

УДК [57.084.1+616-08-039.71]:612.11
DOI <https://doi.org/10.35220/2523-420X/2024.4.9>

С.А. Шнайдер,

доктор медичних наук, професор,
Державна установа «Інститут стоматології
та щелепно-лицевої хірургії Національної академії
медичних наук України»,
вул. Рішельєвська, 11, м. Одеса, Україна, індекс 65026

К.І. Ковешніков,

аспірант,
Державна установа «Інститут стоматології
та щелепно-лицевої хірургії Національної академії
медичних наук України»,
вул. Рішельєвська, 11, м. Одеса, Україна, індекс 65026

К.А. Семенов,

кандидат медичних наук, доцент,
асистент кафедри терапевтичної стоматології ФПО,
Дніпровський державний медичний університет МОЗ
України,
пл. Визволення 5, м. Кривий Ріг, Україна, індекс 50099,
k.75semenov@gmail.com

Д.К. Семенов,

асистент, кафедри анатомії, гістології
і патоморфології тварин,
Дніпровський аграрний економічний університет,
вул. Сергія Єфремова, 25, м. Дніпро, Україна,
індекс 49000

Ж.О. Новікова,

кандидат медичних наук, доцент,
Одеський національний медичний університет,
Валіховський провулок, 2, м. Одеса, Україна,
індекс 65082

АНАЛІЗ ЛЕЙКОЦИТАРНОЇ ФОРМУЛИ КРОВІ ЩУРІВ НА ТЛІ МОДЕЛЮВАННЯ СТРЕСУ ТА ЛІКУВАЛЬНО- ПРОФІЛАКТИЧНИХ ЗАХОДІВ

Хронічний стрес залишається однією з найактуальніших проблем у сучасній біології та медицині через його здатність негативно впливати на імунну й ендокринну системи, зокрема зумовлювати зміни у лейкоцитарній формулі крові й призводити до імуносупресії та запальних реакцій. У зв'язку з цим розроблення й впровадження ефективних лікувально-профілактичних комплексів набуває особливого значення для корекції стрес-індукованих порушень. **Метою дослідження було** визначення впливу лікувального комплексу препаратів на лейкоцитарну формулу крові щурів за умови пролонгованої дії звукового стресу. **Матеріали та методи.** У дослідженні використано 27 білих щурів-самців лінії Wistar (2-місячного віку), розподілених на три групи (по 9 тварин у кожній): інтактну (1-ша група), із моделлю звукового стресу (2-га група) та

із моделлю звукового стресу й додатковим застосуванням лікувально-профілактичного комплексу (3-тя група). Тривалість експерименту становила 49 діб. Стрес моделювали за допомогою ультразвукового відлякувача (30–65 кГц), щоденно по 6 годин, з комбінованим додаванням звуку чутного діапазону. Тварини 3-ї групи отримували лікувально-профілактичні препарати перорально. У крові хвостової вени тварин визначали кількість лейкоцитів та відсотковий вміст різних форм (нейтрофіли, лімфоцити, моноцити, еозинофіли). Статистичний аналіз результатів проводили за допомогою t-критерію Стьюдента ($p < 0,01$). **Результати дослідження.** У групі тварин із хронічним звуковим стресом встановлено суттєве збільшення кількості паличкоядерних (на 45,2 %) та сегментоядерних (на 34,5 %) нейтрофілів, зі зменшенням вмісту лімфоцитів на 19,2 % та еозинофілів на 44,3 % порівняно з інтактними щурами. Застосування лікувально-профілактичного комплексу сприяло нормалізації лейкоцитарної формули, наближаючи показники до рівня інтактних тварин. **Висновки.** Отримані дані свідчать про значну стресову дію комбінованого звуку (ультразвукового та чутного діапазону) на імунну систему щурів і доводять ефективність використання лікувально-профілактичного комплексу для корекції стрес-індукованих змін у лейкоцитарному складі крові. Це відкриває перспективи для розроблення сучасних стратегій запобігання й лікування хронічного стресу та його негативних наслідків.

Ключові слова: хронічний стрес, лейкоцитарна формула, імуносупресія, лікувально-профілактичний комплекс, щури.

S.A. Shneider,

Doctor of Medical Sciences, Professor,
State Establishment "The Institute of Stomatology
and Maxillo-facial Surgery National Academy of Medical
Sciences of Ukraine",
11 Rishelievskaya street, Odesa, Ukraine, postal code 65026

K.I. Koveshnikov,

Post-graduate Student,
State Establishment "The Institute of Stomatology
and Maxillo-facial Surgery National Academy of Medical
Sciences of Ukraine",
11 Rishelievskaya street, Odesa, Ukraine, postal code 65026

K.A. Semenov,

candidate of Medical Sciences, Associate Professor,
Assistant of the Department of therapeutic Dentistry of FPE,
Dnipro State Medical University of the Ministry of health
of Ukraine,
9 Vernadskogo street, Dnipro, Ukraine, postal code 49044

D.K. Semenov,

assistant, at the Department of Anatomy, Histology
and Pathomorphology of Fimals Dnipro State Agrarian
And Economic University,
25 Serhiy Yefremov street, Dnipro, Ukraine, postal code
49000

Zh.O. Novikova,

Candidate of Medical Sciences, Associate Professor,
Odesa National Medical University,
2 Valikhovskiy lane, Odesa, Ukraine, postal code 65082

ANALYSIS OF LEUKOCYTE BLOOD FORMULA IN RATS UNDER STRESS MODELING AND THERAPEUTIC AND PREVENTIVE MEASURES

Chronic stress remains one of the most pressing issues in modern biology and medicine due to its capacity to negatively affect both the immune and endocrine systems, particularly by inducing changes in the blood leukocyte formula and leading to immunosuppression and inflammatory responses. Consequently, the development and implementation of effective therapeutic and prophylactic complexes are of paramount importance for correcting stress-induced disorders. Aim of the study. To determine the effect of a therapeutic drug complex on the blood leukocyte formula in rats subjected to prolonged acoustic stress. Materials and methods. The study included 27 male Wistar rats (2 months old), divided into three groups (9 animals in each): an intact group (Group 1), a group exposed to acoustic stress (Group 2), and a group with acoustic stress plus additional administration of a therapeutic-prophylactic complex (Group 3). The experiment lasted for 49 days. Stress was modeled using an ultrasonic repeller (30–65 kHz), operated 6 hours daily, with the combined addition of sound in the audible range. Animals in Group 3 received the therapeutic-prophylactic agents orally. Blood was collected from the tail vein to determine total leukocyte counts and the percentage of various leukocyte subtypes (neutrophils, lymphocytes, monocytes, eosinophils). Statistical analysis was performed using Student's t-test ($p < 0.01$). Results. In the chronic acoustic stress group, there was a notable increase in band neutrophils (by 45.2 %) and segmented neutrophils (by 34.5 %), accompanied by a reduction in lymphocyte levels by 19.2% and eosinophil levels by 44.3%, compared to intact rats. Administration of the therapeutic-prophylactic complex helped normalize the leukocyte formula, bringing it closer to the parameters observed in intact animals. Conclusions. The findings indicate a significant stress effect of combined sound exposure (ultrasonic plus audible range) on the immune system in rats and confirm the efficacy of the therapeutic-prophylactic complex in correcting stress-induced alterations in blood leukocyte composition. These results provide a promising basis for the development of modern strategies for the prevention and treatment of chronic stress and its adverse consequences.

Key words: chronic stress, leukocyte formula, immunosuppression, therapeutic-prophylactic complex, rats.

Хронічний стрес є одним із ключових чинників, що зумовлюють розвиток дисбалансу в імунній та ендокринній системах, спричиняють зміни у складі лейкоцитів крові та в органних індексах імунокомпетентних органів [1]. За даними

дослідників, тривала дія несприятливих факторів зовнішнього середовища супроводжується порушенням імунної толерантності, збільшенням синтезу специфічних антитіл, а також структурно-функціональними змінами у лімфоїдних органах [2]. Водночас доведено, що хронічний стрес може не лише опосередковано впливати на імунну відповідь, а й запускати низку запальних реакцій у різних тканинах, зокрема у травному тракті [3].

Проте, попри значні напрацювання в експериментальних дослідженнях, наявні дані свідчать про неоднозначність і неповну вивченість впливу хронічного стресу на якісно-кількісні характеристики лейкоцитів крові та можливості фармакологічної корекції цих змін. Зокрема, залишається недостатньо з'ясованим, яким чином комплекс лікувально-профілактичних засобів може впливати на регуляцію імунного статусу за умов пролонгованого звукового стресу. Виходячи з цього, дослідження впливу лікувального комплексу препаратів на лейкоцитарну формулу крові у тварин за тривалого звукового стресу має важливе значення для розробки ефективних методів профілактики та лікування стрес-індукованих імунних порушень.

Мета даного дослідження. Оцінка впливу лікувального комплексу препаратів на лейкоцитарну формулу крові щурів на тлі моделювання стресу.

Матеріал та методи дослідження. Були проведені експериментальні дослідження, в процесі яких було використано 27 щурів-самців лінії Wistar стадного розведення, 2-х місячного віку. Тварин утримували у звичайних умовах віварію при природному освітленні та з вільним доступом до води та їжі. На протязі всього періоду проведення експерименту були дотримані чітко мікрокліматичні умови навколишнього середовища віварію: температура – (19–23°C) та вологість – (50–75 %). Експериментальні дослідження проводили в лабораторії біохімії та віварію ДУ «Інститут стоматології та щелепно-лицьової хірургії Національної академії медичних наук України» (ДУ «ІСЦЛХ НАМН»). Усі експерименти на щурах проводилися за затвердженими в ДУ «ІСЦЛХ НАМН» стандартними операційними процедурами, розробленими відповідно до Методичних вказівок Фармакологічного Комітету МОЗ України та Міжнародних правил роботи з лабораторними тваринами [4, 5].

Тварин розподілили на три групи, по 9 тварин в кожній:

- 1 – інтактна (стандартний раціон віварію), $n=9$;
- 2 – модель звукового стресу, $n=9$;

3 – модель звукового стресу + комплекс препаратів, n=9.

Тривалість моделювання патології склала два місяці.

Для моделювання стресу використовували ультразвуковий відлякувач шкідників LS-912 (виробник «Leaven Enterprise», Тайвань), якій діє у чутному та ультразвуковому діапазонах і має частоту від 30 до 65 кГц, звуковий тиск 130 дБ, потужність 1,5 Вт на площі до 232 м². За рекомендацією виробника пристрій є ефективний для знищення диких щурів, мишей та комах.

Звуковий стрес ультразвуком у щурів 2 і 3 груп здійснювали 5 днів, за виключенням вихідних, по 6 годин на день за схемою: 2 дні – використовували ультразвук з частотою 30 кГц, наступні 2 дні – 40 кГц, наступні 2 дні – 50 кГц, наступні 2 дні – 60 кГц. Далі схему повторювали. Кожного дня до ультразвуку додавали чутний звук по 1 годині за допомогою фіксації кнопки контролю звуку на відлякувачі. Пристрій встановлювали на одному рівні з клітинами зі тваринами на відстані 3 м від них.

Профілактику препаратами 3-їй групі щурів проводили кожен день зранку шляхом перорального введення комплексу.

Тривалість експерименту склала 49 днів. Перед евтаназією, яку здійснювали під тіопенталовим наркозом (40 мг/кг), тварин позбавляли корму проти ночі, залишаючи вільний доступ до води. Збирали кров з хвостової вени, у якій здійснювали підрахунок кількості лейкоцитів у камері Горяєва у мазку крові, що фарбували за методом Романовського. У 4 крайових ділянках фіксованого мазка визначали різні типи лейкоцитів для лейкоцитарної формули: у 100 лейкоцитах визначали відсотковий склад паличкоядерних і сегментоядерних нейтрофілів, моноцитів, лімфоцитів, еозинофілів [6].

При статистичній обробці отриманих результатів використовувалася комп'ютерна програма STATISTICA 6.1. для оцінки їхньої достовірності та похибок вимірювань. Статистично значущу відмінність між альтернативними кількісними ознаками з розподілом, відповідним нормальному закону, оцінювали за допомогою t-критерію Стьюдента. Різницю вважали статистично значущою при $p < 0,01$ [7].

Результати та їх обговорення. Склад лейкоцитів крові є індикатором багатьох патологічних станів, у тому числі і реакції на вплив стресових факторів. Тому метою дослідження було визначення лейкоцитарної формули крові щурів, яких піддавали тривалому звуковому стресу та призначали профілактичні препарати (табл.).

Тривалий вплив ультразвуку змінної частоти у комбінації зі звуком чутного діапазону викликав у периферичній крові щурів 2-ої групи нейтрофільний лейкоцитоз, а саме – збільшення кількості паличкоядерних нейтрофілів на 45,2 %, а сегментоядерних – на 34,5 %. Крім того, тривалий стрес призвів до лімфопенії – зменшення кількості лімфоцитів на 19,2 %, та еозинопенія – зниження частки еозинофілів на 44,3 %. Встановлені еозинопенія, нейтрофільний лейкоцитоз, лімфопенія в крові тварин 2-ої групи вказують на розвиток у них стресової імуносупресії та запальних реакцій, що узгоджується зі зменшенням органного індексу тимусу і селезінки.

Введення профілактичного комплексу тваринам 3-ої групи попереджувало зрушення лейкоцитарної формули крові, що були викликані тривалою дією звукового стресу. Відсоткова частка паличкоядерних, сегментоядерних нейтрофілів, лімфоцитів та еозинофілів у периферичній крові щурів 3-ої групи нормалізувалась до рівня значень у інтактній групі.

Таблиця

Лейкоцитарна формула крові щурів при хронічному стресі та після його профілактики, % (M±m)

Показники Групи щурів	Нейтрофіли		Моноцити	Лімфоцити	Еозинофіли
	Паличкоядерні	Сегментоядерні			
Інтактна група, n=9	3,67±0,11	30,66±1,80	5,00±0,21	59,0±3,62	1,67±0,11
Хронічний стрес, n=9	5,33±0,44 p<0,001	41,24±2,61 p<0,001	4,83±0,31 p>0,1	47,67±2,77 p<0,01	0,93±0,07 p<0,001
Хронічний стрес+ЛПК, n=9	3,48±0,22 p>0,1 p ₁ <0,001	28,54±2,05 p>0,1 p ₁ <0,001	4,33±0,52 p>0,05 p ₁ >0,1	62,09±4,83 p>0,1 p ₁ <0,001	1,56±0,09 p>0,1 p ₁ <0,001

Примітка: p – достовірність відмінностей від показників в інтактній групі; p₁ – достовірність відмінностей від показників у групі «хронічний стрес».

Висновки. 1. У щурів, яким моделювали пролонгований звуковий стрес із частотою 30–60 кГц протягом двох місяців, відзначено помітне зростання паличкоядерних нейтрофілів на 45,2% та сегментоядерних – на 34,5% у порівнянні з інтактними тваринами, що супроводжувалося зниженням вмісту лімфоцитів на 19,2% та еозинофілів на 44,3%. Ці зрушення в лейкоцитарній формулі крові свідчать про виражену стресову дію комбінованого звуку (ультразвук + чутний діапазон).

2. Пероральне застосування лікувально-профілактичного комплексу під час моделювання хронічного стресу сприяло нормалізації відсоткового співвідношення лейкоцитів у периферичній крові, зокрема зменшення частки нейтрофілів до показників інтактних тварин та збільшення лімфоцитів і еозинофілів. Це свідчить про здатність досліджуваних препаратів значною мірою коригувати стрес-індуковані зрушення в імунній системі.

3. Отримані результати підтверджують доцільність і ефективність використання лікувально-профілактичного комплексу для корекції імунних порушень, викликаних тривалою дією звукового стресу. Застосування цих препаратів може стати підґрунтям для подальшої розробки сучасних стратегій профілактики й лікування хронічного стресу та його наслідків.

Література:

1. Divyashree S., Sarjan H., Yajurvedi H. Effects of long-term chronic stress on the lymphoid organs and blood leukocytes of the rat (*Rattus norvegicus*). *Can J Zool.* 2016. № 94. P. 137-43. doi: 10.1139/CJZ-2015-0150.
2. Cuervo P., Beldomenico P., Sánchez A., Pietrobon E., Valdez S., Racca A. Chronic exposure to environmental stressors enhances production of natural and specific antibodies in rats. *J Exp Zool A Ecol Integr Physiol.* 2018. № 329. P. 536-46. doi: 10.1002/jez.2218.
3. Wei L., Li Y., Tang W., Sun Q., Chen L., Wang X., Liu Q., Yu S., Yu S., Liu C., Ma X. Chronic unpredictable mild stress in rats induces colonic inflammation. *Front Physiol.* 2019. № 10. P. 1228. doi: 10.3389/fphys.2019.01228.
4. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. – Strasburg. Council of Europe, 1986. № 123. P. 51.
5. Наказ України «Про затвердження Порядку проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах». Міністерство освіти і науки України. 2012. № 249.

6. Експериментальні методи дослідження стимуляторів остеогенезу / А.П. Левицький та ін. : методичні рекомендації. Київ : ГФЦ, 2005. 50 с.

7. Рогач І. М., Керецман А. О., Сіткар А. Д. Правильно вибраний метод статистичного аналізу – шлях до якісної інтерпретації даних медичних досліджень. *Науковий вісник Ужгородського університету.* 2017. Вип. 2. С. 124-28.

References:

1. Divyashree, S., Sarjan, H., & Yajurvedi, H. (2016). Effects of long-term chronic stress on the lymphoid organs and blood leukocytes of the rat (*Rattus norvegicus*). *Canadian Journal of Zoology*, 94, 137-143. doi: 10.1139/CJZ-2015-0150.
2. Cuervo, P., Beldomenico, P., Sánchez, A., Pietrobon, E., Valdez, S., & Racca, A. (2018). Chronic exposure to environmental stressors enhances production of natural and specific antibodies in rats. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology*, 329, 536-546. doi: 10.1002/jez.2218.
3. Wei, L., Li, Y., Tang, W., Sun, Q., Chen, L., Wang, X., Liu, Q., Yu, S., Yu, S., Liu, C., & Ma, X. (2019). Chronic unpredictable mild stress in rats induces colonic inflammation. *Frontiers in Physiology*, 10, 1228. doi: 10.3389/fphys.2019.01228.
4. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (1986). Strasburg. Council of Europe. Retrieved from <https://rm.coe.int/168007a67b>.
5. Nakaz Ukrainy «Pro zatverdzhennya Poryadku provedennya naukovymy ustanovamy doslidiv, eksperymentiv na tvarynakh» [Order of Ukraine «On Approval of the Procedure for Conducting Experiments and Experiments on Animals by Scientific Institutions»]. *Ministerstvo osvity i nauky Ukrainy – Ministry of Education and Science of Ukraine. zakon.rada.gov.ua*. Retrieved from <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0416-12#Text> [in Ukrainian].
6. Levyc'kyj, A.P., Makarenko, O.A., Den'ga, O.V. & ta in. (2005). Eksperymental'ni metody doslidzhennja stymuljatoriv osteogenezu : Metodychni rekomendacii' [Experimental methods for studying osteogenesis stimulators : methodological recommendations]. Kyi'v : GFC. [in Ukrainian].
7. Rohach, I.M., Keretsman, A.O., & Sitkar, A.D. (2017). Pravylno vybranyy metod statystychnoho analizu – shlyakh do yakisnoyi interpretatsiyi danykh medychnykh doslidzhen [Correct choice of statistical analysis method is the key way to high-quality interpretation of data of medical research]. *Naukovyy visnyk Uzhhordskoho universytetu – Scientific Bulletin of Uzhgorod University*, 2(56), 124-28 [in Ukrainian].