

А. С. Пушкин, Е. Д. Другова, С. А. Камшилин, Н. В. Образцов,  
О. В. Полехина, С. И. Дворецкая, А. И. Чурюмова

## СЕЗОННЫЕ КОЛЕБАНИЯ СРЕДНЕСТАТИСТИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СОСТАВА КРОВИ И МОРФОЛОГИИ ЕЁ КЛЕТОК У ЗДОРОВЫХ БЕЛЫХ КРЫС

ФГУП “Государственный научно-исследовательский институт органической химии и технологии”,  
Россия, Москва; e-mail: dir@gosniiochkt.ru

Цель работы — выявление сезонных колебаний в составе и морфологии крови интактных крыс. Анализировали морфометрические показатели крови 36 клинически здоровых половозрелых крыс самцов в разные сезоны (весна, лето и осень) при помощи АПК “МЕКОС”. Выявленные сезонные колебания в пределах установленных референтных значений необходимо учитывать при проведении доклинических исследований лекарственных препаратов на предмет их эффективности и безопасности.

**Ключевые слова:** морфологии клеток крови; крысы; сезонные колебания

Кровь является одной из наиболее чувствительных систем организма, не только в динамике развития патологических состояний, но и реагирующих на различные воздействия, такие как облучение [1 – 3], токсиканты [4, 5], лекарственные препараты [6, 7]. Это делает необходимым проведение анализов крови в лабораторной клинической диагностике и при мониторинге здоровья, в группах риска развития профессиональной патологии. Анализ крови является обязательным элементом программ и протоколов доклинических испытаний вновь создаваемых лекарственных средств, проводимых в условиях экспериментов на животных, с целью оценки их эффективности и безопасности [8 – 12]. В этой связи важным становится сравнительный анализ показателей крови, изменённых в результате экспериментальных воздействий, с показателями “нормы”. Между тем, соответствующие данные, в особенности применительно к наиболее распространённому биообъекту испытаний — крысам, далеко не однозначны, что может быть обусловлено различными факторами, в том числе и сезонными колебаниями состава и морфо-функционального статуса крови [13, 14].

В отличие от рутинных методов анализа крови вручную или с помощью проточного цитометра, использование автоматизированной компьютерной микроскопии позволяет получить подробную, объективную и статистически верифицированную информацию о составе и морфологии клеток крови. Ранее нами создана методология автоматизированного морфологического обследования крови по множеству показателей и получены объективные характеристики цитоморфологической динамики гематоцитов в условиях экспериментальных воздействий опасными веществами [15, 16]. При этом использованы отечественные аппаратно-программные микроскопические комплексы АПК “МЕКОС-Ц1” и “МЕКОС-Ц2”. Важным аспектом данной методологии стала разработка методов и алгоритмов математической оценки результатов с про-

ведением корректного межгруппового сравнения получаемых среднестатистических показателей.

Целью данной работы стало выявление сезонных колебаний в составе и морфологии крови интактных лабораторных крыс и определение их статистической значимости в картине так называемой “нормы” применительно к оценке гематологического статуса.

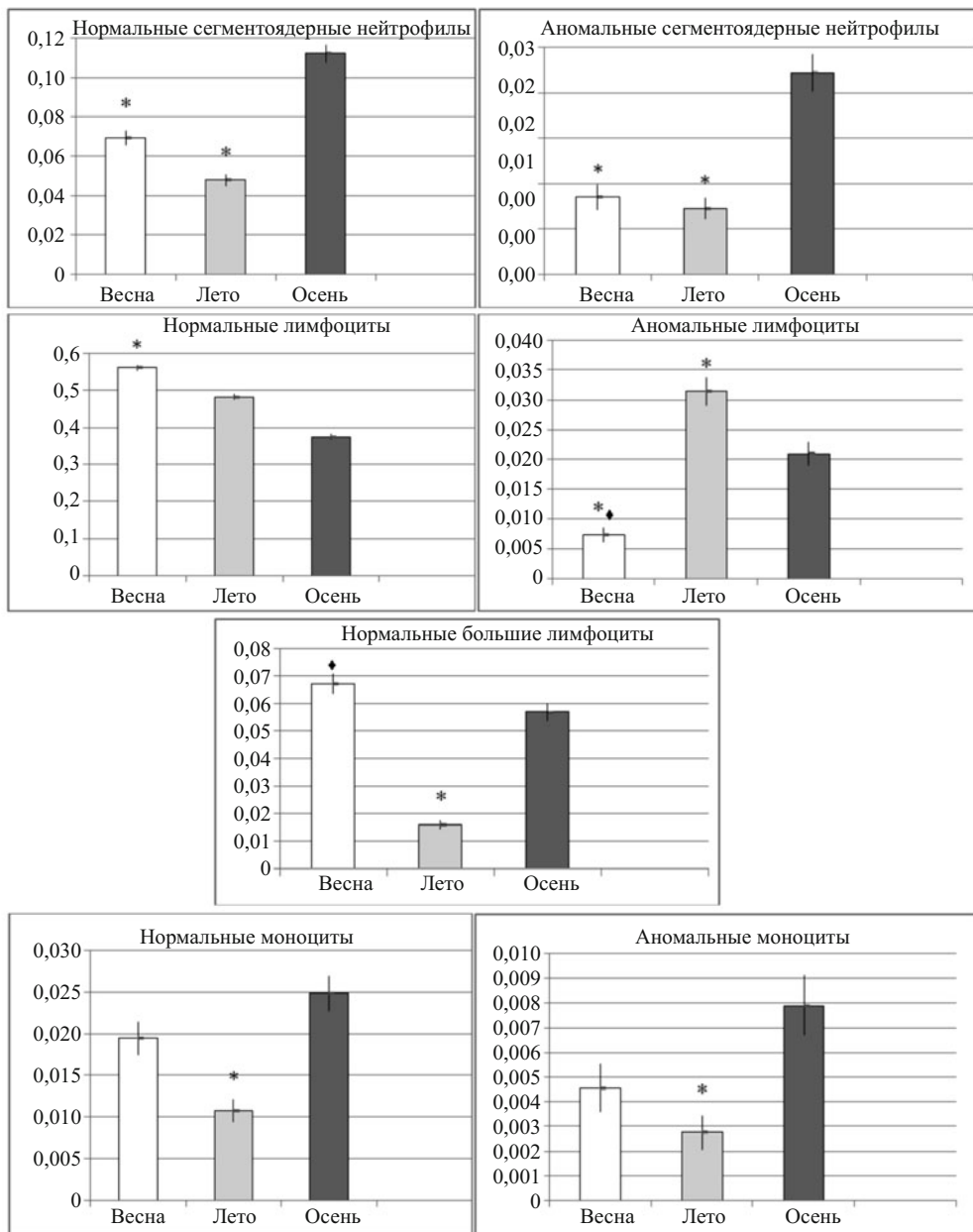
В статье рассматривается репрезентативный материал, полученный в экспериментах с интактными животными в разные сезоны года (весна, лето и осень). В экспериментах использовались клинически здоровые половозрелые белые крысы-самцы (по 12 животных на точку) с массой тела 180 – 200 г, которых содержали в стандартных условиях вивария после карантинного периода продолжительностью 14 сут.

Пробы крови отбирали из хвостовой вены животных в объеме 6 мкл при помощи автоматической пипетки. Изготовление мазков крови осуществляли на устройстве для подготовки стандартизированных мазков крови V-Sampler (Австрия). Полученные мазки маркировали и высушивали при естественной вентиляции, затем фиксировали и окрашивали красителями Май-Грюнвальда и Романовского на автоматическом мультистейнере фирмы Leica (Германия).

Морфометрический анализ клеток крови проводили с использованием автоматизированного гематометрического комплекса фирмы “МЕКОС” с выборкой в 1000 эритроцитов и 500 лейкоцитов в каждом мазке с помощью программного обеспечения “МЕКОС-Ц2”.

Всего анализировали 32 морфотипа клеток красной и белой крови. Были определены доли клеток каждого морфотипа и измерены их диаметр ( $d$ , мкм), площадь ( $S_k$ , мкм<sup>2</sup>), площадь ядра ( $S_y$ , мкм<sup>2</sup>), фактор формы клеточного ядра (ФФЯ) и клетки (ФФК), ядерно-клеточное соотношение (ЯКО), индексы полюсности ядра (ИПЯ) и клетки (ИПК). Далее представлен алгоритм групповой статистической оценки результатов.

1. Первичное статистическое описание данных по группам животных.



**Рис. 1.** Сезонные колебания среднего значения доли разных видов лейкоцитов в периферической крови крыс. Здесь и далее: \*  $p \leq 0,05$ , сравнение показателей лета и весны с осенним периодом, ♦  $p \leq 0,05$ , сравнение показателей весны и лета.

Для всех групп животных определяли выборочные статистические характеристики: оценка среднего значения исследуемого показателя, оценка выборочной дисперсии, стандартное отклонение, стандартное отклонение арифметического среднего и коэффициент вариации.

## 2. Анализ равнозначности наблюдений.

Анализ равнозначности наблюдений в группах животных заключался в проверке однородности (равенства) дисперсий во всех группах по статистическим критериям. Анализ проводился отдельно по сериям опытов.

## 3. Статистический анализ различий средних в серии опытов.

Определение статистической значимости различий данных внутри каждой серии опытов сводилось к вы-

яснению вопросов, значимы ли (в статистическом смысле) колебания средних значений исследуемого показателя, полученные для разных периодов наблюдений, и если значимы — то в какие из них показатель существенно изменяется.

Однородность данных в группах исследовали методом двухфакторного дисперсионного анализа. Первый фактор — животные; второй фактор — сезоны. Метод позволил выявить неоднородность данных, обусловленную влиянием как индивидуальных различий животных, так и сезонного фактора. Для оценки данных нескольких ( $> 2$ ) групп использован чувствительный критерий Ньюмена — Кейлса, дающий наиболее точную оценку вероятности  $\alpha'$ .

Результаты эксперимента представлены на рис. 1 – 8.

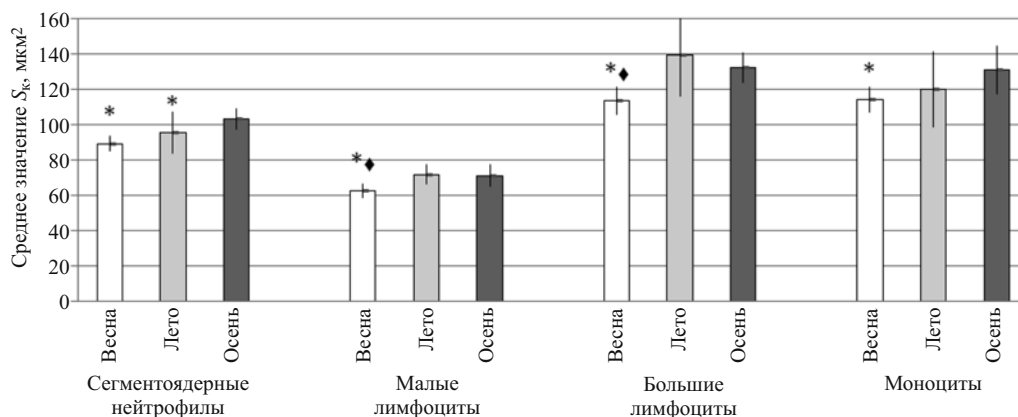


Рис. 2. Сезонные колебания среднего значения площади разных видов лейкоцитов в периферической крови крыс.

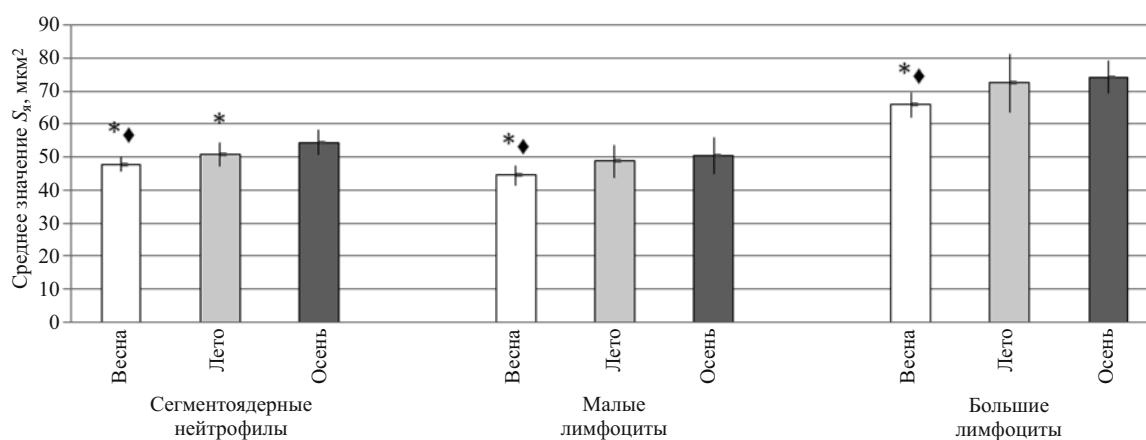


Рис. 3. Сезонные колебания среднего значения площади ядра разных видов лейкоцитов в периферической крови крыс.

Средняя доля как нормальных, так и аномальных сегментоядерных нейтрофилов в периферической крови крыс была достоверно выше осенью при сравнении содержания этих клеток весной и летом (рис. 1). Количество нормальных малых лимфоцитов увеличивалось, а средняя доля аномальных — уменьшалась в весенние месяцы при сопоставлении со средней долей этих клеток осенью, летом среднее содержание этих клеток было выше при сопоставлении с весной. Содержание нормальных больших лимфоцитов летом меньше, чем весной и осенью. Средняя доля нормальных и аномальных моноцитов летом достоверно ниже, чем осенью.

Выявлены достоверные сезонные различия планиметрических характеристик нормальных лейкоцитов, которые представлены на рис. 2 – 5.

Средняя площадь сегментоядерных нейтрофилов, малых и больших лимфоцитов и моноцитов в весенний период, а у сегментоядерных нейтрофилов и летом была достоверно ниже по сравнению с осенью. Отмечено, что этот показатель увеличивался у малых и больших лимфоцитов летом при сопоставлении с таковым весной (рис. 2).

Выявлено, что средняя площадь ядра сегментоядерных нейтрофилов, малых и больших лимфоцитов из-

менялась практически так же, как и площадь этих клеток, однако выявлены различия и между весенним (уменьшение) и летним периодом у сегментоядерных нейтрофилов (рис. 3).

Зарегистрировано снижение среднего фактора формы осенью и весной по сравнению с летом у нейтрофилов, лимфоцитов и моноцитов. Одновременно с этим в осенний период этот показатель у сегментоядерных нейтрофилов, средних и больших лимфоцитов выше при сопоставлении с данными весны (рис. 4).

Выявлено достоверное снижение в весенний по сравнению с летним периодом средних значений ИПК у нейтрофилов и малых лимфоцитов. Кроме того, у сегментоядерных нейтрофилов и больших лимфоцитов эти показатели были выше осенью при сопоставлении с таковыми весной, а у малых лимфоцитов в этот период ниже, чем летом (рис. 5).

Ядерно-клеточное соотношение и индекс полюсности ядра изменялся лишь у больших лимфоцитов. Среднее ядерно-клеточное соотношение этих клеток было ниже летом ( $0,524 \pm 0,044$ ) при сопоставлении данных весны ( $0,581 \pm 0,020$ ) и осени ( $0,565 \pm 0,018$ ). Отмечено увеличение ИПЯ у больших лимфоцитов

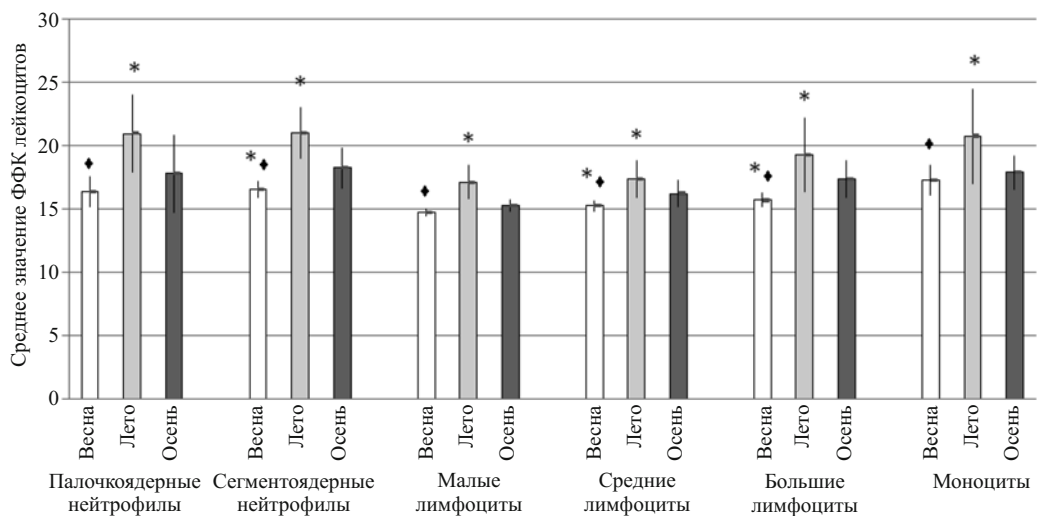


Рис. 4. Сезонные колебания среднего значения фактора формы разных видов лейкоцитов в периферической крови крыс.

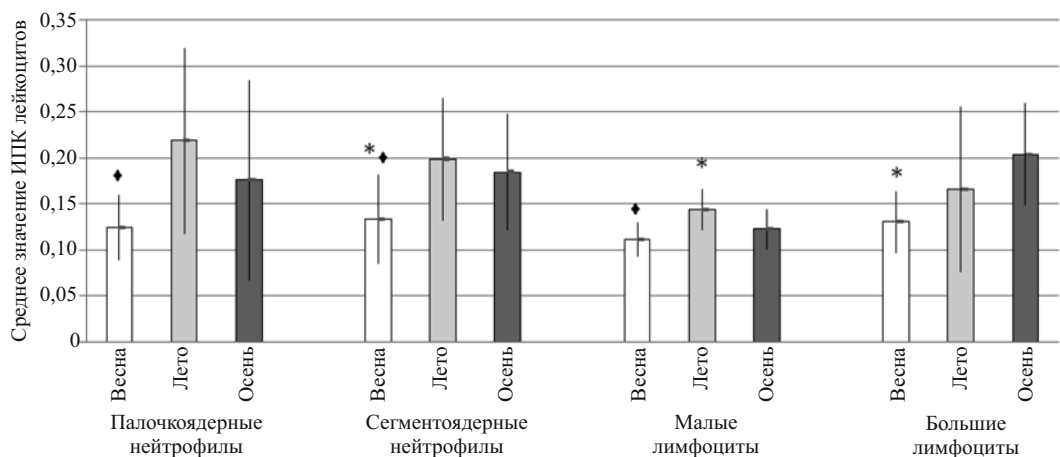


Рис. 5. Сезонные колебания среднего значения индекса полюсности разных видов лейкоцитов в периферической крови крыс.

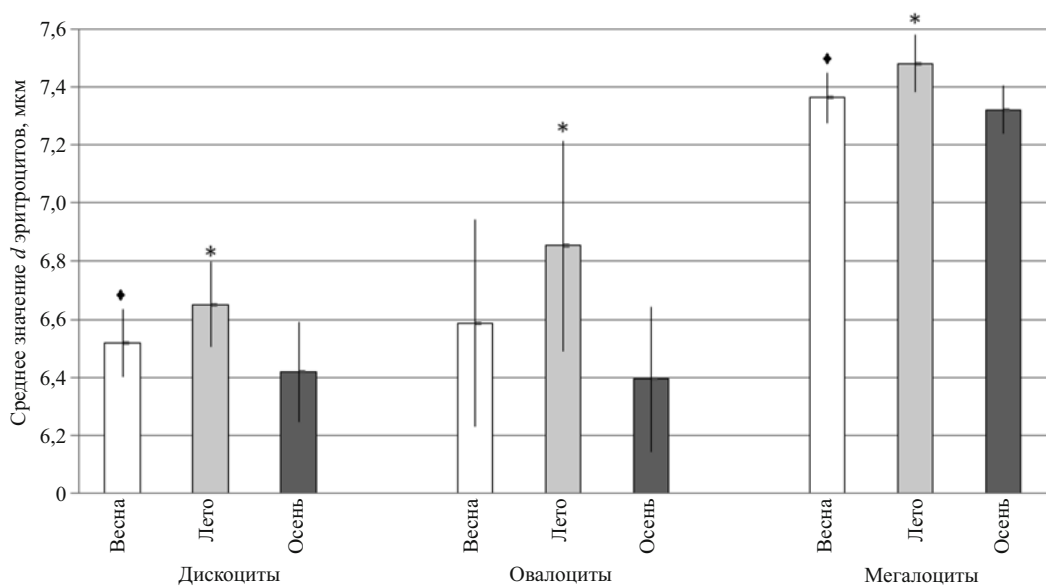


Рис. 6. Сезонные колебания среднего значения диаметра эритроцитов в периферической крови крыс.

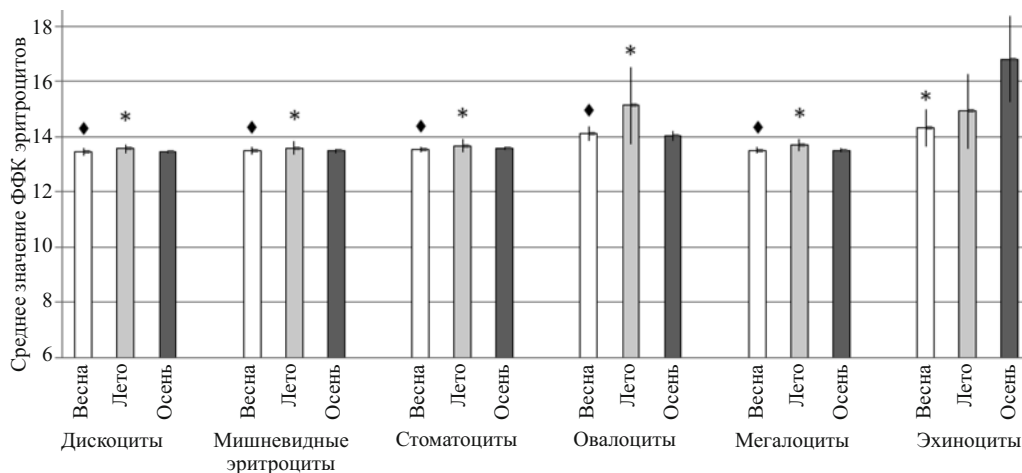


Рис. 7. Сезонные колебания среднего значения фактора формы эритроцитов в периферической крови крыс.

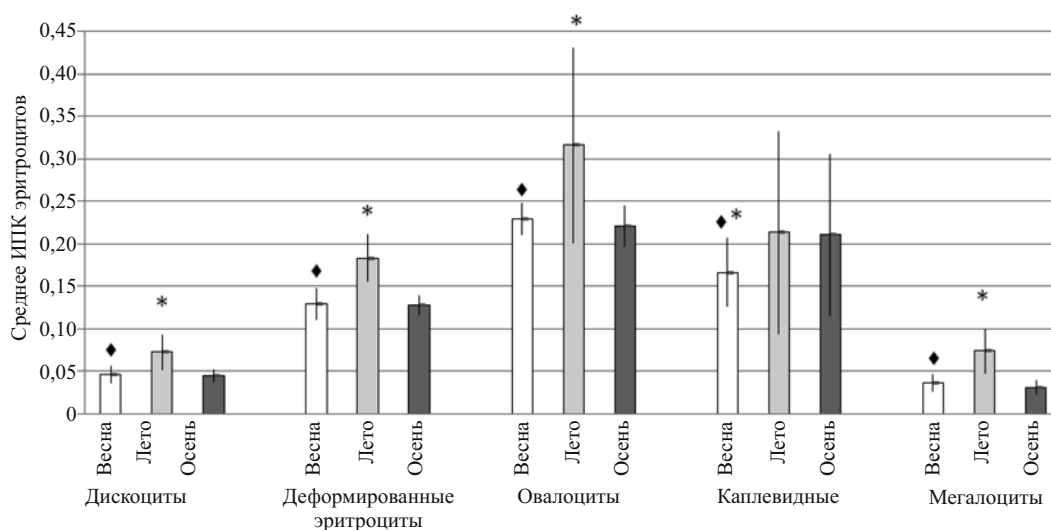


Рис. 8. Сезонные колебания среднего значения индекса полюсности эритроцитов в периферической крови крыс.

осенью ( $0,274 \pm 0,040$ ) по сравнению с ИПЯ летом ( $0,223 \pm 0,062$ ) и весной ( $0,208 \pm 0,031$ ).

Не отмечено сезонного колебания средней доли различных типов эритроцитов; исключение составили сфероциты, их доля в крови крыс достоверно увеличивалась летом по сравнению с весенним периодом ( $0,009 \pm 0,001$ ) и ( $0,001 \pm 0,002$ ) соответственно ( $p \leq 0,005$ ).

Выявлены сезонные колебания планиметрических характеристик различных видов эритроцитов, которые представлены на рис. 6 – 8.

Как следует из рис. 6, средний диаметр дискцитов, овалоцитов и мегалоцитов значимо снижался осенью, а дискцитов и овалоцитов и весной по сравнению с летним периодом.

Выявлено, что фактор формы у большинства типов эритроцитов отличался во все исследуемые периоды. В летний период фактор формы дискцитов, мишеневидных, стоматоцитов, овалоцитов, мегалоцитов был выше по сравнению с осенью и весной. ФФК эхиноцитов в весенний период снижался при сопоставлении с показателями осени (рис. 7).

ИПК дискцитов, деформированных эритроцитов, овалоцитов и мегалоцитов летом был достоверно выше, а каплевидных эритроцитов весной ниже, чем осенью. Одновременно с этим индекс полюсности всех этих типов эритроцитов был ниже весной по сравнению с летним периодом (рис. 8).

Отмечено значимое увеличение площади овалоцитов летом ( $38,351 \pm 3,648$ ) при сопоставлении этого показателя с осенним периодом ( $34,148 \pm 2,537$ ).

В итоге установлено, что 5 из 9 показателей у лейкоцитов и 3 из 5 у эритроцитов достоверно различаются от сезона к сезону, тогда как другие параметры остаются неизменными. Так, фактор формы и ИПК изменяются у лейкоцитов и эритроцитов, одновременно с этим у лейкоцитов различаются доля, площадь клеток и ядра, а у эритроцитов — диаметр клеток. Все исследуемые показатели больших лимфоцитов варьировали в зависимости от сезона, тогда как у эритроцитов различалась лишь доля сфероцитов. Можно полагать, что именно такая картина способна отобразить гематологический статус “сезонной нормы” и что именно этот статус должен служить основанием для коррект-

ных сопоставлений с результатами экспериментальных воздействий.

Полагаем, что выявленные сезонные колебания в пределах установленных референтных значений, равно как и стабильные показатели, должны приниматься во внимание при сравнительной оценке гематологического статуса животных в ходе доклинических испытаний лекарственных средств.

## ЛИТЕРАТУРА

1. К. Н. Муksiнова и Г. С. Мушкачева, *Клеточные и молекулярные основы перестройки кроветворения при длительном радиационном воздействии*, А. К. Гуськова (ред.), Энергоатомиздат, Москва (1990).
2. Е. Д. Другова, *Радиационная биология. Радиоэкология*, **47**(6), 696 – 700 (2007).
3. E. N. Kirillova, M. L. Zakharova, K. N. Muksinova, et al., *Health Phys.*, **103**(1), 28 – 36 (2012).
4. W. J. Liu, N. J. Jiang, Q. L. Guo, et al., *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, **19**(6), 1055 – 1062 (2015).
5. H. M. Zhang, Z. H. Fei, B. P. Tang, et al., *Mol. Biol. Rep.*, **39**(4), 4937 – 4947 (2012).
6. Ю. Б. Белоусов, *Клиническая фармакология и фармакотерапия*, Медицинское информационное агентство, Москва (2010).
7. L. K. Smith, R. R. Shah, J. A. Cidlowski, *J. Biol. Chem.*, **285**(47), 36698 – 36708 (2010).
8. Федеральный закон Российской Федерации от 12 апреля 2010 года № 61-ФЗ “Об обращении лекарственных средств”, Москва (2010).
9. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, ч. 1, Гриф и К, Москва (2012).
10. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, ч. 2, Гриф и К, Москва (2012).
11. Приказ Минздравсоцразвития Российской Федерации от 23 августа 2010 года № 708н “Об утверждении правил лабораторной практики”, Москва (2010).
12. *ГОСТ Р-53434-2009*. Принципы надлежащей лабораторной практики.
13. П. Д. Горизонтов, О. И. Белоусова, М. И. Федотова, *Стресс и система крови*, Медицина, Москва (1983).
14. С. А. Рогачева, О. В. Лузанова, Е. Н. Кириллова и др., *Радиобиология*, **23**(2), 205 – 208 (1983).
15. В. Я. Шульга, Н. В. Образцов, О. В. Полехина и др., *Вестн. рос. военно-мед. академии*, **23**(3), 165 – 166 (2008).
16. А. С. Пушкин, Н. В. Образцов, В. Я. Шульга и др., *Тез. докл. III съезд токсикологов*, Москва (2008), с. 229.

Поступила 12.09.16

## SEASONAL VARIATIONS OF STATISTICAL MEAN INDICES OF BLOOD COMPOSITION AND BLOOD CELL MORPHOLOGY IN HEALTHY WHITE RATS

A. S. Pushkin\*, E. D. Drugova, S. A. Kamshilin, N. V. Obratsov, O. V. Polekhina, S. I. Dvoretzkaya, and A. I. Churyumova

State Research Institute of Organic Chemistry and Technology, Moscow, 111024 Russia;

\* e-mail: dir@gosniokht.ru

The present work was aimed to reveal seasonal variations in the blood composition and blood cells morphology in intact rats. For this purpose, we have determined and analyzed morphometric blood cells indices of 36 clinically healthy adult male rats in various seasons (spring, summer, and autumn) with the aid of MEKOS automated microscope complex. Statistically reliable seasonal fluctuations within the established reference values have been discovered, which should be taken into account during the pre-clinical studies of drugs for their effectiveness and safety.

**Keywords:** blood cell morphology; rats; seasonal variations.