

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ КОСТНОГО МОЗГА ПРИ ОБЛУЧЕНИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**Н. А. Нуралиев, Н. Ф. Муротов**

Бухарский государственный медицинский институт, Бухара, Узбекистан

Ключевые слова: острое облучение, хроническое облучение, цитогенетический анализ костного мозга, белые беспородные крысы.

Таянч сўзлар: ўтқир нурланиш, сурункали нурланиш, суяк илиги цитогенетик таҳлили, оқ монгрел каламушлари.

Key words: acute irradiation, chronic irradiation, cytogenetic analysis of bone marrow, white mongrel rats.

В зависимости от дозы облучения и ее распределения по организму человека или животного варьируют сроки и причины их гибели. Наиболее часто встречающейся является костно-мозговая форма острой лучевой болезни, при этом в зависимости от вида млекопитающих гибель наступает на 7-30 сутки от момента облучения, а причинами смерти чаще всего являются геморрагический синдром или инфекционные осложнения.

**ТАЖРИБАДА НУРЛАНИШ ОСТИДА СУЯК КЎМИГИНИ ЦИТОГЕНЕТИК ТЕКШИРИШ
НАТИЖАЛАРИНИ ТАҲЛИЛ ҚИЛИШ****Н. А. Нуралиев, Н. Ф. Муротов**

Бухоро давлат тиббиёт институти, Бухоро, Ўзбекистон

Радиация дозасига ва унинг инсон ёки ҳайвон танасида тарқалишига қараб, уларнинг ўлим вақти ва сабаблари турлича. Энг кенг тарқалгани ўтқир нурланиш касаллигининг суяк илиги шакли бўлиб, сутемизувчилар турига қараб ўлим нурланиш пайтидан бошлаб 7-30 кун ичида содир бўлади ва ўлим сабаблари кўпинча геморрагик синдром ёки юкумли асоратлардир.

ANALYSIS OF THE RESULTS OF CYTOGENETIC EXAMINATION OF BONE MARROW UNDER IRRADIATION IN AN EXPERIMENT**N. A. Nuraliev, N. F. Murotov**

Bukhara state medical institute, Bukhara, Uzbekistan

Depending on the radiation dose and its distribution throughout the human or animal body, the timing and causes of their death vary. The most common is the bone marrow form of acute radiation sickness, while depending on the type of mammals, death occurs on 7-30 days from the moment of irradiation, and the causes of death are most often hemorrhagic syndrome or infectious complications.

Наиболее часто встречающейся является костно-мозговая форма острой лучевой болезни, при этом в зависимости от вида млекопитающих гибель наступает на 7-30 сутки от момента облучения, а причинами смерти чаще всего являются геморрагический синдром или инфекционные осложнения [3, 10, 11].

К ионизирующим видам излучения относят электромагнитные колебания с малой длиной волны, рентгеновские лучи и γ -излучение, потоки α - и β -частиц (электронов), протонов, позитронов, нейтронов и прочих заряженных частиц, α -излучение и рентгеновское излучение отличается высокой проникающей способностью, меньшей проникающей способностью обладает β -излучение [5]. Радиоактивные субстанции могут попадать в организм через неповрежденную кожу, желудочно-кишечный тракт, органы дыхания. После этого они током крови и лимфы разносятся в органы и ткани [3, 9, 12].

Доказано, что система кроветворения организма наиболее восприимчива к воздействию радиации, особенно это касается клеток костного мозга. Под воздействием радиации развивается аплазия костного мозга, угнетение митотических процессов в органах кроветворения, тотальное отмирание низкодифференцированных клеток костного мозга. Снижение кроветворения сопровождается возникновением геморрагического синдрома [2, 5, 8].

Хроническая лучевая болезнь – это сложный клинический синдром, который развивается в случае длительного воздействия ионизирующего излучения в дозах, которые превышают допустимые. Характерные проявления: длительность и волнообразность течения; наличие в клинической симптоматике как признаков поражения организма от действия облучения, так и проявлений восстановительных и приспособительных реакций. Периоды развития хронической лучевой болезни: период формирования, или собственно хроническая лучевая болезнь; период восстановления; период последствий лучевой болезни [4, 7].

Целью исследования было изучение и оценка цитогенетических изменений в

клетках костного мозга белых беспородных крыс при хроническом и остром облучении в эксперименте в сравнительном аспекте.

Материалы и методы исследования. Для выполнения запланированных исследований использовали 30 белых беспородных крыс массой тела 150-180 г мужского пола, содержащихся в стандартных условиях вивария (температура комнаты 21-22°C, относительная влажность 50-60%, световой режим - по 12 часов темноты и света). Содержание лабораторных животных, кормление и уход за ними, подбор животных, уборка и дезинфекция помещений вивария проводили по Нуралиеву Н.А. и соавт. [6].

Все лабораторные животные (белые беспородные крысы) были получены из одного питомника и одинакового возраста. Перед началом экспериментальных исследований все лабораторные животные содержались в карантине в течение 21 дня. При работе с экспериментальными животными были строго соблюдены все этические принципы работы с лабораторными животными и правила биологической безопасности [1, 6].

Все лабораторные животные были разделены на следующие группы:

Первая группа - белые беспородные крысы (n=12), получавшие острое облучение однократно в дозе 5 Грей;

Вторая группа - белые беспородные крысы (n=12), получавшие хроническое облучение в течение 20 дней по 0,2 Грей ежедневно;

Третья группа - интактные белые беспородные крысы (n=6), не получавшие острого и хронического облучения.

При проведении цитогенетических исследований все работы с ростовыми средами и препаратами проводили в стерильных условиях с использованием ламинарного бокса. Буферы были приготовлены на бидистиллированной воде, отфильтрованы через мембранные фильтры (0,22 мкм «Millipore», Германия) и автоклавированы при 1,2 атм. 30 минут. Стеклопосуда перед использованием предварительно стерилизована при 160°C в течение 120 минут. Оборудование, приспособления, посуда из полимерных материалов подвергались облучению ультрафиолетовым светом в течение 30 минут. Для экспериментальных исследований был отобран костный мозг из бедренной кости белых беспородных крыс при вскрытии животного.

Цитогенетические изменения в клетках костного мозга крыс изучали с помощью прямого метода. Выполнение метода включало следующие этапы: костный мозг вымывали из бедренной кости белых беспородных крыс, вовлеченных в эксперимент всех трех групп исследования питательной средой RPMI 1640 с 0,04% колхицином (которая разрушает веретено деления и хромосомы не расходятся к полюсам во время митоза, образуя полиплоидный организм) в центрифужную пробирку и инкубировали 2-2,5 часа в термостате при 37°C; инкубировали с гипотоническим раствором KCl в течение 40 минут в термостате при 37°C; после гипотонизации трехкратно обрабатывали фиксатором в пропорции одна часть ледяной уксусной кислоты и три части 96-1000 этилового спирта; полученный осадок наносили на предварительно очищенное обезжиренное предметное стекло и окрашивали красителем Гимза; поиск метафаз осуществляли под микроскопом «Leica» (Германия) при увеличении 200 раз, анализ метафазных пластинок при увеличении 1000 раз, в каждом образце анализировали от 15 до 25 клеток с метафазными пластинками.

Статистическую обработку проводили общепринятыми методами вариационной статистики с использованием программ для статистического анализа медико-биологических исследований. Уровнем значимости показателя достоверности различий считали $P < 0,05$. При организации и проведении исследований соблюдали принципы доказательной медицины.

Результаты исследований и их обсуждение. Для анализа нами были использованы клетки костного мозга лабораторных животных, получавших и не получавших разные виды облучения, в которых выявлялись элементы митотического аппарата (табл. 1).

В первой группе (острое облучение) из 123 исследованных клеток костного мозга лабораторных животных в 72,36% (n=89) клеток были выявлены нормальные метафазные пластинки, 12,19% (n=15) клеток были на стадии профазы. Нужно подчеркнуть, что в 5,69% (n=7) клеток были полиплоидные клетки (полиплоидия), 9,76% (n=12) клеток имели преждевременную конденсацию хромосом.

Таблица 1.

Результаты цитогенетического анализа клеток костного мозга белых беспородных крыс, получавших острое и хроническое облучение.

Группы	Количество исследованных			Полипloidия	Преждевременная конденсация хромосом
	Делящихся клеток	Метафаз	Профаз		
Первая группа, n=12	123	89 / 72,36	15 / 12,19	7 / 5,69	12 / 9,76
Вторая группа, n=12	125	60 / 48,0	11 / 8,80	3 / 2,40	51 / 40,80
Третья группа, n=6	75	75 / 100,0	0	0	0

Примечание: в числителе абсолютные; в знаменателе относительные (%) показатели

Метафазные пластинки - это скопление хромосом в плоскости перпендикулярной оси деления (экваториальная плоскость), в которых хромосомы находятся экваториально в метафазе митоза (вторая фаза деления соматических клеток). Количество хромосом у крыс в норме составляет 42 (диплоидный набор).

Таким образом, низкое содержание клеток (9,76%) с преждевременной конденсацией хромосом и отсутствие клеток с пульверизацией и рассеиванием хромосом свидетельствует о незначительных изменениях митотического деления клеток костного мозга лабораторных животных данной группы исследования. Отсутствие животных в этой группе с низкой клеточностью и низкой бласттрансформацией (8,3%, n=1) свидетельствует о нормальной митотической активности клеток костного мозга у всех (n=12) лабораторных животных. В их клетках костного мозга отсутствует патология митоза. По-видимому, этот факт объясняется коротким периодом наблюдения (5 суток) животных после однократного острого облучения, так как считается в зависимости от вида млекопитающих гибель наступает на 7-30 сутки от момента облучения [2, 5].

Проведенными исследованиями доказано, что после установленного однократного острого облучения (5 Грей) в течение первых 5-суток практически не наблюдаются изменения митотического деления клеток костного мозга, не появляются хромосомные aberrации, не снижается митотическая активность.

Далее такие же исследования проведены с белыми беспородными крысами, получавшими хроническое облучение (вторая группа).

Из 125 исследованных клеток костного мозга лабораторных животных второй группы в 48,0% (n=60) клетках были обнаружены нормальные метафазные пластинки, в 8,80% (n=11) клетках наблюдали стадию профазы, в 2,40% (n=3) случаях обнаружены полиплоидные клетки, в 40,80% (n=51) клетках наблюдались клетки с преждевременной конденсацией хромосом.

Из 12 животных второй группы у 1 крысы (8,33%) на препаратах не было обнаружено митотически делящихся клеток, наблюдалась низкая клеточность, низкая бласттрансформация и торможение митоза. Присутствие клеток с пульверизацией хромосом свидетельствует о патологии митоза.

Наличие высокой концентрации клеток (40,80%) с преждевременной конденсацией хромосом в клетках костного мозга крыс второй группы свидетельствует о торможении нормального митотического цикла, что сказывается на пролиферативной активности данной ткани и наличии клеточных клонов с генетической патологией.

Приведенные ниже рис. 1 (метафазная пластинка с нормальным кариотипом) и рис. 2 (нормальная ранняя метафазная пластинка) подтверждают отсутствие изменений в микроскопической картине клеток костного мозга лабораторных животных, получавших однократное острое облучение в дозе 5 Грей на 5-сутки после облучения.

В отличие от лабораторных животных первой группы, которых наблюдали в 5-сутки после острого облучения, во второй группе лабораторных животных, которых исследовали после 20 дневного хронического облучения с ежедневной дозой 0,2 Грей наблюдали иную картину. Отмечали патологию при делении клеток костного мозга.

На рис. 3 видно, что ядро клетки костного мозга животного, относящиеся ко второй группе содержит раннюю фазу с преждевременной конденсацией хромосом. Справа и внизу клетки, которая видна на рис. 3, находятся интерфазные ядра.

Кроме того, в ядре клеток костного мозга лабораторных животных также наблюдали

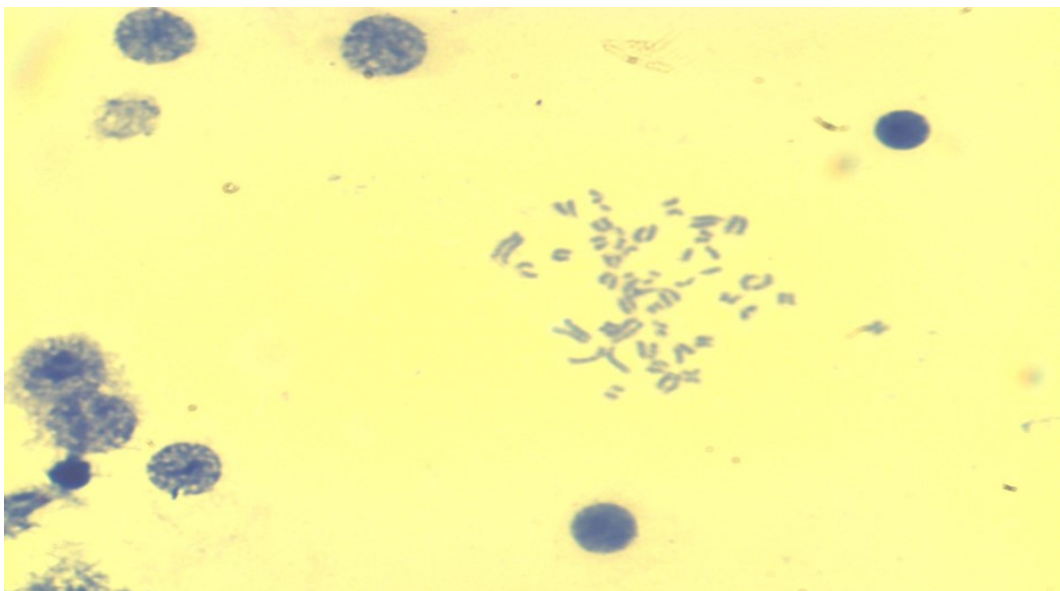


Рис. 1. Клетки костного мозга. Метафазная пластинка с нормальным кариотипом (первая группа - острое облучение, Ок. x10, Об. x100).

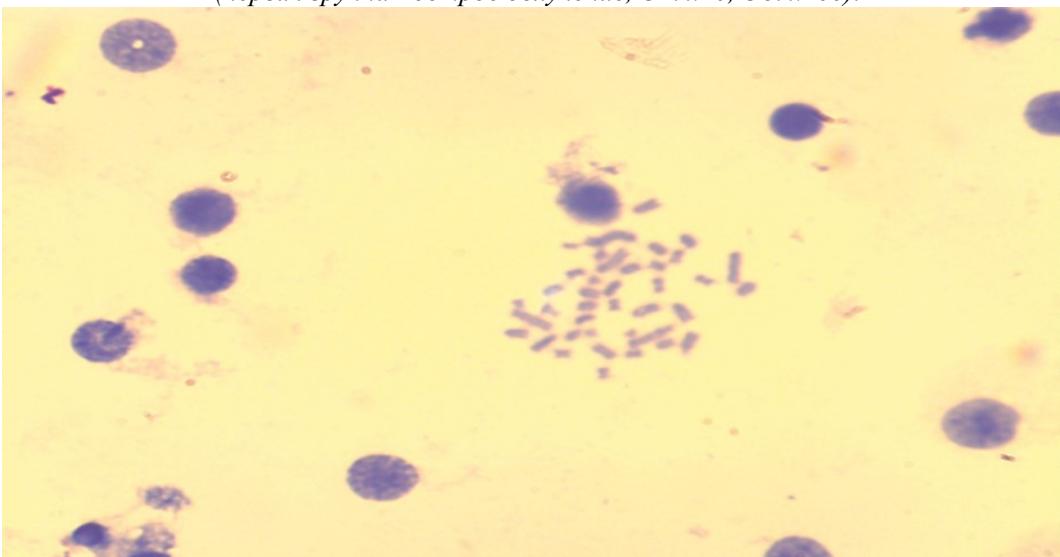


Рис. 2. Клетки костного мозга. Нормальная ранняя метафазная пластинка (первая группа - острое облучение, Ок. x10, Об. x100).

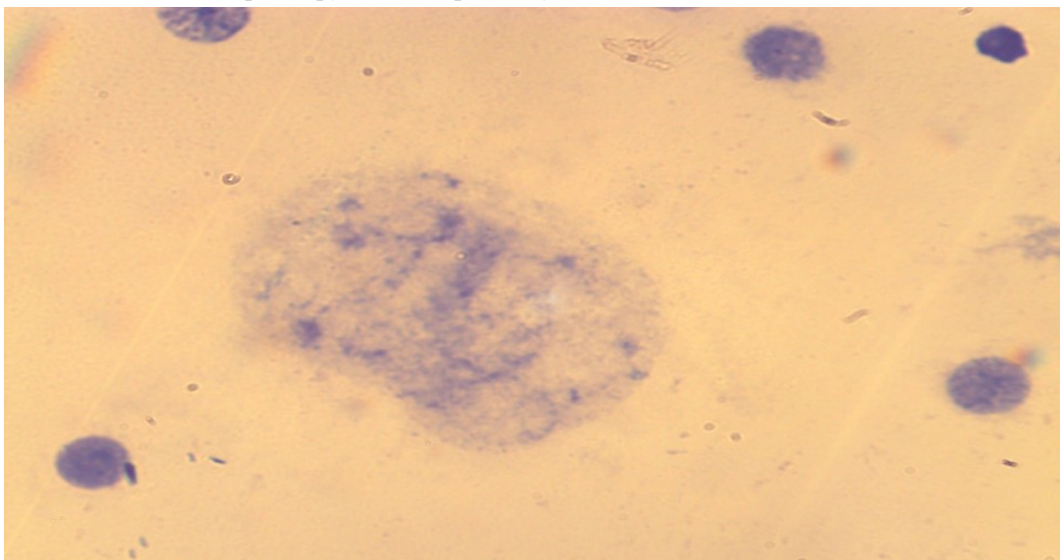


Рис. 3. Клетка костного мозга. Преждевременная конденсация хромосом (вторая группа - хроническое облучение, Ок. x10, Об. x100).

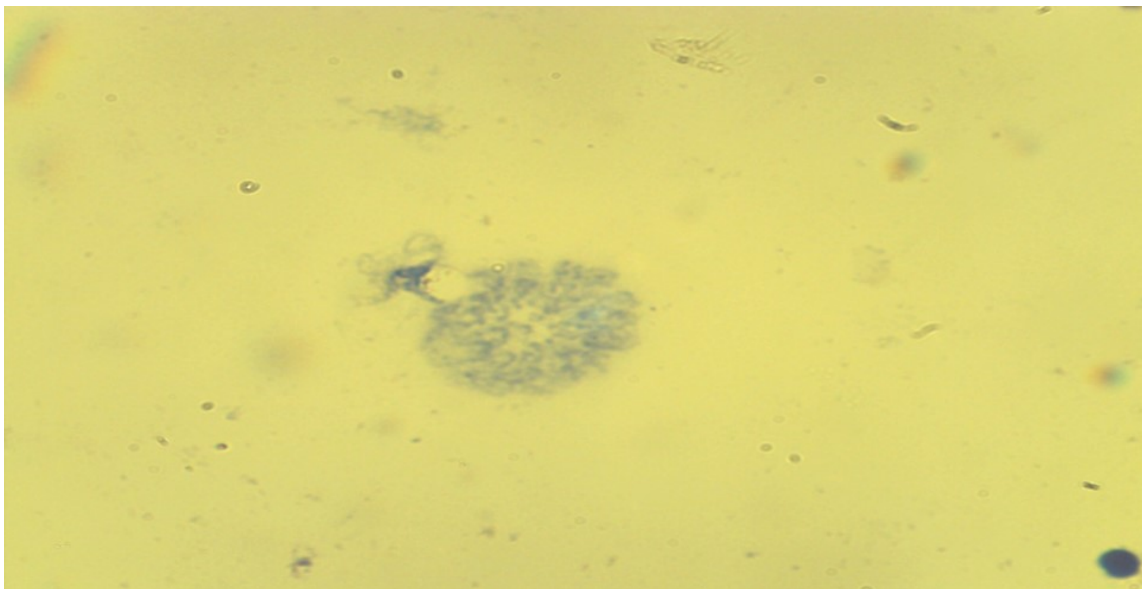


Рис. 4. Клетка костного мозга. В ядре поздняя фаза преждевременной конденсации хромосом (вторая группа - хроническое облучение, Ок. x10, Об. x100).

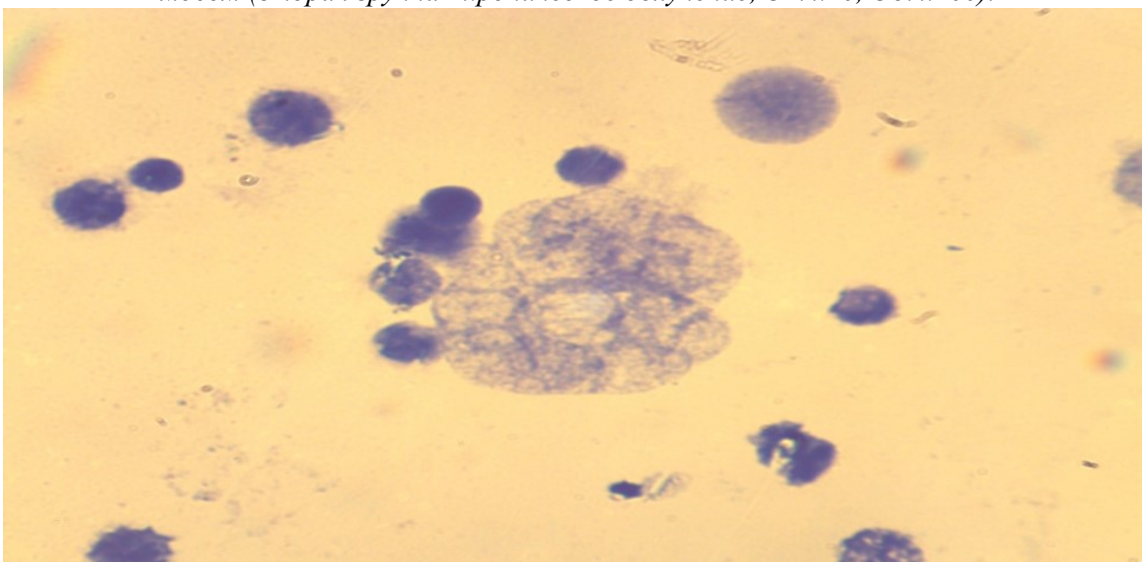


Рис. 5. Клетки костного мозга. В центре ядро с преждевременной конденсацией хромосом. Вокруг интерфазные ядра (вторая группа - хроническое облучение, Ок. x10, Об. x100).

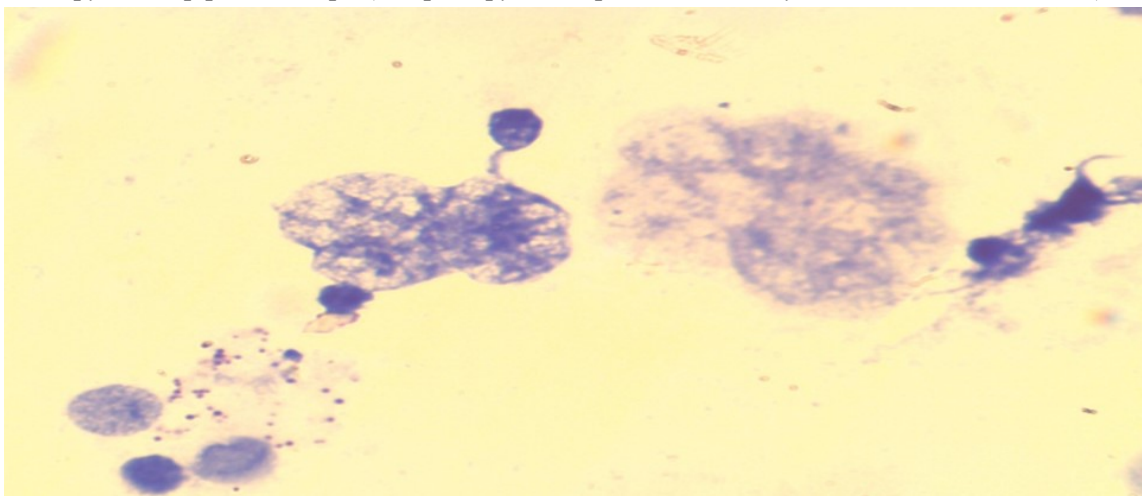


Рис. 6. Клетки костного мозга. В центре ядра с преждевременной конденсацией хромосом, слева ядро с пульверизацией хромосом (вторая группа - хроническое облучение, Ок. x10, Об. x100).

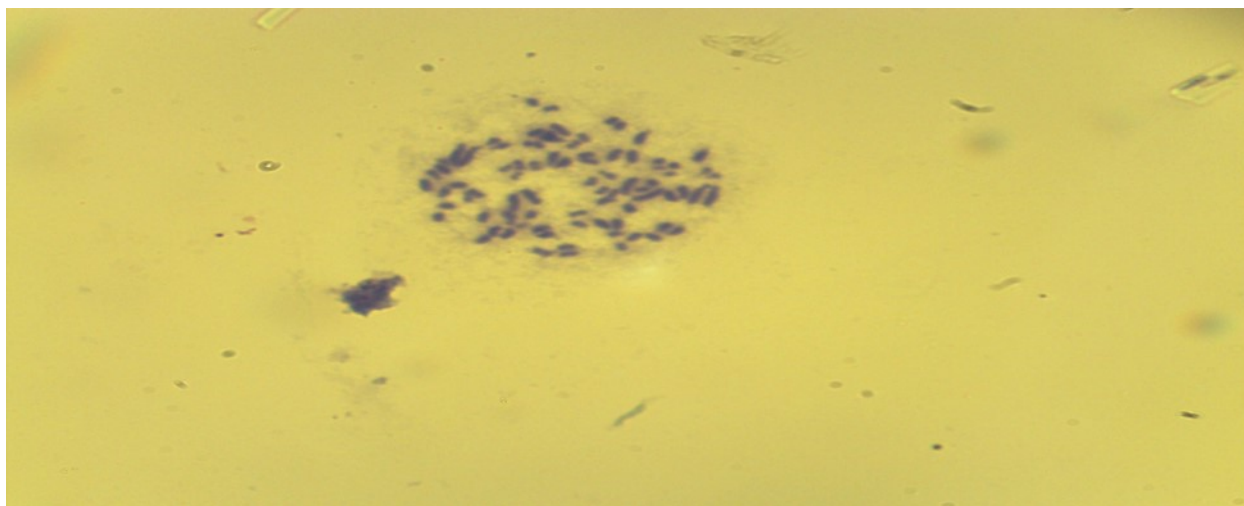


Рис. 7. Клетки костного мозга. Нормальный кариотип, поздняя метафаза (третья группа - без острого и хронического облучения, Ок. x10, Об. x100).

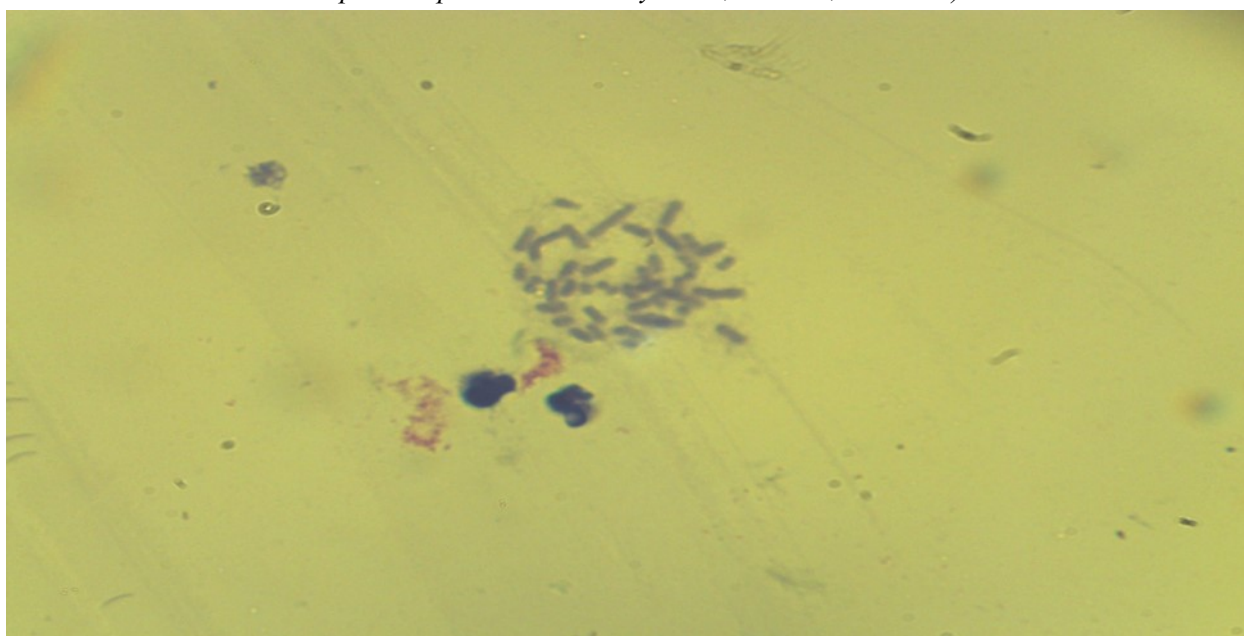


Рис. 8. Клетки костного мозга. Нормальный кариотип, ранняя метафаза (третья группа - без острого и хронического облучения, Ок. x10, Об. x100).

позднюю фазу преждевременной конденсации хромосом (рис. 4).

На другом рисунке (рис. 5) в центре клетки костного мозга животного после хронического облучения наблюдается ядро с преждевременной конденсацией хромосом, а вокруг нее видны интерфазные ядра.

Патологию митоза можно наблюдать и на рис. 6, где в центре видны ядра с преждевременной конденсацией хромосом, а слева наблюдается ядро с пульверизацией хромосом (вторая группа - хроническое облучение).

В отличие от лабораторных животных первой и второй группы, которым проводили острое и хроническое облучение, в клетках костного мозга белых беспородных крыс третьей группы (интактные) изменений в клетках костного мозга и течения деления клеток не наблюдали, во всех случаях обнаружили нормальный кариотип - позднюю (рис. 7) и раннюю (рис. 8) метафазу.

Таким образом, у лабораторных животных после острого однократного облучения выраженность цитогенетических изменений были менее яркими, чем при хроническом облучении. У интактных животных отклонений от нормальных процессов не отмечено.

На основании проведенных исследований изучены и оценены цитогенетические изменения в клетках костного мозга лабораторных животных, получавших острое и хроническое

облучение. Полученные данные позволяют использовать предложенные рекомендации для повышения эффективности методики изучения и оценки цитогенетических изменений в клетках костного мозга лабораторных животных при экспериментальных исследованиях по определению влияния разных доз радиации на организм.

Выводы.

1. В первой группе (острое облучение) из 123 исследованных клеток костного мозга лабораторных животных в 72,36% клеток были выявлены нормальные метафазные пластинки, 12,19% клеток были на стадии профазы. Нужно подчеркнуть, что 5,69% клеток были полиплоидными (полиплоидия), 9,76% клеток имели преждевременную конденсацию хромосомом.

2. Низкое содержание клеток (9,76%) с преждевременной конденсацией хромосомом и отсутствие клеток с пульверизацией и рассеиванием хромосомом свидетельствует о незначительных изменениях митотического деления клеток костного мозга лабораторных животных первой группы исследования. Отсутствие животных с низкой клеточностью и низкой бласттрансформацией (8,3%) свидетельствует о нормальной митотической активности клеток костного мозга у всех лабораторных животных. По-видимому, это объясняется коротким периодом наблюдения (5 суток) животных после острого облучения, так как считается в зависимости от вида млекопитающих гибель наступает на 7-30 сутки от момента облучения.

3. Исследованиями доказано, что после установленного однократного острого облучения (в дозе 5 Грей) в течение первых 5 суток практически не наблюдается патологии митоза (изменения митотического деления клеток костного мозга), не появляются хромосомные aberrации, не снижается митотическая активность. В связи с этим считаем, что в это время можно проводить лечебно-профилактические мероприятия по поддержанию пролиферации и дифференцировки клеток костного мозга, повышению деятельности иммунной системы.

4. Из 125 исследованных клеток костного мозга белых беспородных крыс второй группы (хроническое облучение) в 48,0% клетках были обнаружены нормальные метафазные пластинки, в 8,80% клетках наблюдали стадию профазы, в 2,40% случаях обнаружены полиплоидные клетки, в 40,80% клетках наблюдалась клетки с преждевременной конденсацией хромосомом. Из 12 животных второй группы у 1 крысы (8,33%) на препаратах не было обнаружено митотически делящихся клеток, наблюдалась низкая клеточность, низкая бласттрансформация и торможение митоза. Присутствие клеток с пульверизацией хромосомом свидетельствует о патологии митоза.

5. Наличие высокой концентрации клеток (40,80%) с преждевременной конденсацией хромосомом в клетках костного мозга крыс второй группы свидетельствует о торможении нормального митотического цикла, что сказывается на пролиферативной активности данной ткани и наличии клеточных клонов с генетической патологией.

6. У лабораторных животных после острого однократного облучения выраженность цитогенетических изменений были менее яркими, чем при хроническом облучении. У интактных животных отклонений от нормальных процессов не отмечено.

Использованная литература:

1. Жармухамедова Т.Ю., Семушина С.Г., Пахомова И.А., Пименов М.С., Мурашов А.Н. Международные правила работы с лабораторными животными при проведении доклинических испытаний // Токсикологический вестник. - Москва, 2011. - №4(109). - С.2-9.
2. Иванов А.А., Андрианова И.Е., Мальцев В.Н., Шальнова Г.А., Ставракова Н.М., Булынина Т.М., Караулова Т.А., Бушманов А.Ю., Ушаков И.Б. Иммуно-микробиологическая компонента острого лучевого поражения и модификация его развития иммунотропными препаратами // Медицинская радиология и радиационная безопасность. - 2016. - № 5. - С.39-47.
3. Конопляников А.Г. Клеточные основы радиационных эффектов человека // В кн.: «Радиационная медицина. Том 1. Теоретические основы радиационной медицины». Под общ. ред. Л.А. Ильина. - Москва: Изд. АТ, 2004. - С.189-277.
4. Котенко К.В., Бушманов А.Ю., Иванов А.А. Способ профилактики и лечения острой лучевой болезни в

- эксперименте. Патент РФ 2551619. Опубликовано в Бюллетене № 15. - 27.05.2015.
5. Михеев А.Н. Малые дозы радиобиологии. Моя маленькая радиологическая вера. - Киев, Фотосоциоцентр, 2016. - 371 с.
 6. Нуралиев Н.А., Бектимиров А.М-Т., Алимова М.Т., Сувонов К.Ж. Правила и методы работы с лабораторными животными при экспериментальных микробиологических и иммунологических исследованиях // Методическое пособие. - Ташкент, 2016. - 34 с.
 7. Уланова А.М., Кузьмина Т.Д., Леоненко И.В. Противолучевые свойства нормального гомологичного иммуноглобулина в условиях отсроченного применения у собак на фоне пероральной антибиотикотерапии. Сообщение I. Терапевтическая эффективность нормального гомологичного иммуноглобулина // В кн.: «Избранные материалы «Бюллетеня радиационной медицины». Том 1» Под общ. ред. Л.А. Ильина и А.С. Самойлова. – М.: ФМБА ФГБУ «ГНЦ РФ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна», 2016. - С.663-669.
 8. Тухтаева Х.Х., Нуралиев Н.А., Хамдамов Б.З. Результаты цитогенетического анализа костного мозга при хроническом и остром облучении в эксперименте // Журнал теоретической и клинической медицины. – Ташкент, 2022. - № 1. – С. 25-32.
 9. Dadachova E., Casadevall A., Einstein C. Oral administration of melanin for protection against radiation. Patent US 2014037674. 2014.
 10. Ferrando M.L., Schultsz C. A hypothetical model of host-pathogen interaction of *Streptococcus suis* in the gastrointestinal tract // Gut Microbes. - 2016. - N 7(2). - P.154-162.
 11. Nuraliyev N.A., Tuxtayeva H.H. Comparative evaluation of cytogenetic changes in bone marrow cells under chronic and acute irradiation in an experiment // Europe's Journal of Psychology. - 2021. - № 17 (3). - P. 274-282.
 12. Sender Ron, Fuchs Shai, Milo Ron. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body // PLOS Biology. - 2016. - T. 14. - Vol. 8. - P.25-33.
 13. Farkhodovich, M. N. (2023). Women with Fetal and Malnutrition Cause Purulent Inflammation, Developing a Method to Assess the Effectiveness of Autopsies to Add Antiseptics to their Neighbors. *Research Journal of Trauma and Disability Studies*, 2(4), 257-259.
 14. Farhodovich, M. N. (2023). Peculiarities of Agricultural Workers. *International journal of health systems and medical sciences*, 2(2), 75-78.
 15. Farhodovich, M. N. (2023). Differentiated Approach to Assessing the Immune Status in Pregnant and Lactating Women. *International journal of health systems and medical sciences*, 2(4), 163-168.
 16. Murotov, N. F., & Ilyasov, A. S. Reactive changes in the anal canal and sphincter apparatus of the rectum of rats exposed to xenobiotics.
 17. Курязов А.К., Муротов Н.Ф. Характеристика неспецифических факторов иммунитета ротовой полости у беременных женщин. // *Тиббиётда янги кун* 10 (48) 2022. – с. 229-232
 18. Нуралиев Н.А., Муротов Н.Ф. Бактериал транслокацияда микроорганизмлар ўрнини тажрибада ўрганиш натижалари таҳлили. // *Тиббиётда янги кун* 10 (48) 2022. – с. 216-221