

**Abstract**

*Absettarova A. I., Kakura S. I.,  
Oleynikova O. K.,  
Pikaluk V. S.,  
Bessalova Ye. Yu. \*,  
Crimean State Medical  
University  
named after S. I. Georgievsky,  
5/7 Lenin Boulevard  
Simferopol, 95011, Ukraine*

**CEREBROSPINAL FLUID AS AN ENVIRONMENT WITH  
RADIOPROTECTIVE PROPERTIES**

Our aim is to analyze a xenogenic cerebrospinal fluid as radioprotective biological substrate. The article is devoted to revealing and studying of the morphological changes of the irradiated Wistar rats' bone marrow, blood, hypophysis and peripheral glands after parenteral injection of xenogenic cerebrospinal fluid in different periods of postnatal development (newborn, immature, mature). Lactating cows aged 4–6 years were taken as cerebrospinal fluid donors. We studied the effect of cerebrospinal fluid using certain anatomical and histological methods.

It was found out that cerebrospinal fluid preparation caused different inhibiting effects on destructive processes in cells of some organs; it is associated with the presence of broad spectrum of biological active substances in mammalian cerebrospinal fluid. The evident radioprotective effect was proved by the analyses of the destructive processes degree in red bone marrow cells of the rats exposed to total body radiation at 5 Gr and 3- and 10-times infusions of cerebrospinal fluid. Findings testify to activating of regenerator and strengthening processes of all sprouts of red marrow at the correction of consequences of irradiation by introduction of cerebrospinal fluid. However, the least degree of expression of these processes is noticed in the old age group: there is, probably, cerebrospinal fluid with the decline of activity of adaptation mechanisms. Morphofunctional indexes and age-dependent dynamics were revealed using white rats after xenogenic CSF parenteral injections at various ontogenetic periods.

Nowadays, cerebrospinal fluid is considered to be a morphological substrate at the homeostasis anatomophysiological component; it also participates in the intersystemic nervous and endocrine regulation. These facts allow us to formulate a new scientific conception of xenogenic cerebrospinal fluid morphophysiological regulatory effects. That provides their systemic cognition at leading intention to disclose liquor's regulatory physiological role at an organism. Considering none immunopathological response onto injection of cerebrospinal fluid and the complex assessment of its anatomophysiological effects, we set up challenging perspectives to develop a directional bioactive drug based on cow's cerebrospinal fluid. This drug can be applied in fields of medical and veterinary science, animal breeding and experimental morphology.

**Key words:** cerebrospinal fluid, radiation, bone marrow, nervous, endocrine, immune regulation.

**Corresponding author:** \* sha1936@rambler.ru

#### Резюме

Абсеттарова А. И.,  
Какура С. И.,  
Олейникова О. К.,  
Пикалюк В. С.,  
Бессалова Е. Ю. \*,  
Крымский государственный  
медицинский университет  
им. С. И. Георгиевского,  
бульвар Ленина, 5/7,  
Симферополь, 95011,  
Украина

### ЦЕРЕБРОСПИНАЛЬНАЯ ЖИДКОСТЬ КАК ГУМОРАЛЬНАЯ СРЕДА С РАДИОПРОТЕКТОРНЫМИ СВОЙСТВАМИ

Цереброспинальная жидкость как гуморальная среда мозга выполняет важную регуляторную функцию и является морфологическим субстратом, объединяющим нервную, эндокринную и иммунную системы. В статье описана морфология красного костного мозга, гипофиза и периферических желез белых крыс разных возрастных групп при лучевом поражении и его коррекции парентеральным введением ксеногенной цереброспинальной жидкости, полученной прижизненно методом субокципитальной пункции у коров. Анализ экспериментальных данных позволяет говорить о биостимулирующем, дезинтоксикационном, адаптогенном, противовоспалительном, мембраностабилизирующем эффектах цереброспинальной жидкости. Она благотворно влияет на нормальную дифференцировку гемопозитических клеток. Это позволяет рассматривать цереброспинальную жидкость в качестве мощного корригирующего средства. Полученные результаты являются составной частью экспериментального исследования по созданию биопрепарата на основе цереброспинальной жидкости крупного рогатого скота для применения в качестве радиопротектора при лучевом поражении.

**Ключевые слова:** цереброспинальная жидкость; облучение; костный мозг; нервная, эндокринная, иммунная регуляция.

#### Резюме

Абсеттарова А. И.,  
Какура С. И.,  
Олейникова О. К.,  
Пикалюк В. С.,  
Бессалова Е. Ю. \*,  
Кримський державний  
медичний університет  
ім. С. І. Георгієвського,  
бульвар Леніна, 5/7,  
Сімферополь, 95011, Україна

### ЦЕРЕБРОСПИНАЛЬНА РІДИНА ЯК ГУМОРАЛЬНЕ СЕРЕДОВИЩЕ, ЩО МАЄ РАДІОПРОТЕКТОРНІ ВЛАСТИВОСТІ

Цереброспінальна рідина як гуморальне середовище головного мозку виконує важливу регуляторну функцію і є морфологічним субстратом, що об'єднує нервову, ендокринну та імунну системи. У статті описана морфологія червоного кісткового мозку, гіпофіза і периферичних залоз білих щурів різних вікових груп при променевому ураженні та його корекції парентеральним введенням ксеногенної цереброспінальної рідини, отриманої прижиттєво методом субокципітальної пункції у корів. Аналіз експериментальних даних виявив біостимулювальний, дезинтоксикаційний, адаптогенний, протизапальний, мембраностабілізувальний ефекти цереброспінальної рідини. Це дозволяє розглядати цереброспінальну рідину як потужний коригувальний засіб. Отримані результати є складовою частиною експериментального дослідження зі створення біопрепарату на основі цереброспінальної рідини великої рогатої худоби для застосування як радіопротектора при променевому ураженні.

**Ключові слова:** цереброспінальна рідина; опромінення; кістковий мозок; нервова, ендокринна, імунна регуляція.

Автор, відповідальний за кореспонденцію: \* sha1936@rambler.ru

## **Введение**

Цереброспинальная жидкость (ЦСЖ) как одна из гуморальных сред организма выполняет важную регуляторную функцию и является морфологическим субстратом, объединяющим нервную, эндокринную и иммунную системы [1]. Как непосредственная среда головного и спинного мозга ЦСЖ является носителем гуморальных факторов высших регуляторных нейроиммуноэндокринных центров (в пределах ЦНС регуляторные системы структурно и функционально практически неразделимы) [2]. В экспериментальных работах установлено, что ЦСЖ не обладает видовой иммуноспецифичностью, и ее парентеральное введение в качестве ксеногенного биопрепарата не вызывает анафилактических реакций [3]. В связи с разнообразием биологических эффектов ЦСЖ, предложена перспектива использования ее в качестве основы для разработки биологических препаратов широкого спектра действия. Профессор Ткач В. В. впервые экспериментально подтвердил выраженный радиопротекторный эффект ксеногенной ЦСЖ [1]. Биологические эффекты парентерального введения ЦСЖ обусловлены наличием в ней широкого спектра гормонов, метаболитов различного происхождения, в том числе иммунотропных биологически активных веществ, а также клеточных элементов [4]. Среди внешних факторов, вызывающих нарушение регуляторных процессов, кроветворения, особое значение имеет общее и местное лучевое поражение, в том числе, проводимое с целью диагностики и терапии, вызывая структурные изменения и гипофункцию органов, дефект общего и местного иммунитета, рост частоты инфекционных заболеваний [5]. В нашей работе детально изучена морфология красного костного мозга как наиболее чувствительного элемента организма, а также приведены некоторые данные исследований центральных и периферических эндокринных желез при лучевом поражении и его коррекции парентеральным введением ксеногенной ЦСЖ.

## **Материалы и методы**

ЦСЖ получали прижизненно методом субокципитальной пункции у коров по методу В. В. Ткача [1] и сохраняли в жидком азоте. Эксперимент проведен на 144 белых крысах линии Wistar обоих полов 4 групп:

новорожденные, неполовозрелые, молодые половозрелые и особи предстарческого возраста, их подвергали тотальному однократному гамма-облучению в дозе 5 Гр на установке «Тератрон». В каждой возрастной группе после облучения 3-кратно или 10-кратно с интервалом в 2 дня вводили ЦСЖ, забор материала производили на 7-е, 14-е, 21-е и 30-е сутки. Мазки и отпечатки костного мозга, полученного из бедренных костей, окрашивали по Романовскому-Гимза, на каждом стекле подсчитывали 500 клеточных элементов, определяли количество клеток каждого вида и пересчитывали в процентное соотношение. Для анализа крови ее забирали в видалевскую пробирку с 5 % цитратом натрия, разводя на четверть. Подсчет эритроцитов проводили в камере Горяева в 5 больших квадратах, к полученному числу прибавляли  $\frac{1}{4}$ . Для подсчета лейкоцитарной формулы готовили серию мазков на стеклах и после высушивания фиксировали в этиловом спирте 10 минут, затем окрашивали по Романовскому-Гимза, подсчитывали процентное соотношение лейкоцитов. Исследование паренхиматозных органов проводили при помощи стандартных морфологических методов – органометрия, заключение в парафин, смолы, изготовление срезов и окрашивание обзорными методиками [6]. Ультратонкие срезы получали на ультрамикротоме ULTRACUT, контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца. Срезы изучали и фотографировали на трансмиссионном электронном микроскопе ПЭМ-125. При анализе количественных показателей результаты сводили в структурированную базу данных, рассчитывали среднюю арифметическую для группы, ошибку средней, среднеквадратическое отклонение, коэффициент вариации, отклонение величины в опыте от величины в контроле (%). Статистическая обработка проведена с помощью лицензионных программ «MS Office-Excel» согласно рекомендациям производителей программного обеспечения. При использовании метода вариационной статистики для оценки значимости отличий цифровых данных использовали t-критерий Стьюдента. Достоверными считали результаты при значении  $p \leq 0,05$ . Перед использованием параметрического критерия проверяли распределение на нормальность. При работе с

животными придерживались биоэтических норм и правил в соответствии с положением «Общих этических принципов экспериментов на животных» (Киев, 2001), требованиями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986) и принципами Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным.

#### Результаты и их обсуждение

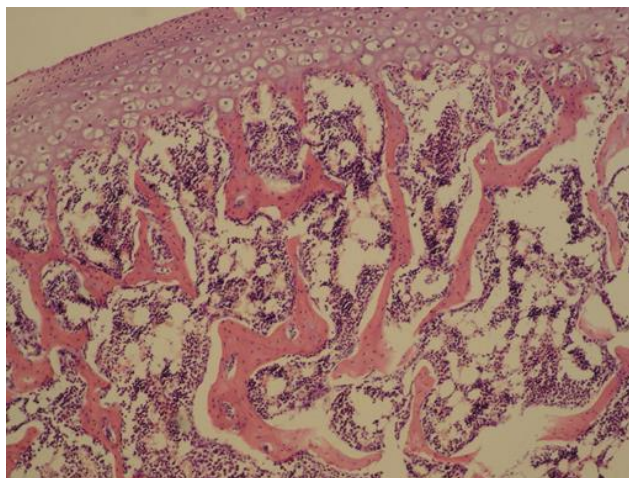
При исследовании морфофункциональных показателей гипоплазированного костного мозга крыс в возрастном аспекте при коррекции ЦСЖ установили ряд закономерностей. Наиболее тяжелые последствия облучения выявлены в группе новорожденных животных, что проявлялось угнетением гемоцитопоэза с исчезновением клеток-предшественниц и созревающих форм в различные сроки в зависимости от вида дифферона. Применение ЦСЖ позволило снизить смертность в данной возрастной группе в 3,33 раза – с 70 % у контрольных до 21 % у подопытных животных. Восстановление красного костного мозга при введении ЦСЖ проходило интенсивнее и в более ранние сроки. Так, площадь, занимаемая красным костным мозгом у ювенильных животных, превышала к 30-м суткам контрольные показатели (у особей без коррекции) в проксимальном и дистальном эпифизах в 1,34 и 1,27 раза, диафизе – в 1,19 раза; у половозрелых крыс – в 2,03; 1,67; 2,17 раза соответственно (рис. 1).

У половозрелых животных к 30-м суткам эксперимента введение ЦСЖ повышало адаптационные возможности костного мозга

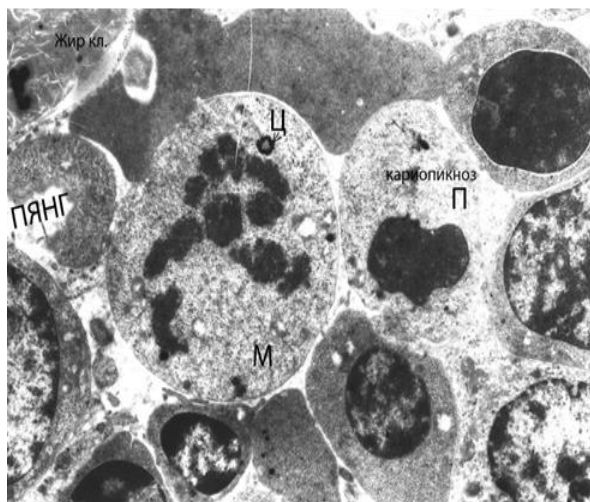
после облучения. Увеличилась относительная площадь ретикулярной стромы в проксимальном эпифизе, диафизе и дистальном эпифизе на  $(19,17 \pm 0,66)$ ;  $(16,33 \pm 1,08)$  и  $(9,33 \pm 0,88)$  % соответственно. Во всех возрастных группах к 7-м суткам эксперимента после введения облученным животным ЦСЖ снижалась интенсивность деструктивных процессов, проявляющихся вакуолизацией ядер, разрушением эндоплазматического ретикула, распадом глыбок хроматина и другими признаками некробиоза.

Деструкция клеток костного мозга после облучения проявлялась внутриклеточным отеком с расширением цистерн эндоплазматического ретикула и деструкцией митохондрий (рис. 2). Палочкоядерные и сегментоядерные гранулоциты характеризовались дезориентацией и дискомплексацией внутренних мембран митохондрий и относительным снижением количества вторичных гранул на фоне сохранения нормальной структуры и электронной плотности ядра и расширением перинуклеарного пространства. В IV возрастной группе обнаруживались очаговые скопления клеточных обломков и апоптотические тельца.

Весьма важным является повышение активности фибробластов со скоплением в межклеточном веществе хаотично расположенных пучков коллагеновых фибрилл. Ядра фибробластов имели неправильную овальную форму со множеством инвагинаций и скоплением хроматина в виде отдельных глыбок вблизи кариолеммы (рис. 3).



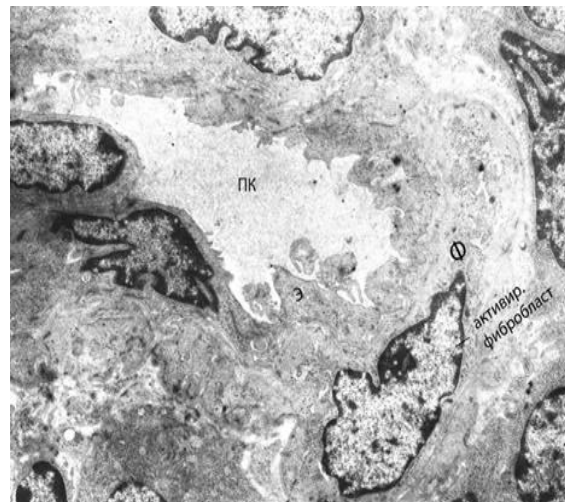
**Рис. 1.** Фрагмент проксимального эпифиза бедренной кости крысы II группы после облучения и введения КЦСЖ на 30-е сутки. Между утолщенными трабекулами костной ткани группами располагаются адипоциты и миелоидная ткань. Окраска гематоксилином и еозином. Ув. 150



**Рис. 2.** Изменения ядерной структуры клеток. IV возрастная группа, 30-е сутки эксперимента. М – митоз; Ц – центриоль; П – кариопикноз; ПНГ – палочкоядерный нейтрофильный гранулоцит. ТЭМ. Ув. 3200

При введении облученным крысам КЦСЖ отмечалось преобладание компенсаторно-приспособительных процессов над дистрофическими изменениями. Однако часть клеток все же имела признаки деструктивных процессов. К таким клеткам относились, прежде всего, наиболее радиочувствительные – лимфоциты различных генераций. Макрофаги в составе эритроидных ростков имели более округлую форму, чем в контрольных наблюдениях. Микроворсинки на их поверхности были мелкими и многочисленными. Ядра таких клеток характеризовались неправильной формой с конденсацией хроматина около кариолеммы, цитоплазма содержала большое количество органелл, лизосом и вторичных фагосом, а также большое количество мелких электронноплотных гранул. Цистерны цитоплазматического ретикулама выглядели расширенными, часть митохондрий имела округлую форму с разнонаправленными кристами и частичной фрагментацией внутренних мембран. Такие изменения свидетельствовали о высокой функциональной активности клеток.

Единичные проэритробласты содержали округлой формы крупное ядро с конденсированным по краю кариоплазмы хроматином и 2–3 ядрышками. Базофильные эритробласты экспериментальной группы имели округлое ядро со слабовыраженными



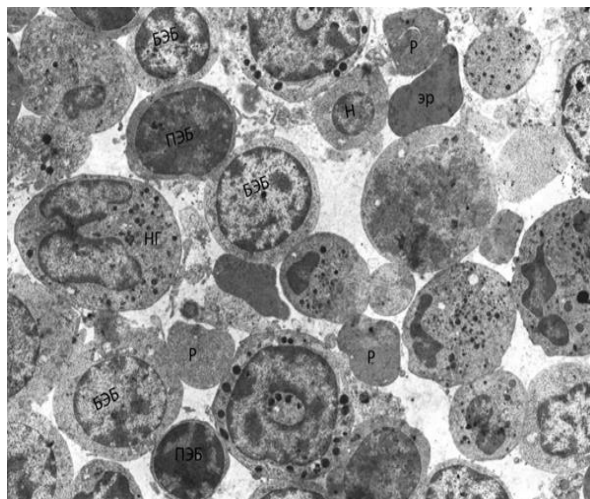
**Рис. 3.** Активированный фибробласт (Ф), располагающийся возле кровеносного капилляра. IV возрастная группа, 30-е сутки эксперимента. ПК – просвет капилляра; Э – эндотелиальные клетки. ТЭМ. Ув. 2800

инвагинациями, равномерно распределенным мелкодисперсным хроматином (рис. 4).

Цитоплазма этих клеток содержала многочисленные полисомы и митохондрии округлой и/или овальной формы. В ряде наблюдений обнаруживались фигуры митоза (рис. 5). Однако часть клеток сохраняла тенденцию к дегенеративным изменениям, что сопровождалось расширением перинуклеарного пространства и деструкцией крист митохондрий.

К 30-м суткам эксперимента после коррекции ЦСЖ в миелограмме ювенильных животных цитоз гранулоцитарного ряда превышал показатель контрольной серии в 4,93 раза; бластная составляющая при этом оказалась выше в 2,5 раза. Морфологическая картина крови коррелировала с данными миелограммы, что отражало состоятельность гематомедулярного барьера. Ведущим фактором в репопуляции костного мозга после облучения и последующего введения ЦСЖ являлся возраст реципиентов. Наибольший позитивный эффект наблюдался у ювенильных и половозрелых животных. Основными векторами влияния ЦСЖ на восстановление гипоплазированного костного мозга являлись ее стимулирующее действие на пролиферацию бластных клеток, полноценное дифференцирование созревающих клеток и воздействие на микроокружение очагов гемоцитопоза – желтый костный мозг и ретикулярную строму.

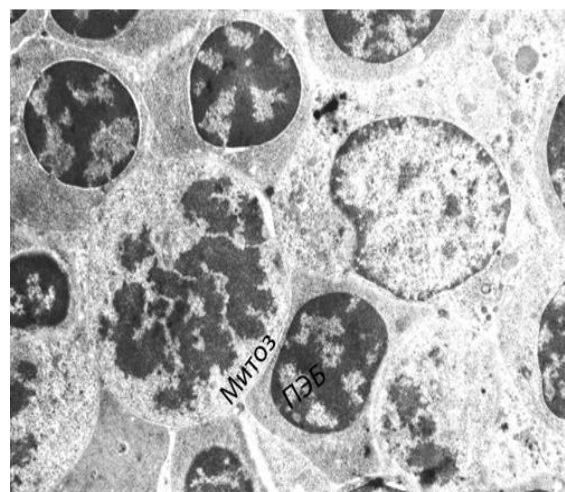




**Рис. 4.** Скопление клеток эритроидного и миелоидного ростков. БЭБ – базофильный эритробласт, ПЭБ – полихроматофильный эритробласт, Н – нормоциты, Р – ретикулоциты, Эр – эритроциты. III возрастная группа, 30-е сутки эксперимента. ТЭМ. Ув. 2600

Полученные эффекты позволяют рассматривать ЦСЖ в качестве мощного корректирующего средства.

Изменения выявлены и в периферической крови. Во всех возрастных группах введение ЦСЖ стимулировало дифференцировку ретикулоцитов и тромбоцитов к 30-м суткам наблюдения. Несмотря на признаки медленного восстановления гранулоцитарного ростка к 30-м суткам у облученных животных, темпы восстановления числа нейтрофильных гранулоцитов оказались выше после введения ЦСЖ. Количество сегментоядерных лейкоцитов в опытной группе превышало значение контроля на 16,46 %, однако подъем кривой гранулоцитов отражает лишь относительное (%) преобладание сегментоядерных клеток в лейкоцитарной формуле в основном за счет небольшого числа лимфоцитов и моноцитов. Несмотря на то, что при облучении количество эритроцитов как зрелых клеток относительно долгое время не уменьшается, в крови облученных животных и еще в большей степени после коррекции ЦСЖ отмечали ретикулоцитоз, что предвосхищало последующую потерю эритроцитов. Общей тенденцией эффектов ЦСЖ явилась поэтапная стимуляция эритроцитарного, тромбоцитарного, гранулоцитарного и лимфоцитарного ростков. Сравнение относительного количества клеток белой крови в лейкоцитарной формуле позволяет предположить конкурирующий тип



**Рис. 5.** Проэритробласт в процессе деления (Митоз), окруженный полихроматофильными эритроблантами (ПЭБ). I возрастная группа, 30 сутки эксперимента. ТЭМ. Ув. 4000

активации и восстановления ростков гемоцитопоэза. Стоит отметить появление уродливых клеток измененной формы в большом количестве на 7-е, 14-е, 21-е, 30-е сутки, при этом количество таковых в опытной группе после коррекции ЦСЖ было значительно меньшим.

После проведения основных исследований и получения положительного эффекта от введения ЦСЖ в качестве радиопротектора эксперимент повторили на самцах половозрелых белых крыс в возрасте расцвета репродуктивной функции и исследовали центральные и периферические органы при моделировании острой лучевой болезни (однократное гамма-облучение в дозе 5 Гр) и введении ЦСЖ. ЦСЖ вводили внутримышечно из расчета дозы 2 мл/кг, используя многократную схему введения (через 1 день), и в дозе 10 мл/кг, вводя ее однократно в первые сутки после облучения. Крыс выводили из эксперимента сериями, по 6 особей в каждой, на 3-е, 7-е, 14-е и 30-е сутки после начала опыта. В течение первых двух недель после облучения масса околоушных слюнных желез превысила контрольные показатели до 20 % (при  $p \leq 5\%$ ). Схожие данные выявлены при исследовании ряда других паренхиматозных органов, являющихся важнейшими звеньями нейроэндокринной регуляции – гипофиз, надпочечники, гонады. Данные изменения, по-видимому, обусловлены острым отеком, деструкцией с последующим развитием

репаративных процессов. При введении ЦСЖ в любой схеме таких значительных изменений на органном уровне выявлено не было, ЦСЖ вызывала компенсацию поражения, корректировала массу желез, что, вероятно, связано с ее комплексным каскадным действием на всех уровнях работы нейроиммунно-эндокринной системы [7]. Особо стоит отметить эффект ЦСЖ на переднюю долю аденогипофиза облученных животных как центрального звена регуляции функций. Выявлено относительное увеличение ее площади на максимальном срезе, признаки специфической стимуляции – повышение функциональной активности аденотропоцитов основных групп, проявляющееся вакуолизацией цитоплазмы, активацией секреторных и энергетических процессов в клетке, выявленное на ультраструктурном уровне организации, снижение интенсивности проявления деструктивных последствий облучения. Аналогичные признаки стимуляции выявлены при исследовании промежуточной доли в условиях введения ЦСЖ. ЦСЖ как среда мозга при парентеральном введении включается в регуляторные цепи реципиента за счет того, что она вводится за пределы гематоэнцефалического барьера, ее эффекты достаточно значительны, что было установлено ранее на необлученных животных при изучении органов регуляторных систем [8].

#### Выводы

Суммирование выявленных морфофункциональных изменений гипоплазированного костного мозга и ряда паренхиматозных органов после облучения и его коррекции с помощью ЦСЖ позволяет говорить о ее биостимулирующем, мембраностабилизирующем эффектах. Кроме того, очевидно ее стимулирующее действие на гемоцитопоз, осуществляемое, как минимум, двумя механизмами: посредством воздействия на ретикулярную строму костного мозга, являющуюся микроокружением для стволовых гемопоэтических клеток, и путем активации пролиферации стволовых и полустволовых клеток (клеток-предшественниц) согласно кинетике их конкурирующего развития. Важно отметить, что ЦСЖ также благотворно влияет на нормальную дифференцировку гемопоэтических клеток. Таким образом, эффекты влияния КЦСЖ на гипоплазированный

костный мозг позволяют рассматривать ее в качестве мощного корректирующего средства. Полученные результаты морфофункциональных изменений облученного костного мозга после введения ЦСЖ являются составной частью экспериментального исследования по созданию биопрепарата на ее основе для применения в качестве радиопротектора при лучевом поражении различного генеза.

#### References (список литературы)

1. Tkach VV, Kubishkin AV, Tkach VV Jr. [Estimation of biological activity level in cattle cerebrospinal fluid on different pharmaceutical tests]. *Tavrisheski medikobiologicheski vestnik*. 2002;5(3):154–155.
2. Paltsev MA, Kvetnoi IM. *Rukovodstvo po neuroimmunoendokrinologii* [Guidance on neuroimmunoendocrinology]. 2nd ed. Moscow: Medicine Publ., 2008. 512 p.
3. Bessalova YeYu, Barsukov NP, Ivahnenko VN. [Changes of dehydrogenase activity in organs of the reproductive system of female pigs at xenogenic cerebrospinal fluid parenterally injection (cytochemical research)]. *Morphology*. 2006;129(1):80–84.
4. Bessalova YeYu, Korolov VA. [Indexes of estral cycles of white rats in a norm and at parenteral introduction of xenogenic cerebrospinal fluid]. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2007;144(8):213–215.
5. Blanco AI, Chao KS, El Naqa I, Franklin GE, Zakarian K, Vivic M, Deasy JO. *Dose-volume modeling of salivary function in patients with head-and-neck cancer receiving radiotherapy*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2005;62(4):1055–69.
6. Merkulov GA. *Kurs patogistologicheskoi tekhniki* [Course of pathohistological technique]. 5th ed. Saint Petersburg: Medicine Publ., 1969. 423 p.
7. Bessalova YeYu. *Behavioral activity and anxiety of rats under open field conditions in the norm and after parenteral introductions of xenogenic cerebrospinal fluid*. *Neurophysiology*. 2012;43(5):369–376.

(received 22.07.2014, published online 15.10.2014)

(получено 22.07.2014, опубликовано 15.10.2014)

