

УДК 612.1+612.8-085.322-929

Т. В. Гладкій, канд. біол. наук, доц., Т. В. Коломійчук, ст. викл.,
Л. І. Сьомік, канд. біол. наук, доц., Л. М. Карпов, д-р біол. наук., проф.,
О. Д. Павліченко, ст. викл., Т. В. Бузика, біолог
Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова,
кафедра фізіології людини та тварин,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна

МОРФОЛОГІЧНІ ПОКАЗНИКИ ЕРИТРОЦИТІВ ЩУРІВ ЗА ШТУЧНОЇ ГЕМОЛІТИЧНОЇ АНЕМІЇ НА ФОНІ ЗАСТОСУВАННЯ ВОДРОСТІ *SPIRULINA PLATENSIS* У ЯКОСТІ ХАРЧОВОЇ ДОБАВКИ

Показано, що при введенні щурам фенілгідазину (ФГ) на п'яту добу формується гемолітична анемія, яка характеризується значним зменшенням кількості, а також дегенеративними змінами морфології еритроцитів: анізоцитозом, пойкилоцитозом, гіпохромією, включеннями. У всіх щурів спостерігається активний регенеративний процес, що супроводжується появою великої кількості поліхроматофільних еритроцитів і нормобластів. Відновлення картини червоної крові за штучної анемії відбувалося інтенсивніше у тварин, що приймали як харчову добавку спіруліну. Чітких відмінностей у впливах дикого штаму спіруліни і мутантів 198 В і 27 G на хід регенеративного процесу не виявлено.

Ключові слова: анемія, фенілгідазин, спіруліна, кров, щури.

За останні роки у зв'язку із загрозою екологічної кризи гостро постало питання пошуку засобів захисту організму людини від тривалого техногенного навантаження, яке викликає появу порушень різних систем організму, особливо системи крові. Так, гемолітичні анемії стали широко розповсюджені. Вони становлять велику групу захворювань, що розрізняються за етіологією, патогенезом, клінічною картиною, методами лікування. Основною ознакою гемолітичних анемії є підвищений розпад еритроцитів і скорочення тривалості їх існування у 8–10 разів.

Для вивчення порушень в системі крові в експерименті часто застосовують різні чинники, що викликають анемії. Однією з відомих гемолітичних отрут є фенілгідазин (ФГ), який викликає анемію з внутрішньосудинним гемолізом еритроцитів. Анемія, що розвивається в результаті навіть одноразового введення ФГ, діагностується досить рано і прояви її достатньо виразні [1].

В сучасній літературі є багато даних про застосування синьо-зеленої водорості спіруліни в гематології. Завдяки високому вмісту вітаміну В₁₂, заліза, міді, кобальту та марганцю її використовують

при лікуванні гіпохромних анемії. При цьому спостерігали нормалізацію рівня гемоглобіну, збільшення засвоєння заліза еритроцитами [2, 3].

Для посилення позитивних властивостей спіруліни в лабораторіях світу здійснюється селекція нових штамів спіруліни, що мають здатність накопичувати значно більшу кількість тих або інших біологічно активних компонентів. У лабораторії ОНУ були отримані штами, в яких вміст метіоніну в біомасі значно більший, ніж у штамі дикого типу. Надсинтез метіоніну у цих штамів супроводжується збільшенням вмісту білка (до 80% від ваги сухої біомаси) і зменшенням вмісту вуглеводів (до 3–6%), а у штамі 27 G — ще й значним підвищенням вмісту с-фікоціаніну [4, 5].

Попередні наші дослідження виявили позитивний вплив як дикого, так і мутантних штамів спіруліни на деякі показники організму щурів [6], тому метою даного дослідження було порівняльне вивчення дії біомаси штамів *Spirulina platensis* дикого типу і мутантів 198 B і 27 G як харчової добавки на динаміку морфологічних показників еритроцитів білих щурів за умов гемолітичної анемії, яка була модельована за допомогою фенілгідразину.

Матеріал і методи дослідження

Вивчення динаміки еритрограм після моделювання гемолітичної анемії проводили на базі кафедри фізіології людини і тварин ОНУ восени 2004 року на 40 білих щурах вагою 180–220 г. Тварини були поділені на п'ять груп, по 8 щурів у кожній.

Перша група щурів була інтактною. У тварин другої — п'ятої груп викликали розвиток гемолітичної анемії шляхом щоденного внутрішньом'язового введення солянокислого фенілгідразину (ФГ) в дозі 20 мг/кг маси тіла впродовж чотирьох діб. П'ята доба після початку введення ФГ вважалася першим днем сформованої гемолітичної анемії. Про розвиток анемії судили за даними лабораторно-клінічних досліджень: вмісту еритроцитів і концентрації гемоглобіну.

Тваринам третьої — п'ятої груп на другу добу після початку введення фенілгідразину внутрішньошлунково вводили синьо-зелену водорість спіруліну у розрахунку 250 мг сухої ваги на кг маси тіла у вигляді водної суспензії в об'ємі 2 мл. Введення здійснювали щодня впродовж двох тижнів.

Тваринам третьої групи вводили чисту культуру спіруліни дикого типу (ДТ), четвертої групи — штам мутанта 198 B (надалі група 198 B), тваринам п'ятої групи — штам мутанта 27 G (надалі група 27 G). Всі штами спіруліни були вирощені в лабораторії ціанобактерій ОНУ. Тваринам контрольної групи щодня внутрішньошлунково вводили еквівалентний об'єм фізіологічного розчину.

Показники еритрограм вивчали на мазках крові, забарвлених по Романовському-Гімза. Кров для дослідження відбирали з хвостової вени тварин. Взяття крові здійснювали на 1, 5, 10, 20 і 30 добу після розвитку анемії. Мікроскопію мазків провадили за допомогою мікроскопа "Біолам" (збільшення 7 x 90). Фотореєстрацію клітин крові — за допомогою цифрової відеокамери.

На мазках крові виявляли показники, що характеризують стан еритроцитів: форму, розміри, насиченість гемоглобіном і наявність включень. Всі знайдені порушення фіксували кількісно, розраховували кількість аномальних клітин на 1000 еритроцитів. У ряді випадків використовували напівкількісний спосіб реєстрації, відзначаючи значками "+" ступінь вираженості аномалії.

Результати досліджень і їх обговорення

Результати досліджень показали, що для крові здорових щурів характерна наявність незначної кількості поліхроматофільних еритроцитів та одиничних нормобластів. У деяких тварин була виявлена гіпохромія, що свідчило про недостатнє насичення гемоглобіном еритроцитів.

У таблицях 1 і 2 представлені дані, що характеризують стан еритроцитів периферійної крові щурів, у яких була сформована гемолітична анемія.

Через 5 діб після початку внутрішньом'язового введення солянокислого ФГ спостерігався пік розвитку анемічного процесу у тварин всіх експериментальних груп. Цей термін був прийнятий за "відправну" точку, і його позначили як перший день розвинутої анемії. На цей момент вміст еритроцитів в крові щурів контрольної групи і щурів, які отримували спіруліну штамів дикого типу і 198 В, досягав 48,3–50,9% від вихідного рівня, а в крові щурів, що отримували спіруліну штаму 27 G, — 54,7% (табл. 1). Зрілі еритроцити до моменту формування анемії практично зникли з крові і були заміщені поліхроматофільними.

У процесі виходу щурів із стану анемії кількість еритроцитів в крові поступово збільшувалася і на 20 добу досягла 90–112,9%, а на 30 добу у всіх групах не відрізнялася від вихідного рівня. У щурів, які отримували спіруліну, збільшення кількості еритроцитів відбувалося помітно швидше. Особливо це стосується щурів групи 198 В, у яких повернення даного показника до норми досягалося практично вже на 10 добу.

На перший день сформованої анемії на мазках крові щурів виявлялися різні дегенеративні зміни еритроцитів. На препаратах спостерігався виражений анізоцитоз, тобто наявність у крові клітин, які розміром перевищували межі фізіологічної варіації (шизоцити, мікроцити, макроцити, мегалоцити). У деяких щурів усі еритроцити були представлені клітинами аномальних розмірів (табл. 2).

Таблиця 1

Динамика вмісту еритроцитів у крові щурів з анемією в процесі їх реабілітації (кількість клітин $\cdot 10^{12}/л$)

Терміни експерименту	Стат. показники	Дослідні групи							
		ФГ (контроль)		ФГ-ДТ		ФГ+198В		ФГ+27G	
		Кількість клітин	%	Кількість клітин	%	Кількість клітин	%	Кількість клітин	%
Вихідні значення	M ±m p ₂	5.96 ±0.32	100	5.13 ±0.24 >0.05	100	5.92 ±0.34 >0.05	100	6.25 ±0.34 >0.05	100
1 доба	M ±m p ₁ p ₂	2.88 ±0.23 <0.001	48.3	2.61 ±0.21 <0.01 >0.05	50.9	2.98 ±0.16 <0.01 >0.05	49.9	3.42 ±0.11 <0.001 <0.05	54.7
5 доба	M ±m p ₁ p ₂	3.69 ±0.06 <0.01	61.9	4.13 ±0.26 <0.05 >0.05	80.5	4.52 ±0.29 <0.05 <0.05	75.7	4.16 ±0.19 <0.01 <0.05	66.6
10 доба	M ±m p ₁ p ₂	4.28 ±0.15 <0.05	71.8	4.24 ±0.29 <0.05 >0.05	82.6	5.60 ±0.14 >0.05 <0.001	93.8	4.93 ±0.42 <0.05 >0.05	78.8
20 доба	M ±m p ₁ p ₂	5.37 ±0.21 >0.05	90.1	5.79 ±0.22 >0.05 >0.05	112.9	6.12 ±0.40 >0.05 >0.05	102.5	5.68 ±0.18 >0.05 >0.05	90.9
30 доба	M ±m p ₁ p ₂	5.79 ±0.07 >0.05	97.1	5.68 ±0.16 >0.05 >0.05	110.7	6.31 ±0.29 >0.05 >0.05	105.7	6.04 ±0.26 >0.05 >0.05	96.6

Примітка: p₁ — вірогідність різниці середніх при порівнянні з вихідними значеннями; p₂ — при порівнянні даних піддослідних груп зі середніми значеннями контрольної групи.

Тут і далі: ФГ-фенілгідрозин; ДТ, 198 В і 27G — штами спіруліни, які були використовувані у якості харчової добавки.

У щурів відмічався пойкилоцитоз, тобто порушення форми еритроцитів. Деякі з них виглядали як такі, що згорнулися навпіл або частково, зустрічалися овалоцити, стоматоцити. У забарвленні еритроцитів спостерігалась виражена анізохромія. У більшості щурів багато еритроцитів були гіпохромними. Відмічено багато тіней еритроцитів і планоцитів, тобто клітин, практично позбавлених гемоглобіну.

Поява в крові поліхроматофільних еритроцитів і нормобластів є найцікавішою і значущою ознакою анемії, що вказує на інтенсивний регенеративний процес. У щурів контрольної групи на момент формування анемії кількість поліхроматофілів складала в середньому $460,75 \pm 79,02$ на 1000 еритроцитів. У щурів групи 198 В і 27 G вона була істотно вищою: $731 \pm 43,23$ і $716,25 \pm$

83,25 (рис. 1). Слід зазначити, що у щурів, які отримували спіруліну, регенеративні процеси кров'яних клітин йшли інтенсивніше. На це вказує більша частка поліхроматофільних еритроцитів, а також те, що загальний вміст еритроцитів в їх крові був вищим, ніж у щурів, що не отримували спіруліну.

Таблиця 2

Динаміка показників стану еритроцитів щурів дослідних груп в процесі реабілітації

Показники (ступінь вираженості)	Дослідні групи	Вихідні значення	Дні після формування анемії				
			1 -й	5 -й	10 -й	20-й	30-й
Анізоцитоз	ФГ	-	++++	++	+	-	-
	ФГ+ДГ	-	++++	+	+	+	-
	ФГ+198В	-	++	+	+	-	-
	ФГ+27G	-	++++	+	+	-	-
Пойкілоцитоз	ФГ	-	++	+	-	-	-
	ФГ+ДГ	-	++	+	-	-	-
	ФГ+198В	-	+	+	-	-	-
	ФГ+27G	-	++	+	-	-	-
Анізохромія	ФГ	-	++++	+	+	+	-
	ФГ+ДГ	-	++	+	-	+	-
	ФГ+198В	+	++	-	-	-	-
	ФГ+27G	-	++++	+	-	-	-
Гіпохромія	ФГ	+	++++	+	+	-	-
	ФГ+ДГ	-	++	+	-	+	-
	ФГ+198В	+	++	+	-	-	-
	ФГ+27G	-	++++	+	+	-	-
Нормобласти, шт./1000 клітин	ФГ	0,12±0,12	10,12±1,62	0,0	0,0	0,0	0,0
	ФГ+ДГ	0,0	12,0±1,21	0,2±0,05	0,0	0,0	0,0
	ФГ+198В	1,0 0,5	9,75±1,16	2,0±0,3	0,2±0,1	0,0	0,0
	ФГ+27G	0,0	12,25±3,78	0,5±0,22	0,0	0,0	0,0
Тільця Жолі, шт./1000 клітин	ФГ	0,0	3,25±0,5	0,0	0,0	0,0	0,0
	ФГ+ДГ	0,0	2,5±0,15	0,2±0,04	0,0	0,0	0,0
	ФГ+198В	0,0	1,87±0,3	0,0	0,0	0,0	0,0
	ФГ+27G	0,0	3,00±0,96	0,2±0,2	0,0	0,0	0,0

Примітка: "+" означає наявність поодиноких клітин у кожному полі зору мікроскопу; "++" — у кожному полі зору зустрічається від 4 до 6 клітин з даною характеристикою; "+++" — більше 10 клітин у полі зору; "++++" — всі клітини представлені аномальною формою.

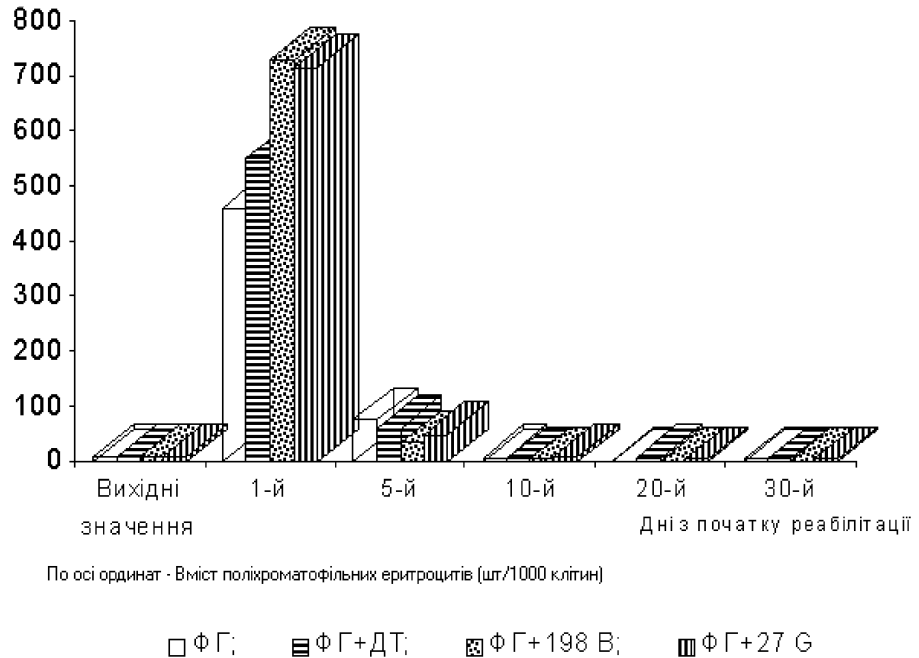


Рис. 1. Динаміка вмісту поліхроматофільних еритроцитів в мазках крові після формування анемії

У крові всіх піддослідних щурів з'явилися нормобласти в кількості 10–12 на 1000 еритроцитів. У деяких щурів кількість нормобластів досягала 15–16/1000 еритроцитів.

В мазках були виявлені елементи патологічної регенерації у вигляді тілець Жоллі, в середньому в кількості 3 на 1000 еритроцитів. Тільця Жоллі є залишками ядра мегалобласта, що затримуються в еритроциті у зв'язку з порушенням процесу звільнення мегалобласта від ядра в кістковому мозку.

Таким чином, при сформованій фенілгідразиновій анемії з'являється велика кількість дегенеративних форм еритроцитів, а також включень, пов'язаних безпосередньо з дією гемолітичної отрути на мембрани еритроцитів.

На п'яту добу після формування анемії відзначено істотне поліпшення стану еритроцитів, що вказує на те, що кровотворна система щурів успішно справляється з анемією, а застосована гемолітична отрута викликає внутрішньосудинний гемоліз еритроцитів, істотно не впливаючи на клітини кісткового мозку.

Всі відмічені раніше дегенеративні зміни еритроцитів стають менш вираженими (табл. 2). Так, анізоцитоз характеризується як "+", тобто в полі зору зустрічаються або поодинокі клітини, або декілька клітин різних розмірів.

Еритроцити зміненої форми зустрічались тільки у окремих щурів.

Кількість поліхроматофілів зменшувалась до $74,2 \pm 44,11$ клітин на 1000 еритроцитів в контрольній групі і до 31–58/1000 еритроцитів у піддослідних групах.

Гіпохромні еритроцити виявлялися в помірній кількості. На мазках були відсутні нормобласти і еритроцитарні включення, тобто елементи патологічної регенерації.

До 10 доби спостерігалася нормалізація форми, забарвлення і ступеня зрілості еритроцитів (табл. 2). Вміст поліхроматофілів складав, в середньому по групах 5,4–8,0 /1000 еритроцитів, тобто 0,54–0,80%.

Завдяки здатності до швидкої регенерації кровотворних органів білих щурів як вміст еритроцитів, так і морфологічні показники еритроцитів достовірно не відрізнялися від таких у щурів до введення фенілгідазину вже на двадцятую добу після розвинутої анемії у всіх групах тварин.

Проте у тварин, яким на фоні моделювання ФГ-анемії вводили спіруліну, ступінь вираженості анемії був меншим і здатність до регенерації крові була вищою, ніж у щурів, що не отримували спіруліну.

Однак виразність впливу спіруліни різних штамів, які щури отримували у вигляді харчової добавки в період формування ФГ-анемії і протягом десяти днів після формування анемії, на швидкість відновних процесів червоної крові була неоднаковою.

Так, штам 27 G більш ефективно запобігав дії гемолітичної отрути на еритроцити безпосередньо в період її введення. У тварин, що отримували спіруліну штаму 27 G, кількість еритроцитів на перший день сформованої анемії виявилася найбільшою в порівнянні з іншими групами. Проте у щурів, що отримували штами дикий і 198 B динаміка відновлення кількості еритроцитів була інтенсивнішою, а наявність патологічних форм еритроцитів меншою, ніж у контрольних щурів і щурів, що отримували штам 27 G.

Таким чином результати експерименту свідчать про відсутність чіткої різниці між диким та мутантними штамми спіруліни за їх впливом на показники червоної крові за гемолітичної анемії. Позитивні зміни, які спостерігалися під впливом штамів на показники крові у порівнянні з контрольною групою, можуть бути обумовлені тими речовинами, які входять до складу цих штамів.

Так, відомо, що дефіцит метіоніну сприяє розвитку анемії та іншим порушенням фізіологічних функцій, які являються наслідком гіпопротеїнемії. Збагачення спіруліни фікоціаніном, можливо, забезпечує збільшення кількості пірольних кілець, необхідних для синтезу гема в організмі, а у сполученні з іншими компонентами спіруліни (вітамін B12, залізо, мідь та ін.) сприяє синтезу гемоглобіну та стимулює еритропоез. Все це обумовило сприятливий вплив спіруліни на швидкість та виразність відновлювальних процесів червоної крові щурів.

Отримані дані, а також дослідження інших авторів [1,9] дозволяють зробити висновок про доцільність розробки нових штамів спіруліни для застосування їх у якості харчової добавки для лікування та профілактики анемії, яка може виникнути у наслідку дії гемолітичних отрут, а також радіаційного опромінення.

Висновки

1. Розвинута фенілгідразинова анемія формується на п'яту добу як у контрольних щурів, так і у тварин, які отримували експериментальні штами спіруліни.

2. У тварин, які на фоні моделювання фенілгідразинової анемії отримували спіруліну, ступінь прояву анемії був меншим, а здатність до відновлення крові була вищою.

3. Спіруліна штаму 27 G більш ефективно запобігала дії гемолітичної отрути на еритроцити безпосередньо у період введення отрути, а спіруліна штаму 198 B у порівнянні з іншими штамми сприяла більш інтенсивному відновленню крові у період реабілітації.

Література

1. *Болезни системы крови.* — М.: МЕДпресс-информ, 2004. — 424 с.
2. *Лук'янова О. М.* Особливості перебігу, діагностики та лікування найчастіше поширених захворювань у дітей, що постраждали в наслідок аварії на ЧАЕС // Лікування та діагностика. — 1996, № 2. — С. 6-12.
3. *Seshadri C. V., Villiammai V.* The study of haemoglobin levels in humans fed on Spirulina supplement // Mono. Ser. Photosyn. — 1990. — Vol. 30. — P. 8-12.
4. *Brown I. I., Karakis S. G.* Mutants strains of Spirulina platensis with improved food and pharmaceutical value of biomass. 3-rd European Workshop. Biotechnology of Microalgae: Abstracts. — 1997. — June 16-17. — P. 28.
5. *Каракіс С. Г., Драгоєва О. Г., Лавренюк Т. І., Сагаріц В. А., Карнов Л. М.* Селекція мутантних штамів Spirulina platensis з підвищеним вмістом метіоніну в біомасі // Вісник ОНУ. — 2005. — Т. 10, вип. 3. — С. 55-62.
6. *Гладкій Т. В., Коломійчук Т. В., Сьомік Л. І., Павліченко О. Д., Карнов Л. М., Каракіс С. Г., Бузика Т. В.* Вивчення впливу різних штамів Spirulina platensis на показники фізіологічного стану організму щурів // Аграрний вісник Причорномор'я. — 2005. — Вип. 31. — С. 184-187.
7. *Loseva L. P.* The prospect of Spirulina platensis application // Congress of the International society for Applied Phycology: 9th International Conference on Applied Algology. — Roquetas de Mar. — 2002.
8. *Негруцкий С. Ф.* Физиология и биохимия низших растений. — К.: Выща школа, 1990. — 192 с.
9. *Купраш Л. П., Чекман И. С., Горчакова Н. А.* Спирулина и здоровье. — Николаев: МПКФ "Спирулина", 2000. — 76 с.

**Т. В. Гладкий, Т. В. Коломийчук, Л. И. Семик, Л. М. Карпов,
О. Д. Павличенко, Т. В. Бузыка**

Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова,
кафедра физиологии человека и животных,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина

**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЭРИТРОЦИТОВ КРЫС ПРИ
МОДЕЛИРОВАНИИ ГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ АНЕМИИ НА ФОНЕ
ПРИМЕНЕНИЯ ВОДОРΟΣЛИ SPIRULINA PLATENSIS В КАЧЕСТВЕ
ПИЩЕВОЙ ДОБАВКИ**

Резюме

Показано, что при введении крысам фенилгидразина на пятые сутки формируется гемолитическая анемия, которая характеризуется значительным уменьшением количества, а также дегенеративными изменениями эритроцитов. Появление большого количества полихроматофильных эритроцитов и нормобластов свидетельствует о высокой способности крови крыс к регенерации. Восстановление картины красной крови после формирования анемии происходило интенсивнее у животных, принимавших в качестве пищевой добавки спирулину. Четких различий между диким и мутантными штаммами 198 В и 27 G по их влиянию на ход регенеративного процесса не выявлено.

Ключевые слова: анемия, фенилгидразин, спирулина, кровь, крысы.

**Gladky T. V., Kolomiychuk T. V., Semik L. I., Karpov L. M.,
Pavlichenko O. D., Buzyka T. V.**

Odessa National University, Department of Human Physiology,
Dvoryanskaya St., 2, Odessa, 65026, Ukraine

**MORPHOLOGICAL PARAMETERS OF RAT ERYTHROCYTES AT
MODELLING HAEMOLYTIC ANAEMIA ON THE BACKGROUND OF
ALGA SPIRULINA PLATENSIS AS NUTRIENT MEDIUM**

Summary

It was shown that after application to rats phenylhydrazine the haemolytic anaemia characterized by significant reduction of quantity, and also by degenerate changes of the morphological picture of erythrocytes was formed on the fifth day. The appearance of a great number of plenty polychromatophilous erythrocytes and normoblasts testifies the high ability of rat blood to regeneration. It was found out that restoration of the red blood picture after formation of anaemia at the animals accepting Spirulina as the nutrient medium occurred more intensively. It has been revealed no precise differences between wild and mutant stains of 198 B and 27 G with their influence on a course of regenerative process.

Keywords: anemia, phenylhydrazine, spirulina, blood, rat.