

АКТУАЛЬНІ ПРОБЛЕМИ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ

ГЕМОПОЕЗ У ЩУРІВ ПРИ ДОСЛІДЖЕННІ ГОСТРОЇ ТОКСИЧНОСТІ ЛІПОВІДУ

Л.І. Апуховська, канд. біол. наук, Інститут біохімії НАН,
М.М. Костюк, асист., В.І. Головаха, В.В. Сахнюк, кандидати вет. наук

Вітамін D₃ та його активні метаболіти – 1,25-(OH)₂D₃ та 24,25-(OH)₂D₃ належать до речовин з високою біологічною активністю, тому передозування цих стероїдів справляє токсичну дію на організм. Навіть у міліграмовій кількості вітамін D₃ за короткий проміжок часу може спричинити незворотні порушення і загибель тварин [1].

Метаболіти холекальциферолу беруть активну участь не тільки в мінеральному, ліпідному, білковому [2] і гормональному [3] обміні, а й у проліферації та диференціації кісткових [4], імунокомпетентних клітин [5], β-клітин підшлункової залози, клітин крові [6].

Доведено, що D-гіпервітамінозний стан супроводжується пошкодженням проникності плазматичних мембран та гемолізом кров'яних клітин [7]. Тому досить актуальним є питання визначення терапевтичних та токсичних доз нових синтезованих форм вітаміну D₃.

Метою нашої роботи було виявлення токсичного впливу на загальний стан та деякі показники гемопоезу водорозчинного холекальциферолу (ліповіду) при одноразовому введенні його шурам у дозах, що перевищують фізіологічні у 8-24 тис. разів.

Матеріали і методи досліджень. Гостру токсичність водорозчинного холекальциферолу – ліповіду вивчали на щурах лінії Wistar. Для дослідів були відібрані статевозрілі тварини, самці і самки порівну, в кількості 40 голів. Протягом 30 днів до початку дослідів та в період його проведення щурі утримувалися на вітамін-D-дефіцитному раціоні – гранульованому комбікормі, спеціально приготовленому підприємством з вирощування лабораторних тварин НАН України.

Води тварини отримували в достатку. При виборі доз вітаміну D₃ виходили з методичних вказівок "Требования к доклиническому изучению общетоксического действия новых фармакологических веществ", схвалених фармакологічним комітетом МОЗ СРСР від 25.09.1984 року, протокол № 19 та отриманих в Інституті біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України результатів дослідження біологічної активності водорозчинної форми холекальциферолу.

За щурами вели щоденне клінічне спостереження. Через 30 днів від початку досліду тварин зважували. Під легким інгаляційним наркозом брали кров з ретробульбарного синуса, а після забою – паренхіматозні органи для патоморфологічного дослідження. Визначали абсолютну масу окремих органів: серця, печінки, селезінки, нирок, легень, а також індекс органа, тобто відношення його маси до загальної маси тіла.

Таблиця 1- Схема досліду щодо вивчення гострої токсичності ліповіду (n = 8)

Група тварин	Препарат для введення	Доза віт. D ₃ на кг маси тіла, МО	Доза, більша за фізіологічну, тис.разів
Контроль	0,85 %-NaCl	-	-
1 дослідна	ліповід	4000	8
2 дослідна	ліповід	8000	16
3 дослідна	ліповід	12000	24
4 дослідна	відехол	4000	8

Результати досліджень. Середня маса тіла щурів дослідних груп на початок досліду не мала статистично вірогідної різниці, порівняно з масою тіла щурів контрольної групи ($p < 0,5$).

При клінічному спостереженні протягом 30 днів не виявили особливих відмінностей між щурами різних груп. Волосяний покрив був блискучим, не скуйовдженим, не ламким, добре утримувався у шкірі. Слизова оболонка ока – рожева, помірно волога, без пошкоджень; слизова оболонка носа – блідо-рожева, помірно волога, без пошкоджень та сторонніх нашарувань. Апетит у щурів був збережений протягом усього досліду. Корм, який давали згідно з нормами раціону, поїдався повністю, спраги не спостерігали. Темперамент не змінився, тварини були активні, не пригнічені, без ознак агресії. Симптомів, які б характеризували розлад функцій травного каналу, органів дихання, серцево-судинної і нервової систем, не спостерігали. Загибелі тварин у період експерименту не було.

Маса щурів окремих груп наприкінці досліду істотно не відрізнялась, оскільки в усіх групах спостерігали рівномірні прирости ($p < 0,5$). Зокрема, у тварин першої дослідної групи маса тіла зросла на 12,5 %, другої – 10,8%, третьої – 10 %, четвертої – 10,4 % та на 10 % – у тварин контрольної групи. Вірогідної різниці в абсолютній масі паренхіматозних органів тварин окремих груп також не було. Відносна маса печінки тварин другої і четвертої груп була нижчою від контрольної групи ($p < 0,5$), а відносна маса внутрішніх органів щурів третьої групи мала тенденцію до збільшення.

Таким чином, нами не встановлено статистично вірогідної різниці у масі тіла, абсолютної і відносної маси окремих органів тварин, що характеризувало б

гостроперебігаючий токсикоз (за винятком щурів третьої групи). Це свідчить про адекватність впливу різних доз препарату та відсутність його токсичної дії (за даними показниками).

Швидкість зсідання крові у щурів третьої групи мала тенденцію до підвищення ($p < 0,1$) відносно контрольної групи. Це пояснюється скороченням протромбінового часу під впливом високих доз холекальциферолу. Дана тенденція в інших групах простежувалася меншою мірою (табл. 2).

Кількість еритроцитів у крові щурів усіх дослідних груп була майже однаковою, тому різниця між ними невірогідна ($p < 0,1$). Проте після введення ліповіду у дозі 8 тис. МО на кг маси спостерігали тенденцію до посилення еритропоезу, а у щурів четвертої групи, яким вводили комерційний препарат відехол, навпаки – до його пригнічення, хоч насиченість хромопротеїдом та середній об'єм еритроцитів залишалися високими.

Введення ліповіду щурам другої групи стимулювало не лише еритропоез, а й синтез гемоглобіну, кількість якого була у них вірогідно більшою, порівняно з контролем. Оскільки кількість еритроцитів позитивно корелює з гематокритною величиною, то модуль останньої у щурів другої групи був вірогідно вищим ($p < 0,001$), ніж у щурів контрольної групи. Подібна тенденція простежується у тварин першої та третьої груп ($p < 0,5$). Однак, середній об'єм еритроцитів у третій та другій групах дещо менший, порівняно з щурами контрольної та третьої і четвертої дослідних груп, тобто газообмін у тварин цих груп відбувається за рахунок мікроцитарного дихання, на відміну від макроцитарного у тварин третьої та четвертої груп. І все ж, збільшення кількості еритроцитів у крові тварин першої та другої груп веде до зростання загального дихального об'єму еритроцитів на 3 та 7 % ($p < 0,05$), відносно контрольної групи, і ще більше – порівняно з щурами третьої (на 10 та 22%) та четвертої (на 14 та 26%) груп.

У щурів перших двох груп спостерігали тенденцію до збільшення кількості лейкоцитів відносно контрольної. Оскільки у тварин третьої та четвертої груп тенденція була протилежною, то різниця у кількості лейкоцитів між щурами другої дослідної групи ($6,6 \pm 0,6$ Г/л) та третьої ($5,0 \pm 0,4$ Г/л) і четвертої ($4,4 \pm 0,8$ Г/л) була статистично вірогідною ($p < 0,05$). При виведенні лейкограми периферичної крові виявили анбазофілію в усіх групах.

У щурів першої групи еозинофіли зустрічались у 12,5 %, другої – 63 %, третьої – 56 % тварин. Максимальна кількість еозинофілів у тварин вище зазначених груп становила: у першій – 1 %, у другій – 3, у третій – 7 % (табл. 3). Еозинофіли виявлені у 57 % тварин контрольної групи, їх максимальна кількість становила 3 %, при середньому значенні по групі $1,8 \pm 0,49$ %. У щурів, яким вводили олійний розчин відехолу, еозинофіли виявили в усіх особин, у найбільшій кількості – 3 % при середньому значенні $2,2 \pm 0,63$ % по групі, але різниця між групами невірогідна. Проте тенденція до зростання кількості еозинофілів із збільшенням дози ліповіду – очевидна. Збільшення даного виду лейкоцитів указує на відсутність симптомів токсикозу.

Таблиця 2 - Вплив одноразової ін'єкції ліновіду і відходу на гемопоєз шурів (M ± m; n = 8)

Група тварин	Гемоглобін, г/л	Кількість еритроцитів, Т/л	ВГЕ, пг	Гематокрит, л/л	Середній об'єм еритроцита, мкм ³	Загальний об'єм еритроцитів, мкм ³	Швидкість зсідання крові, с
Контрольна	113,0 ± 12,0	4,0 ± 0,5	28,5 ± 6,7	0,35 ± 0,09	105,4 ± 22,8	418,4 ± 9,7	140,6 ± 9,6
1 дослідна	125,0 ± 6,7	4,5 ± 0,6	27,7 ± 3,3	0,38 ± 0,23	95,9 ± 13,5	431,6 ± 22,2	128,1 ± 5,7
2 дослідна	132,0 ± 2,6**	4,9 ± 0,6	26,8 ± 3,3	0,41 ± 0,09***	91,3 ± 13,4	447,4 ± 9,8*	133,4 ± 5,4
3 дослідна	119,0 ± 4,2	3,6 ± 0,3	33,1 ± 4,0	0,36 ± 0,11	109,4 ± 13,2	393,8 ± 11,3	115,3 ± 10,0
4 дослідна	113,0 ± 12,0	3,0 ± 0,5	37,4 ± 10,2	0,32 ± 0,40	118,0 ± 29,3	354,0 ± 41,0	134,8 ± 7,6

Примітка: * - p < 0,05; ** - p < 0,01; *** - p < 0,001. У решти показників p < 0,5

Таблиця 3 - Вплив лісоводу і відходу, введених у токсичних дозах, на лейкопоз у щурів ($M \pm m$; $n = 8$)

Група тварин	Лейкоцити, Г/л	Еозинофіли, в процентах	Нейтрофіли, у процентах		Лімфоцити, у процентах
			паличкоядерні	сегментоядерні	
Контрольна	$5,6 \pm 0,9$	$1,8 \pm 0,5$	$7,6 \pm 1,0$	$7,8 \pm 2,0$	$83,0 \pm 2,2$
1 дослідна	$5,9 \pm 1,6$	$0,4 \pm 0,26^{**}$	$13,0 \pm 2,5$	$8,5 \pm 2,5$	$78,0 \pm 4,5$
2 дослідна	$6,6 \pm 0,6$	$1,1 \pm 0,4$	$6,5 \pm 1,2$	$8,8 \pm 1,5$	$83,0 \pm 2,2$
3 дослідна	$5,0 \pm 0,4$	$1,6 \pm 0,8$	$10,0 \pm 3,1$	$6,3 \pm 1,3$	$81,3 \pm 3,6$
4 дослідна	$4,4 \pm 0,8$	$2,2 \pm 0,6$	$8,3 \pm 1,1$	$6,5 \pm 2,3$	$83,0 \pm 3,2$

Примітка: ** - $p < 0,01$. У решті показників $p < 0,5$

Поодинокі клітини юних форм нейтрофілів виявляли у щурів лише першої і третьої груп – у 13 % тварин. Кількість паличкоядерних гетерофілів у першій та третій, а сегментоядерних – у першій та другій групах була більшою щодо контрольної, а різниця між ними – невірогідна. У щурів першої та третьої груп простежується просте регенеративне зрушення ядра, що характерне для легкого перебігу гострих запальних процесів. Кількість лімфоцитів у всіх групах була майже однаковою і близькою до контролю ($p < 0,5$).

Моноцити у тварин контрольної групи були відсутні. Кількість їх зростала із збільшенням дози ліповіду. Так, у тварин першої групи моноцити виявляли у поодиноких особин у кількості, що не перевищувала 1 %, тоді як у тварин третьої групи вона досягала 3 % і діагностувалась у 33 % тварин. Отже, водорозчинний холекальциферол стимулював процес проліферації моноцитарних клітин, що не суперечить даним, отриманим Fabian I., Kletter Y., Bleiberg I. (1987), Sheren E., Goldman R. (1987), Koffler H.P., Reiduk H., Bishop I.E. et al (1984), про стимулюючу дію гормональної форми вітаміну D_3 – $1,25-(OH)_2D_3$ щодо збільшення кількості моноцитарно-макрофагальних клітин.

Висновок. Отримані результати клінічного дослідження та морфологічного аналізу крові свідчать про відсутність ознак токсичного впливу водорозчинного холекальциферолу у дозах, які більші за фізіологічні у 8 – 24 тис. разів. Введення водорозчинного вітаміну D_3 у дозі 4 та 8 тис. МО на кг маси тіла не пригнічувало, а, навпаки, стимулювало еритропоез, лейкопоез і синтез гемоглобіну.

1. Бауман В.К. Биохимия и физиология витамина D. – Рига: Зинатне.-1989. – 378 с.
2. Спиричев В.Б., Блажеевич Н.В. К вопросу о механизме гемолитического действия витамина D // Вопр. мед. химии. – 1968. – Т.14. – № 4. – С.371–375.
3. Karlach V., Rummel W. Trans- and paracellular long-term treatment with 1,25-dihydroxyvitamin D_3 // Eur. J. Clin. Invest. – 1986. – V.16. – № 5. – P.347 – 351.
4. Differential effects of 1,25-dihydroxycholecalciferol and 24,25-dihydroxy-cholecalciferol on the proliferation and the differentiation phenotype of reboit costal chondrocyte in culture / M.Takigama, M.Enomoto, E.Shirai et al. // Endocrinology. – 1988. – V.122. – № 3. – P. 831 – 839.
5. Dritanti L., Boland A.R. Changes in muscle in lipid metabolism induced in vitro by 1,25-dihydroxyvitamin D_3 // Biochem. Biophys. Acte. – 1978. – V.91. – №1. – P. 83 – 92.
6. 1,25-dihydroxyvitamin mechanism prostaglandin E_2 production by monocytes. Mechanism which partially accounts for the antiproliferative effect 1,25- $(OH)_2D_3$ on lymphocytes / R.Koren, A.Ravic, C.Rotem et al. // FEBS Lett. – 1986. – V.205. – № 4. – P. 113 – 116.
7. 1,25-dihydroxyvitamin D_3 target cells in immature pancreatic islets / S.A.Clark, W.E.Stuap, M.Sar, H.E.De Luca // Amer. J. Physiol. – 1987. – V.120. – № 4. – P. 1490 – 1497.

Hemopoiesis in rats at investigation of acute toxic hypovidi

L.I. Apuchovska, M.M. Kostuk, V.I. Golovacha, V.V. Sachnuk

The obtained clinical and morphological results allow us to assume that there is no any toxic effect of water soluble cholecalciferol in dosages that are more than physiological in 8 – 24 times. Injection of water soluble vitamin D_3 of 4 and 8 thousand I.O. on 1 kg of weight do not oppress but stimulate erythropoiesis, leukopoiesis and synthesis of hemoglobins.