

## THE EXPERIMENTAL MODELING OF APLASTIC ANAEMIA

I.I. Lanovenko

SI "Institute of Haematology and Transfusiology NAMS of Ukraine", Kyiv

**Summary.** *Review of the literature and our own experimental data playback (modeling) of aplastic anaemia in laboratory animals using chemical, physical, pathophysiological and combined damaging influences.*

**Key words:** *aplastic anaemia, experimental modeling.*

Анемії та анемічні стани, внаслідок значної поширеності та недостатньої ефективності лікування, складають величезну медичну і соціальну проблему. Особливо це стосується анемій апластичного генезу, які відрізняються надто тяжким перебігом і несприятливим прогнозом [1, 2, 4, 19, 20].

Апластична анемія (АА) – стан панцитопенії периферичної крові, обумовленої глибоким пригніченням всіх паростків кісткового мозку. За сучасними уявленнями, АА відносять до категорії мієлодисплазій; вона виникає в результаті пошкодження стовбурової клітини крові, наслідком чого є якісні та кількісні зміни клітин гемопоєзу та їх мікрооточення, гіпоклітинність та жирова інфільтрація кісткового мозку. АА досить рідкісне захворювання, її частота складає 5 випадків на 1 млн населення у рік; зустрічається частіше у осіб молодого віку, однаково часто у чоловіків і жінок [1, 10, 20].

Проведення ефективного патогенетичного лікування АА є не вирішеною проблемою в зв'язку з тим, що до теперішнього часу відсутнє єдине уявлення про етіологію цього захворювання, не з'ясованими залишаються чисельні питання патогенезу. Патогенетичною основою анемій є гемічна гіпоксія. Для визначення генезу гемічної гіпоксії надзвичайну важливість має комплексне вивчення механізмів адаптації до гіпоксії, висвітлення системних, тканинних, клітинних і молекулярних механізмів розвитку гіпоксичного синдрому при анеміях взагалі і при апластичній анемії, зокрема. Нами доведено, що експериментальне вивчення можливостей корекції гемічної гіпоксії має значну актуальність для вирішення проблеми анемій [7].

Моделювання апластичних анемій, в першу чергу – відтворення захворювання в експерименті на лабораторних тваринах, є необхідним підґрунтям для вирішення складних питань патогенезу і пошуку нових шляхів і методів підвищення ефективності терапії цього захворювання.

Для відтворення АА в експерименті застосовуються різні підходи. Це обумовлено тим, що, за багаточисельними клінічними спостереженнями, до аплазії кістковомозкової тканини можуть призводити

різноманітні етіологічні чинники: дія хімічних речовин, в тому числі лікарських засобів; іонізуюча радіація, інфекційні агенти, імунологічні розладнання, спадкові фактори та інші причини. У половині випадків причину розвитку цієї патології з'ясувати не представляється можливим.

Важкість вибору методу експериментального моделювання АА, таким чином, полягає не тільки в поліетіологічності цього захворювання й тому, що різні відомі методи моделювання анемії можуть бути застосовані для з'ясування тих чи інших конкретних задач, але і в зв'язку з вимогами, які пред'являють до будь-якої експериментальної моделі при проведенні експериментально-терапевтичних досліджень. Сюди відносяться: простота виконання, високий відсоток відтворення і можлива найбільш повна відповідність моделі клінічній картині захворювання у людини.

Незважаючи на важливість проблеми вивчення патогенезу і лікування АА та значну кількість публікацій відносно клінічних досліджень, повідомлення про експериментальні роботи в даній галузі малочисельні. Можливо, це пов'язано з деякою недосконалістю відомих до теперішнього часу експериментальних моделей АА.

Класичним підходом до моделювання АА можна вважати підгостру і хронічну інтоксикацію бензолом. Підставою для застосування цієї речовини в експерименті слугували дані клінічних спостережень про масове професійне отруєння і розвиток АА у робітників гумової, взуттєвої, лакофарбової промисловості та інших виробництв, пов'язаних із застосуванням бензолу. У випадках підгострого або хронічного отруєння у постраждалих клінічно виявляється панцитопенія з розвитком тромбогеморагічного синдрому та анемії, яка досягає дуже високого ступеня – із зниженням гемоглобіну до 20%, і лейкопенії, при якій у важких випадках може розвинутися картина тяжкого септичного захворювання [1, 20].

Як правило, в експериментальних дослідженнях бензол застосовується для моделювання змін клітинного складу лейкоцитів периферичній крові. Причому, для досягнення результату досить ефективним вважається як метод відтворення лейкопенії (7 підшкірних введеннь бензолу кролям в дозі 0,1 мл/кг маси тварин впродовж тижня), так і лейкоцитозу (3 підшкірних введення в дозі 0,2 мл/кг маси) [3, 15].

Про стимулюючу дію малих доз бензолу на лейко- і еритропоез свідчать дані деяких клінічних спостережень, а також результати Американської бензолної комісії, яка проводила масові обстеження робітників, які працювали з бензолом. Розвиток симптомів АА при бензолній інтоксикації починається через тривалий термін, дія бензолу і його похідних на кістковий мозок прогресує повільно, зниженню кількості клітин в периферичній крові звичайно передує період їх збільшення [15, 20].

Відмічені вище факти, звичайно, ускладнюють задачу експериментатора і знижують відтворюваність даної моделі. Тим більш, що в процесі моделювання відмічається висока летальність тварин через нейротоксичну дію бензолу, та, в залежності від індивідуальної реактивності організму, відтворити АА вдається не у всіх тварин.

Найбільш зручним об'єктом при моделюванні АА слід вважати кролів. При моделюванні отруєння бензолом цитопенію викликає підшкірне введення кролям бензолу в дозі 1 мл/кг маси щоденно або через день. Зміни клітинного складу периферичної крові відбуваються переважно за рахунок псевдоеозинофілів. При розтині у частини тварин спостерігались атрофія кісткового мозку, нерідко з великою кількістю лейкоцитів з пікнотичними, поруйнованими ядрами. Більшість тварин при такій постановці досліду гинуло впродовж двох тижнів, а у частини тварин не спостерігалось значних змін ні в периферичній крові, ні в кістковому мозку, що вказує на виражену індивідуальну стійкість до отрути.

За даними інших керівництв по відтворенню захворювань у тварин, навіть невеликі дози бензолу (0,5 мл/кг підшкірно, через день, протягом 20–25 днів) викликають зниження кількості еритроцитів і вмісту гемоглобіну на 30–40%. Відновлення ж цих показників відбувається дуже повільно, не раніше 8–10 тижнів після припинення введень бензолу. Однак ще більше зменшення дози бензолу (0,1 або 0,05 мл/кг протягом 8 місяців і більше) не призводило ні до анемії, ні до лейкопенії, ні до тромбоцитопенії [15]. Модель бензольної інтоксикації, відтворену у кролів (бензол 1 мл/кг маси, введення протягом 10–12 діб), визнано як працездатну для доклінічного вивчення антианемічних засобів при АА з періодом анемізації більше 20 діб [8].

Менш коштовними, в порівнянні до кролів, є експерименти на дрібних лабораторних гризунах. В дослідах на мишах щоденним підшкірним введенням бензолу протягом 12 днів досягнуто достовірне, досить тривале зниження показників еритроцитів (на 30%), гемоглобіну (на 41%), тромбоцитів і лейкоцитів (до 14% і 17% вихідної кількості, відповідно).

Різниця в реакції тварин при інтоксикації бензолом можуть бути пов'язані з відмінностями у видовій та індивідуальній чутливості до отрути, в застосованих дозах (однократних чи сумарних), термінах спостереження (підгостре і хронічне отруєння), інтенсивності затравки (введення щоденні або через день), шляхах введення (внутрішньоочеревинне, підшкірне, пероральне, інгаляційне) [3, 9, 15].

В зв'язку з тим, що проблема лікування АА набуває особливої актуальності, відбувається постійне удосконалення і відпрацювання більш адекватних експериментальних моделей апластичної анемії токсичного генезу.

Ретельно досліджена експериментальна АА на моделі у щурів, індукованої пероральним та підшкірним введенням бензолу. Самцям щурів Вістар вводили бензол підшкірно (п/ш) в дозі 2 мл/кг або перорально (п/о) в дозах 1,14 і 2 мл/кг. Протягом 4 тижнів виявлені зниження концентрації гемоглобіну, тромбоцитопенія, мікро- і макроцитоз в групах п/ш застосування бензолу в дозі 1,14 мл/кг і п/о в дозі 2 мл/кг. Впродовж 60 діб в групі п/ш застосування спостерігалось зменшення концентрації гемоглобіну, кількості еритроцитів і тромбоцитів, макроцитоз, лімфопенія та відносна нейтропенія. Протягом 120 діб зберігалася гипоклітинність кісткового мозку. Модель відповідала АА [12]. Rovira E. та співавт. [18] вивчали перебіг АА, індукованої похідним бензолу – альбендазолом. Визначені умови і дози, які призводять до розвитку стійкої трицитопенії з можливістю наступного застосування для проведення наукових досліджень.

Автори обговорюють працездатність моделей АА для скринінгу та тестування фармакологічних антианемічних засобів [12, 18].

Окрім хімічних речовин, зокрема бензолу і його похідних, в спеціальних фундаментальних і фармакологічних дослідженнях розробляють або удосконалюють методи моделювання АА із застосуванням ураження кісткового мозку за допомогою опромінення, лікарських заходів, хіміотерапевтичних препаратів, колонієстимулюючих факторів гемопоезу, інтерлейкинів, порушення імунологічної реактивності і зриву імунологічного захисту. Враховуючи той факт, що природньо в оточуючому людину середовищі діють асоціації шкідливих чинників та екологічних обставин, при моделюванні АА іноді застосовують комбінації різних токсичних впливів чи уражень (наприклад, опромінення з хімічною речовиною).

Наводимо найбільш цікаві, на наш погляд, розробки в цьому напрямку.

Jongen-Lavreneis M. та співавт. [13] досліджували анемію у щурів, яку викликали інтерлейкином-6 (ІЛ-6). Автори вказують на можливий патогенетичний зв'язок цієї експериментальної моделі з анемією, яка спостерігається при хронічному запаленні. Ю.В. Ніколаєнко та співавт. [9] доліджували особливості еритропоезу і перебіг постгеморагічної анемії у щурів, які знаходились протягом 100 днів в умовах обмеженої рухової активності. В огляді Lu G. та Liu J. [14] стисло викладені дані про зміни вмісту в еритроцитах хворих на АА білків, фосфоліпідів, жирних кислот. Представлена модель розвитку АА у щурів, які вдихали бензин впродовж 4 місяців. Розглянуті зміни вуглеводного і нуклеотидного обміну в еритроцитах. Автори аналізують вплив введення препарату Sheng-Mai на функції еритроцитів при АА у щурів. Raja K.B. та співавт. [16]

спостерігали значні порушення метаболізму заліза у трансгенних мишей з гіпопластичною анемією, яка виникає внаслідок неповного дефіциту еритропоєтину. Rodriques J.N. та співавт. [17] визначили взаємозв'язок тіклопідину і важкої АА. Звертається увага на можливість відтворення відповідної експериментальної моделі АА.

Daiker D.H. та співавт. [11] досліджували генотоксичність комбінованої дії бензолу та опромінення. Тестування потенційного синергізму за генотоксичністю при дії бензолу (1, 10 і 50 ppm) і гамма-опромінення (0,1–0,2 Гр) проведено на лабораторних мишах лінії DBA/2; бензол вводили інгаляційним шляхом. Клітини кісткового мозку аналізували на присутність мікроядер і хромосомних аберацій; лімфоцити селезінки – на присутність мікроядер і сестринських хроматидних обмінів (СХО). Показано, що в обох мікроядерних тестах кожний з досліджених типів події обумовлюють сильний позитивний відгук, однак їхня комбінована дія не призводить до будь-якого суттєвого посилення генотоксичності. За двома іншими критеріями (СХО і аберації) отримані аналогічні результати, хоча в цих випадках відмічена менша чутливість і до бензолу, і до гамма-опромінення. В цілому, отримані результати підтвердили відсутність синергізму двох вивчених факторів в межах досліджених доз.

В роботі Putinsteva E. [15] здійснено критичний огляд і аналіз фізичних, хімічних, біологічних, біохімічних факторів та їх асоціацій, які інгібують гемопоєз з наступним розвитком аплазії кісткового мозку; показано їх сучасне значення і майбутність, наведені узагальнення з проблеми.

Нами для проведення цілеспрямованих фундаментальних і прикладних наукових досліджень розроблені, вдосконалені та опрацьовані власні експериментальні моделі та модифікації апластичної анемії в досліді на лабораторних мишах та щурах. Розроблені експериментальні моделі АА токсичного, токсико-радіаційного і комбінованого генезу. При моделюванні АА токсичного генезу застосовували хронічну інтоксикацію бензолом – підшкірне введення бензолу в дозі 0,2 мл на 100 г маси тварин, через добу протягом від одного (12 ін'єкцій) до двох місяців (24 ін'єкції). При утворенні моделі АА токсико-радіаційного генезу застосовували п'ять введень бензолу за аналогічним режимом, після чого через добу застосовували зовнішнє  $\gamma$ -опромінення у дозі 5 Гр. Модель АА складного генезу (комбіноване ураження) створюється застосуванням бензолу (5–8 введень) з наступним одноразовим (через добу) застосуванням крововтрати (25% ОЦК) і фенілгідразину (5 мг/100 г маси, внутрішньоочеровинно). Після застосування бензольної інтоксикації відтворюється модель АА легкого ступеня важкості в стадії подразнення і гіпоплазії кістковомозкового кровотворення, а після

застосування бензолу в комбінації з іншими ушкоджуючими агентами відтворюється модель АА середнього ступеня важкості в стадіях від подразнення до гіпоплазії з елементами аплазії (ознаками спустошення) кісткомозкового кровотворення [5–7].

На розроблених моделях здійснюються фундаментальні дослідження для вивчення закономірностей і механізмів пошкоджень кисневі-транспортної системи, тобто генезу гемічної гіпоксії, при апластичній анемії та можливості її корекції в умовах експериментальної терапії за допомогою застосування біологічно активних речовин (низькомолекулярних пептидів, антиоксидантів), регуляції метаболізму оксиду азоту та глутатіону, а також гіпоксичного тренування.

### Література

1. Абдулкадыров К.М. Апластическая анемия / К.М. Абдулкадыров, С.С. Бессмельцев. – М.; СПб. : Наука : Изд-во КН, 1995. – 248 с.
2. Алексеев Н.А. Анемия : Практическое руководство / Н.А. Алексеев. – СПб. : Гиппократ, 2004. – 511 с.
3. Нарушение липидной пероксидации и ферментной антиоксидантной защиты в эритроцитах крыс с экспериментальной аплазией кроветворения; коррекция аскорбатом и глицином / М.И. Баканов, Л.П. Быкова, Ю.В. Герасимова [и др.] // Вестн. нов. мед. технол. – 1998. – 5, №2. – С. 67–70.
4. Котоян Э.Р. Клиническая гематология : Руководство для врачей / Э.Р. Котоян. – М. : МИА, 2003. – 245 с.
5. Моделирование апластической анемии в эксперименте / И.И. Лановенко, В.И. Федоров, С.Ю. Сергутина [и др.] // Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии : Материалы Рос. науч.-практ. конф. (Санкт-Петербург, 8–10 июня 2004 г.). – СПб., 2004. – С. 75.
6. Деклараційний пат. на корисну модель 9423 UA, МПК7 G 09 B 23/00.
7. Спосіб моделювання гіпопластичної анемії в експерименті / І.І. Лановенко, В.І. Федоров, Н.П. Доценко; заявник та патентовласник Інститут гематології та трансфузіології АМН України. – № u 200503481 ; заявл. 13.04.2005 ; опубл. 15.09.2005, Бюл. № 9.
8. Лановенко І.І. Реактивність кисневотранспортної системи та генез гіпоксії при гіпоплазії кровотворення / І.І. Лановенко, Г.П. Гашук // Доповіді національної академії наук України. – 2011. – № 11. – С. 160–168.
9. Доклиническое изучение антианемических средств, антикоагулянтов и фибринолитиков // Доклиническое исследование лекарственных средств : метод. рекомендации / Максимов Ю.Н., Лановенко И.И. – К. : ИД «Авиценна», 2002. – С. 302–310.
10. Влияние длительной гипоксии на эритроцитарную систему крыс / Ю.В. Николаенко, Л.С. Горожанина, Г.И. Кашманова, Л.А. Полумискова // Вестн. Иван. мед. акад. – 1997. – 2, № 1–2. – С. 24–27.
11. Шиффман Ф. Дж. Патофизиология крови : Пер. с англ. / Ф. Дж. Шиффман. – М., СПб. : Изд-во «Бином – Невский Диалект», 2000. – 448 с.

12. Genotoxic effects of combined exposure to benzene and radiation: Abstr. Environ. Mutagen Soc. 29th Annu. Meet., Anaheim, Calif., March 21-26, 1998 / D.H. Daiker, E.M. Postlethwait, W.W. Au [et al.] // Environ. and Mol. Mutagenes. – 1998. – Vol. 31, Suppl. No 29. – P. 39.
13. Anemia aplastica: Modelo para su inducción con benceno por via oral y subcutánea en ratas / E.B. Escorcía, R.V. Lezama, A.M. Torres [et al.] // Sangre. – 1997. – Vol. 42, No 5. – P. 357–362.
14. IL-6-induced anaemia in rats: Possible pathogenetic implications for anaemia observed in chronic inflammations / M. Jongen-Lavreñic, H.R.M. Peeters, H. Rosenmuller [et al.] // Clin. and Exp. Immunol. – 1996. – Vol. 103, No 2. – P. 328–334.
15. Lu G. Membrane changes and metabolic disorders in erythrocytes of patients and rat models with aplastic anemia / G. Lu, J. Liu // Clin. Med. J. – 1996. – Vol. 109, No 1. – P. 49–51.
16. Putinsteva E. Factores inhibidores de la hematopoyesis: Presente y futuro / E. Putinsteva // Sangre. – 1996. – Vol. 41, No 6. – P. 459–463.
17. Iron metabolism in transgenic mice with hypoplastic anaemia due to incomplete deficiency of erythropoietin / K.B. Raja, P.U. Maxwell, P.J. Ratcliff [et al.] // Brit. J. Haematol. – 1997. – Vol. 96, No 2. – P. 248–253.
18. Ticlopidine and severe aplastic anemia / J.N. Rodrigues, A. Fernandez-Jurado, J.C. Deguez [et al.] // Amer. J. Hematol. – 1994. – Vol. 47, No 4. – P. 332.
19. Rovira E. Anemia aplastica inducida por albendazol / E. Rovira, M. Garcia, D.E. Castera // Med. Clin. – 1998. – Vol. 110, No 12. – P. 477.
20. Tichelli A. Treatment of acquired aplastic anemia / A. Tichelli // The Hematology Journal. – 2003. – Vol. 4, Suppl. No 3. – P. 94–100.
21. Young N.S. The pathophysiology of acquired aplastic anemia / N.S. Young, I. Maciejewski // New Engl. J. Med. – 1997. – Vol. 336, No 19. – P. 1365–1372.

УДК 616.115+616.152.21

## **КИСНЕВОТРАНСПОРТНА ФУНКЦІЯ КРОВІ У ХВОРИХ НА ГЕМОФІЛІЮ В СТАБІЛЬНИЙ ПЕРІОД**

**І.І. Лановенко, Є.В. Авер'янов, П.В. Ющенко, В.І. Семеняка**

ДУ «Інститут гематології та трансфузіології НАМН України», Київ

**Резюме.** У хворих на гемофілію в стабільний період виявлені артеріальна гіпертензія і різна реактивність серцево-судинної системи (ССС). У 31,3% хворих визначається нормодинамічний режим системної гемодинаміки (серцевий індекс (СІ) від 2,45 до 3,50 л/(м<sup>2</sup>·хв)); у 22,9% – гіподинамічний (СІ менше 1,90 л/(м<sup>2</sup>·хв)); у 25,0% – відносно гіпо- і нормодинамічний режими; у 20,8% – гіпердинамічний режим (СІ більше 3,50 л/(м<sup>2</sup>·хв)). Гіподинамічний режим гемодинаміки є несприятливою формою реактивності ССС, викликає недостатність киснетранспортної функції (КТФ) крові і формує гіпоксію циркуляторного