

УДК: 612.419+612.83:611-08

© Шаймарданова Л.Р., Корольов В.О., 2011

ЦИТОМОРФОЛОГІЧНІ ТА ЦИТОХІМІЧНІ ЗМІНИ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ ЩУРІВ ПІД ВПЛИВОМ КСЕНОГЕННОЇ СПИННОМОЗКОВОЇ РІДИНИ

Шаймарданова Л.Р., Корольов В.О.

ДУ «Кримський державний медичний університет ім. С.І. Георгієвського»

Шаймарданова Л.Р., Корольов В.О. Цитоморфологічні та цитохімічні зміни клітин кісткового мозку щурів під впливом ксеногенної спинномозкової рідини // Український морфологічний альманах. – 2011. – Том 9, № 3 (додаток). – С. 91-93.

Ксеногенна спинномозкова рідина (КСМР) розглядається як можливий субстрат для виготовлення міцного біорегулюючого препарату. Важливе значення має дослідження змін кісткового мозку, як центрального органу гемопоєзу та імуногенезу. Морфологію та цитохімію клітин кісткового мозку вивчали після фарбування їх за Романовським-Гімза та реакціями ШИК та мієлопероксидази. Дослідження продемонструвало відсутність патологічних змін у клітинах та нормальний розвиток клітин-попередників. Виявлено достовірне збільшення кількості ШИК-позитивного матеріалу у експериментальних групах, що засвідчувало вплив КСМР на диференціювання клітин. За допомогою кортикотропного гормону могло відбуватися зниження пероксидазної активності, що було відмічено в усіх групах. Подальші дослідження будуть проводитись з вивченням кількісних та ультраструктурних змін клітин кісткового мозку.

Ключові слова: кістковий мозок, спинномозкова рідина, експериментальна анатомія.

Шаймарданова Л.Р., Корольов В.О. Цитоморфологические и цитохимические изменения клеток костного мозга крыс под действием ксеногенной спинномозговой жидкости // Український морфологічний альманах. – 2011. – Том 9, № 3 (додаток). – С. 91-93.

Ксеногенная спинномозговая жидкость (КСМР) рассматривается как возможный субстрат для производства мощного биорегулирующего препарата. Важное значение имеет исследование изменений костного мозга, как центрального органа гемопоэза и иммуногенеза. Морфологию и цитохимию клеток костного мозга изучали после окраски клеток по Романовскому-Гимза и с использованием ШИК и миелопероксидазной реакции. Исследование показало отсутствие патологических изменений в клетках и нормальное развитие клеток-предшественников. Обнаружено достоверное увеличение количества PAS-позитивного материала в опытных группах, что означало влияние КСМР на дифференцировку клеток. Посредством кортикотропного гормона могло осуществляться снижение пероксидазной активности, отмеченное во всех группах. Дальнейшие исследования будут проводиться с изучением количественных и ультраструктурных изменений клеток костного мозга.

Ключевые слова: костный мозг, спинномозговая жидкость, экспериментальная анатомия.

Shaymardanova L.R., Korol'ov V.A. Changes in cells morphology and biochemistry in bone marrow of rats exposed for xenogenous cerebrospinal fluid // Український морфологічний альманах. – 2011. – Том 9, № 3 (додаток). – С. 91-93.

Xenogenous cerebrospinal fluid is considered a possible base for the production of powerful medicine of biological origin. Of great importance is the investigation of bone marrow, as the central organ of haemopoiesis and immunogenesis. Morphologic and biochemical changes of bone marrow cells were studied after Romanowsky staining, PAS and peroxidase reactions. The study revealed the absence of pathological changes in cells and normal development of progenitor cells. The evident increase of PAS-positive substances was found out in experimental animals, which means the influence of xenogenous cerebrospinal fluid on differentiation process. The latter, by corticotropin, could also affect the diminishing of peroxidase activity which was found in all groups. Further investigations continue on the study of the quantitative and ultrastructural changes of bone marrow cells.

Key words: bone marrow, cerebrospinal liquid, experimental anatomy.

Багато сучасних світових дослідницьких лабораторій сконцентрували свої зусилля на пошуку нових біопептидних регуляторів полі функціональної дії. У якості одного з субстратів таких регуляторів розглядається спинномозкова рідина (СМР), яка є цінним біологічним середовищем нервової системи та має унікальні імунобіологічні властивості [1]. Першочергово вивчались склад та біологічні властивості аlogenної СМР, інфузії якої доводили її високу ефективність при корекції різноманітних патологічних станів; у подальшому, почали застосовувати також і ксеногенну СМР (КСМР) [2]. Експерименти доводили відсутність тератогенних, ембріотоксичних властивостей КСМР, а також імунопато-

логічних реакцій після введення [3,4,5]. Доклінічні дослідження з вивчення властивостей ксеногенної спинномозкової рідини (КСМР), яка розглядається як перспективна сировина для виготовлення нового імунобіологічного препарату, проводяться *in vivo* у ДУ «Кримський державний медичний університет імені С.І. Георгієвського на базі кафедри нормальної анатомії людини [6]. Одним з показових досліджень було вивчення морфологічних змін кісткового мозку (КМ), як центрального органу гемопоєзу та імуногенезу, під впливом КСМР.

Матеріал та методи. КСМР отримували за методом [7], проводили крізь бактеріальні фільтри «Міліпор» та запаювали у ампули. Для ек-

перименту обрали білих щурів лінії Вістар обох статей 4 вікових категорій: новонароджені, інфантильні, молодого репродуктивного віку та передстаречого віку, означень римськими цифрами I, II, III, IV відповідно. КСМР вводили одноразово, трьохразово та десятиразово з інтервалом у два дні. Матеріал для дослідження – кістковий мозок отримували на сьому та тридцять добу. Зміни показників експериментальних тварин порівнювали з показниками контрольних тварин тих самих статі, віку та маси. Зміни клітин кісткового мозку відмічали по відбитках та мазках кісткового мозку стегнових кісток щурів. Для вивчення морфології клітин проводили фарбування за Романовським-Гімза, для цитохімічного дослідження – реакції ШИК за McManus та Hotchkiss, та МПО (реакція на мієлопероксидазу) за Loele. Результати відображали у вигляді середнього цитохімічного коефіцієнту, використовуючи найвільніший метод за Astaldi, Verga.

Результати. У експерименті у наслідок дії КСМР у тварин I групи як на 7, так і на 30 добу у малюнку мазку кісткового мозку (КМ) не було відмічено патологічних проявів – зміни форми клітин та їхніх ядер, незвичайних включень у цитоплазмі. КМ включав у себе представників усіх клітинних ліній різних класів диференціювання, які розподілені за ступенем зрілості. При застосуванні ШИК-реакції відмічали дифузне забарвлення цитоплазми мієлобластів та промієлоцитів. Нейтрофільні мієлоцити та метамієлоцити мали помірну кількість полісахаридів, але менш ніж поліморфноядерні клітини. У еозинофільних метамієлоцитах та мієлоцитах ШИК-позитивний матеріал цілком заповнював цитоплазму, залишаючи незабарвленими великі специфічні еозинофільні гранули. Те саме спостерігали у зрілих еозинофілах. Поліморфноядерні нейтрофільні лейкоцити мали дуже багато ШИК-позитивного матеріалу у вигляді доволі дрібних гранул, густо заповнюючих цитоплазму. Гранули розташовувалися також над поверхнею ядра. Специфічні гранули базофілів виявлялися ШИК-негативними, однак у частини базофілів реакція була слабкопозитивною. У цитоплазмі лімфоцитів часто знаходилися ШИК-позитивні гранули, розборсані по всій клітині. Частина лімфоцитів мала ШИК-позитивний матеріал у вигляді вінця з гранул навколо ядра, в інших лімфоцитах він знаходився у вигляді великих блоків. Моноцити мали невелику кількість дрібних розсіяних гранул полісахаридів. У цитоплазмі мегакаріоцитів на дифузно забарвленому розрізніли інтенсивно позитивні гранули. Периферія цитоплазми частіше була незабарвленою, мала кайму з гранул у місцях відшнуровки ШИК-позитивних тромбоцитів. У I групі тварин на 7 добу середній цитохімічний коефіцієнт (СЦК) ШИК-реакції клітин КМ складав $1,3 \pm 0,01$ у контрольній серії та $1,38 \pm 0,03^*$ у експериментальній (* - тут і далі, $*P < 0,05$). Подібне збільшення СЦК відмічено також на 30 добу у тій самій групі – з $1,27 \pm 0,01$ у контрольній групі до

$1,61 \pm 0,03^*$ у експериментальній групі. У даній групі тварин активність мієлопероксидази виявлялася у клітинах гранулоцитарного ряду, нейтрофілах та еозинофілах, починаючи з мієлобластів до сегментоядерних клітин, у вигляді розсіяних у цитоплазмі гранул. У базофільних промієлоцитах та мієлоцитах виявлялася висока активність мієлопероксидази, проте у зрілих базофілах реакція була негативною. У моноцитах виявлялися розсіяні слабкопозитивні гранули. Реакція МПО була абсолютно негативною у еритроїдних клітинах, мегакаріоцитах та лімфоцитах. СЦК реакції МПО у I групі експериментальних тварин на 7 добу складав $1,43 \pm 0,03^*$, що відставало від відповідного значення у контрольній серії ($1,58 \pm 0,01$). На 30 добу СЦК МПО у даній групі склав $1,41 \pm 0,06^*$, що відображало зниження активності МПО у порівнянні з контрольною серією, де СЦК дорівнював $1,73 \pm 0,08$.

У тварин II групи після трьох- та десятиразового введення КСМР на 7 та 30 добу спостереження морфологія клітин не відрізнялася від контрольних тварин. КМ експериментальних тварин включав клітини всіх гемопоетичних ліній без ознак атипізму. При використанні ШИК-реакції, полісахариди виявлялися в усіх морфологічно ідентифікованих клітинах гранулоцитарного ряду. Концентрація ШИК-позитивного матеріалу у клітинах гранулоцитопоезу зростала по мірі дозрівання клітин. Дифузне забарвлення цитоплазми зустрічалось у найбільш молодих клітинах гранулоцитарного ряду (мієлобласти, промієлоцити, мієлоцити). Зрілі нейтрофіли містили багато ШИК-позитивної речовини у вигляді дрібних щільно впакованих гранул, за якими важко розрізняється цитоплазматичний фон. У зрілих еозинофілах та базофілах специфічні гранули лишалися незабарвленими та різко виділялися на тлі дифузного забарвлення цитоплазми. У моноцитах ШИК-позитивний матеріал частіше виявлявся у вигляді дрібної пілоподібної зернистості. У лімфоцитах відмічали меншу концентрацію полісахаридів, ніж у гранулоцитах. У тварин II групи трьохразове введення КСМР викликало достовірне збільшення СЦК у ШИК-реакції з $1,26 \pm 0,01$ у контрольній серії до $1,49 \pm 0,02^*$ у експериментальній. Також достовірно збільшилося накопичування полісахаридів після десятиразового введення КСМР тваринам тієї самої групи, де СЦК зріс з $1,22 \pm 0,02$ до $1,5 \pm 0,03^*$, у контрольній та експериментальній серіях, відповідно. МПО виявляли у специфічних азурофільних гранулах у цитоплазмі гранулоцитів, починаючи з мієлобласта. У сегментоядерних нейтрофілах відмічали високу активність МПО у вигляді гранул, що заповнюють цитоплазму. Висока активність ферменту проявлялася у зрілих еозинофілах. У базофільних промієлоцитах та мієлоцитах активність МПО була порівняно високою. У зрілих базофілах МПО-матеріал не зустрічався. Слабкопозитивну реакцію МПО спостерігали у деяких моноцитах у вигляді небагатьох розсіяних

гранул. У еритрокаріоцитах, лімфоцитах та мегакаріоцитах МПО не виявлялася. Реакція МПО у II експериментальній групі показала зростання активності ферменту по мірі дозрівання клітин. Кількість МПО-позитивного матеріалу та інтенсивність забарвлення значно збільшилась у дозріваючих клітинах нейтрофільних гранулоцитів, порівняно з бластними. СЦК реакції МПО у 2 групі тварин на 7 добу складав $1,63 \pm 0,08$, що відставало від відповідного значення у контрольній серії ($1,68 \pm 0,08$). На 30 добу СЦК МПО у даній групі склав $1,67 \pm 0,04^*$, що відображало зниження активності МПО порівняно з контрольною серією, де СЦК = $1,68 \pm 0,01$.

КМ тварин III групи у наслідок трьохразового введення КСМР, показав велику кількість мегакаріоцитів, які розрізнялися навіть при невеликому збільшенні. Десятиразове введення КСМР показало збільшення кількості клітин різних популяцій без зміни їхньої морфології. Так само, як і в інших групах не було виявлено патологічних відхилень у клітинній морфології. Клітини без ознак атипізму, токсигенна зернистість нейтрофілів була відсутня. У тварин III групи у наслідок трьохразового введення КСМР відмічали збільшення кількості полісахаридів у клітинах КМ. СЦК ШИК-реакції збільшився більш істотно, ніж у попередніх вікових групах – з $1,36 \pm 0,04$ у контрольній серії до $1,56 \pm 0,05^*$ у експериментальній. Після десятиразового введення КСМР на 30 добу СЦК зріс з $1,37 \pm 0,05$ у контрольній серії до $1,41 \pm 0,05^*$ у експериментальній. Реакція МПО довела, що у III групі тварин у наслідок КСМР відмічалось зменшення кількості пероксидази у нейтрофільних гранулоцитах. СЦК реакції МПО 3 групі тварин на 7 добу склав $1,81 \pm 0,02^*$, що відставало від відповідного показника у контрольній серії ($1,84 \pm 0,01$). На 30 добу СЦК МПО у даній групі склав $1,37 \pm 0,02^*$, що відображало зниження активності МПО у порівнянні з контрольною серією, де СЦК складав $1,84 \pm 0,01$.

Морфологія клітин КМ експериментальних тварин IV вікової групи не відрізнялася від аналогічної контрольної групи. Також не виявляли ознак атипізму клітин, незвичайних включень у цитоплазмі та переконливих змін клітинного складу у бік домінування одного з диферонів. Після трьохразового введення КСМР у IV групі тварин СЦК ШИК-реакції дещо зростав – з $1,39 \pm 0,02$ у контрольній серії до $1,49 \pm 0,01^*$ у експериментальній. Як наслідок десятиразового введення у тій самій групі відмічали підйом значення СЦК з $1,39 \pm 0,02$ до $1,50 \pm 0,01^*$ у контрольній та експериментальній серіях, відповідно. СЦК реакції МПО у IV групі тварин на 7 добу склав $1,76 \pm 0,08^*$, що відставало від відповідного значення у контрольній серії ($1,78 \pm 0,02$). На 30 добу СЦК МПО у даній групі склав $1,64 \pm 0,02^*$, що відображало зниження активності МПО порівняно з контрольною серією, де СЦК складав $1,78 \pm 0,01$.

Висновки: Переконливих відмінностей у

морфології клітин контрольної та експериментальної групи не спостерігали у жодній серії експерименту. Фарбування за Романовським-Гімза продемонструвала відсутність візуальних патологічних змін у клітинах IV-VII класів усіх диферонів. Цитохімічні реакції ШИК та МПО виявили нормальний розвиток клітин-попередників. У результаті ШИК-реакції спостерігали достовірне збільшення кількості ШИК-позитивного матеріалу у експериментальних групах порівняно з контрольними, що свідчить про вплив КСМР на глікогенакумулюючу функцію клітин, котра звичайно супроводжує процес повноцінного дозрівання клітин у КМ. Одночасно з цим відмічали достовірне зменшення кількості продуктів пероксидазного окислювання (МПО-реакція) в усіх вікових групах, що безпосередньо зв'язано з дією кортикостероїдного гормону у складі КСМР. Подальші дослідження будуть спрямовані на аналіз кількісних змін гемопоетичних клітин усіх диферонів за результатами мієлограми.

ЛІТЕРАТУРА:

1. Макаров А.Ю. Роль ликвора в нейрогуморальної регуляції фізіологічних функцій. // Успехи фізіологічних наук.-1978.- Т. 9, № 4.- С.82-96.
2. Фридман А.П. Основы ликворологии // Изд. «Медицина», Л.; 1971.- 647 с.
3. Ткач В.В. Определение тератогенных и эмбриотоксических свойств биопрепарата «Ликворин» / В.В. Ткач, А.В. Кубышкин, В.В. Ткач (мл.) // Проблемы, достижения и перспективы развития медико-биологических наук и практического здравоохранения: сб. тр. Крым. мед. ун-та. — Симферополь, 1998. — Т. 134. — С. 89–95.
4. Ткач В.В.(мл.). Влияние ксеногенной спинномозговой жидкости на клеточный иммунитет в эксперименте/ В.В.(Ткач мл.), В.В. Ткач, М.А. Кривенцов // Клінічна анатомія та оперативна хірургія.- 2006.- Т. 5, №2.- С.61-62
5. Ткач В.В.(мл.). Влияние ксеногенной спинномозговой жидкости на реакции гуморального иммунитета/ В.В. Ткач(мл.), В.В. Ткач, М.А. Кривенцов //Клінічна анатомія та оперативна хірургія.- 2006.-Т. 5, №2.- С.62.
6. Ликвор как гуморальная среда организма./ В.С. Пикалюк, Е.Ю. Бессалова, В.В. Ткач, и др. // ИТ «Ариал».- Симферополь, 2010.- 192 с.
7. Патент 62850А, Україна. Спосіб одержання цільного лікворного препарату: Патент 62850А, Україна, 7А61К35/24, А61К35/12. В.В. Ткач, Ф.В. Адамень, В.В.Лисенко и др. Опубл. 15.12.2003, Бюл.№12.- 3 с.

Надійшла 11.09.2011 р.

Рецензент: доц. А.І.Чистолінова