клітин периферичної крові і кісткового мозку, ми вважали за необхідне зробити оцінку ранніх відділів кровотворення, а саме, гемопоетичних клітин-попередників.

Колонієутворюючі клітини в культурі з напіврідким агаром *in vivo* представляють собою найближчі нащадки стовбурових гемопоетичних клітин. У той час як істинно стовбурові клітини перебувають в нішах в G_0 періоді і захищені від згубного впливу радіації, кровотворні клітини-попередники виявляються на «передовій». Визначалася колонієутворююча здатність (CFU-GM) кісткового мозку щурів в культурі клітин *in vitro*, як кількість колоній, які виростають в напіврідкому агарі з розрахунку 100 000 посаджених (або експлантованих) клітин. Саме їх кількість ми визначали в культурі з напіврідким агаром, який додається в живильне середовище для того, щоб уповільнити міграцію проліферуючих клітин від центру клітинних агрегатів на периферію. За колонію брали клітинні агрегати, що налічують 40 і більше клітин. Клітинні скупчення від 3 до 39 клітин вважали кластерами. Це більш зрілі клітини-попередники, які пройшли раніше кілька поділів і тепер в культурі здатні сформувати клітинні агрегати, що складаються з меншої кількості клітин, ніж колонії.

Як і слід було очікувати, нами було отримано падіння колонієутворюючої здатності кровотворних кісткомозкових клітин-попередників як в групі з опроміненням, так і в групі щурів опромінених, які отримували сорбент з їжею в порівнянні з контролем. Але в групі тварин, які отримували сорбент, колонієутворення було активніше і статистично достовірно відрізнялося від групи тварин, що не отримували сорбент. Різниця статистично достовірна. Тому цього потенціалу виявилось досить, щоб на 9-ту добу досягти репарацію кровотворення на 80-90%. А це означає, що в механізмі відновлення компартмента стовбурових клітин і їх найближчих нащадків (гемопоетичних клітин-попередників) грає істотну роль захисна дія ентеросорбенту, що підтверджується відновленням пулу дозріваючих і зрілих клітин кровотворної системи до 9-ї доби спостереження.

ВИСНОВКИ

1. Показана можливість отримання гемопоетичних клітин-попередників, найближчих нащадків стовбурової клітини, з кісткового мозку щурів Wistar у культурі гелевих дифузійних камер, імплантованих у черевну порожнину мишей СВА.

2. В роботі на моделі опромінених у сублетальній дозі щурів на 1-й день після опромінення в результаті аналізу кількісного і якісного складу клітин периферичної крові, кісткового мозку, включаючи мітотичний індекс, продемонстровано пошкодження кровотворної функції в групі тварин, яким не давали ентеросорбента з їжою.

3. Отримано значне падіння рівня гемопоетичних клітин-попередників у культурі дифузійних камер в групі опромінених тварин, які сорбент не отримували.

4. Використання ентеросорбента свідчило про його захисну дію на клас гемопоетичних клітин-попередників вже на першу добу після опромінення, що передувало відновленню гемопоеза на 9-й день як в групі тварин, які не отримували сорбент, і ще інтенсивніше в групі тварин, які сорбент отримували.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Brizel D.M. *Clin. Oncol.* 2007. Vol. 25, N 26. P. 4084–4089.
2. Erslev AJ, Williams WJ, Beutler E, Lichtman MA. *Production of erythrocytes*. New York: McGraw-Hill; 1983.
3. Dancey JT, Deubelbeiss KA, Harker LA, Finch CA. Neutrophil kinetics in man. *Clin Invest* 1976; (706).
4. Володимирська ЄБ, Майорова О.А, Румянцев СА, Румянцева О.Г. Біологічні основи та перспективи терапії стовбуровими клітинами, *Медпрактика*. 2005.
5. Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells', *Radiat Res.* 1961.
6. Pluznik DH, Sachs L. The cloning of normal “mast” cells in tissue culture, *Cell Physiol.* 1965.
7. Bradley TR, Metcalf D. The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *Exp Biol Med.* 1966.
8. Allen TD, Dexter TM. Cellular interrelationships during in vitro granulopoiesis. *Differentiation.* 1976.
9. Katrina Woznicki. Stem Cell Debate Expected to Intensify, *Medline Plus.* 2002.
10. Raja Mishra. Stem cell research runs into roadblocks, *Knight Ridder, Tribune Business News.* 2005.
11. Lajtha LG. On the concept of the cell cycle, *Cell Comp Physiol.* 1963.
12. Lajtha LG. Stem cell concepts. *Differentiation,* 1979.
13. Becker AJ, McCulloch EA, Siminovitch L, Till JE. The effect of differing demands for blood cell production on DNA synthesis by hemopoietic colony forming cells of mice, *Blood.* 1965.

14. Hara H, Ogawa M. Murine hemopoietic colonies in culture containing normoblasts, macrophages, and megakaryocytes, *Hematol.* 1978.
15. Hodgson GS, Bradley TR. Properties of haematopoietic stem cells surviving 5-fluorouracil treatment: Evidence for a pre-CFU-S cell, *Nature.* 1979.
16. Suda T, Suda J, Ogawa M. Proliferative kinetics and differentiation of murine blast cell colonies in culture: Evidence for variable Go periods and constant doubling rates of early pluripotent hemopoietic progenitors, *Cell Physiol.* 1983.
17. Leary AG, Himi Y, Kishimoto T, Clark SC, Ogawa M. Survival of hemopoietic progenitors in Go does not require early hemopoietic regulators, *Proc Natl Acad.* 1989.
18. Leary AG, Zeng HQ, Clark SC, Ogawa M. Growth factor requirements for survival in Go and entry into the cell cycle of primitive human hemopoietic progenitors, *Proc Natl Acad.* 1992.
19. Suda T, Suda J, Ogawa M. Disparate differentiation in mouse hemopoietic colonies derived from paired progenitors, *Proc Natl Acad.* 1984.
20. Suda J, Suda T, Ogawa M. Analysis of differentiation of mouse hemopoietic stem cells in culture by sequential replating of paired progenitors, *Blood.* 1984.
21. Leary AG, Ogawa M, Strauss LC, Civin CI. Single cell origin of multilineage colonies in culture: Evidence that differentiation of multipotent progenitors and restriction of proliferative potential of monopotent progenitors are stochastic processes, *Clin Invest.* 1984.
22. Wu AM. Regulation of self-renewal on human T lymphocyte colony-forming units (TL-CFUs), *Cell Physiol.* 1983.
23. Pharr PN, Nedelman J, Downs HP, Ogawa M, Gross AJ. A stochastic model for mast cell proliferation in culture, *Cell Physiol.* 1985.
24. Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells, *Blood.* February 21, 2013.

25. Metcalf D. Lineage commitment of hemopoietic progenitor cells in developing blast cell colonies: Influence of colony-stimulating factors, *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992.
26. Lei J., Zhou C. Hu H. et al. *Cell Biochem*. 2012, (2633–2642).
27. Leary AG, Wong GG, Clark SC, Smith AG, Ogawa M. Leukemia inhibitory factor/differentiation-inhibiting activity/human interleukin for DA cells augments proliferation of human hemopoietic stem cells, *Blood*. 1990.
28. Sutherland HJ, Eaves CJ, Lansdorp PM, Thacker JD, Hogge DE. Differential regulation of primitive human hematopoietic cells in long-term cultures maintained on genetically engineered murine stromal cells, *Blood*. 1991.
29. Burdelya L. G., Krivokrysenko V. J., Talant T. C. An antagonist of Toll-like receptor 5 has radioprotective activity in mouse and primate models, *Science*. 2008. (226-230).
30. Кадирова Н. Ж. . *Вестник НЯЦ РК* 2004; (19).
31. Sweeny T. R. A survey of compounds from the antiradiation drug development program of the USA army medical research and development command, *Walter Reed Army Res. Inst*. 1979. (850).
32. Абдуль Ю. А., Антушевич А. Е., Деев С. П. и др. Современная система противорадиационной медицинской защиты участников ликвидации последствий крупномасштабных радиационных аварий, *Военная медицина. Проблемы профилактики, диагностики, лечения экстремальных состояний*. 1994. (76-85).
33. Uma Devi P. Normal tissue protection in cancer therapy, *Acta Oncologica*. 1998. (247-252).
34. Annex A. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. Sources and Effects of Ionizing Radiation, UNSCEAR. 2008.

35. Sources and Effects of Ionizing Radiation. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. UNSCEAR. 2000. Report to the General Assembly. N-Y. 2000.
36. Vines A. Ling F. McClean B. Bystander signal production and response are independent processes which are cell line dependent, *Radiat. Biol.* 2008.(83-90).
37. Рождественский Л. М. Радиобиологический анализ оценки канцерогенного риска в радиационно-эпидемиологических исследованиях, *Радиац. биол. радиоэкология.* 2008.
38. Robbins M.C, Zhao W. Chronic oxidative stress and radiation-induced late normal tissue injury, *Radiat. Biol.* 2004.
39. Васин М.В. *Средства профилактики и лечения лучевых поражений*, 2001. (314).
40. Легеза В.Н, Гребенюк А.Н, Бутомо Н.В. *Медицинские средства противорадиационной защиты*, 2001. (96).
41. Иванов Е. В, Пономарева Т. В, Романович И. К, Меркушев Н. Г. Дигидропиридины в лечении и профилактике лучевых поражений. Кн. 1. Радиопротекторные свойства 1,4-дигидропиридинов, 2009. (374).
42. Василенко С. А., Пономарева Т. В., Гонцов А. А. Влияние биологически активных пищевых добавок на восстановление пострadiационных нарушений, *Экологическая экспертиза.* 2003. (2-32).
43. Иванова А. А., Шепилова В. А. Механизм действия глико-зида витамина С (AAG) в защите системы кроветворения у мышей после облучения в сублетальной дозе. Докл. 4-й региональной конференции молодых ученых «Вопросы экспериментальной и клинической онкологии», г. Томск. СПб. онкол. журн. 2009, прил. № 1. С. 80-81.
44. Гадилия А.П., Гавриш Л.И., Меркулов С.П., Степанов Ю.В. Влияние препаратов АММИВИТ и ЦЕРУЛОПЛАЗМИН на коррекцию радиоиндуцированных показателей ПОЛ в лимфоидных клетках селезенки и тимуса крыс, *Медико-биол. пробл. противолучевой и противо-хим. защиты.* СПб.: Фолиант, 2004. (227-228).

45. Вернигорова Л.А., Жирова Е.С., Попов Б.А., Парфенова И.М. Разработка комплекса радиозащитных препаратов для применения в условиях чрезвычайных радиационных ситуаций, *Медико-биол. пробл. противолучевой и противохим. защиты*. СПб.: Фолиант, 2004. (223-224).
46. Vines A. Ling F. McClean B. Bystander signal production and response are independent processes which are cell line dependent, *Radiat. Biol.* 2008.(83-90).
47. Вартамян Л.П., Пустовалов Ю.И., Горнаева Г.Ф. Средства раннего превентивного лечения острой лучевой болезни. Теоретические подходы и практические возможности. 2011. (39).
48. Kovacsics C.E., Gould T.D., Gottesman I.I. Lithium's antisuicidal efficacy. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2009. 49. 175-98.
49. Бородин Ю.И. Лимфатические структуры при токсикозе и сорбентной детоксикации, *Морфология*. 2000. 117. (3). 25.
50. Borodin Yu.I., Kudryavtseva N.N., Tendit-nik M.V et al. Behavioral effects of novel enterosor-bent Noolit on mice with mixed depression/anxiety like state, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2002. 72. 131-141.
51. Рачковская Л.Н., Бгатова Н.П., Бородин Ю.И., Коненков В.И. Протекторные свойства сорбентов, возможности применения в лимфологии, *Лимфология*. 2012. 1063-1091.
52. Kudryavtseva N.N. A sensory contact model for the study of aggressive and submissive behavior in male mice, *Aggress. Behav.* 1991. 17. (5). 285-291.
53. Shaun G. General Management of Poisoned Patients. In: Tintinalli J.E., Stapczynski J.S., Ma O.J., Yealy D.M., Meckler G.D., Cline D.M., editors. *Tintinalli's Emergency Medicine: A Comprehensive Study Guide*. 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2016.
54. Marraffa JM, Cohen V, Howland MA. Antidotes for toxicological emergencies: a practical review. *Am J Health Syst Pharm.* 2012.

55. Rumack B.H., Matthew H. Acetaminophen poisoning and toxicity, *Pediatrics*. 1975. (871-876).
56. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. - Council of Europe, Strasbourg, 1986.- 56 p
57. Структурные основы адаптации и компенсации нарушенных функций: Руководство Л.И. Аруин [и др.]; под ред. Д.С. Саркисова. - М.: Медицина, 1987. - 448с.
58. Lance, E.M. Immunosuppression E.M. Lance, *Immunology for surgeons*; ed. by S.L. Castro. Washington, 1976. P. 229-257.
59. Гогин, Е.Е. Сочетанные радиационные поражения. Е.Е. Гогин, В.М. Емельяненко, Б.А. Бенецкий, В.Н. Филатов. - М.: ППО «Известия», 2000. 240 с.
60. Chinda, Daisuke. A competitive marathon race decreases neutrophil functions in athletes. Daisuke Chinda, Nacaji Shigeyuki, Umeda Takashi et al. *Luminescence*. - 2003. - Vol. 18, No. 6. - P. 324-329.
61. Аксенова, Н.В. Экспериментальное обоснование использования интерлейкина-1 β при различных вариантах радиационного воздействия: автореф. дис. канд. мед. наук Н.В. Аксенова; Воен.мед. акад. им. С.М. Кирова. СПб., 2004.- 28 с.
62. Білько Н. М. Патент України № 2692. Спосіб виготовлення камери для культивування клітин. від 15.04.1994. Офіційний бюлетень «Промислова власність», 1994, 5: 218.
63. Білько Н.М. Методи експериментальної гематології. Навчально-методичний посібник. К.: Видавничий дім «Києво-Могилянська академія». 2006. – 66 с.

64. Гольдберг Е.Д. Методы культуры ткани в гематологии. Е.Д. Гольдберг, А.М. Дыгай, В.П. Шахов. Томск: Изд-во Том. Ун-та. – 1992. – 246 с.
65. Животная клетка в культуре (Методы и применение в биологии) / Под ред. проф. Л.П. Дяконова. М.: Компания Спутник. 2000. С. 7 – 18, 121 – 147.
66. Helgason C.D., Miller Helgason C.L. Basic cell culture protocols, third edition. Human Press, 2012, 290: 364.