

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

УДК [57.084.1+616-08-039.71]:612.11

DOI <https://doi.org/10.35220/2078-8916-2024-53-3.22>**С.В. Шпак**

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

О.В. Дєньга,

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

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

І.В. Шахновський,

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

А.В. Чердиченко,

асистент,
Одеський національний медичний університет,
Валіховський провулок, 2, м. Одеса, Україна,
індекс 65082

І.Г. Топов,

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

О.І. Демид,

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

**ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ОЦІНКА
ЛЕЙКОЦИТАРНОЇ ФОРМУЛИ
ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ЩУРІВ
НА ТЛІ МОДЕЛЮВАННЯ ХРОНІЧНОГО
СТРЕСУ ТА ЛІКУВАЛЬНО-
ПРОФІЛАКТИЧНИХ ЗАХОДІВ**

Хронічний стрес є суттєвим фактором, що негативно впливає на імунну систему, сприяючи розвитку запальних процесів та імносупресії, які можуть погіршувати стан тканин порожнини рота та загальне стоматологічне здоров'я. Це підкреслює необхідність розробки ефективних лікувально-профілактичних заходів для корекції порушень, викликаних стресом.

Метою дослідження було оцінити вплив лікувального комплексу препаратів на лейкоцитарну формулу периферичної крові щурів в умовах моделювання хронічного стресу.

Матеріали та методи. У дослідженні взяли участь 34 самці щурів лінії Wistar віком 2 місяці. Тварин розподілили на три групи: інтактна (контрольна) група, група з моделлю хронічного звукового стресу та група з моделлю хронічного звукового стресу, де застосовували лікувальний комплекс. Хронічний стрес моделювали за допомогою ультразвукового відлякувача, що генерував звуки різної частоти в ультразвуковому та чутному діапазонах. Лікувальний комплекс вводили перорально протягом експерименту. Після завершення дослідження здійснювали відбір периферичної крові для аналізу гематологічних показників та лейкоцитарної формули за стандартними методиками.

Результати дослідження. У щурів, підданих хронічному звуковому стресу, виявлено значні зміни в лейкоцитарній формулі периферичної крові: зниження загальної кількості лейкоцитів, підвищення вмісту нейтрофілів та зниження відсотка лімфоцитів і еозинофілів. Це свідчить про розвиток запальних реакцій та стрес-індукованої імносупресії. Застосування лікувального комплексу призвело до нормалізації цих показників, відновивши кількість та співвідношення лейкоцитів до рівня інтактної групи, що вказує на відновлення функціонування імунної системи.

Висновки. Лікувально-профілактичний комплекс препаратів ефективно знижує негативний вплив хронічного стресу на імунну систему, нормалізуючи лейкоцитарну формулу периферичної крові. Це підтверджує доцільність використання даного комплексу для корекції імунних порушень, викликаних стресовими факторами, особливо в стоматологічній практиці, де підтримка імунної компетентності є важливою.

Ключові слова: стрес, кров, щури, експеримент, біохімічні маркери.

S.V. Shpak,

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

O.V. Dienha,

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

S.A. Shnaider,

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

I.V. Shakhnovskiy,

Candidate of Medical Sciences,
Odesa National Medical University,
2 Valikhovsky lane, Odesa, Ukraine, postal code 65082

A.V. Cherednychenko,

assistant, Odesa National Medical University,
2 Valikhovsky lane, Odesa, Ukraine, postal code 65082

I.H. Topov,

Candidate of Medical Sciences,
Odesa National Medical University,
2 Valikhovsky lane, Odesa, Ukraine, postal code 65082

O.I. Demyd,

Candidate of Medical Sciences,
Odesa National Medical University,
2 Valikhovsky lane, Odesa, Ukraine, postal code 65082

EXPERIMENTAL EVALUATION OF PERIPHERAL BLOOD LEUKOCYTE DIFFERENTIAL IN RATS UNDER CHRONIC STRESS MODELING AND THERAPEUTIC AND PREVENTIVE MEASURES

Chronic stress is a significant factor that negatively affects the immune system, contributing to the development of inflammatory processes and immunosuppression, which can worsen the condition of oral tissues and overall dental health. This emphasizes the need to develop effective therapeutic and preventive measures to correct stress-related disorders.

The purpose of the study was to evaluate the effect of a therapeutic complex of drugs on the leukocyte formula of peripheral blood of rats under conditions of chronic stress modeling.

Materials and methods. The study involved 34 male Wistar rats aged 2 months. The animals were divided into three groups: an intact (control) group, a group with a

model of chronic sound stress, and a group with a model of chronic sound stress where the treatment complex was applied. Chronic stress was modeled using an ultrasonic repeller that generated sounds of different frequencies in the ultrasonic and audible ranges. The treatment complex was administered orally during the experiment. At the end of the study, peripheral blood was collected for the analysis of hematological parameters and leukocyte formula according to standard methods.

Research results. In rats exposed to chronic sound stress, significant changes in the leukocyte formula of peripheral blood were found: a decrease in the total number of leukocytes, an increase in the content of neutrophils, and a decrease in the percentage of lymphocytes and eosinophils. This indicates the development of inflammatory reactions and stress-induced immunosuppression. The use of the treatment complex led to the normalization of these indicators, restoring the number and ratio of leukocytes to the level of the intact group, indicating the restoration of the immune system.

Conclusions. The therapeutic and prophylactic complex of drugs effectively reduces the negative impact of chronic stress on the immune system, normalizing the leukocyte formula of peripheral blood. This confirms the expediency of using this complex for the correction of immune disorders caused by stress factors, especially in dental practice, where maintaining immune competence is important.

Key words: stress, blood, rats, experiment, biochemical markers.

Хронічний стрес є одним із ключових факторів, що негативно впливають на здоров'я порожнини рота, сприяючи розвитку стоматологічних захворювань, зокрема запальних процесів у пародонті [1, 3]. Доведено, що тривала дія стресових факторів призводить до порушень в імунній системі, які проявляються змінами у лейкоцитарній формулі периферичної крові [3, 4]. Ці зміни можуть знижувати резистентність тканин порожнини рота до патогенних мікроорганізмів, сприяючи прогресуванню пародонтиту та інших стоматологічних патологій [2].

Зокрема, під впливом хронічного стресу спостерігається нейтрофільний лейкоцитоз, еозінопенія та лімфопенія, що свідчить про розвиток запальних реакцій та імуносупресії в тканинах пародонта [4]. Крім того, хронічний стрес асоціюється зі збільшенням оксидативного стресу, що призводить до пошкодження клітинних структур у ротовій порожнині [2]. Це може погіршувати регенеративні процеси та ускладнювати перебіг стоматологічних захворювань [3].

Важливість розробки ефективних лікувально-профілактичних заходів у стоматології для корекції цих змін є надзвичайно актуальною [2, 3]. Деякі дослідження вказують на перспективність використання антиоксидантів та імуномодулю-

ючих препаратів для покращення стану тканин порожнини рота в умовах хронічного стресу [4]. Проте механізми впливу різних лікувальних комплексів на лейкоцитарну формулу крові та стан ротової порожнини в умовах стресу залишаються недостатньо вивченими [1, 3].

Метою даного дослідження була оцінка впливу лікувального комплексу препаратів на маркери лейкоцитарної формули периферичної крові щурів на тлі моделювання хронічного стресу.

Матеріал та методи дослідження. Були проведені експериментальні дослідження, в процесі яких було використано 34 щурах-самцях лінії Wistar стадного розведення, 2-х місячного віку із середньою масою тіла 140 ± 8 г. 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 [5, 6].

Тварин розподілили на 3 групи наступним чином:

- 1 – інтактна (стандартний раціон віварію), $n=10$;
- 2 – модель хронічного звукового стресу, $n=12$;
- 3 – модель хронічного звукового стресу + комплекс препаратів, $n=12$.

Стрес моделювали за допомогою ультразвукового відлякувача шкідників LS-912 (виробник «Leaven Enterprise», Тайвань), що діє у чутному та ультразвуковому діапазонах та має частоту від 30 до 65 кГц. Звуковий тиск 130 дБ, потужність 1,5 Вт на площі до 232 м².

Моделювання звукового стресу ультразвуком у щурів 2 та 3 групи здійснювали протягом 5 діб, по 6 годин на день за наступною схемою: на протязі 2-х днів – застосовували ультразвук із частотою 30 кГц, наступні 2 дні – по 40 кГц, наступні 2 дні – по 50 кГц, наступні 2 дні – по 60 кГц. Далі схему повторювали за допомогою ультра звуку. До ультра звуку кожного дня додавали чутний звук по 1 годині за допомогою фіксації кнопки

контролю звуку на відлякувачі. На одному рівні з клітками тварин встановлювали відлякувач на відстані 3 м від них.

Тривалість експерименту склала 50 днів. По закінченню експерименту, перед евтаназією, проводили відбір крові для визначення гематологічних показників, які проводили зі стандартами операційних процедур лабораторії: зранку (між 9 та 10 годинами) натще із хвостової вени одноразовими капілярними забірниками крові. Периферична кров для визначення кількості лейкоцитів надходила вільним потоком одразу до забірника. У периферичній крові підраховували загальну кількість лейкоцитів під мікроскопом у камері із сіткою Горяєва. Для підготовки мазків крові на край скельця наносили 3 мкл крові який розводили на 1,5 см за допомогою іншого скельця, розміщеного під кутом 45°. Одержані мазки висушували при кімнатній температурі, фіксували у 75% розчині етанолу. Після цього мазки промивали дистильованою водою, фарбували за методом Романовського-Гімзи та сушили на повітрі. Підрахунок кількості клітин проводили під мікроскопом «Біолам Р-11» за схемою – 50 % клітин підраховували у верхній половині мазка, решту 50 % клітин у нижній частині мазка. Середній процентний уміст певних типів лейкоцитів в кожному мазку визначали після підрахунку 200 клітин [7, с. 50].

Дослідних тварин виводили із експерименту евтаназією під тіопенталовим наркозом (40 мг/кг) шляхом кровопускання з серця.

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 $p < 0,01$ [8, с. 124].

Результати та їх обговорення.

Основним критерієм оцінки формування стресорної реакції організму є зміна показників білої крові – лейкоцитів. Лейкоцити – є захисними клітинами нашого організму, які захищають нас від вірусів, бактерій та алергенів.

Тому нами було вивчено вплив лікувально-профілактичного комплексу (ЛПК) препаратів на особливості лейкоцитарної формули крові тварин в умовах моделювання хронічного стресу. Результати даного дослідження на тлі хронічного звукового стресу та застосування комплексу препаратів представлені у таблиці 1.

Таблиця 1

Підрахунок лейкоцитів та лейкоцитарної формули периферичної крові дослідних тварин за умов моделювання хронічного стресу та після його профілактики лікувально-профілактичним комплексом препаратів, $M \pm m$

	Інтактна група, n =10	Хронічний стрес, n =12	Хронічний стрес+ЛПК, n =12
Загальна кількість лейкоцитів, $10^9/л$	9,44±0,42	6,45±0,20 p<0,001	9,94±0,43 p>0,8 p ₁ <0,001
Паличко ядерні нейтрофіли, %	3,45±0,21	5,86±0,24 p<0,001	3,35±0,19 p>0,7 p ₁ <0,001
Сегментоядерні нейтрофіли, %	29,47±1,83	39,29±2,05 p<0,002	27,49±0,16 p>0,3 p ₁ <0,001
Моноцити, %	5,56±0,27	5,49±0,31 p>0,7	5,79±0,21 p>0,25 p ₁ >0,4
Лімфоцити, %	60,0±3,4	48,38±2,7 p<0,01	61,90±3,2 p>0,6 p ₁ <0,002
Еозинофіли, %	1,52±0,10	0,98±0,06 p<0,001	1,47±0,08 p>0,7 p ₁ <0,001

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

Із наведених даних таблиці свідчить, що на тлі хронічного стресу у периферичній крові тварин вірогідно знижується кількість лейкоцитів на 31,6 % (p<0,001). Водночас, під впливом звукового стресу в досліджуваних зразках спостерігалася зміна відсотку формених елементів крові. Так, відсоток паличкоядерних нейтрофілів збільшився на 69,8 % (p<0,001), сегментоядерних на 33,3 % (p<0,002), при цьому відсоток лімфоцитів знизився на 19,3 % (p<0,01) та еозинофілів на 35,52 % (p<0,001). Таким чином, тривалий вплив ультразвуку змінної частоти у комбінації із звуком чутного діапазону в периферичній крові щурів 2-ої групи призводить до нейтрофільного лейкоцитозу, еозинопенії та лімфопенії, ці зміни свідчать про розвиток запальних реакцій та стресової імуносупресії.

Лікувально-профілактичне введення композиції препаратів щурам 3-ої групи відновлювало функціонування імунної системи, що підтверджувалося збільшенням відсоткового складу лейкоцитів на 54,1 % (p₁<0,001), лімфоцитів на 27,9 % (p₁<0,002) та еозинофілів на 50,0 % (p₁<0,001). Водночас, рестрували вірогідне збільшення паличкоядерних нейтрофілів на 42,38 % (p₁<0,001) та сегментоядерних нейтрофілів на 30,03 % (p₁<0,001), відповідно до показників 2-ої групи стрес-контролю. Необхідно відмітити, що цифрові дані

периферичної крові щурів 3-ої групи нормалізувалась до рівня значень у інтактній групі.

Отримані результати свідчать про те, що тривале, щоденне пероральне введення ЛПК препаратів дослідним щурам 3-ої групи призводить до зменшення запальної реакції організму та нормалізації порушень в імунній системі тварин за умов тривалого звукового стресу.

Висновки:

1. У щурів, підданих моделюванню хронічного звукового стресу, відзначено суттєве зниження загальної кількості лейкоцитів та зміни в лейкоцитарній формулі периферичної крові, що свідчить про розвиток запальних реакцій та стрес-індукованої імуносупресії.

2. Застосування лікувально-профілактичного комплексу препаратів у щурів на фоні хронічного звукового стресу призвело до значного і стійкого відновлення показників лейкоцитарної формули, зокрема збільшення загальної кількості лейкоцитів та нормалізації відсоткового складу лейкоцитів до рівня інтактної групи.

3. Довготривале, щоденне пероральне введення лікувально-профілактичного комплексу забезпечило зменшення запальної реакції та нормалізацію порушень імунної системи, що вказує на ефективність комбінованого підходу в корекції негативних наслідків хронічного стресу.

Література:

1. Koplík E.V., Vlasova M.A., Moshkovsky S.A., Archakov A.I., Sudakov K.V. Mass spectrometric profile of the serum as a marker of experimental psychoemotional stress in rats. *Bull Exp Biol Med.* 2008 May;145(5):552-5. doi: 10.1007/s10517-008-0148-9.

2. Jamel M.J., Pereira L.de P., Mello N.B., Eleuthério E.C., Schanaider A. Blood carbonyl protein measurement as a specific oxidative stress biomarker after intestinal reperfusion in rats. *Acta Cir Bras.* 2010 Feb;25(1):59-62. doi: 10.1590/s0102-86502010000100014.

3. Gokul M., Arun Kumar N., Durgadas Kini R., Blossom V., Kodavanji B., Noojibail A., Murali N., Vishwanath Rai S.P. Evaluation of biomarkers of stress in chronic stress-exposed comorbid depression model Wistar rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 2019 Aug 30;30(5). doi: 10.1515/jbcpp-2018-0215.

4. Pal R., Gulati K., Banerjee B., Ray A. Pharmacological and biochemical studies on the role of free radicals during stress-induced immunomodulation in rats. *Int Immunopharmacol.* 2011 Nov;11(11):1680-4. doi: 10.1016/j.intimp.2011.05.026.

5. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. *Strasbourg, Council of Europe, 1986;123:51.*

6. Наказ України «Про затвердження Порядку проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах» / Міністерство освіти і науки України. 2012. № 249.

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

8. 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. Koplík, E. V., Vlasova, M. A., Moshkovsky, S. A., Archakov, A. I., & Sudakov, K. V. (2008). Mass spectrometric profile of the serum as a marker of experimental psychoemotional stress in rats. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 145(5), 552-555. <https://doi.org/10.1007/s10517-008-0148-9>

2. Jamel, M. J., Pereira, L. de P., Mello, N. B., Eleuthério, E. C., & Schanaider, A. (2010). Blood carbonyl protein measurement as a specific oxidative stress biomarker after intestinal reperfusion in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 25(1), 59-62. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502010000100014>

3. Gokul, M., Arun Kumar, N., Durgadas Kini, R., Blossom, V., Kodavanji, B., Noojibail, A., Murali, N., & Vishwanath Rai, S. P. (2019). Evaluation of biomarkers of stress in chronic stress-exposed comorbid depression model Wistar rats. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 30(5). <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2018-0215>

4. Pal, R., Gulati, K., Banerjee, B., & Ray, A. (2011). Pharmacological and biochemical studies on the role of free radicals during stress-induced immunomodulation in rats. *International Immunopharmacology*, 11(11), 1680-1684. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2011.05.026>

5. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (1986). *Strasbourg, Council of Europe.* Retrieved from <https://rm.coe.int/168007a67b>.

6. Nakaz Ukrainyiny «Pro zatverdzhennya Poryadku provedennya naukovy my 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].

7. Levyc'kyj, A.P., Makarenko, O.A., Den'ga, O.V. ta in. (2005). Eksperymental'ni metody doslidzhenja stymuljatoriv osteogenezu : Metodychni rekomendacii' [Experimental methods for studying osteogenesis stimulators : methodological recommendations]. Kyi'v : GFC.

8. Rohach, I.M., Keretsman, A.O., Sitkar, A.D. (2017). Pravylny 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 Uzhhorodskoho universytetu – Scientific Bulletin of Uzhgorod University*, 2(56), 124-28 [in Ukrainian].