

КРАТКИЕ НАУЧНЫЕ СООБЩЕНИЯ

Р. А. АРУТЮНЯН, В. С. МАРКОСЯН

ИЗУЧЕНИЕ ЛЕЙКОПОЭТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПЛАЗМЫ
МЕТОДИКОЙ КУЛЬТУРЫ КОСТНОГО МОЗГА

В механизме нейро-гуморальной регуляции процессов кроветворения эндогенные стимуляторы гемопоэза—эритропоэтины, лейкопоэтины и тромбопоэтины, наряду с другими факторами, занимают важное место. Из них эритропоэтины исследованы достаточно подробно [2, 4, 8, 11, 15]. Что касается лейкопоэтинов, то эта проблема разработана далеко не полностью.

Имеющиеся немногочисленные исследования показывают, что лейкопоэтины в регуляции лейкопоэза выполняют определенную роль. Выявлено, что содержание лейкопоэтинов в крови животных и человека заметно возрастает в условиях экспериментального извлечения из организма большого количества лейкоцитов [6, 13], при введении кроликам брюшнотифозной вакцины [14], а также при некоторых патологиях системы крови—агранулоцитозе и панмиелофтизе [1]. В этих исследованиях определение содержания лейкопоэтинов производилось, главным образом, с помощью методик *in vivo*: 1) введением исследуемой плазмы животным-реципиентам—кроликам, крысам и мышам [1, 6, 12] и 2) перфузией изолированной конечности реципиента с добавлением в перфузат плазмы, богатой лейкопоэтинами [12]. В обоих случаях в качестве показателей, определяющих наличие того или иного количества лейкопоэтинов, служили изменения в составе элементов белого ряда периферической крови и костного мозга. Следует отметить, что вышеперечисленные методики, имея ряд преимуществ, не лишены определенных недостатков и не всегда обеспечивают стабильность полученных результатов: индивидуальные реактивные особенности системы крови животных-реципиентов приводят к возникновению больших колебаний в исследуемых показателях лейкопоэза. Последнее обстоятельство, естественно, снижает точность полученных данных.

Настоящая работа ставит себе задачу проверить возможность изучения лейкопоэтической активности плазмы животных и человека *in vitro* с помощью определения митотической активности элементов белого ряда в культуре костного мозга при добавлении к нему исследуемых проб плазмы. Известно, что методика культивирования костного мозга с учетом соответствующих сдвигов в эритробластическом ростке или митотической активности элементов эритробластического ростка успешно применяется в исследованиях по эритропоэтинам [5, 10]. Исходя из этого,

мы пришли к предположению, что определение митотической активности элементов лейкобластического ряда в культуре костного мозга также может быть использовано для определения лейкопоэтической активности плазмы. При этом принималось во внимание то обстоятельство, что уровень митотической активности клеток костного мозга является надежным показателем его репродуктивной активности и степени клеточного роста.

Методика опытов. Животными-донорами служили 20 здоровых, половозрелых крыс-самцов, которые были подразделены на две группы. У крыс первой группы изучался уровень лейкопоэтической активности плазмы без каких-либо предварительных вмешательств. Кровь добывалась из брюшной аорты, в стерильных условиях, гепаринизированным шприцем и подвергалась трехкратному центрифугированию. Крысы второй группы подвергались лейкоферезу с помощью быстрого извлечения из организма большого количества лейкоцитов. С этой целью под легким эфирным наркозом крысам внутрибрюшинно вводилось 20 мл стерильного физиологического раствора. Через 12 час. крысам добавочно вводилось 10 мл физиологического раствора и тут же, через эту же иглу, физиологический раствор высасывался обратно в максимальном количестве. Вся эта процедура повторялась 8 раз, через каждые 12 час. В результате этого из организма подопытных крыс удалялось около 1 млрд. лейкоцитов. Спустя 12 час. после последнего лейкофереза, из брюшной аорты, в стерильных условиях, выпускалась вся кровь и трехкратно центрифугировалась для получения плазмы. В качестве стабилизатора использовался раствор гепарина («Рихтер»). Таким образом, с помощью определения митотической активности лейкобластических элементов в культуре костного мозга в наших опытах исследовалась лейкопоэтическая активность плазмы здоровых крыс и плазмы лейкоферетических крыс, богатой лейкопоэтинами.

Костный мозг культивировался в виде суспензии [3, 7]. У здорового кролика из обеих бедренных костей извлекалось около 1 мл костного мозга, который переносился в две пробирки, содержащие по 5 мл изотонического солевого раствора Хэнкса, к которому предварительно добавлялся гепарин. После 10-минутного центрифугирования при 1000 об./мин, осадок костномозговых элементов из обеих пробирок переносился в один флакон, в который добавлялось такое количество гомологичной плазмы, антибиотиков и колхицина, чтобы доля плазмы во всем объеме составляла $\frac{2}{3}$, концентрация антибиотиков (пенициллин + стрептомицин)—200 ед. на 1 культуральную пробирку, а содержание колхицина—0,05 мл на 1 пробирку (из рабочего раствора, содержащего 1 : 25 000 колхицина в растворе Хэнкса). После 10-минутного встряхивания суспензия костного мозга переносилась в силиконизированные культуральные пробирки по 0,5 мл. Испытуемая плазма в количестве 0,5 мл добавлялась к суспензии костного мозга. Для контрольного сравнения в отдельные пробирки с костномозговой суспензией добавлялось 0,5 мл раствора Хэнкса. После всего этого пробирки закрывались стерильными резиновыми пробками

и помещались в термостат при 38° на 6 часов. После окончания инкубации все культуральные пробирки центрифугировались и из осадка изготовлялись мазки, которые красились по Паппенгейму. В препаратах подсчитывалось 300 клеток лейкобластического ряда, среди которых отмечались митотически делящиеся клетки: процентное содержание их сравнивалось с процентными показателями митозов, зарегистрированных в контроле—при культивировании костного мозга в растворе Хэнкса. Полученные данные были подвергнуты статистической обработке.

Результаты опытов. Добавление к культуре костного мозга плазмы, взятой у здоровых интактных крыс по сравнению с контролем привело к появлению небольшого, но статистически вполне достоверного усиления митотической активности лейкобластических элементов костного мозга. Содержание митотически делящихся клеток при культивировании костного мозга в присутствии раствора Хэнкса (контроль) составляло $1,0 \pm 0,27\%$. В присутствии плазмы здоровых крыс содержание митозов в элементах белого ряда культивируемого костного мозга составляло $3,3 \pm 0,48\%$. Последнее обстоятельство явно говорит в пользу усиления процесса клеточного деления под влиянием плазмы здоровых крыс. Подробные данные этих опытов представлены в табл. 1.

Культивирование костного мозга в присутствии плазмы лейкоферетических крыс, которая, как уже было отмечено выше, обладает сильно выраженной лейкопоэтической активностью, привело к аналогичным, но более выраженным сдвигам. Содержание митозов в элементах белого ряда культивируемого костного мозга составляло $5,7 \pm 0,4\%$, что убедительно свидетельствует о значительном увеличении количества лейкопоэтинов в плазме лейкоферетических крыс (табл. 1).

Таблица 1

Лейкопоэтическое действие плазмы здоровых и лейкоферетических крыс, выявляемое путем определения митотической активности элементов лейкобластического ряда в культуре костного мозга

Показатель	Добавление раствора Хэнкса		Добавление нормальной плазмы		Добавление плазмы лейкоферетич. крыс	
	n_1	$M_1 \pm m_1$	n_2	$M_2 \pm m_2$	n_3	$M_3 \pm m_3$
Содержание митотически делящихся клеток χ_2 (в %) χ_2	10	$1,0 \pm 0,27$	10	$3,3 \pm 0,48$ $P < 0,001$	10	$5,7 \pm 0,45$ $P < 0,01$

Полученные нами данные дают основание утверждать, что методика культуры костного мозга в жидкой среде может быть с успехом применена для определения лейкопоэтической активности плазмы. Изучение митотической активности элементов белого ряда культивируемого костного мозга при добавлении к последнему той или иной исследуемой плазмы позволяет получить достоверные данные в исследованиях по лейкопоэтинам. Преимущество предлагаемой нами методики, по сравнению с имеющимися способами определения лейкопоэтинов, мы видим в том,

что она дает непосредственное отражение действия лейкопоэтинов на рост элементов белого ряда костного мозга. Предлагаемая нами методика сравнительно нетрудоемкая, требует небольшого количества исследуемой плазмы и обеспечивает максимальную стандартность условий опыта. Нам кажется, что при изучении лейкопоэтической активности крови человека и животных целесообразнее провести параллельное использование методик *in vivo* и *in vitro*. Комплексное применение этих двух способов в какой-то мере позволит преодолеть имеющиеся методические недостатки и получить объективное представление о лейкопоэтической активности исследуемых веществ.

Сектор радиобиологии
МЗ АрмССР

Поступило 5.X 1967 г.

Ռ. Հ. ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ, Վ. Ս. ՄԱՐԿՈՍՅԱՆ

ՊԼԱՋՄԱՅԻ ԼԵՅԿՈՊՈԵՏԻԿ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՈՐՈՇՈՒՄԸ ՈՍԿՐԱԾՈՒԹՅ ԿՈՒԼՏՈՒՐԱՅԻ ՄԵԹՈԴԻԿԱՅԻՆՈՎ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Հեղինակներն ուսումնասիրել են արյան պլազմայի լեյկոպոէտիկ ակտիվությունը՝ ոսկրածուծի կուլտուրայում լեյկոբլաստիկ էլեմենտների միթոզները գրանցելու օգնությամբ: Պարզվել է, որ այդ մեթոդիկան ունի մի շարք առավելություններ գոյություն ունեցող մեթոդիկաների նկատմամբ և հաշվությամբ կարող է կիրառվել ինչպես մարդու, այնպես էլ կենդանիների արյան լեյկոպոէտիկ ակտիվությունը որոշելու փորձերում:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Алмазов В. А., Шуккин В. Б., Ромм Р. С. Лаборат. дело, 3, 160, 1965.
2. Арутюнян Р. А. О механизмах возникновения некоторых экспериментальных анемий. Автореф. докт. дисс. Ереван, 1966.
3. Арутюнян Р. А., Шехтер С. Ю. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 6, 23, 1964.
4. Кахетелидзе М. Г. Гемопоэтины в условиях нормы и патологии. Автореф. докт. дисс. М., 1965.
5. Моисеева О. И., Рощина Г. М. Пробл. гематол., 5, 52, 1967.
6. Цомая И. С. Тез. докл. 18 сессии Института перелив. крови Груз. ССР. Тбилиси, 50, 1966.
7. Шехтер С. Ю. Пат. физиол. и эксперим. терап. 2, 81, 1965.
8. Ярошевский А. Я. Эндогенные стимуляторы кроветворения (эритропоэтины): Л., 1963.
9. Bierman H. R. et al. Blood, 21, 164, 1963.
10. Cardinali G. et al. Blood, 18, 328, 1961.
11. Gordon A. S. Hemopoietine. Physiol. Rev., 39, 1, 1959.
12. Gordon A. S. et al. Acta Haemat., 23, 323, 1960.
13. Graddock Ch. G. et al. J. Lab. Clin. Med., 45, 881, 1955.
14. Komija E. Die Zentralnervose Regulation des blutbildes. Stuttgart, 1956.
15. Linman J. W., Bethell F. Factors Controlling Erythropoiesis. USA, 1960.